

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**TEMOZOLOMİD (TMZ) DUYARLI U87MG
GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTINDA,
TMZ-RADYOTERAPİ KOMBİNE TEDAVİSİNE EK
RİBOSİKLİB İLAÇ UYGULAMASININ
HÜCRE SİKLUSU AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Merzuka KALAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**TEMOZOLOMİD (TMZ) DUYARLI U87MG
GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTINDA,
TMZ-RADYOTERAPİ KOMBİNE TEDAVİSİNE EK
RİBOSİKLİB İLAÇ UYGULAMASININ
HÜCRE SİKLUSU AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Merzuka KALAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
1002 Hızlı Destek Modülü kapsamında 223Z067 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında, Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Saffet ÖZTÜRK
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS
Gazi 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.

Merzuka KALAY

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik anlamda beni hep bir adım öne taşımaya yönelik donanımlı yetiştiren ve tez çalışmam sürecinde desteğini, bilgisini ve sevgisini hep hissettiren, yoluma ışıklar tutan, dokunduğu her şeyi ve her yeri güzelleştiren çok sevgili danışman hocam Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER'e,

Antalya'daki en büyük destekçilerim, ekip olmayı beraber öğrendiğimiz ve birbirimize öğrettiğimiz, destekleriyle her zaman yanımda olan çok değerli ekip arkadaşlarım Aleyna ŞİŞANECİ, Emine YAZICI, Ece OYLUMLU ve Sendegül YILDIRIM İLDEM'e,

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren üzerimde büyük emekleri olan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki sayın hocalarıma ve sevgili asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmam boyunca bilgilerini esirgemeyen, her zaman desteklerini sunan değerli hocam Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e ve AKVUAM ekibine,

Tezimin radyoterapi içeren deney aşamalarında bilgileri ve desteğiyle yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Aylin F. KORCUM ŞAHİN ve sevgili asistanlarına,

Tez savunma sınavımda görüşleriyle ve sorularıyla çalışmamızı zenginleştiren, ileriye taşıyacak katkılarda bulunan değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Saffet ÖZTÜRK ve Prof. Dr. Çiğdem ELMAS hocalarıma,

Tezimin gerçekleşebilmesi için sağladığı maddi destekten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Hayattaki en büyük şansım olan, arkama dönüp baktığımda bana her zaman en önden sevgiyle ve gururla bakan, aldığım tüm kararlarda beni her zaman maddi ve manevi destekleyen canım annem Sevim KALAY, kıymetli babam Hayreddin KALAY ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Glioblastoma Multiform (GBM), gliomaların %54'ünü ve tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %16'sını oluşturan, en yaygın malign beyin tümörü olarak bilinmektedir. CDK 4/6 inhibitörlerinden biri olan Ribosiklib'in; hücre siklusunda G1'den S fazına geçişi engellemektedir. Çalışmamızda U87MG hücre hattı kullanılarak, TMZ ve radyoterapi tedavisine ek Ribosiklib uygulamasının hücre sağkalımı ve hücre siklusu açısından değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: TMZ'ye duyarlı U87MG GBM hücre hattı kullanıldı. Deney planı, kontrol, TMZ, Ribosiklib, çözücü ve TMZ+Ribosiklib'in birlikte uygulandığı gruplar şeklinde kurgulandı. Gruplara, radyoterapi uygulamasının yapıldığı deney grupları da dahil edildi. TMZ ve Ribosiklib'in, U87MG hücrelerinin canlılığına etkisi MTT testi değerlendirildi ve IC₅₀ (yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu) değerleri bulundu. Hücrelere günde 2 Gray (Gy) olmak üzere ardışık 5 gün toplamda 10Gy ışıma yapıldı. Belirlenen etkin dozların, hücre siklusu ve apoptoza etkisi siklin D, p53, p21, Tap73, pRB ve aktif kaspaz-3 protein düzeyleri western blot ile analiz edilerek değerlendirildi.

Bulgular: U87MG hücrelerinde Ribosiklib ve TMZ'nin IC₅₀ değeri sırasıyla; 10 ve 120 µM olarak belirlendi. Ribosiklib ve TMZ'nin tek başına ve birlikte uygulamalarından 1 saat sonra radyoterapinin eklenmesiyle hücre canlılığında azalma görüldü ($p<0.001$). Ayrıca, koloni oluşturma potansiyellerinin sınırlandığı ilk kez çalışmamız ile ortaya konuldu. Ribosiklib ve TMZ'nin hücre siklusuna etkisi belirlenen proteinler ile yorumlandı ve ek olarak apoptotik mekanizmanın TAp73 aracılı olup olmadığı ilk kez değerlendirildi.

Sonuç: Ribosiklib'in TMZ ile birlikte uygulanmasıyla agresif karakterli GBM hücrelerinin canlılığının azaltılabildiği belirlendi. Ayrıca, çalışmamız ile Ribosiklib'in, TMZ'ye ek uygulanması sonucu GBM tedavisine yeni bir terapötik olma potansiyeli taşıdığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multiform (GBM), U87MG, Temozolomid, Ribosiklib

ABSTRACT

Objective: Glioblastoma Multiform (GBM) is known as the most common malignant brain tumor, accounting for 54% of gliomas and approximately 16% of all brain tumors. Ribociclib, one of the CDK4/6 inhibitors; It prevents the transition from G1 to S phase in the cell cycle. Our study aims to evaluate Ribociclib application in addition to TMZ and radiotherapy treatment in terms of cell survival and cell cycle, using the U87MG cell line.

Method: TMZ-sensitive U87MG GBM cell line was used. The experimental plan was designed as control, TMZ, Ribociclib, vehicle and TMZ+Ribociclib groups. The experimental groups in which radiotherapy was applied were also included in the groups. The effect of TMZ and Ribociclib on the viability of U87MG cells was evaluated by MTT assay and IC₅₀ (half maximum inhibitory concentration) values were found. Cells were irradiated at 2 Gray (Gy) per day for 5 consecutive days for a total of 10Gy. The effect of the determined effective doses on cell cycle and apoptosis was evaluated by analyzing cyclin D, p53, p21, Tap73, pRB and active caspase-3 protein levels by western blot.

Results: IC₅₀ values of Ribociclib and TMZ in U87MG cells, respectively; It was determined as 10 and 120μM. A decrease in cell viability was observed with the addition of radiotherapy 1 hour after the application of Ribociclib and TMZ alone and together ($p<0.001$). Additionally, our study revealed for the first time that their colony-forming potential is limited. The effects of ribociclib and TMZ on the cell cycle were interpreted with the determined proteins, and in addition, whether the apoptotic mechanism was mediated by TAp73 was evaluated for the first time.

Conclusion: It has been demonstrated that Ribociclib in combination with TMZ can reduce the viability of aggressive GBM cells. In addition, our study shows that Ribociclib has the potential to be a new therapeutic for the treatment of GBM as an adjunct to TMZ.

Key words: Glioblastoma Multiforme (GBM), U87MG, Temozolomide, Ribociclib

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Temeli ve Hipotezin Amacı	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser Tanımı ve Özellikleri	4
2.1.1. Kanser Tedavisi	5
2.2. Beyin Tümörleri	11
2.2.1. Gliomalar	14
2.3. Glioblastoma Multiform (GBM)	16
2.4. GBM Tedavisi	19
2.4.1. Cerrahi Rezeksiyon	22
2.4.2. Kemoradyasyon Tedavisi	22
2.5. Temozolomid (TMZ)	24
2.5.1. TMZ Etki Mekanizması	25
2.6. Hücre Siklusu	27
2.6.1. Siklin ve Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)	28
2.7. CDK4/6 İnhibitörleri	31
2.7.1. Ribosiklib	33
2.8. Kanser Onkogenleri ve Tümör Baskılayıcılar	33

3. GEREÇ ve YÖNTEM	36
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	36
3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	37
3.2.1. U87MG Hücrelerinin Deneye Hazırlanması	37
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	38
3.2.3. Hücrelerin Dondurulması	38
3.3. U87MG Hücrelerinin Canlılık Analizi İçin Bölünmesi	39
3.4. Temozolomid (TMZ) ve Ribosiklib'in Etkin Dozlarının Belirlenmesi	39
3.4.1. TMZ'nin Etkin Dozunun Belirlenmesi	39
3.4.2. Ribosiklib'in Etkin Dozunun Belirlenmesi	41
3.5. U87MG Hücrelerine Kemoterapi ve Radyoterapi Uygulanması	42
3.6. U87MG Hücrelerinde Koloni Oluşturma Potansiyelinin Değerlendirilmesi	45
3.7. Western Blot Yöntemi	46
3.7.1. U87MG Hücrelerinden Lizat Eldesi ve Protein Miktarının Tayini	46
3.7.2. Western Blot Yöntemi ile Protein Düzeyinin Belirlenmesi	48
3.8. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1. U87MG Hücrelerinde Temozolomid (TMZ) ve Ribosiklib'in Etkin Dozlarının Değerlendirilmesi	52
4.1.1. TMZ'nin Etkin Dozunun Belirlenmesi	52
4.1.2. Ribosiklib'in Etkin Dozunun Belirlenmesi	53
4.2. U87MG Hücrelerinde TMZ ve Ribosiklib'in IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	54
4.2.1. TMZ'nin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	54
4.2.2. Ribosiklib'in IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	55
4.3. Kemoterapi ve Radyoterapi Uygulamasının Değerlendirilmesi	56
4.3.1. U87MG Hücrelerinde Kemoterapi Etkisinin Değerlendirilmesi	56
4.3.2. U87MG Hücrelerinde Radyoterapi Etkisinin Değerlendirilmesi	58
4.4. U87MG Hücrelerinde Koloni Oluşturma Potansiyelinin Gösterilmesi	60
4.5. U87MG Hücrelerinde Ribosiklib ve TMZ Uygulanması Sonrası Protein Seviye Değişiminin Gösterilmesi	61

5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	96



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Kemoterapi uygulanacak deney grupları.	42
Tablo 3.2.	Kemoterapi ve radyoterapi aşamasında TMZ ile Ribosiklib için belirlenen ilaç dozları.	43
Tablo 3.3.	Radyoterapi uygulanacak deney grupları.	44
Tablo 3.4.	Western blot yöntemi için kullanılan solüsyonlar.	48
Tablo 3.5.	%10'luk poliakrilamid jelde kullanılan ayırıcı ve toplayıcı jellerin solüsyonları.	49
Tablo 3.6.	Western blot yönteminde kullanılan primer/sekonder antikor bilgisi ve dilüsyon oranları.	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kanserin ayırt edici özellikleri.	4
Şekil 2.2.	Radyasyonun direkt ve dolaylı olarak etki ettiği mekanizma.	8
Şekil 2.3.	Kişiselleştirilmiş tedaviyi elde etmek amacıyla farklı disiplinleri birleştiren, yenilikçi stratejiler.	10
Şekil 2.4.	www.clinicaltrials.gov adresinde kayıtlı olan klinik araştırmalar ve araştırmaların toplam sayıları.	10
Şekil 2.5.	Beyin tümörlerinin birincil (primer) ve ikincil (metastatik) olarak sınıflandırılması.	12
Şekil 2.6.	İyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörlerin karakteristik özellikleri.	12
Şekil 2.7.	Gliomaların, Dünya Sağlık Örgütü (I–IV) derecelerine göre histolojik olarak sınıflandırması.	15
Şekil 2.8.	IDH enzimlerinin hücre içi konumları, kofaktörleri ve IDH1, IDH2 ve IDH3 tarafından katalize edilen reaksiyonlar.	17
Şekil 2.9.	GBM özellikleri ve terapötik zorlukları.	18
Şekil 2.10.	Gıda ve İlaç İdaresi (Gİİ) tarafından onaylı protein ailelerini hedefleyen küçük molekülü ilaçların yüzdeleri.	20
Şekil 2.11.	GBM için uygulanan standart tedavi gösterilmektedir.	21
Şekil 2.12.	Temozolomid'in aktif metaboliti olan MTIC'in hücre içerisine girişi ve etki mekanizması sonucu tümör hücrelerin apoptoza yönlendirilmesi.	26

Şekil 2.13.	Hücre siklus fazları ve kontrol noktaları.	27
Şekil 2.14.	Hücre siklusunda yer alan siklinler ve siklus aşamaları sırasındaki seviye değişimleri.	29
Şekil 2.15.	Hücre siklusu ve E2F'nin aktivasyonu.	30
Şekil 2.16.	Palbosiklib, Abemasiklib ve Ribosiklib'in, RB'nin fosforilasyonundan ve inhibisyonundan sorumlu olan CDK4/6 + siklin D1 kompleksini inhibe etmesi.	32
Şekil 2.17.	TAp73'ün E2F aracılı, p53'ten bağımsız apoptoz yolağı.	34
Şekil 3.1.	Çalışma deney grupları.	37
Şekil 3.2.	U87MG hücrelerinde yapılan doz taraması için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TMZ dozlarının uygulanması.	40
Şekil 3.3.	U87MG hücrelerinde yapılan doz taraması için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Ribosiklib dozlarının uygulanması.	41
Şekil 3.4.	U87MG hücrelerinin olduğu steril kültür tabaklarının "pleksiglass" içerisinde radyoterapi uygulanması.	44
Şekil 4.1.	Etkin dozun belirlenmesi için yapılan doz taramasında, U87MG hücrelerine farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulamaları.	53
Şekil 4.2.	Etkin dozun belirlenmesi için yapılan doz taramasında, U87MG hücrelerine farklı konsantrasyonlarda Ribosiklib uygulamaları.	54
Şekil 4.3.	U87MG hücrelerinde yapılan doz taraması sonucunda, TMZ'nin hücreler üzerinde etkin olduğu saat ve buna bağlı olarak hesaplanan IC ₅₀ değeri.	55

- Şekil 4.4.** U87MG hücrelerinde yapılan doz taraması sonucunda, Ribosiklib'in hücreler üzerinde etkin olduğu saat ve buna bağlı olarak hesaplanan IC_{50} değeri. 55
- Şekil 4.5.** U87MG hücrelerine Ribosiklib'in bireysel ve TMZ ile kombine uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. 58
- Şekil 4.6.** U87MG hücrelerine Ribosiklib'in bireysel ve TMZ ile kombine uygulanmasını takiben 1 saat sonra günde 2 Gy ardışık beş gün boyunca (toplam 10 Gy) ışınlamaların hücre canlılığına etkisi. 60
- Şekil 4.7.** Ribosiklib ile TMZ'nin bireysel ve kombine uygulamasından sonra, U87MG hücrelerinde hareket potansiyellerinin değerlendirilmesi. 61
- Şekil 4.8.** U87MG hücrelerine Ribosiklib ve TMZ'nin bireysel ve kombine olarak uygulanması sonrası elde edilen western blot sonuçları. 62

SİMGELER ve KISALTMALAR

BCA	: Bikinkoninik Asit
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
dH₂O	: Distile Su
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
FBS	: Fetal Sığır Serumı
GBM	: Glioblastoma Multiform
Gİİ	: Gıda ve İlaç İdaresi
IDH	: İzositrat Dehidrojenaz
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
KTb	: Kan Tümör Bariyeri
MGMT	: O6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MTIC	: [5-(3-dimetil-1-triazenil) imidazol-4-karboksamid]
NAD⁺	: Adenin Dinükleotit
NADP⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
RB	: Retinoblastoma
RT	: Radyasyon Tedavisi
T0	: Başlangıç Zamanı

TMÇ : T m r Mikro evresi

TMZ : Temozolomid

α -KG : α -ketoglutarat



1. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Temeli ve Hipotezin Amacı

Glioblastoma Multiform (GBM), santral sinir sisteminin en sık görülen ve tedavisi her yönü ile oldukça zor olan, heterojen karakterdeki malign tümördür (Ostrom, Gittleman, Truitt, vd., 2018a). Glial hücreler tarafından oluşan GBM, klasik histopatolojik bilgiler doğrultusunda, evre IV infiltratif glial tümör olarak tanımlanmaktadır. GBM'ler üzerinde son yıllarda artan moleküler çalışmalar Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) evre IV tümörlerin heterojen bir grup olduğunu göstermiştir. Ayrıca, GBM'ler genetik geçişli oldukları kadar, fenotipik olarak da heterojendirler (Chhabda vd., 2016). En yaygın primer malign beyin tümörü olarak kabul edilen evre IV GBM, genel olarak hızlı büyüyen bir tür olup; 3-6 ay içerisinde bulgu vermektedir. Tanıdan sonra hastalarda ortalama sağkalım 12-15 ay ile sınırlı kalmaktadır (Ostrom, Gittleman, Truitt, vd., 2018b). Klinikte GBM tedavisinde, cerrahi rezeksiyonu takiben Temozolomid (TMZ) ve radyoterapi başlanması ilk adımdır.

TMZ, normal koşullarda kan beyin bariyerini (KBB) geçemeyen ancak bazik pH koşullarında heterosiklik halkanın açılmasıyla bariyeri aşabilen bir kemoterapötiktir (Ramalho vd., 2019). Ayrıca DNA hasarını tetikleyerek hücre döngüsünün G2/M fazında kalmasına ve hücrenin ölüm yolağına girmesine neden olmaktadır (Mhaidat vd., 2007). Bu haliyle klinikte tek tedavi seçeneği olarak görülen TMZ'nin düzenli ve uzun süreli kullanımında da hastalarda direnç geliştiği görülmektedir. Günümüzde direnç gelişen hastalarda TMZ tedavisine ek olarak kombine tedaviler araştırılmaktadır. Bunun için yalnızca apoptotik yollar değil, aynı zamanda hücre döngüsü düzensizliğini hedef alan yolların da kullanılması tümör hücrelerinin kontrol altına alınmasında amaçlanmaktadır. Bu nedenle, yeni terapötik stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Hücre döngüsünün kontrolü, siklin ve siklin bağımlı kinazların (CDK'lerin) aktivitesine bağlı olarak gerçekleşmektedir. CDK'lerin aşırı aktiviteleri kontrolsüz hücre çoğalmasına ve dolayısıyla tümör hücrelerinin artışına neden olmaktadır (Piezzo vd., 2020). CDK'ler, hücre döngüsü düzenleyicileri arasında en önemli protein ailelerinden olan serin/treonin kinazların bir alt grubudur (Corona & Generali, 2018a). Siklinlerin dört temel tipi vardır: G1 siklinler, G1/S siklinler, S siklinler ve M siklinlerdir. Her siklin, hücre döngüsündeki belirli bir faz ile ilişkilidir ve bu fazın görevlerini yönetmektedir. Her bir fazda ilgili siklinlerin konsantrasyonları değişmekte ve döngü boyunca siklin

sentez ve yıkımı devam etmektedir (Hochegger vd., 2008). Hücre döngüsünde G1-S fazı geçişi CDK4 ve CDK6 ile kontrol edilmektedir. CDK 4/6, D tipi siklinlere bağlandığında aktive olarak S fazı girişi için gerekli genlerin ekspresyonuna yol açmaktadır.

Tümörögenез sırasında ise CDK 4/6-siklinD kompleksinin aşırı aktivitesi retinoblastomanın (RB'nin) hiperfosforilasyonuna sebep olarak, hücrenin S fazına kontrolsüz geçmesine ve E2F transkripsiyon faktörünün aktive olmasına neden olmaktadır. RB fosforilasyonu hücrenin G1'den S fazına ilerlemesi için gerekli olan genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Groenland vd., 2020). Hücre çoğalmasında artışa sebep olan bu kompleksin inhibe edilmesi ve siklusta G1'den S fazına geçişin engellenmesi gerekmektedir. Bu inhibisyon, CDK 4/6 inhibitörleri ile mümkün olmaktadır (J. S. Young vd., 2022). Palbosiklib, Ribosiklib ve Abemasiklib, Gıda ve İlaç İdaresi (Gİİ) tarafından onaylanan CDK 4/6 inhibitörleri olup, ileri evre östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılması onaylanmıştır (Li vd., 2020). Bu üç ajan, CDK 4/6 inhibitörü olsa da yan etki profilleri ve etki ettikleri dozlarda farklılıklar bulunmaktadır (Corona & Generali, 2018b).

Ribosiklib (LEE011), üçüncü nesil ve seçiciliği oldukça yüksek olan bir CDK 4/6 inhibitörüdür. CDK4/6 + siklin D kompleksi ile RB-E2F yolağını inhibe edip kontrolsüz hücre çoğalmasını engelleyerek, hücrelerin G1 fazında tutulmasını sağlamaktadır. Meme kanseri, rahim kanseri gibi farklı kanser tiplerinde pre-klinik ve klinik deneme çalışmaları halen devam eden Ribosiklib'in; *KRAS* mutasyonuna sahip pRB pozitif kanser tiplerinde anti-tümörojenik aktivite gösterdiği yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Wong vd., 2018a).

Literatürde yer alan çalışmalar doğrultusunda CDK4/6 inhibitörlerinin kullanımı sonunda glioma hücrelerinin, hangi apoptotik yolağı tercih ettiğine dair kesin bir veri yer almamaktadır. Ayrıca, TMZ duyarlı U87MG hücre hattında Ribosiklib'in, TMZ ve radyoterapi ile kombine uygulanmasının siklin D yolağı üzerinden herhangi bir etkisinin olup olmadığının ve bu yolaktaki hangi proteinleri düzenlediğinin aydınlatıldığı bir çalışmaya da literatürde rastlanmamıştır. Bu bağlamda projemizle, TMZ ve radyoterapi kombine tedavisine ek uygulanan Ribosiklib'in, U87MG GBM hücrelerinde sağkalım ve CDK4/6 inhibisyonunun alt yolakları nasıl etkilediğinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda; siklin D/RB/TAp73 yolağında görev alan proteinlerin

düzeylerini değerlendirilerek, Ribosiklib'in bireysel ve TMZ ile radyoterapinin de eklenmesiyle elde edilecek verilerin kıyaslanması hedeflenmektedir.

TAp73, tümör baskılayıcı bir gen olan *p53*'ün yapısal bir homologudur. Bununla birlikte *p53*'ün aksine TAp73 nadiren mutasyona uğramaktadır. Bu genin meme, mesane, prostat ve kolorektal gibi çeşitli kanserlerde aşırı ekspre olmakta (Du vd., 2013) ve *p53*'ten bağımsız olarak apoptozu indüklemektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamız, “U87MG hücre hattında, *p53* ve TAp73 hücreleri apoptoza yönlendirir.” fikrinden yola çıkarak kurgulanmıştır. Bu doğrultuda *p53*'ün aktive olması: *p21*'in etkinliğini sorgulatacak ve *p21*'in siklin/CDK inhibisyonunu sağlayabileceği fikrini de destekleyecektir. Bu yolak tam olarak, hücre siklusunun durmasını sağlayacak ya da hücrelerde DNA hasarı oluşturarak apoptozu tetikleyecektir. Edindiğimiz bilgilerden yola çıkarak “Ribosiklib'in, TMZ ve radyoterapi ile kombinasyonu, U87MG hücrelerinde hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreleri apoptoza yönlendirir.” hipotezini kurguladığımız çalışmamızla; bu kombine etkinin hücre sağkalımı, hücre siklusu ve apoptotik açıdan ise CDK 4/6 inhibisyonunun alt yolaklarını nasıl etkilediğinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Hipotezimiz doğrultusunda kapsamlı olarak *in vitro* deneylerle kurguladığımız çalışmamız, literatürde yer alan araştırmaların devamı niteliğindedir. Elde edilecek her veri, GBM tedavisinde tümörün patolojik seyrini yavaşlatabilmek ve hasta sağkalım süresini uzatabilmek için atılmış adımlardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Tanımı ve Özellikleri

Son on yılda yapılan araştırmalara ve hızlı gelişmelere rağmen, dünya çapındaki ölüm nedenleri arasında başta yer alan kanser; giderek artan bir insidansla yayılım göstermektedir (Bray vd., 2021). Son istatistiklere göre, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki (ABD'deki) toplam ölümlerin yaklaşık %23'ünü oluşturmakta ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen ikinci ölüm nedenidir (Jemal vd., 2007). Kanser, hücrelerde mutasyonların meydana gelmesi ve bu mutasyonların birikmesinden kaynaklanan genetik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Xiao & Yu, 2021). Özellikle onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar, hücrelerdeki aktivitelerin değişmesine neden olmakta ve bunun sonucunda da neoplastik dönüşümlere, hücrelerin malign özellikler kazanmasına yol açmaktadır (Şekil 2.1.).



2.1. Kanserın ayırt edici özellikleri gösterilmektedir. Kanser oluşumu hücrelerin bu özellikleri kazanması sonucu meydana gelmektedir (Cristian Prieto-Garcia, 2022).

Kanser oluşumu, sağlıklı hücrelerin büyüme ve bölünme gibi aktivitelerini kontrol eden mekanizmalarının bozulmasıyla kendi özgün kimliklerini kaybetmeleri sonucu oluşmaktadır. Bu sürecin, kanserli hücrelerin farklılaşma, hızlı çoğalma, metastaz, düzensiz metabolizma, apoptozdan ve immün gözetimden kaçma v.b. gibi özelliklere sahip olması nedeniyle oldukça dinamik olduğu bilinmektedir (Cao, 2017; Roda vd., 2021) (Şekil 2.1.). Ancak bu süreçte tümör hücrelerinin etrafındaki stroma ile sürekli etkileşim halinde olması kritik bir öneme sahiptir. Stromal hücreler ve gömülü olduğu matris, tümör mikroçevresi (TMÇ) olarak adlandırılan heterojen bir yapı oluşturmaktadır (Balkwill vd., 2012).

Kanser hücreleri ile TMÇ arasındaki moleküler ortam, hem hücre-hücre iletişimlerinden, hem de hücrelerden salgılanan faktörlerden (büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, enzimler, inflamatuvar yanıtlar gibi.) oluşmaktadır (Jin & Jin, 2020). Bu iki ana faktör kanser fenotipini sürekli olarak değiştirdiği için, son yıllardaki kanser çalışmalarında ve prognozundaki tüm adımlarda kritik bir öneme sahiptir (Hanahan & Coussens, 2012).

2.1.1. Kanser Tedavisi

Kanser, kontrolsüz bir şekilde çoğalan, dokuları istila eden ve neoplazmalar olarak adlandırılan tümörlere yol açan, yapısal ve işlevsel olarak değişikliğe uğramış hücrelerin ortaya çıkması ile karakterize edilen geniş bir hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır (Maude vd., 2014). Kanser tedavisinde ciddi ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, ölüm oranları ve yüksek insidansı sebebi ile hala dünya çapında görülme oranı en yüksek seviyededir (Virmani vd., 2023a). DSÖ, 2020'de on milyon ölümün kanserden kaynaklandığını ve yılda dört yüz bin çocuğa kanser teşhisi konulduğunu tahmin etmektedir (Nirmala vd., 2023). 2040 yılına kadar 29.5 milyon yeni vakanın ve 16.4 milyon kansere bağlı ölümün yaşanacağı tahmin edilmektedir. Bu da dünya çapında ciddi bir sağlık problemini oluşturmaktadır (Nirmala vd., 2023).

Tümör hücrelerinin kontrolsüz olarak sürekli bölünmesi ve büyümesi, besin tüketimine ve hipoksiyi tetiklemekten sorumlu olan transkripsiyon faktörlerinin salınmasına neden olmaktadır (Vito vd., 2020a). Kanser hücrelerindeki çoğalmanın artışı, oksijenden yoksun bir ortam yaratmaktadır. Tümörlerdeki düşük oksijen seviyesine karşılık olarak; birçok anjiyojenik, metabolik ve hücre döngüsü geninin ekspresyonunu kontrol eden

transkripsiyonel faktörler regüle olmaktadır (Krock vd., 2011). Malign hücreler, ortaya çıkan hipoksik mikro ortamda büyümeye ve gelişmeye devam edebilirken; bu durum bağışıklık hücreleri için uygun olmayan koşullar yaratarak bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olmaktadır (Chen vd., 2009).

Günümüzde kanser tedavisi, kanserin türüne ve evresine bağlı olarak cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi gibi birbirini takip eden tedavilerin kombinasyonundan oluşmaktadır. Bu tedavi seçenekleri, erken evrelerde olumlu sonuçlar vermekte, ileri veya nüks görülen evrelerde genellikle etkisiz kalmaktadır (Igarashi & Sasada, 2020). Ancak, kemoterapi esas olarak tedavide kullanılsa da, immünterapi, hormon tedavisi ve hedefe yönelik tedaviler gibi çeşitli alternatif tedavi seçenekleri de mevcuttur (Virmani vd., 2023b).

Radyoterapi ile hücrelerin kısmen hedeflenmesi, kemoterapötik ilaç direnci ve toksisite gibi zorluklar tedavideki en önemli sorunlardandır (de Oliveira vd., 2021). Kanser tedavisindeki bir diğer zorluk ise kanser ilerlemesi sırasında, oluşan tümörlerin oldukça heterojen bir yapı haline gelmesidir (Prasetyanti & Medema, 2017). Bu heterojen yapı, farklı moleküler özellikte ve transkripsiyonel profillerinde farklılıklar olan karışık bir hücre popülasyonundan oluşmaktadır.

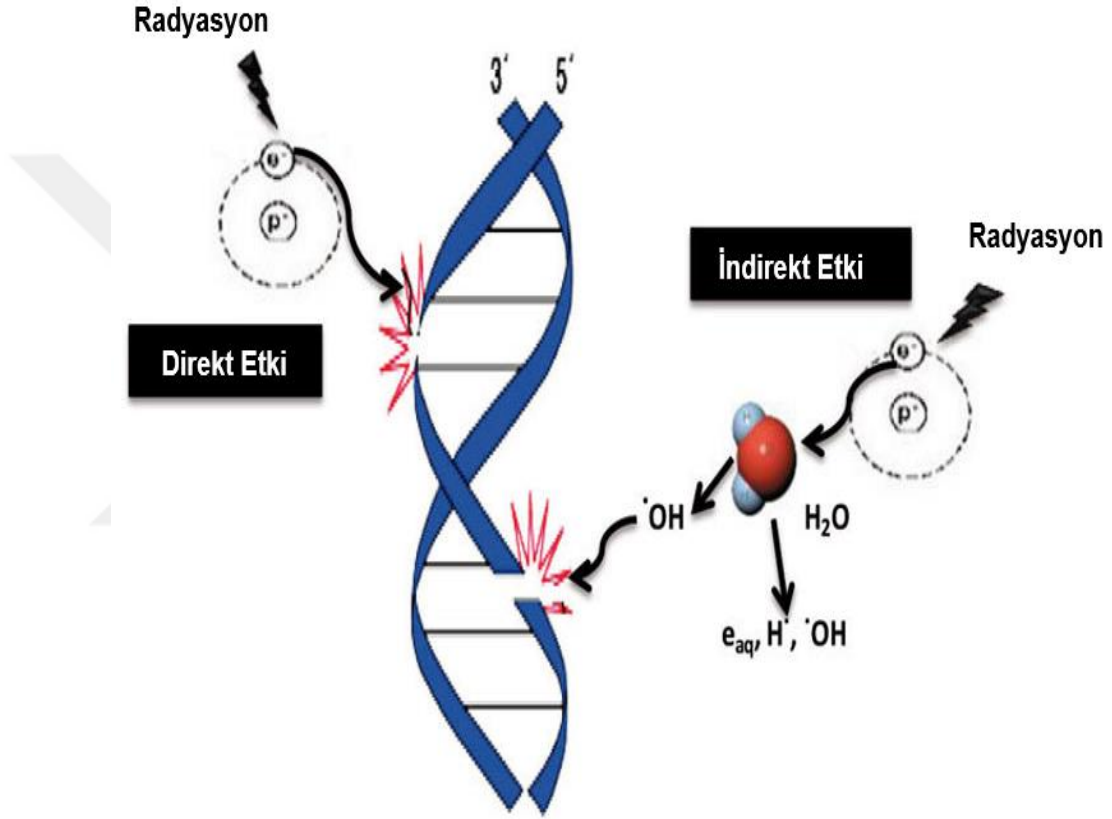
Heterojenlik, TMÇ'de bulunan hücrelerin çeşitliliğini tanımlamak için sıklıkla kullanılmaktadır (Lim & Ma, 2019). Tümör heterojenliğinin büyük oranda TMÇ'deki yüksek mutasyon potansiyeli, hipoksik koşullar ve anormal damarlanma (vaskülarizasyon) gibi değişikliklerden kaynaklandığı bilinmektedir (Vito vd., 2020b). Burada bulunan kanser hücreleri, anti-proliferatif sinyallere yanıt vermemeye, apoptozdan kaçmaya, kontrolsüz çoğalmaya ve dokulara invazyona/metastaza sebep olmaktadır. Onkoloji araştırmalarının tarihi boyunca tümör heterojenliği, kanserin başarılı tedavisinin önünde büyük bir engel oluşturmaktadır (El-Sayes vd., 2021). Gİİ, kanser tedavisi için üç yüzden fazla kemoterapötik ilacın kullanımına izin vermiştir. Ancak kanserin heterojen doğası tüm bu kemoterapötik ajanların etkinliğini sınırlandırmaktadır (Gao vd., 2022). Bu nedenle, kanserde etkili tedaviler tasarlamak için bu karmaşık ve dinamik olan heterojen yapının derinlemesine anlaşılması büyük önem taşımaktadır (Pucci vd., 2019).

Kemoterapinin kanser tedavisi için önemi, özellikle lokal tedaviye adjuvan olarak kullanılmasıyla artmaktadır. İlerleyen evrelerde ve tümör kitlesi metastaz yapmış ise kemoterapi, kanser türüne bağlı olarak değişen semptomları hafifletmekte ve hasta sağkalımını uzatmaktadır (Nygren, 2001). Kanserli hücrelerin büyümesini ve yayılmasını engellemede etkili olan ve hastalara daha kaliteli yaşam sağlamayı hedefleyen kemoterapötik ilaçlar, genellikle cerrahi rezeksiyondan sonra radyasyon tedavisi ile birlikte kullanılmaktadırlar (DeVita & Chu, 2008, Baskar vd., 2012).Yapılan birçok çalışma, kanser tedavisinde tek bir kemoterapötik ilaç yerine, birden fazla ilacın birlikte kullanılmasının çok daha etkili olduğunu göstermektedir (DeVita & Chu, 2008).Tedavide kullanılan ajanlar, tümör hücrelerinin çevrelerindeki değişikliklere uyumunu sağlamak ve kanserin yayılmasını tetikleyen nükleik asitleri, hücre proteinlerini, karsinojenik sinyal yollarını özgün olarak hedefleyerek etkinliklerini göstermektedir (Kumar vd., 2023). Ancak, kullanılan kemoterapötik ilaca bağlı olarak oluşan yan etkiler, ilaç direnci ve kanser hücrelerinin tedavilere duyarsızlığı gibi çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır (Anand vd., 2023; Kumar vd., 2023). Kemoterapötik ajanların yüksek doz ihtiyacı, zayıf emilim, düşük seçicilik indeksi, özgün olmayan etkileşim göstermeleri ve hastaların rahatsızlığı da kemoterapi tedavisindeki önemli dezavantajlarındandır (Shakil vd., 2021). Bu nedenle, kemoterapötik ajanların terapötik etkinliğini artırmak için yeni ve ileri tedavi alternatiflerinin araştırılması gerekmektedir.

Kanserde radyasyon tedavisi ise klinikte en yaygın kullanılan tedavi yöntemlerinden bir diğeridir. Tam olarak rezeke edilemeyen veya cerrahi rezeksiyondan sonra nüks meydana gelen hastalar çoğunlukla radyasyon tedavisi ile tedavi edilmektedir (Burnette & Weichselbaum, 2013; EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group), 2014; Durante & Loeffler, 2010). Radyasyon tedavisi, tümör hücrelerinin iyonlaştırıcı radyasyonla patlatılması ve bunun sonucunda da tümörlü hücrelerin yüksek enerjiyle öldürülerek yok edilmesi prensibi üzerine kurulu bir tedavi seçeneğidir (Baskar vd., 2012b).

İyonlaştırıcı radyasyonun tümör dokusu üzerine etkisi, çoğunlukla DNA'ya zarar vererek ve hücre ölümüne sebep olarak gerçekleşmektedir. Bu etki malign hücre popülasyonlarının azalmasına ve hücrelerde fonksiyonel yetersizliğe neden olmaktadır.

Radyasyonun neden olduğu iyonlaşmalar, direkt ve indirekt etki olarak 2 şekilde gerçekleşmektedir. Direkt etki; hücresel moleküller üzerinde etki etmekte ve DNA hasarına neden olmaktadır. İndirekt etki ise hücrelerin su bileşeninin iyonlaşmasından veya uyarılmasından türetilen serbest radikaller üreterek etki etmektedir (Baskar vd., 2014) (Şekil 2.2.).



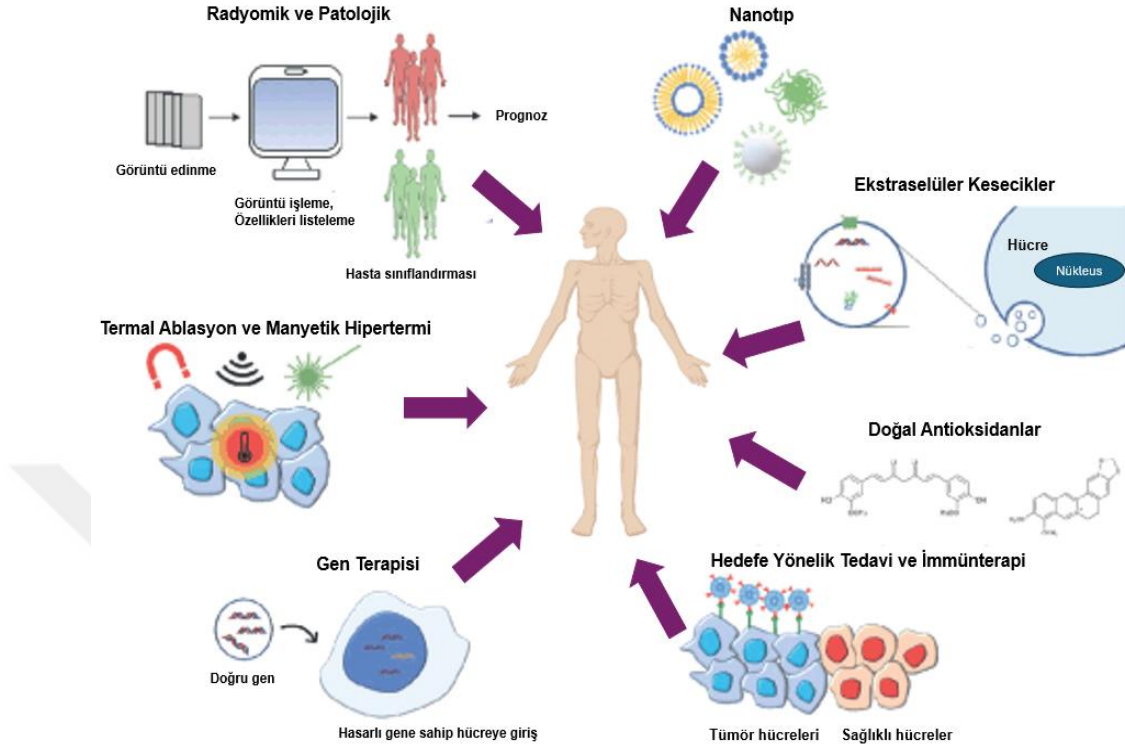
Şekil 2.2. Radyasyonun direkt ve dolaylı olarak (indirekt) etki ettiği mekanizma gösterilmektedir (Riccardo Ridolfi, 2018).

Direkt etki, tüm biyolojik etkenlerin 1/3'ünü oluştururken geri kalan 2/3'lük kısmı ise indirekt etki ile oluşmaktadır. Radyasyonun neden olduğu DNA hasarları temel olarak tek zincirli ve çift zincirli DNA kırıkları şeklindedir (Riccardo Ridolfi, 2018). Çift zincirli DNA kırıkları, en ölümcül DNA hasarı türlerini temsil etmekte ve onarılmazsa hücre ölümüne yol açabilmektedir.

Radyasyon tedavisindeki en büyük zorluk: sadece tümörlü bölgenin temizlenmesini hedeflemek, bu alan dışında kalan normal doku ve sağlıklı hücrelerin etkilenmemesini

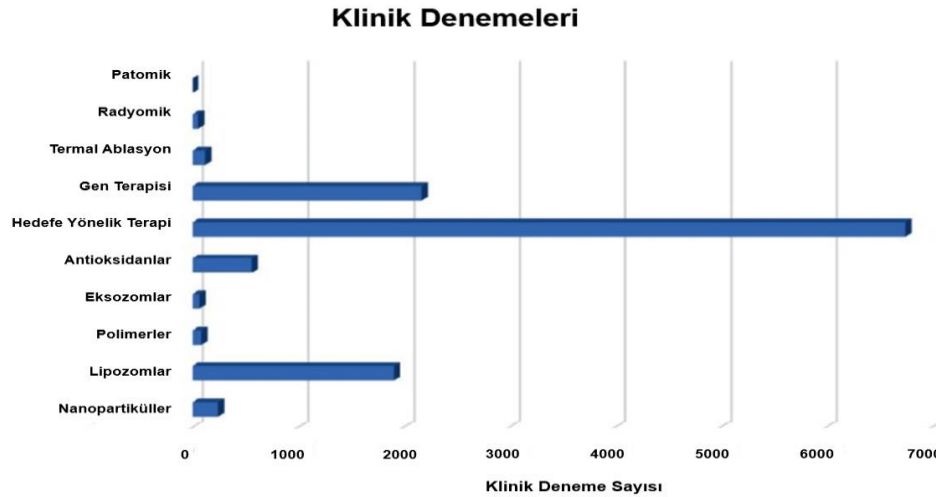
sağlamaktır (Baskar vd., 2014). Ancak, yine de etkilenen sağlıklı hücreler genellikle kendilerini daha hızlı onarabilirler ve normal işlevini kanser hücrelerine göre koruyabilirler. Bu nedenle, genel olarak kanser hücreleri, radyasyon tedavisinin neden olduğu hasarı onarmak konusunda, sağlıklı hücreler kadar başarılı değildir (Baskar vd., 2012c).

Günümüzde 3D konformal radyoterapi (3DKRT), yoğunluk ayarlı radyasyon tedavisi (IMRT), görüntü kılavuzluğunda radyoterapi (GKRT), stereotaksik vücut radyasyon tedavisi (SVRT) ve parçacık radyasyonları (elektron, proton ve nötron ışınları) gibi birçok teknik radyoterapi tedavisinde kullanılmaktadır (Baskar vd., 2012c). Bu tedavi yöntemlerinin yanı sıra son yıllarda, kanser araştırmalarında daha etkili ve daha az invaziv kanser tedavilerine yönelik dikkate değer adımlar atılmaktadır. Nanotıp, hedefe yönelik terapi ile birlikte, tedavi edilecek hedef doku çevresinde yeni veya önceden denenmiş kemoterapötik ajanların biyolojik dağılımına yardımcı olmaktadır. Gen terapisi ise siRNA'ların iletimi, immünoterapi ve antioksidan moleküller gibi diğer kanser hastalarına yeni olanaklar sunmaktadır. Cerrahi rezeksiyonda ise termal ablasyon ve manyetik hipertermi umut verici seçenekler arasındadır. Son olarak, radyomik ve patolojik yaklaşımlar, prognozu iyileştirmek için kanser hastalarından alınan veri setlerinin yönetimine yardımcı olmaktadır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Kişiselleştirilmiş tedaviyi elde etmek amacıyla farklı disiplinleri birleştiren, yenilikçi stratejiler temsil edilmektedir (Pucci vd., 2019b).

Şu anda kanser tedavisiyle ilgili klinik araştırmalar veri tabanındaki en sık girişler, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve gen terapisi terimlerini içermekte ve bunların araştırılmakta olan en popüler yöntemler olduğu vurgulanmaktadır. Bu yöntemlerin kanser hastaları için umut verici ve etkili olduğu gösterilmektedir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. www.clinicaltrials.gov adresinde kayıtlı olan klinik araştırmalar ve araştırmaların toplam sayıları gösterilmektedir (Pucci vd., 2019b).

Kanser tedavisindeki önemli gelişmeler, tedavi sırasında hastanın sağlık durumunu ve yaşam kalitelerini de dikkate alarak iyileşmesini sağlamak üzerine kuruludur. Gelişen bu tedavilerin avantajları ve dezavantajları mevcut olsa da, ilerlemeler kaydedilmektedir (Pucci vd., 2019b).

2.2. Beyin Tümörleri

Beyin, vücudun en önemli organıdır ve genel olarak yönetim noktası olarak kabul edilmektedir. Duyguları, hareketi, konuşmayı, hafızayı, duyuları, düşünceleri, fiziksel aktiviteleri, tadı ve yaratıcılığı gibi birçok hayati aktivitenin yönetildiği beyinde, oluşabilecek herhangi bir problem, vücudun rutin işleyişini bozmakta ve anormal bir rutine neden olmaktadır. Bu nedenle beynin korunması oldukça önemlidir (Lather & Singh, 2020a).

Beynin çeşitli problemleri arasında günümüzde en yaygın ve her yaştan insanı etkileyebilen problem, beyin tümörleridir (Laws & Thapar, 1993, Lather & Singh, 2020b). Beyin tümörü olarak da bilinen intrakraniyel tümörler, beyin içindeki farklı glial hücrelerden (birincil tümörler) veya beyine metastaz yapmış sistemik tümörlerden (ikincil tümörler) kaynaklanan çeşitli kanser türlerini ifade etmektedir (Butowski, 2015a). Hücre tipine, beyin içindeki konumuna, büyüme ve ilerleme hızına bağlı olarak beyin tümörlerinin yaklaşık 130 farklı çeşidi vardır (Lather & Singh, 2020c). Primer beyin tümörleri, çeşitli moleküler özelliklere sahip bir dizi histolojik tipi içermektedir ve DSÖ'nün Merkezi Sinir Sistemi (MSS) tümörlerinin sınıflandırmasına göre sınıflandırılmaktadır (Louis vd., 2007a).

Birincil beyin tümörleri, beyindeki dokulardan veya beynin yakın çevresinden ortaya çıkmaktadır. Genellikle hipofiz, epifiz bezi, beyin lenfomaları, nöroglia, meninksler, koroid pleksus ve sinir liflerinden köken almaktadırlar (Shehu vd., 2021). İkincil veya metastatik beyin tümörlerinin çoğu ise vücudun başka bir yerinden kaynaklanan ve dolaşım yoluyla beyine giden tümörlerdir. Özellikle akciğer ya da meme kanserinden kaynaklanmaktadır. Ancak melanom, kolon ve böbrek kanserinin de yetişkin hastalarda beyine metastaz yaptığı görülmüştür (Pozzilli vd., 1992) (Şekil 2.5.).

BEYİN TÜMÖRLERİ

Birincil (Primer) Beyin Tümörleri

- Beyin dokusundan ve çevresinden köken almaktadır.
- Beynin ve omurganın diğer bölgelerine yayılım göstermektedir.
- Nadiren diğer organlara yayılmaktadır.

İkincil (Metastatik) Beyin Tümörleri

- Vücudun başka bir bölümünden kaynaklanmaktadır.
- Dolaşım yoluyla beyine ilerlemektedir.
- Köken aldığı yere göre isimlendirilmektedir.
- Primer beyin tümöründen daha sık görülmektedir.

Şekil 2.5. Beyin tümörlerinin birincil (primer) ve ikincil (metastatik) olarak sınıflandırılması gösterilmektedir (Lather & Singh, 2020c).

Ayrıca, beyin tümörleri benign veya malign olmalarına göre de sınıflandırılmaktadırlar. İyi huylu beyin tümörleri, iyileşmenin mümkün olduğu tümörlerdir. Ancak bu durum tümörün büyüklüğüne, kafa içi basınç artışına, beyin ödemeine bağlıdır ve özellikle pons, medulla gibi kritik bir bölgede bulunması durumunda, kötü huylu beyin tümörleri gibi hayati tehlike yaratmaktadır (Hill vd., 2002; Pozzilli vd., 1992; Freeman vd., 1996). Şekil 2.6.'da iyi ve kötü huylu tümörlerin karakteristik özellikleri gösterilmektedir.

BEYİN TÜMÖRLERİNİN ÖZELLİKLERİ

İyi Huylu (Benign) Beyin Tümörleri

- Hücre proliferasyonu yavaş seyir göstermektedir.
- Diğer dokulara yayılım göstermezler.
- Hastalarda en az yıkıcı hasara sahiptir.
- Cerrahi olarak tedavi edilebilmektedir.

Kötü Huylu (Malign) Beyin Tümörleri

- Hücre proliferasyonu hızlı seyir göstermektedir.
- Tüm beyine ve omurgaya yayılabilen tümörlerdir.
- Hastaların yaşam kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir.
- Radyasyon ve kemoterapiyle tedavi edilebilmektedir.
- Tedaviden sonra nüks meydana gelebilme ihtimali vardır.

Şekil 2.6. İyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörlerin karakteristik özellikleri gösterilmektedir (Lather & Singh, 2020d).

Tüm kanserlerin %2'sini oluşturan beyin tümörlerinde oluşan neoplazmalar, kanser morbidite ve mortalitesinde büyük bir orana neden olmaktadır. Tüm yaşlar ve tüm ırklar dahil olmak üzere bütün malign beyin tümörlerinde yaklaşık 5 yıllık hasta sağkalım oranı %33 olarak tanımlanmaktadır. Histolojik alt tipler arasında en sık görülen anaplastik astrositom için 5 yıllık hasta sağkalım oranı %30 ve glioblastoma için ise bu oran %3 olarak ifade edilmektedir (Butowski, 2015b). Her yıl yaklaşık 11.000 kişiye beyin tümörü teşhisi konulmaktadır. Bu tümörlerin insidansı, özellikle yaşlı yetişkinler olmak üzere tüm yaş gruplarında giderek artmaktadır (Butowski, 2015b; Laws & Thapar, 1993b; Lather & Singh, 2020e) .

Beyin tümörleri genellikle baş ağrısı, baş dönmesi, kusma, kişilik değişiklikleri veya nörolojik bozuklukları içeren klinik belirtilerden sonra teşhis edilmektedir. Günümüzde beyin tümörü olduğundan şüphelenilen hastaların tümörlerini teşhis etmek için gelişmiş görüntüleme teknikleri mevcuttur. Bilgisayarlı tomografi (BT) taraması ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) en sık kullanılan görüntüleme yöntemidir. Ayrıca manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) kullanılarak tümörün kimyasal profilinin incelenmesi ve MRG'de saptanan lezyon tipinin belirlenmesi yapılabilmektedir (Lather & Singh, 2020e). Ancak tümör tipi ve malignite derecesinin kesin tanısı için biyopsi veya cerrahi rezeksiyon ile elde edilen tümör dokusunun incelenmesi gerekmektedir (Stupp vd., 2014).

Hastalığın saptandığı evre prognoz ile ilişkilidir ve bu nedenle, tümörün erken saptanmasını sağlayan belirteçlerin bulunması oldukça önemlidir. Bir tümörün ilerleyişi, birçok biyokimyasal ve moleküler değişikliğe yol açan karmaşık bir süreçtir. Bu değişikliklerin tespit edilmesi için kullanılan biyobelirteçler, tümörün erken tespiti için büyük bir önem taşımaktadır. Örneğin, son birkaç yılda, kötü huylu glioblastomaların çeşitli tanısallık ve prognostik biyobelirteçleri tanımlanmıştır (Müller Bark vd., 2020). Bu belirteçler, tanının doğruluğuna ve uygulanacak olan tedavinin etkinliğine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Ayrıca, invazif tanı yöntemleri de beyin tümörleri için tanı koyma ve tedaviyi belirleme konusunda klinikte yeni yaklaşımlar da değerlidir (Jelski & Mroczko, 2021). Birincil beyin tümörleri için olumlu prognostik faktörler arasında, hastaların genç yaşta olması ve düşük patolojik dereceye sahip olmaları önemli bir yer almaktadır. Prognozun belirleyici unsurları arasında semptomların süresi, tanı sırasında

hastada bilişsel değişikliklerin varlığı, tümörün posterior fossa yerleşimi ve cerrahi rezeksiyonun kapsamı da yer almaktadır (Ostrom vd., 2014a).

En yaygın kötü huylu beyin tümörleri, glial hücrelerden köken alan glioblastomlardır ve çoğu beyin tümörünün nedeni hala bilinmemektedir. Bugüne kadar yapılan araştırmalar belirli nedenlere ilişkin çok az veri ortaya koymuştur. Ancak genetik ve epidemiyoloji alanlarındaki ilerlemeler, beyin tümörlerinin sadece oluşma nedenini değil, aynı zamanda oluşan beyin tümörlerinin tedavisi için yeni yaklaşımların keşfedilmesini de sağlamaktadır (Louis vd., 2007b; Wrensch vd., 2002). Ancak bu tip tümörlerin agresifliği, tümörün karmaşık yapısı ve hastaların hızlı ölümü gibi birçok faktörün olması sebebiyle, beyin tümörlerinin nedenlerine yönelik araştırmalar sınırlı kalmaktadır (Butowski, 2015c; Louis vd., 2007c)

2.2.1. Gliomalar

Gliomalar malign beyin tümörlerinin %81'ini oluşturan ve çoğunlukla yetişkinlerde görülen intrakraniyal tümörlerdir. Gliomaların, neoplastik dönüşüm üzerine glial özellikler geliştiren glial (progenitör) hücrelerden veya kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Perry & Wesseling, 2016). Yıllık insidansı 100.000 popülasyonda 5.26 veya yılda 17.000 yeni tanı ile en sık görülen primer beyin tümörleridir. Bu tümörler tipik olarak kötü bir prognoz ve hastalarının yaşam kalitesinin kötü ilerlemesi ile ilişkilidir (Omuro, 2013a).

Gliomalar oluştukları yerin çevresindeki beyin dokusunu etkileyen infiltratif tümörler olarak tanımlanmaktadır (Mesfin & Al-Dhahir, 2024). MSS'de herhangi bir yerde meydana gelen gliomaların, özellikle beyinde ve glial dokuda olduğu gözlenmektedir (Ostrom vd., 2014b). Bu tümörler tipik olarak malign karakterde olmalarına rağmen bazı gliomalar sürekli olarak kötü huylu özellik göstermezler (Louis vd., 2007d). Genel olarak astrositomlar, oligodendrogliomalar ve her iki hücrenin karışımı olan oligoastrositomalar olarak histolojik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır; her grup farklı biyolojik malignite aralıklarına sahip tümör alt tipleri içermektedir. DSÖ'ye göre bu derecelendirme, derece I-IV arası olabilmektedir (Şekil 2.7.).

Derece I katı ve infiltratif olmayan tümörleri (pilositik astrositomlar), derece II-IV ise diffüz infiltrasyonlu gliomaları temsil etmektedir. Derece II, genellikle düşük dereceli gliomalar olarak adlandırılırken, daha agresif tümörler yüksek dereceli gliomalar (derece III ve IV) olarak adlandırılmaktadır (Louis vd., 2007d). Derece III gliomalar ise, invazif ve agresif olup, sağkalım oranlarının az olduğu ve hızlı ilerlemeye sahip olan tümörlerdir. “Glioblastoma” olarak da bilinen derece IV tümörler, yetişkinlerde görülen yaygın ve en ölümcül beyin tümörüdür (Stupp vd., 2005a; Wen & Kesari, 2008).

<i>Histolojik</i> <i>DSÖ Dereceleri</i>	Astrositom	Oligoastrositom	Oligodendrogliom
Derece I	Pilositik Astrositom		
Derece II (düşük derece)	Diffüz astrositom	Oligoastrositom	Oligodendrogliom
Derece III (diffüz, yüksek derece)	Anaplastik astrositom	Anaplastik oligoastrositom	Anaplastik oligodendrogliom
Derece IV (yüksek derece)	Glioblastoma		

Şekil 2.7. Gliomaların Dünya Sağlık Örgütü (I–IV) derecelerine göre histolojik sınıflandırması gösterilmektedir (Arcella vd., 2020’den revize edilmiştir) (Yeşilin farklı tonları sadece grupları ayırmak için kullanılmıştır, herhangi bir anlam ifade etmemektedir.)

Glioblastoma, birincil veya ikincil kökenli olarak sınıflandırılmaktadır. Glioblastomaların %90’ı, çoğunlukla birincil tümörler olup, yaşlı hastaları etkileyen son derece agresif tümörler olup hızla gelişmektedir. İkincil glioblastomaların görülme oranı ise %10’dur ve daha düşük dereceli (DSÖ’ye göre derece II veya derece III) gliomalardan, yani diffüz veya anaplastik astrositomlardan kaynaklanmakta ve genellikle genç hastalarda ortaya çıkmaktadır. İkincil glioblastomalar, başlangıç evresinde birincil gliomalarla benzer klinik ve histolojik özelliklere sahip olmasına rağmen farklı genetik ve epigenetik profiller ve moleküler yollar da bu tümörlerin tanımlanabilmesi için söz konusudur (Ohgaki & Kleihues, 2013).

Diğer tüm tümörlere kıyasla ortalama sağkalım süresi en az olan glioma tümörlerinin, küçük bir kısmının kalıtsal genetik bozukluklardan, çoğunlukla ise iyonize radyasyona maruz kalma nedeniyle meydana geldiği bilinmektedir (Ostrom, Gittleman, Stetson, vd., 2018; Ostrom vd., 2015; Schwartzbaum vd., 2006). İyonize radyasyon maruziyeti, tamir edilemez DNA hasarlarına sebep olduğundan her tümörde olduğu gibi gliomalarda da önemli bir etkidir. İlerleyen yaşlarda, özellikle 45-65 yaşları arasında görülme olasılıkları yüksektir. Klinik açıdan incelendiğinde gliomalı hastalarda genellikle baş ağrısı, kusma, beyin fonksiyonlarında azalma, hafıza kaybı, karakter özelliklerinde değişimler, denge kayıpları, idrar kaçırma, görme problemleri, konuşma zorlukları ve bayılma gibi semptomlar görülmektedir. Bu semptomlar tümör büyüklüğü, bölgesi ve derecesi gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Rasmussen vd., 2017). Bunlara ek olarak yaş, cinsiyet ve genetik mutasyonlara bağlı olarak da hastaların ortalama sağkalım süreleri değişmektedir. Glioma tümörleri arasında en düşük sağkalım gösteren GBM'dur (Butler vd., 2020).

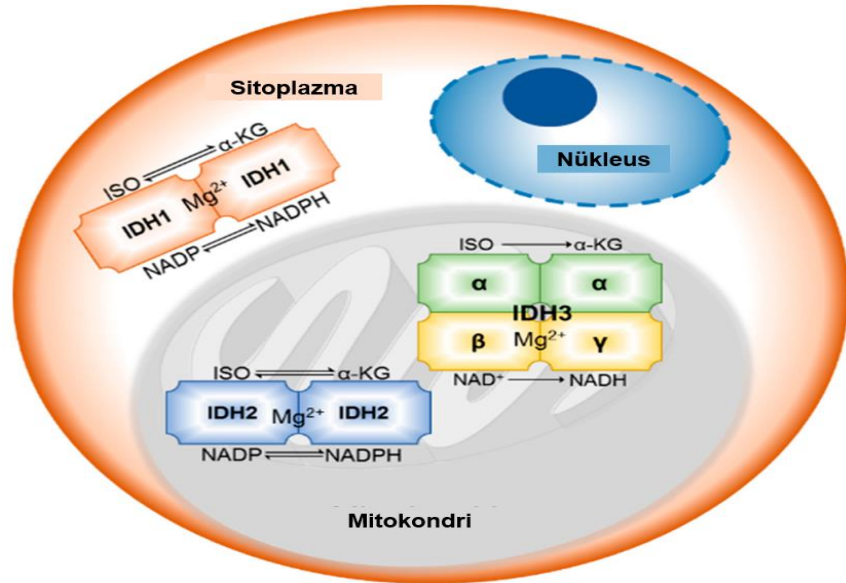
2.3. Glioblastoma Multiform (GBM)

GBM, DSÖ tarafından derece IV astrositom olarak sınıflandırılan, MSS tümörleri arasında en yaygın ve agresif primer malign beyin tümörüdür (B. Huang vd., 2021). GBM tümörünün teşhis edilmesinden sonra hastalarda ortalama 12-15 aylık sağkalım gözlenmektedir (Abadi vd., 2021). Yaşam tarzındaki değişiklikler, erken tanı yapılması ve tedavi gibi önleyici tedbirlerin alınması hastalığın ilerleyişini engellemekte ve sonucu değiştirmemektedir (Omuro, 2013b). GBM, %90 birincil GBM ve %10 ikincil GBM olarak ikiye ayrılmaktadır. Birincil GBM'de, daha düşük dereceli patoloji veya semptomlar gözlenmemekte ve tümör hızlı bir şekilde ortaya çıkmaktadır. İkincil GBM ise düşük dereceli astrositomların değişimi ve dönüşümünden kaynaklanmaktadır ve genelde genç hastalarda görülmektedir. GBM'in bu iki alt türü farklı genetik profiller sunmasına rağmen spesifik hücre belirteçlerinin varlığı ile tanımlanmakta olup morfolojik ve klinik olarak ayırt edilemezler (Furnari vd., 2007).

Moleküler biyobelirteçler, glioblastomaların histolojik tiplendirilmesinde, tanısında, hayatta kalma ve tedaviye yanıtın tahmin edilebilmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. GBM için en iyi bilinen biyobelirteç, MGMT (O6-metilguanin-DNA metiltransferaz)

promotörünün metilasyon durumudur. MGMT promotörünün metilasyonu yoluyla, susturulması olumlu bir prognostik sürecin göstergesi olup radyasyon terapisi ve alkilatör kemoterapisi olan Temozolomid (TMZ) ile tedavi edilen hastalarda artan ortalama sağkalım ile ilişkilendirilmektedir (Mansouri vd., 2019). MGMT ile metillenmiş tümörleri olan hastaların ortalama sağkalımı 12-15 ay ile sınırlı kalırken, MGMT ile metillenmemiş tümörleri olan hastaların ortalama sağkalımının ise 22-26 aya kadar uzadığı bilinmektedir (Hegi vd., 2005).

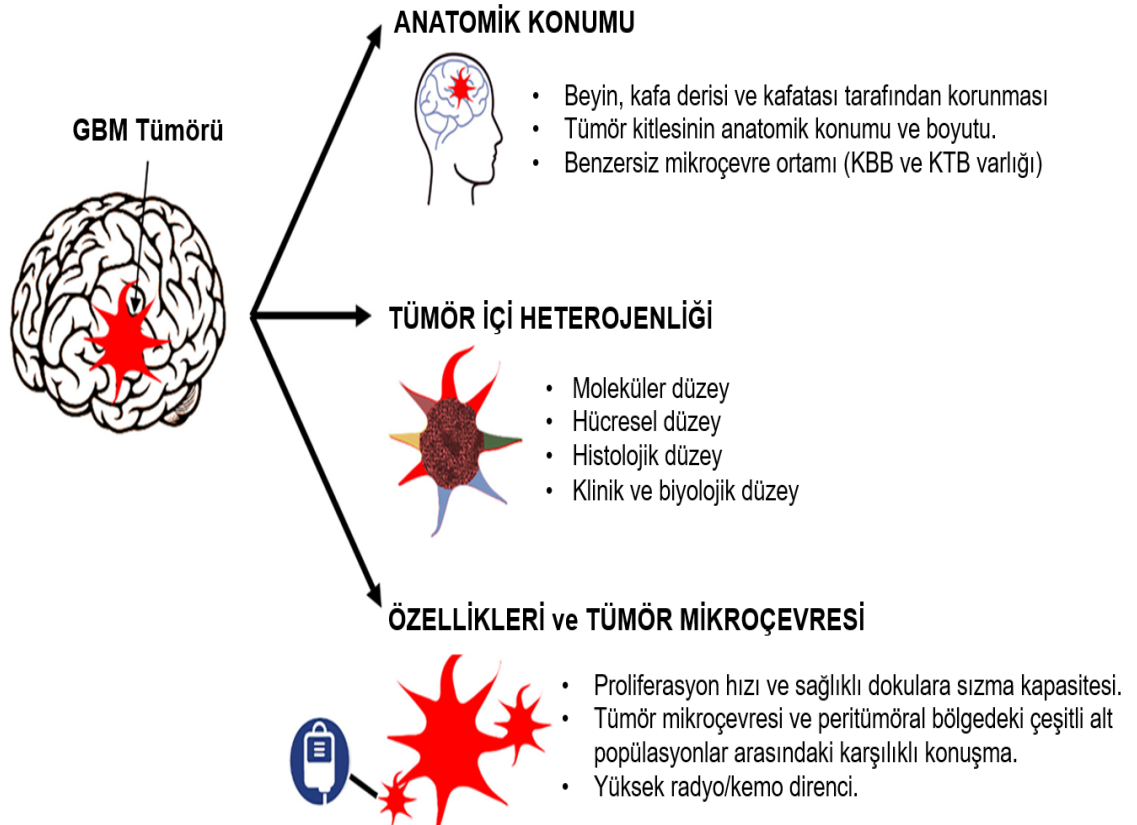
Klinik açıdan GBM için bir başka biyobelirteç ise IDH (izositrat dehidrojenaz) mutasyonu durumudur. IDH'in IDH1, IDH2 ve IDH3 şeklinde 3 izoformu vardır. IDH enzimleri, krebs döngüsü, glutamin metabolizması, lipogenez ve redoks regülasyonu gibi birçok ana metabolik sürece katılan temel enzimler olarak tanımlanmaktadır (Koh vd., 2004). IDH1, sitoplazmada ve peroksizomlarda bulunurken, IDH2 ve IDH3 mitokondriyal matrikste bulunmaktadır (Leighton vd., 1969). IDH1 ve IDH2'nin katalitik bölgeleri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺) ve iki değerlikli metal katyonu (genellikle magnezyum veya manganez 5) ile birlikte substrat olan izositrat için afinite sergilemektedir ve bu da α -ketoglutarat (α -KG) oluşumuyla sonuçlanmaktadır. İzositrattan α -KG'ye dönüşümü de katalize eden IDH3 ise kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) kullanmaktadır (Hurley vd., 1991) (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. IDH enzimlerinin hücre içi konumları, kofaktörleri ve IDH1, IDH2 ve IDH3 tarafından katalize edilen reaksiyonlar gösterilmektedir (Madala vd., 2018).

IDH'deki mutasyonlar, insan malignitelerinde oldukça yaygın görülmektedir. Gliomalı hastaların yaşlaşıık %10'unda, gliomagenез sırasında erken bir genetik olay olan bu enzimlerin herhangi birinde mutasyonun meydana geldiği bilinmektedir (Louis vd., 2016). Gliomalarda, DSÖ tarafından derece II ve derece III vakalarının %80'inde *IDH* mutasyonları tanımlanmaktadır. DSÖ evre IV olarak ifade edilen GBM'de ise *IDH* mutasyonları, klinik vakaların %73'ünü oluşturan ikincil GBM daha sık görölürken, birincil GBM'de daha az (%3.7) görölürmektedir (Nobusawa vd., 2009).

GBM gibi malign gliomalarda, son zamanlarda onkoloji alanında önemli başarılar olmasına rağmen, dünya çapında GBM hastalarının tedavisinde büyük zorluklar görölürmektedir (Kanu vd., 2009). Karmaşıık tümör heterojenitesi, tümör hücrelerinin kemoterapötiklere karşı geliştirdiği direnç, kemoterapötiklerin KBB'yi ve Kan-Tümör Bariyer (KTB)'ni geçememesi gibi zorluklar GBM hastalarının prognozunun kötü seyretmesine sebep olmaktadır (Upadhaya vd., 2020). (Şekil 2.9.)



Şekil 2.9. GBM özellikleri ve terapötik zorlukları gösterilmektedir (Bastiancich vd., 2021a).

GBM’de günümüzde mevcut tedavi güvenli maksimum cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapiden oluşmasına rağmen tedavide yüksek oranda başarısızlık ve zaman içerisinde nüks meydana gelmektedir (Ortiz vd., 2019). Mikroçevrede yer alan ve kendilerini yenileme yeteneğine sahip olan kanser kök hücrelerinin varlığı, GBM nükslerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Denysenko vd., 2010). Ancak teknolojik gelişmeler ve klinik araştırmalar doğrultusunda, hastalık biyolojisinin anlaşılması sayesinde, nüks meydana gelmesine rağmen, hastaların sağkalımı ve yaşam kalitesinin yüksek tutulması sağlanabilmektedir (Koray Özduman, 2019).

GBM’in ayırt edici özellikleri arasında kontrolsüz proliferasyon, nekroz ve anjiyogenez eğilimi, apoptoz direnci, yüksek genomik instabilite ve kemorezistans yer almaktadır (Furnari vd., 2007b). GBM hücreleri, tümör kitlesi oluşurken, erken evrelerde primer lezyonun çevresine diffüz şekilde sızarak çevredeki normal parankim dokusu içine doğru göç edebilmektedirler. Bu sebeple GBM tümörü aynı zamanda “ahtapot tümörü” olarak da isimlendirilmektedir (Yamahara vd., 2010). GBM hücrelerinin migrasyon ve invazyonunda önemli rol oynayan birçok gen tanımlanmıştır ve bunların varlığı hastaların ortalama sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, hücrelerin göçünün rastgele olmadığı, kan damarlarının bazal membranları ya da subependim boyunca nöronlara bitişik olarak meydana geldiği ve nadiren de kontralateral hemisfere ulaştığı gösterilmiştir (Bastiancich vd., 2016; Fisher & Buffler, 2005).

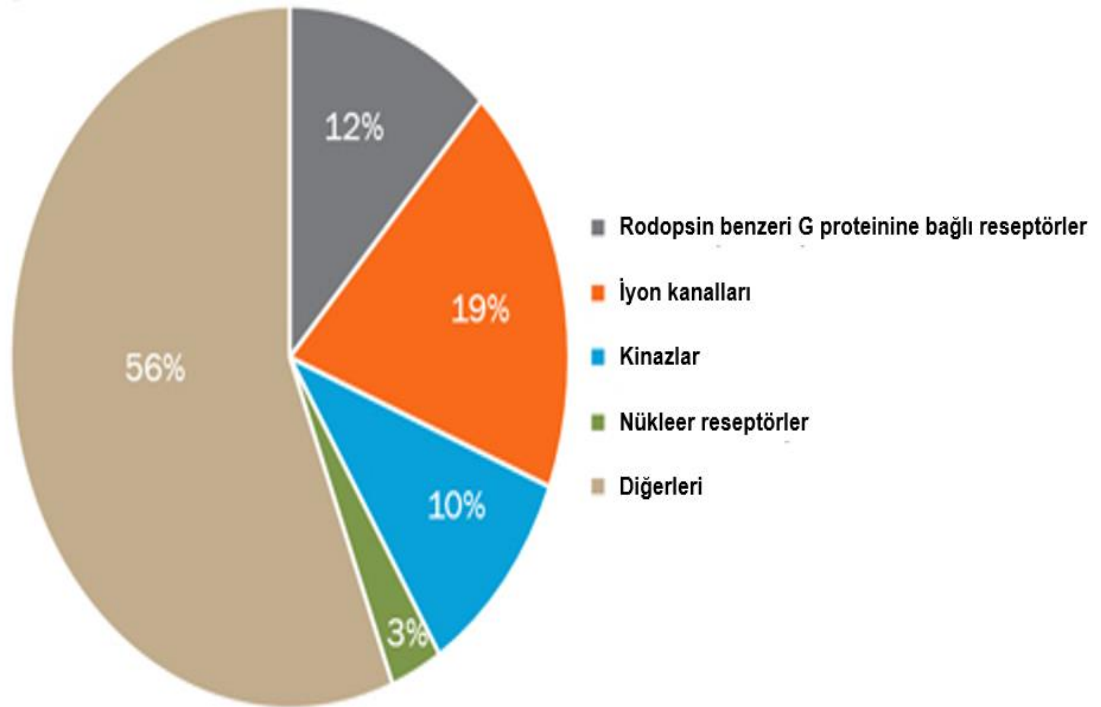
Günümüzde GBM’in ne ile bağlantısı olduğunu araştıran birçok çalışma olmasına rağmen tümör heterojenitesi ve karmaşıklığı sebebiyle GBM’lerin neden oluştukları konusu ve tedavideki etkili parametrelerin belirlenmesi hala sınırlı kalmaktadır. Birçok kanser türü gibi sporadik olduğunu belirtilen GBM’in, genetik ve çevresel risk faktörlerinin yanı sıra yaş, ırk ve cinsiyete göre görülme sıklığı değişmektedir (Thakkar vd., 2014). Ancak özellikle hastaların atopi ve alerji öyküsü, iyonize radyasyona maruziyeti GBM riskine potansiyel katkıda bulunmaktadır (Ostrom vd., 2014a).

2.4. GBM Tedavisi

GBM, MSS’nin birincil tümörüdür ve kötü prognoza sahiptir. GBM için iyileştirici bir tedavi seçeneği henüz mevcut değildir ve terapötik araştırmalara rağmen GBM teşhisi konan hastaların sağkalım oranı oldukça sınırlı kalmaktadır (Ostrom vd., 2016). Bu

terapötik araştırmalar genellikle tek bir protein hedeflerini belirlemeye yönelik olarak halen araştırılmaya ve geliştirilmeye devam etmektedir. Ancak çoğu durumda, hedeflenen bileşikler klinik öncesi çalışmalarda olumlu sonuçlar göstermelerine rağmen, insanlar üzerinde yapılan Faz III klinik deneylerinde başarısız olmuştur. Bu başarısız ilaç çalışmalarının; farmakokinetik özelliklerin zayıf olması, direnç yollarının ortaya çıkması, karmaşık tümör heterojenitesi ve klinik denemelerin yetersiz olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Bu nedenle, ileri tümör evrelerindeki başarısızlığı önlemek için preklinik aşamada potansiyel ilaçları belirlemek ve incelemek için etkili bir yaklaşıma ihtiyaç duyulmaktadır (Shergalis vd., 2018a).

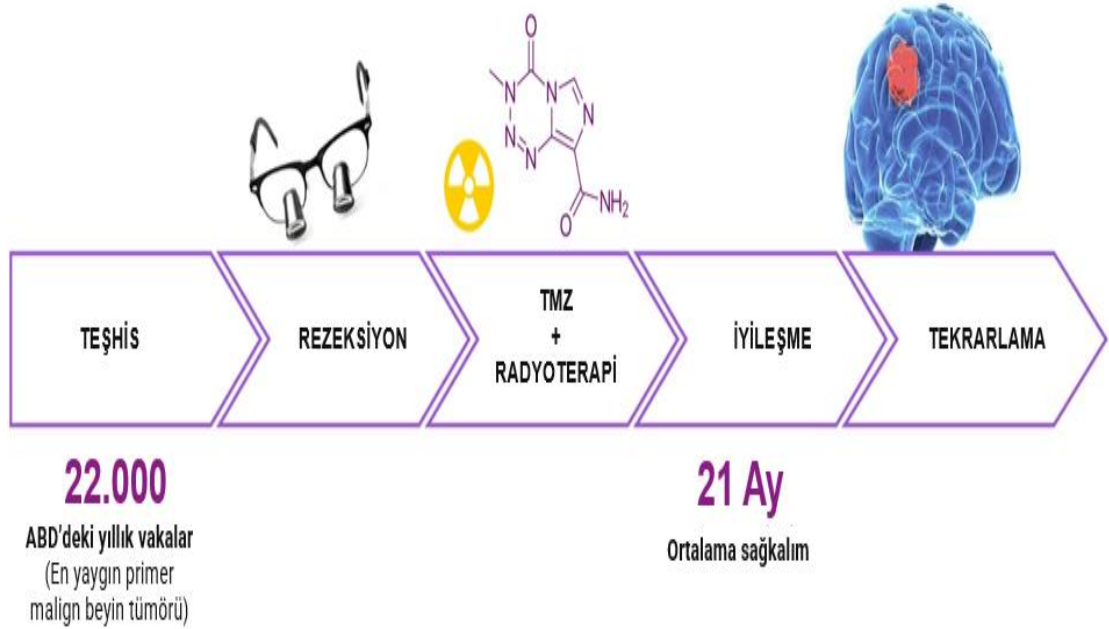
Hedefleri bilinen yaklaşık 1600 Gİİ onaylı ilaçların çoğu; Rodopsin benzeri G proteinine bağlı reseptörler (%33), iyon kanalları (%18), nükleer reseptörler (%16), kinazlar (%3) ve diğerleri (%30) olmak üzere dört sınıfa ait ilaçlardan oluşmaktadır (şekil 2.10.). Ancak yine de Gİİ onaylı çoğu ilacın hedefi ve etki mekanizması tam olarak hala belirlenememiştir (Santos vd., 2017).



şekil 2.10. Gıda ve İlaç İdaresi (Gİİ) tarafından onaylı protein ailelerini hedefleyen küçük molekülli ilaçların yüzdeleri gösterilmektedir (Santos vd., 2017).

Geliştirilmekte olan GBM tedavisindeki zorluğun çoğu, terapötik ilaç konsantrasyonlarının hedef bölgeye ulaşamamasıdır. Bu nedenle çok az ilaç molekülü beyne erişimini kısıtlayan KBB'yi geçebilmektedir. Ayrıca, MSS'nin karmaşık ve dinamik bir mikroçevreye sahip olması GBM için kullanılan mevcut kemoterapötiklerin etkinliğini azaltmaktadır (Bastiancich vd., 2021b). Tedavideki bu zorluklar nedeniyle hedef proteinin seçimi, geçirgenlik ve ilaç farmakokinetiği GBM ilaçlarının geliştirilmesinde oldukça önemlidir (Shergalis vd., 2018b).

Uzun yıllar boyunca GBM'nin standart tedavisi cerrahi rezeksiyonu takiben adjuvan radyoterapiden oluşmaktaydı. Ancak 2005 yılından itibaren günümüzde yeni teşhis edilmiş veya nüks meydana gelmiş GBM hastaları için standart tedavi, maksimum güvenli cerrahi rezeksiyonun ardından DNA hasarına neden olan kemoterapötik TMZ ve eş zamanlı olarak başlanan radyoterapiden oluşmaktadır (Şekil 2.11.). Bu kombine tedavinin GBM hastalarında ortalama sağkalımını, tek başına cerrahi rezeksiyona göre 3 kat arttırdığı bilinmektedir (Cha vd., 2020). GBM agresivitesi sebebiyle, nüks etme eğilimindedir ve tamamen tedavisi oldukça zordur (Duwa vd., 2019; Sales vd., 2022).



Şekil 2.11. GBM için uygulanan standart tedavi gösterilmektedir (The Ahmed Lab @ Northwestern. “GBM için güncel standart tedavi.” <https://www.ahmed-lab.org/resistance>. Son Erişim Tarihi: 21.05.2024).

Gen terapisi, anjiyogenez inhibisyonu ve immünoterapi içeren alternatif terapötik tedavi seçenekleri, GBM tedavisinde sınırlı düzeyde olsa da etkili olma potansiyeli göstermektedir. İlaçların terapötik etkinliğini arttırmak için dozlarının artırılması, normal hücrelere yönelik toksisiteyi arttırarak olumlu etkiyi azaltmaktadır. Ayrıca, GBM hastalarında yüksek seviyedeki genetik heterojenliğe karşı koymak için çoklu ilaç kombinasyonlarının uygulanması artan yan etki riski nedeniyle sınırlı kalmaktadır (Cha vd., 2020).

2.4.1. Cerrahi Rezeksiyon

Malign glioma için sitoredüktif cerrahi, lobektomilerden hemisferektomilere kadar yüzlerce yıldır uygulanmaktadır (Dandy, 1928). Cerrahinin amacı, oluşan tümör kitlesinin etkisini hafifletmek, histolojik ya da moleküler tanı için doku elde etmek ve nüksü geciktirmek için total veya subtotal cerrahi rezeksiyonu gerçekleştirmektir (R. M. Young vd., 2015). Ayrıca, cerrahi rezeksiyon, GBM hastalarında kafa içi basıncı azaltarak terapötik bir rol oynamakta ve tümör kitlesinin konumuna göre bazen bazı nörolojik işlevlerin iyileşmesini sağlamaktadır (Wilson vd., 2014a). Ancak tümör kitlesinin yaygın infiltratif doğası ve kitlenin çıkarılması sırasında hastanın konuşma yeteneğinde ya da motor fonksiyonlarında kalıcı olarak hasar oluşabileceği için, maksimum cerrahi rezeksiyon her zaman gerçekleşmemektedir (Duffau, 2016).

MRG kraniyotomi, kortikal haritalama, stereotaksik biyopsi ve floresans değerlendirmeler gibi cerrahi görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler, tümör kitlesinin sınırlarının tanımlanmasını kolaylaştırmakta ve maksimum güvenli cerrahi rezeksiyonu optimize etmeye yardımcı olmaktadır (Anton vd., 2012; Hoover vd., 2010; J. Perry vd., 2012a; Wilson vd., 2014b). Yapılan çok sayıda çalışma ile GBM hastalarında cerrahi rezeksiyonun, progresyonu iyileştirdiğini ve total rezeksiyon yapılan hastaların ortalama sağkalımını, subtotal rezeksiyon yapılanlara göre önemli ölçüde uzattığını ortaya koymaktadır (Davis, 2016a; McGirt vd., 2009).

2.4.2. Kemoradyasyon Tedavisi

Güvenli cerrahi rezeksiyonun ardından, hastaların kraniyotomi yaralarının iyileşmesi için yaklaşık 4 hafta beklenmektedir (Davis, 2016b). Postoperatif dönemden sonra malign gliomalı hastalarda standart adjuvan tedavi şekli radyoterapidir. Radyasyon tedavisinin

etkinliği 1970'lerde ortaya koyulmuş olup cerrahi rezeksiyon boşluğuna ve boşluğu çevreleyen beyin dokusunun 2 cm'lik bir kenarına fokal olarak fraksiyone eksternal ışın radyasyonu uygulanmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyon, çoğalan tümör hücrelerin DNA'sında tek ve çift zincir kırıklarına neden olduğu için genellikle hastalara 6 hafta boyunca 2 Gy, toplam 60 Gy radyasyon tedavisi verilmektedir (Leibel & Sheline, 1987; Shapiro vd., 1989).

Yaşlı GBM hastalarında hipofraksiyone radyoterapi (40 Gy/15 Fraksiyon), standart radyasyon tedavisine (60 Gy/30 Fraksiyon) uygun bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Benzer bir ortalama sağkalım sağlasa da, hipofraksiyone radyasyon tedavisinin daha az nörotoksisite ve steroid uygulaması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (OKADA vd., 2017). Ancak 2005 yılında yapılan önemli bir faz III çalışmasında, radyasyon tedavisine eş zamanlı olarak TMZ uygulanmasının, tek başına RT uygulanmasına kıyasla hastaların ortalama sağkalım süresini artırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada yeni teşhis edilmiş glioblastomalı toplam 573 hasta kaydedilmiş ve 5 yıllık genel sağkalım oranı kombine tedavi grubu için %9.8'ken, tek başına radyasyon tedavi grubu için %1.9 olduğu gösterilmiştir (Stupp vd., 2005b). Bu sonuçlar doğrultusunda, TMZ ve radyasyon tedavisinin kombine tedavisi, yaygın olarak yeni teşhis edilmiş glioblastomalı hastalar için günümüzde standart GBM tedavisi olarak kabul edilmektedir.

Günümüzde radyasyon ve TMZ'nin kombine tedavisi standart hale gelmesine rağmen, çoğu hastada nüks meydana gelmektedir. Nükslerin yaklaşık %80'i ışın alanının içerisinde ya da bu alanın kenarında meydana gelmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar nüksü geciktirmeye odaklanmaktadır (van Solinge vd., 2022). Bu nedenle, nüks sonucu kalan tümör hücrelerinin ya da mevcut tedaviye karşı oluşan direnci kırmak için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Radyasyon dozunun yoğunluğunu arttırmak ya da doz-yoğun rejimler gibi yaklaşımlarla TMZ kullanımının optimizasyonunu sağlamak, direnci kırmaya yönelik yaklaşımlardan birkaçıdır (J. Perry vd., 2012b).

Bevacizumab, TMZ dışında GBM tedavisi için daha önce denenmiş bir kemoterapötik ilaçtır. Hipoksinin glioblastoma biyolojisindeki potansiyel rolü göz önüne alındığında, anti-anjiyogenez tedavileri oldukça önemlidir. Ancak, Bevacizumab gibi ajanlarla uzun

sürekli tedavinin tümör hipoksisini artırabileceği ve daha infiltratif bir fenotip ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir ve daha kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Iwamoto vd., 2009). Bu nedenle, günümüzde GBM hastalarının tedavisi için TMZ kullanılmaktadır.

2.5. Temozolomid (TMZ)

Ticari adı Temodar veya Temodal olan Temozolomid, 20 yılı aşkın süredir yüksek dereceli malign gliomaların tedavisi için onaylanan TMZ, oral alkilleyici bir kemoterapötik ajandır (Agarwala & Kirkwood, 2000a). Hücrelerde DNA hasarına neden olmakta ve tümör hücrelerinin apoptozuna yol açan bir dizi olayı tetiklemektedir (Day & Waziri, 2012). TMZ'nin kimyasal yapısı ve farmakokinetik özellikleri nedeniyle mevcut birçok alkilleyici ajana göre belirli avantajlara sahiptir (Stevens vd., 1984). 194 daltonluk küçük moleküler ağırlığı ve lipofilik karakterde olması nedeniyle KBB'yi geçerek önemli konsantrasyonlarda etkili bir şekilde tümör hücrelerine ulaşmaktadır. Aynı zamanda düşük yan etkilerinin olması sebebiyle birincil beyin tümörlerinde oldukça etkilidir (Agarwala & Kirkwood, 2000b).

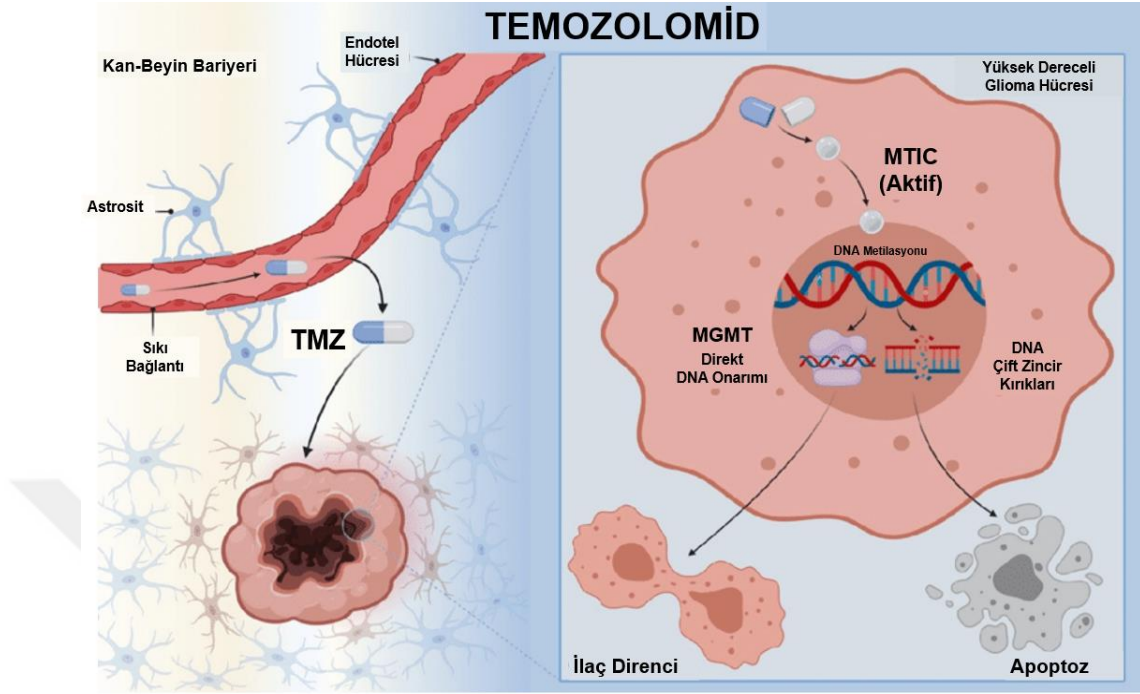
Maksimum TMZ konsantrasyonları, oral olarak alındıktan sonra 30 ile 90 dakika içinde sistemik dolaşımda etkisini göstermekte olup (Brada vd., 1999), beyin omurilik sıvısındaki (BOS) ilaç seviyelerinin, sistemik dolaşımda ölçülenlerin yaklaşık %20'sini oluşturduğu rapor edilmiştir (Ostermann vd., 2004). GBM tedavisinde kullanılan tek kemoterapötik olan TMZ, güçlü bir radyo hassaslaştırıcıdır ve yeni teşhis edilen GBM'li hastalar için kemoradyasyon tedavisinin önemli bir bileşenidir (Stupp vd., 2005c).

Onaylanmış klinikteki standart TMZ tedavisi, radyoterapi ile birlikte her 28 günlük döngüde 5 gün boyunca hastaların vücut yüzeyinin metrekaresi başına günlük 150 ile 200 mg'lık TMZ olacak şekildedir (Oronsky vd., 2021). Yedi haftaya kadar bu dozun 75 mg/m²/gün olması güvenlidir (Stupp vd., 2005d). Hastaların TMZ'ye bu düzeyde maruz kalmaları, DNA onarım enzimi olan MGMT seviyesinde azalışa neden olmaktadır. Tümör dokusundaki düşük MGMT seviyesi, nitrozüre bazlı adjuvan kemoterapi alan GBM'li hastaların daha uzun sağkalımla ilişkili olduğunu göstermiştir (Esteller vd., 2000).

2.5.1. TMZ Etki Mekanizması

TMZ gibi alkilleyici ajanlar, tekrarlayan yüksek dereceli gliomanın tedavisinde kullanılan birincil basamak kemoterapötik ajanlardır ve ayrıca ilerlemiş malign melanom hastalarında ve diğer katı neoplazilerin tedavisinde de kullanılmıştır (Bei vd., 2010). TMZ imidazotetrazinler olarak bilinen alkilleyici ajan sınıfına aittir. Bu bileşikler bir imidazol halkası içermekte ve yapısal/işlevsel olarak triazen alt grubunun bir üyesi olan DTIC'ye (Dimetil Triazeno İmidazol Karboksamid) benzemektedir (Newlands vd., 1997a). Midenin asidik pH'ında oldukça stabil olan TMZ, kanın ve dokuların hafif bazik pH'ı ile temas halinde olduğunda, kendiliğinden aktif metaboliti olan MTIC'e [5-(3-dimetil-1-triazenil) imidazol-4-karboksamid] hidrolize edilmekte ve bu metabolit de hızla reaktif metildiazonyum iyonunu oluşturmak üzere parçalanmaktadır (Newlands vd., 1997b). MTIC'in parçalanmasıyla oluşan metildiazonyum iyonu öncelikle DNA molekülündeki guanin nükleotitlerini metile etmekte ve bunun sonucunda da O6- ve N7- metilguanin oluşmaktadır (Şekil 2.12.).

TMZ ve DTIC'nin sitotoksik etkilerinden temel olarak O6- metilguanin oluşumu sorumludur. TMZ, DNA'yı O-6, N-3 ve N-7 pozisyonlarında metile ederek DNA zincir kırıklıklarına yol açmaktadır (Fan vd., 2013). Bu bağlamda TMZ'nin birincil sitotoksik hedefi çoğunlukla O-6-metilguanindir. O-6-metilguanine eklenen metil gruplarını uzaklaştırma işlevi ise DNA onarım proteini olan MGMT tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu metil grubunun çıkarılması ve hasarın onarılması, hücreleri DNA'ya zarar veren etkilerinden koruyarak tümör hücrelerinin TMZ'ye ve diğer alkile edici kemoterapötik ajanlara karşı direncini sağlamaktadır (Kaina vd., 2007; Villalva vd., 2012). Aksine, metillenmemiş MGMT enzimi, MGMT'nin yüksek, TMZ'nin ise düşük aktivitesine neden olmaktadır. Bu nedenle, metillenmiş MGMT GBM hastaları için olumlu bir prognostik faktördür (Pandith vd., 2018).



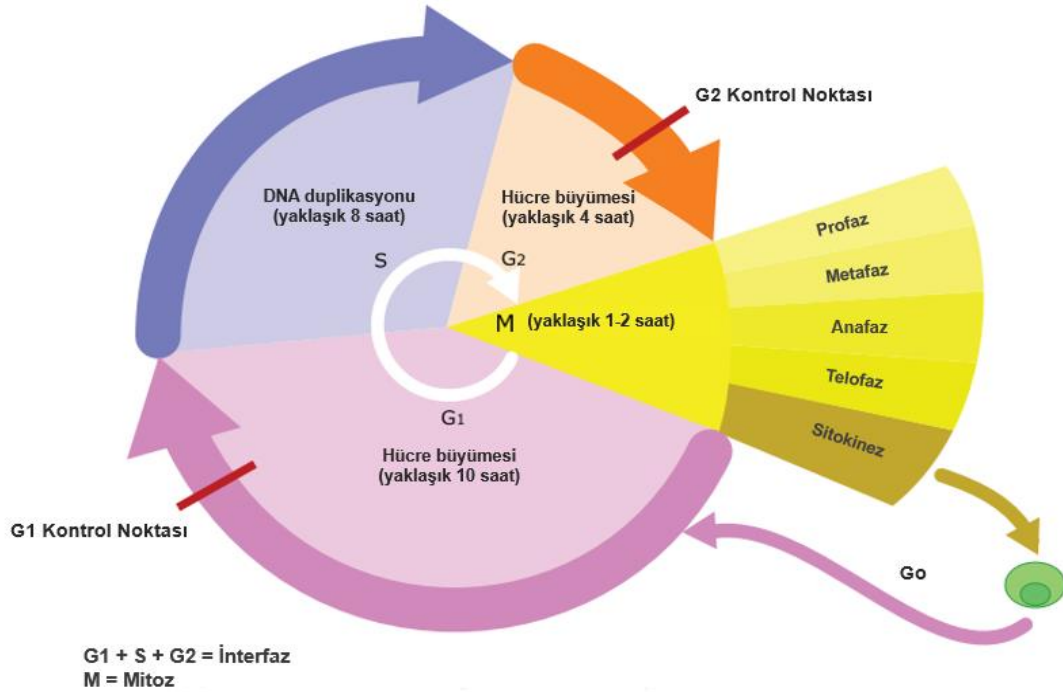
2.12. Temozolomid'in aktif metaboliti olan MTIC'in hücre içerisine girişi ve etki mekanizması sonucu tümör hücrelerin apoptoza yönlendirilmesi gösterilmektedir (Giotta Lucifero & Luzzi, 2021).

GBM tedavisindeki en büyük zorluklardan biri, hastaların TMZ'ye karşı direnç geliştirmesidir. TMZ ve diğer kemoterapötik ilaçlar, tümörün gelişimini engelleyen etkilerini, DNA'ya zarar vererek ve programlanmış hücre ölümüne neden olarak göstermektedirler. TMZ'ye dirençli tümör hücrelerinde DNA onarım mekanizmaları genellikle bozulmaktadır. Bu nedenle tümör hücreleri alternatif onarım yollarıyla TMZ'nin neden olduğu lezyonları ortadan kaldırmaktadırlar (Lee, 2016). DNA onarım aktivitesi sitotoksik kemoterapötik ilaçlara karşı duyarlılığı etkileyebilmektedir. Araştırmalar, GBM'de TMZ direncinin ana nedeninin, MGMT'nin aşırı aktif hale gelmesi ve TMZ kaynaklı alkilasyonun farklı nükleotitlerden çıkarılması olduğunu göstermektedir. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalar, gliomalarda TMZ direncine neden olan tek faktörün MGMT'nin aşırı ekspresyonunun olmadığını, MGMT'den bağımsız olarak başka birçok yolun da TMZ direncine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. DNA onarım yollarının hiperaktivasyonu, ilaç akışındaki artış, yüksek anti-apoptotik potansiyel ve glioma kök hücrelerinin ortaya çıkışı, TMZ direncinde MGMT'nin aşırı ekspresyonunu tamamlamaktadır (Tomar vd., 2021). Bu nedenle, direnci belirleyen heterojen hücre grupları ve dirence neden olan mekanizmaların aydınlatılması oldukça önemlidir.

2.6. Hücre Siklusu

Kanser, çevresel ve kalıtsal etkenlere bağlı olarak oluşan metabolik ve kompleks bir olay olarak kabul edilmektedir. Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelere göre daha hızlı ve kontrolsüz çoğalmaya yönelik metabolize olmaktadır (Lin vd., 2022). Bu nedenle hücre siklusu, genetik bilginin bir hücre neslinden diğerine kopyalanması ve aktarılmasıyla sonuçlanan oldukça düzenli bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Israels & Israels, 2000a). Kanser oluşumunda ve ilerlemesinde önemli rol oynayan siklus, normal hücrelerde; kontrol noktaları proteinleri, onkogenler, tümör baskılayıcı genler, siklin ve sikline bağımlı kinazların görev alması sebebiyle düzenli bir şekilde gerçekleşmektedir. Kanser hücrelerinde ise siklusunun düzensizleşmesi, siklusun kontrolünde görevli olan bu proteinlerin kaybı ve sinyal yollarındaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Elizabeth S Wenzel, 2018).

Hücre siklusu, hücrelerin genetik materyalini çoğalttığı ve ardışık olarak bölünmeler geçirdiği mitotik bir periyottur. Ardışık olarak G1, S ve G2 fazlarından oluşan interfaz evresi ile M (mitoz) fazından oluşmaktadır (Elizabeth S Wenzel, 2018) (Şekil 2.13.).



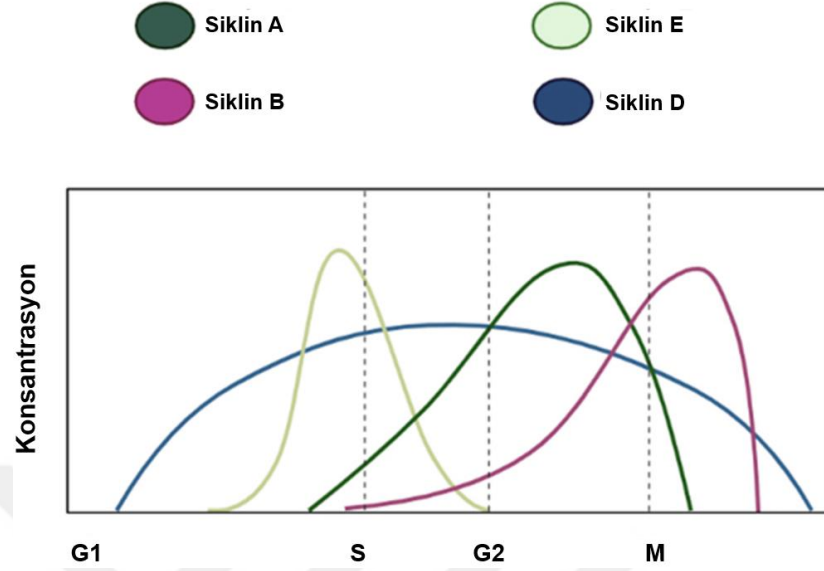
Şekil 2.13. Hücre siklusu fazları ve kontrol noktaları gösterilmektedir (Brain Kart, t.y.).

G1 fazı, önceki bir bölünmenin sitokinezinin sonu ile S fazının başlangıcı arasındaki dönemdir ve hücrenin DNA replikasyonu için hazırlık amacıyla büyüdüğü, aynı zamanda bir bölünmenin gerçekleşip gerçekleşmeyeceğine karar verildiği aşamadır. Bu aşamada hücre tekrar bölünecek ya da dinlenme evresi olan Go'a dönecektir (Schafer, 1998). Bu nedenle G1 fazı sırasında hücre, hücre dışı mitojenler ve büyüme faktörleri tarafından uyarılmaya maruz kalmakta ve bu uyarılara yanıt olarak hücre bölünmek üzere G1'den S fazına geçmektedir (Israels & Israels, 2000b). S fazında DNA replikasyonu meydana gelmekte ve her kromozom kopyalanarak iki kardeş kromatit halini almaktadır. G2, S fazının sonu ile mitozun başlangıcı arasındaki dönemi ifade etmektedir. Bu dönemde, mitoz için gerekli olan RNA ve proteinler gibi moleküller sentezlenmektedir (Baserga, 1962). M fazı ise profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere beş aşamaya ayrılarak sitokinezle sona ermektedir. Hücre siklusunun sorunsuz sonuçlanması durumunda genetik olarak özdeş hücreler meydana gelmektedir (Liang vd., 2023).

Siklusa fazların düzenli olarak geçişi, hücrelerin hatasız oluşması için önemlidir. Siklusun düzenlenmesinin temeli, bir sonraki faza geçmeden önce her fazdaki olayların tamamlanmasıdır. Bu bağlamda mutasyona uğramış veya hasar görmüş hücrelerin ilerlemesini/yayılmasını önlemek için bulunan DNA'nın bütünlüğünü izlemeye yönelik kontrol noktaları yer almaktadır. Ayrıca esas olarak aktif formundayken kompleks oluşturan siklin proteinleri ve siklin bağımlı kinaz (CDK)'lar da bulunmaktadır. CDK'lar aktive edildiğinde çeşitli hücresel proteinlerin fosforillenmesi sonucu, siklus düzgün bir şekilde ilerlemektedir (Teixeira & Reed, 2013).

2.6.1. Siklin ve Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK'lar)

Siklus boyunca siklin proteinlerinin sistematik sentezi ve yok edilmesinin bir sonucu olarak, CDK'lar hücre siklusu içinde yalnızca belirli zamanlarda etkin halde bulunmaktadır. Bu durum, hücre siklusunun düzenlenmesinde anahtar bir faktördür. Her bir siklin, farklı bir CDK ile kompleks oluşturmaktadır ve her bir siklin seviyesi siklus aşamaları içerisinde bağımsız olarak artış veya azalış göstermektedir (Israels & Israels, 2000c; Malumbres & Barbacid, 2009) (Şekil 2.14.).



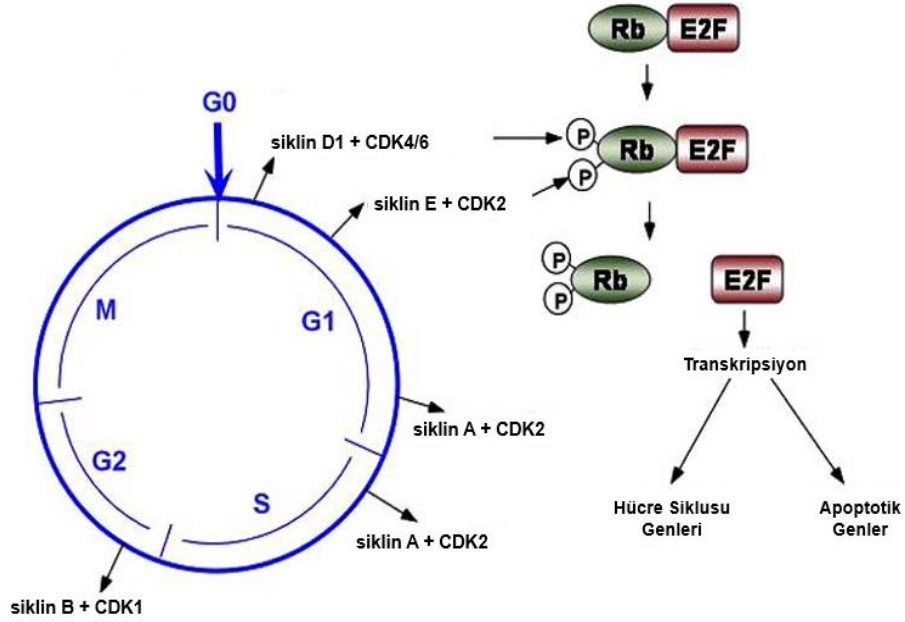
Şekil 2.14. Hücre siklusunda yer alan siklinler ve siklus aşamaları sırasındaki seviye değişimleri gösterilmektedir (Manzoor Ahmad Mir & Burhan Ul Haq, 2023).

CDK'ların aktivitesi, siklinlerle oluşturdukları yapı ve yan gruplarındaki değişiklik gösteren serin/treonin protein kinaz gruplarına bağlıdır. Yaklaşık 30-40 kDa ağırlığında olan bu heterodimerik kompleks yapı, siklusta önemli bir enzim ailesini oluşturmakta ve farklı substratların fosforillenmesini sağlayarak transkripsiyon ile birlikte hücre siklusunun düzenlenmesini sağlamaktadır (Malumbres & Barbacid, 2005). Ayrıca CDK'ların, metabolizma ve programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz gibi birçok önemli süreçte de yer aldığı bilinmektedir (Łukasik vd., 2021).

Siklus G1 fazında D siklinlerin (D1, D2 ve D3) ekspresyonunun artmasıyla başlamaktadır. D siklinler, interfaz sırasında düzenlemeye dahil olan CDK'lardan (CDK2, CDK4 ve CDK6) özellikle CDK4 ve CDK6 ile kompleks oluşturmaktadır (Malumbres & Barbacid, 2009). Siklin/CDK komplekslerinin oluşumu CDK'ların fosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanmakta ve hücrelerin G1 fazı boyunca ilerlemesini, G1/S fazına geçişini desteklemektedir (X. Huang vd., 2012; Israels & Israels, 2000d).

Oluşan CDK4/6 + siklin D kompleksinin siklustaki ilk hedefi RB proteindir ve G1 fazı sırasında ortamda birikerek RB'yi fosforile etmektedir. RB proteini, G1 ilerlemesinin düzenlenmesinde kritik bir etkiye sahiptir; genomik bir hasar durumunda hücre siklusu gecikebilir veya durdurulabilir (Gousias vd., 2022).

Siklusta yer alan E2F'ler ise DNA ile kompleks oluşturmakta ve fosforile edilmemiş RB ile bağlı halde bulunarak transkripsiyonu inhibe etmektedir. CDK4/6 + siklin D kompleksi tarafından fosforile edilerek inaktif hale gelen RB, E2F transkripsiyon faktöründen ayrılarak siklin E'yi ve hücrenin S fazına geçmesinde görevli olan hedef genlerin transkripsiyonunu tetiklemektedir (Leal-Esteban & Fajas, 2020) (Şekil 2.15.). RB, siklusun geri kalan fazları boyunca hiperfosforile halde bulunmaktadır ve hücrenin S, G2 ve M yoluyla yönlendirilmesine katkı sağlamaktadır. pRB fonksiyonlarının kaybı, hücre siklusu düzensizliğine neden olmaktadır. Dolayısıyla malign bir fenotipe yol açabilir. Oluşabilecek kromozomal mutasyonlar yoluyla gen inaktivasyonu, retinoblastoma tümör gelişiminin temel nedenlerinden biri olarak bilinmektedir (Giacinti & Giordano, 2006).



Şekil 2.15. Hücre siklusu ve E2F'nin aktivasyonu gösterilmektedir. G1 sırasında Siklin D1 + CDK4/6 ve Siklin E + CDK2, Retinoblastoma (RB) proteinlerini fosforile ederek E2F'nin ayrılmasına neden olmaktadır. E2F hücre siklusunun ilerlemesini, DNA onarım ve apoptozu kontrol eden genleri indüklemektedir (D'Mello & Chin, 2005).

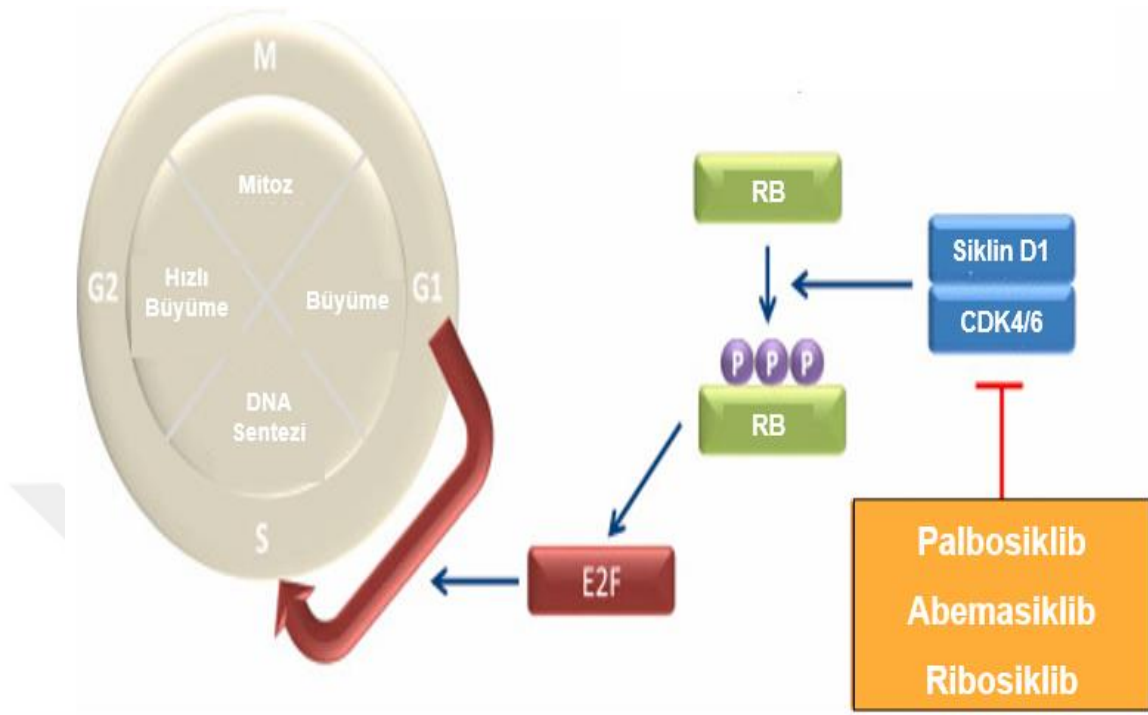
Son zamanlarda yapılan çalışmalar CDK4/6'nın seçici farmakolojik inhibitörlerinin, çeşitli kanserlerin tedavisi için büyük umut vaat ettiğini ortaya koymaktadır. Temel olarak CDK4/6 inhibitör aktivitesinin mekanizması: RB fosforilasyonunun baskılanması, G1 hücre siklusunun durdurulması ve tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektir (Goel vd., 2018).

2.7. CDK4/6 İnhibitörleri

Memeli hücrelerinde hücre siklusunun kontrolü, CDK'ların (CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6) ve bunların temel aktive edici koenzimleri olan siklinlerin (siklin A, siklin B, siklin D ve siklin E) aktivitesi ile düzenlenmektedir (Kim & Zhao, 2005). Kanseri çalışmalarında, siklin/CDK kompleksleri aracılığıyla, hücre siklusunun ilerlemesi ve sürecin sıklıkla bozulması sebebiyle CDK inhibitörleri önemli bir hedef haline gelmektedir (Tripathy vd., 2017a). Hücre siklusunda yer alan siklin D + CDK4/6 kompleksi aracılığıyla aktive edilen RB-E2F yolunun önemini gösteren klinik öncesi çalışmalar, birinci nesil geniş etkili CDK inhibitörlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Asghar vd., 2015). Bu tip inhibitörler arasında klinik denemelere giren ilk inhibitör Flavopiridol'dur. Ancak yapılan klinik çalışmalar zayıf etkinliği, karmaşık farmakokinetiği, hedef dışı etkilerden dolayı ve doz sınırlayıcı toksisite göstermesi sebebiyle kullanımı kısıtlanmıştır (Dickson, 2014). Ayrıca, Flavopiridol tek bir ajan olarak az aktivite gösterirken; kemoterapi ile kombinasyon halinde orta derecede aktivite gösterdiği de bilinmektedir (Fornier vd., 2007).

Yapılan çalışmalar sonucunda ikinci nesil CDK inhibitörleri geliştirilmiştir. Bu inhibitörlerin, özellikle CDK1 ve CDK2'nin seçici inhibisyonunu ve/veya etki gücünün arttığı ortaya konmuştur. CDK1, CDK2, CDK5 ve CDK9 inhibitörü olarak bilinen Dinaciclib ise klinikte kapsamlı olarak çalışılmaktaydı ancak faz I ve faz II denemelerinde hastaların %74'ünde ciddi yan etkilere sebep olması nedeniyle sınırlı etkinlik göstermiştir (Mita vd., 2014; Nemunaitis vd., 2013; Stephenson vd., 2014).

Son olarak ortaya çıkan ve kullanımı onaylanmış yeni nesil CDK inhibitörleri, oral uygulama avantajının yanı sıra, özellikle CDK4 ve CDK6'yı hedef alarak çok daha yüksek bir seçicilik göstermektedir (Fry vd., 2004). Şu ana kadar CDK4/6 için üç seçici inhibitör geliştirilmiştir ve bunlar; Ribosiklib (LEE011; Novartis tarafından geliştirilmiştir.), Palbosiklib (Ibrance; Pfizer tarafından geliştirilmiştir.) ve Abemaciclib (LY-2835219; Eli Lilly tarafından geliştirilmiştir.)'dir. Her üç inhibitör de klinik öncesi ve klinik denemelerden geçmiş ve geliştirme aşamasındadır. Ayrıca, ER⁺ HER2⁻ ileri evre metastatik meme kanseri tedavisinde kullanımı Gİİ tarafından onaylanmıştır (Corona & Generali, 2018c) (Şekil 2.16.).



2.16. Palbosiklib, Abemasiklib ve Ribosiklib'in; RB'nin fosforilasyonundan ve inhibisyonundan sorumlu olan CDK4/6 + Siklin D1 kompleksini inhibe etmesi gösterilmektedir. RB fosforile olduğunda normal hücreler, hücre döngüsünde G1'den S fazına ilerlemekte ve DNA'sını kopyalayarak mitozla hazırlanmaktadır (Corona & Generali, 2018d; Loibl & Furlanetto, 2022'den uyarlanmıştır.).

Palbosiklib'in Letrozol veya Fulvestrant ile kombine edilmesi, HR⁺ ilerlemiş meme kanseri hastalarında etkinlik göstermiş olup; bu kombinasyonun kullanımı ABD'de ve Avrupa'da onay almıştır (Kwapisz, 2017).

Abemasiklib, HR⁺ ilerlemiş meme kanseri hastalarında tek bir ilaç olarak ve endokrin tedavileriyle kombinasyon şeklinde etkinlik göstermiştir. 2015 yılında ise dirençli hormon reseptör pozitif (HR⁺) ilerlemiş meme kanseri hastaları için GII "çığır açan tedavi" tanımlaması ile faz III gelişimine girmesine onay vermiştir (Beeram vd., 2016; Dickler vd., 2016).

Ribosiklib ise seçici bir CDK4/6 inhibitörüdür ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 negatif (HER2⁻) ve HR⁺ için Mart 2017'de Letrozol ile kombinasyon halinde GII tarafından onayını almıştır (Tripathy vd., 2017b). Ayrıca, farklı kanser türlerinde pre-klinik ve klinik deneme çalışmaları halen devam etmektedir.

2.7.1. Ribosiklib

Ribosiklib (LEE011), ana aktif metaboliti LEQ803 olan, oral olarak alınan ve Gİİ tarafından onaylanan, küçük moleküllü seçici bir CDK4/6 inhibitörüdür (Rader vd., 2013). Klinik öncesi tümör modellerinde Ribosiklib, RB'nin tam fosforilasyonunu indüklemekte ve G1 tutuklanması yoluyla hücre büyümesini inhibe etmektedir. Siklin D1 translokasyonu gibi CDK4/6 aktivitesini artıran anormallikleri içeren kanserlerde aktif olarak kullanılmaktadır. Ribosiklib'in, KRAS'ın aktive edici mutasyonları ve PTEN'in inaktivasyonu gibi üst kontrolde yer alan onkogenler tarafından uyarılan pRB⁺ kanserlerde, anti-tümör aktivite gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca, faz III MONALEESA-2 çalışmasıyla da, aromataz inhibitörüyle kombinasyon halinde HR⁺/HER2⁻ ilerlemiş meme kanseri hastalarında birinci basamak tedavi için etkinliği değerlendirilmiştir (Samant vd., 2018; Wong vd., 2018b).

Ribosiklib, Letrozol ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolu inhibitörleriyle kombinasyon halinde çeşitli çalışmalarda da değerlendirilmektedir. Bu çalışmalarda ER⁺ meme kanseri hastalarında anti-tümör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Hortobagyi vd., 2016). Ribosiklib için önerilen başlangıç dozu üç hafta boyunca günde 600 mg olarak belirlenmiştir. Ancak üç hafta sonunda bir hafta tedaviye ara verilmektedir.

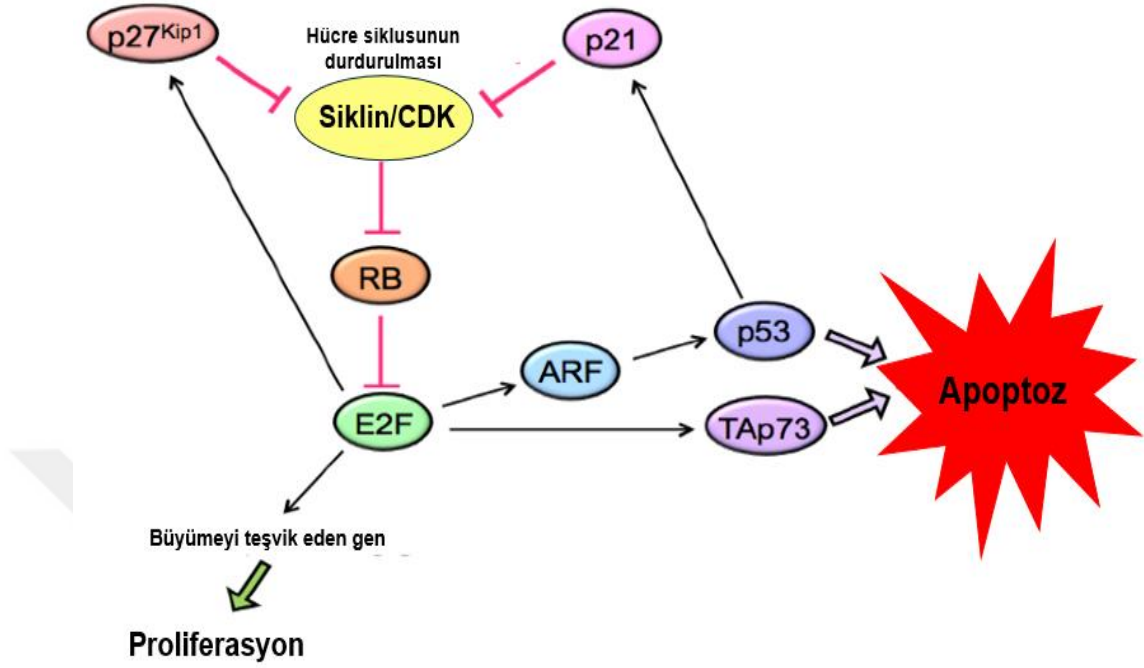
2.8. Kanser Onkogenleri ve Tümör Baskılayıcılar

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, hücre siklusunun özellikle de kontrol noktasında yer alan p53 ve pRB yolaklarının düzenlenmesinde büyük bir rol oynamaktadır. Tümör baskılayıcı bir protein olan p53, G1 fazı sırasında yanlış eşleşmeler ve tek zincirli DNA gibi DNA hasarına yanıt vererek, pRB'yi fosforile etmek için gerekli CDK'ların aktivasyonunu inhibe eden p21 proteininin transkripsiyonunu başlatmaktadır (Nataraj vd., 1995). Ayrıca, p53 proteini, onarılamaz hasar durumlarında apoptozda da oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Clarke vd., 1994). p53 proteininde meydana gelen mutasyonlar, kanser hastalarında son derece yaygın olarak görülmektedir ve p21 transkripsiyonunun eksikliği nedeniyle G1 fazının işlevsiz hale gelmesine veya hücre siklusunun duraklamasına yol açmaktadır. G1 fazındaki p53'un bu durumu, p53-eksik transgenik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, DNA hasarıyla karşılaştıklarında, G1 sırasındaki hücrelerin duraklamamasıyla gösterilmiştir (Yao vd., 1996).

pRB, bir başka tümör baskılayıcıdır ve G1 fazının kontrol noktasında yer alan CDK'ların (CDK2, CDK4 ve CDK6) hedefi olarak bilinmektedir (Malumbres & Barbacid, 2001; Zetterberg vd., 1995). Hasarlı pRB, E2F'ye bağlanma eksikliği ile sonuçlanmaktadır ve bu da bu tür proteinlerin düzenleme olmadan kontrolsüz olarak kopyalanmasına ve hücrenin siklus boyunca bu şekilde ilerlemesine neden olmaktadır (Arroyo & Raychaudhuri, 1992).

p53'ün yapısal bir homoloğu olarak tanımlanan ve yine tümör baskılayıcı gen olarak bilinen TAp73 ise nadiren mutasyona uğramaktadır (Flores vd., 2005). Meme, mesane ve prostat gibi çeşitli kanserlerde aşırı ekspre olduğu bilinen TAp73'ün, özellikle lösemi ve lenfomalarda, ekspresyonu azalmakta ve bu da tümör baskılayıcı bir rol oynadığını göstermektedir (Coates, 2006; Jiang vd., 2013). Ayrıca, 2006 yılında yapılan bir çalışmada, ilk kez kolorektal kanserde, TAp73 izoformlarının yukarı regülasyonu ile ileri tümör evresinde kötü prognoz arasında bir ilişki olduğu gösterilmiş olup, sonuçların klinik prognostik değere sahip olabileceği vurgulanmıştır (Domínguez vd., 2006).

TAp73'ün hücredeki ana işlevi, p53'ten bağımsız olarak tümör hücrelerini apoptoza yönlendirmek, kısmen hücre siklusunun durdurulmasını ve genomik kararlılığın düzenlenmesini sağlamaktır (Amelio vd., 2014; CATANI vd., 2002) (Şekil 2.17.).



Şekil 2.17. TAp73'ün E2F aracılı, p53'ten bağımsız apoptoz yoluğı gösterilmektedir (Ozono vd., 2013).

Yukarıda bahsedilen yolakta, p53'ün bu yolak üzerindeki etkinliğinin p21'i indükleyerek farklı bir açıdan siklin/CDK inhibisyonunu sağlayabileceğı gösterilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmamda, U87MG hücre hattında; “p53 ve TAp73 aktive olarak hücreleri apoptoza yönlendirir.” fikrinden yola çıkarak kurgulanmıştır. Bu doğrultuda p53'ün aktive olması, p21'in etkinliğini sorgulatacak ve p21'in siklin/CDK inhibisyonunu sağlayabileceğı fikrini de destekleyecektir. Bu yolak tam olarak, hücre siklusunun durmasını sağlayacak ya da hücrelerde DNA hasarı oluşturarak, apoptozu tetikleyecektir. Edindiğimiz bilgilerden yola çıkarak “Ribosiklib'in, TMZ ve radyoterapi ile kombinasyonu, U87MG hücrelerinde, hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreleri apoptoza yönlendirir.” hipotezini kurguladığımız bu çalışmada: bu kombine etkinin hücre sağkalımı, hücre siklusu ve apoptotik açıdan ise CDK4/6 inhibisyonunun alt yolları nasıl etkilediğinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Hipotezimiz doğrultusunda kapsamlı olarak *in vitro* deneylerle kurguladığımız bu proje, literatürde yer alan çalışmaların çok daha kapsamlı bir devamı niteliğindedir. Elde edilecek her veri GBM tedavisinde tümörün patolojik seyrini yavaşlatabilmek ve hasta sağkalım süresini uzatabilmek için atılmış önemli adımlar olacağı düşüncesindeyiz.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Klinikte, GBM hastalarında tedavi seçeneği olarak tanı konulduktan hemen sonra, radyoterapi ve TMZ tedavisi birlikte uygulanmaktadır. Ancak kısa bir zaman sonra hastalar TMZ'ye karşı direnç gösterme eğiliminde olduklarından, klinikte tedavi süreci giderek zorlaşmaktadır. Bu sebeple çalışmamız, kliniğin çıkmaza girdiği bu noktada, TMZ ve radyoterapi tedavisine ek olarak; Ribosiklib uygulanmasıyla apoptotik yolların değerlendirilmesi ve hücre siklusunun durmasına yönelik bilgilerin aydınlatılmasını içermektedir.

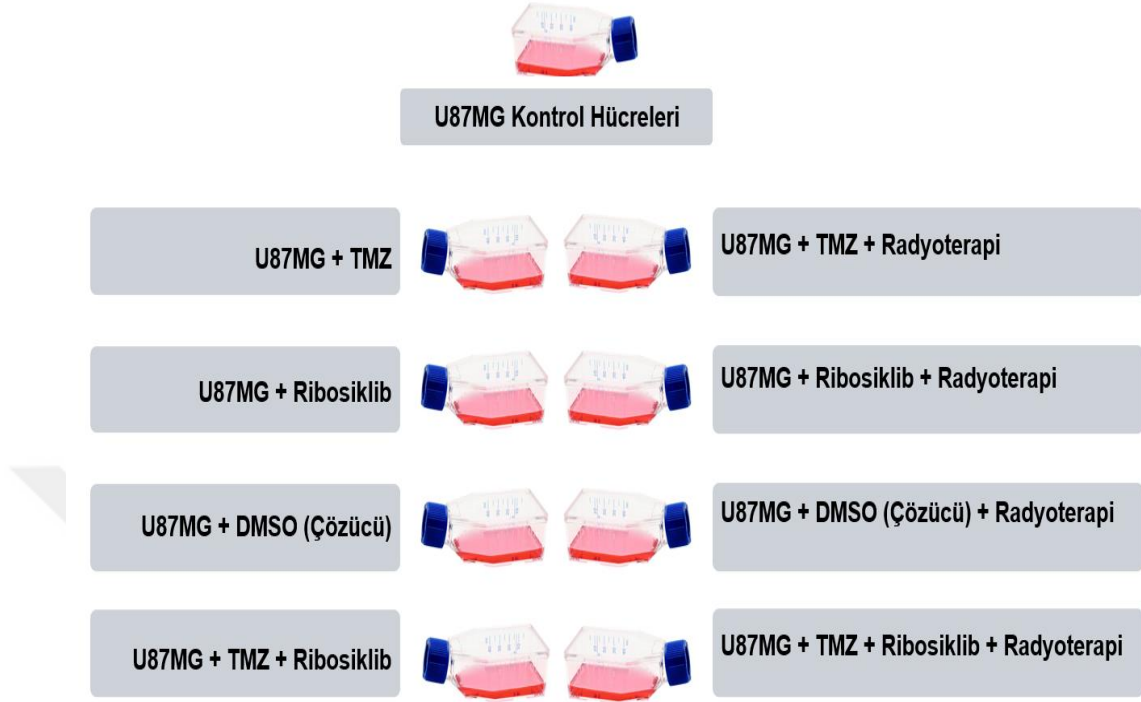
Tez çalışmasında yer alan tüm iş paketleri *in vitro* deneylerden oluşmaktadır ve bu deneyler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmanın deney kısmında TMZ'ye direnç geliştirmemiş, duyarlı GBM hücre hattı olan U87MG kullanılmış olup; bu hücre hattı Dr. Tuğba BAĞCI ÖNDER'den (Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin Kanseri Terapi ve Araştırma Merkezi) temin edilmiştir.

TMZ duyarlı U87MG, insan glioblastoma hücre hattıdır ve 1966 yılında 44 yaşında bir kadın hastanın beyin epitelyal karsinoma dokusundan kültüre edilerek üretilmiştir (Pokorná vd., 2021). Bu sebeple bu hücre hattı tedavi öncesi hastaları taklit etmek üzere seçilmiştir ve deney gruplarımız bunun üzerine kurgulanmıştır.

Deney gruplarımız: U87MG hücrelerine herhangi bir ajanın uygulanmadığı kontrol grubundan, TMZ ve Ribosiklib'in bireysel ve kombine olarak uygulandığı ilaç gruplarından ve TMZ ve Ribosiklib'in çözücüsü olan DMSO grubundan oluşmaktadır. Kliniği taklit etmek amacıyla deney gruplarımıza radyoterapi uygulamasının yapıldığı gruplar da eklenmiştir. Tüm deney grupları Şekil 3.1'de belirtildiği gibi oluşturulmuştur.



Şekil 3.1. Çalışmada planlanan deney grupları gösterilmektedir. Deney grupları arasında Ribosiklib ve TMZ'nin çözücüsü olan DMSO grubu da yer almaktadır. DMSO grubunun eklenmesi ile Ribosiklib ve TMZ'nin hücreler üzerindeki etkinliğinin çözücünden kaynaklı olma durumunu ortadan kaldırılmak amaçlanmıştır.

3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1. U87MG Hücrelerinin Deneye Hazırlanması

Çalışmanın hücre kültürü deneyleri kapsamında U87MG hücreleri %10'luk FBS (fötal sığır serumu) (Gibco, #10270-106), %1 penisilin/streptomisin (Thermo Fisher, #15140122) ve %2 glutamin ile desteklenmiş DMEM (Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyum) (Thermo; #11965092) hücre medyumunda, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ koşullarındaki steril etüvde inkübe edilerek çoğaltıldı. Hücreler %70 konfluensiye ulaştıktan sonra kültür tabaklarındaki medyumları uzaklaştırıldı ve petriye yapışan hücrelerin petriden ayrılmasını sağlamak için hücre yoğunluğuna göre yaklaşık 2-4 ml tripsin-EDTA (etilendiamin tetra asetik asit) karışımından (%0.25 tripsin, %0.03 EDTA (1X)) (Gibco, #25200-056) eklenerek hücreler inkübatörde 3-5 dakika tripsin-EDTA solüsyonunda bekletildi. Ardından hücreler mikroskopla kontrol edilerek, tüm hücrelerin kalktıkları kontrol edildi. Takiben tripsinizasyon aktivasyonunu durdurmak için petri kabına eklenen tripsin-EDTA'nın, 2 katı kadar (4-8 ml) olacak şekilde %10'luk FBS içeren DMEM medyum eklendi. Petri kabındaki hücreler ve medyum toplanarak falkona

alındı. Falkon, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve hücrelerin falkonun dibine çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant kısmı atıldı ve dipte kalan hücre pelleti pasajlama, dondurma ve hücre bölme gibi işlemler için kullanıldı.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

U87MG hücrelerinin pasajlanma oranları hücre yoğunluğuna göre 1:2 veya 1:3 olarak belirlendi. Kültür tabaklarının yoğunluğuna göre tripsinizasyon işlemi sonrası santrifüj edilen hücrelerin üstteki süpernatant kısmının atılmasının ardından falkon içerisine 10 ml %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri eklendi. Pipetaj yapılarak hücrelerin medyum içerisinde homojenize bir şekilde dağılması sağlandı. Takiben bu süspansiyondan 1 ml alınarak yeni petri kabına aktarıldı. Üzerine petri kabının tabanını kaplayacak şekilde yaklaşık 7-9 ml besiyeri eklendi ve günün tarihi/pasaj no yazılarak inkübatöre kaldırıldı. Hücreler, proliferasyon hızlarına bağlı olarak belirli aralıklarla mikroskopta kontrol edildi ve hücrelerin proliferasyon hızlarına bağlı olarak 3-4 günde bir pasajlama işlemine devam edildi. Yapılan her pasajlama işlemi sonrası canlı/ölü hücreler ve hücrelerin morfolojileri kontrol edildi.

3.2.3. Hücrelerin Dondurulması

U87MG hücrelerinde yaşanabilecek olası bir kontaminasyon sorunu için ve deneylerin devamlılığının sağlanması için kriyo tüpler içerisinde -80 °C'de saklandı. Bu işlem için öncesinde %95 DMEM ve %5 DMSO içeren dondurma medyum hazırlandı. Hazırlanan medyum folyo ile sarılarak DMSO içermesinden dolayı karanlıkta çalışıldı. Kültür tabaklarında yoğun bulunan ve pasajlanmayacak ya da stoklanmak üzere kaldırılacak hücreler, tripsinizasyon işlemi sonrası falkon içine toplanarak 1500 rpm'da 5 dakika santrifüj edildi. Böylece, süpernatant kısmının ayrışması sağlandı. Süpernatant kısmının atılmasını takiben falkon içerisine dondurma medyum eklenerek, iyice pipetaj yapıp hücrelerin homojen dağılması sağlandı. Elde edilen homojenize süspansiyondan 1-1.5 ml alınarak kriyo tüplere aktarıldı. İlgili bilgilerinin (tarih/pasaj no/dondurma medyum içeriği vs.) yazıldığı kriyo tüplerdeki hücreler 2-3 gün -20 °C'de, daha sonra uzun süreli saklayabilmek için -80 °C'ye kaldırıldı. Dondurma işlemi bittikten sonra kalan dondurma medyum, +4 °C'de daha sonra hücre dondurma işlemleri için muhafaza edildi.

3.3. U87MG Hücrelerinin Canlılık Analizleri İçin Bölünmesi

U87MG hücreleri tripsinizasyon işlemi sonrası santrifüj edilerek, 10 ml %10'luk FBS içeren DMEM eklendi ve falkon tüpünde toplandı. Takiben pipetaj yapılarak, iyice karışan hücre topluluğundan 100 µl alınarak ependorf tüpün içerisine konuldu. Ependorfun içerisine 1:1 oranında (100 µl) tripan mavisi eklenerek, pipetajla homojen bir karışım olması sağlandı. Hücre karışımından bir miktar lam üzerine alınarak hücreler, hücre sayım cihazında (Thermo; #Countess II Automated Cell Counter) sayıldı. Cihazın hesapladığı canlı hücre sayısına göre 24., 48., 72. ve 96. saatler için üç ayrı set şeklinde 96 kuyucuklu kültür tabaklarına her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak ekildi. Hücrelerin kültür tabaklarına tutunmaları için 24 saat beklendi ve hücreler %70 konfluensiye ulaştıktan sonra hücre canlılığı deneyine başlandı. Bu doğrultuda TMZ ve Ribosiklib'in, U87MG hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla etkin dozlarının belirlenmesi için doz taraması yapıldı.

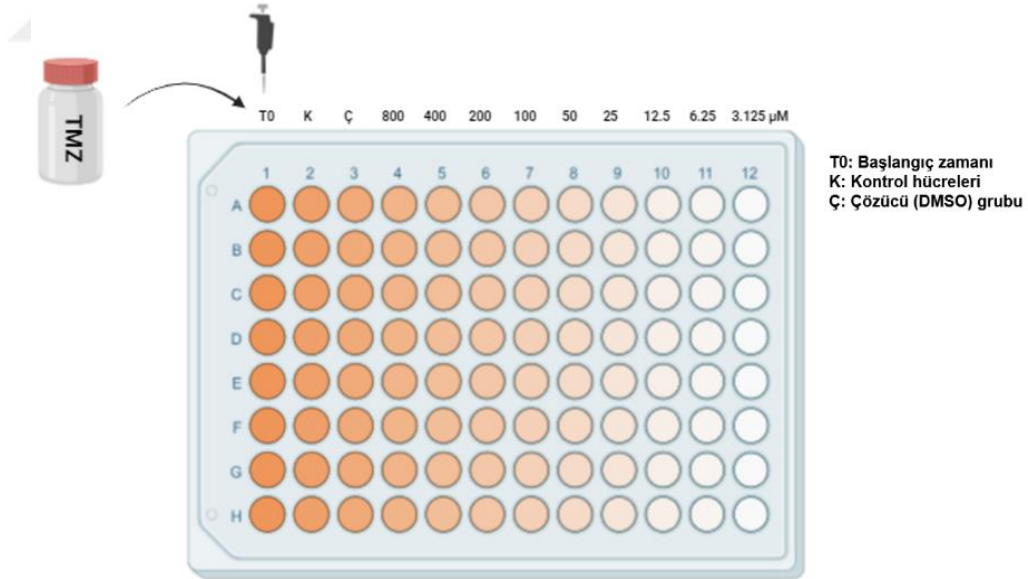
3.4. Temozolomid (TMZ) ve Ribosiklib'in Etkin Dozlarının Belirlenmesi

3.4.1. TMZ'nin Etkin Dozunun Belirlenmesi

Literatürde U87MG hücre hattı için TMZ 1000 µM'dan başlayarak azalan dozlar şeklinde uygulanmaktadır. Çalışmada, TMZ'nin en yüksek dozu olan 800 µM'dan başlanarak her defasında ½ kez seyreltme oranında seri dilüsyonlar halinde hazırlanıp, 9 farklı konsantrasyonda doz (800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM) kullanıldı (Şekil 3.2.). Hücrelere belirlenen dozlarda TMZ uygulanması için TMZ (Sigma; #T2577) veri sayfasında yer alan protokol doğrultusunda 10 mM'lık ana stok şeklinde DMSO içerisinde çözdürüldü ve dozlar bu ana stoktan %1 FBS içeren DMEM besiyerinde hazırlandı. TMZ dozlarının %1 FBS içeren DMEM besiyerinde hazırlanmasının sebebi; besiyeri içerisinde bulunan serum proteinlerinin TMZ ilacı ile etkileşiminin en aza indirgenmesinin sağlanmasıdır. Dozların hazırlanmasını takiben U87MG hücrelerinde TMZ'nin etkin dozunun belirlenmesi için 96 kuyucuklu kültür tabaklarına her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri çekilerek farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulandı. TMZ uygulamasının ardından başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek için başlangıç zamanı (T0: başlangıç zamanı) okuması yapıldı. Bunun için T0 olarak belirlenen kuyucuğun besiyeri çekilerek, çalışmada

kullanılan MTT (Roche; #11465007001) protokolüne göre her bir kuyucuğa 10 µl MTT uygulandı ve inkübe edildi. Dört saat sonra MTT protokolüne göre hücrelere 100 µl MTT solübilizasyon tamponu eklenerek, hücrelerin gece boyu inkübe olması için kültür tabakları etüve kaldırıldı.

İnkübasyon süresi sonunda 96 kuyucuklu kültür tabağının kapağı açılmadan ELISA okuyucusunda 580 nm’de okuma yapıp, deney sonlandırıldı. Bu okumanın ardından kültür tabakları 48, 72 ve 96 saatlik periyotlarda inkübe edildi ve MTT protokolü tüm periyotlarda aynı şekilde uygulandı. Her bir inkübasyon sonunda deney 24. saatteki okumasında olduğu gibi sonlandırılarak TMZ’nin, U87MG hücrelerinin sağkalımı üzerine etkisi belirlendi. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız üç farklı deney sonucu istatistiksel olarak değerlendirilip, TMZ uygulanmamış olan kontrol grubu hücreleri ile diğer deney grupları karşılaştırılarak yorumlandı. Bu deney basamağı sonucunda TMZ’nin U87MG hücreleri üzerindeki etkin dozunun belirlenmesi için doz taraması yapılarak elde edilen veriler doğrultusunda IC₅₀ değeri belirlendi.

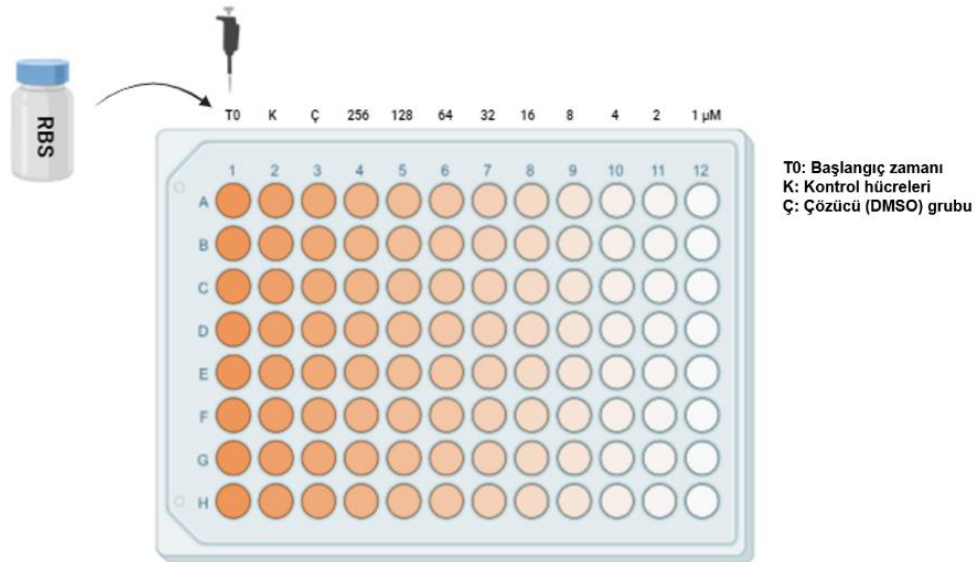


Şekil 3.2. U87MG hücrelerinde yapılan doz taraması için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TMZ dozlarının uygulanması gösterilmektedir.

3.4.2. Ribosiklib'in Etkin Dozunun Belirlenmesi

Literatürde U87MG hücre hattı için Ribosiklib uygulamasının yapıldığı herhangi bir çalışma yer almadığı için farklı kanser türlerinde uygulanan Ribosiklib dozları referans alınarak doz taraması yapıldı. Doz taraması için çalışmamızda, 256 μM 'dan başlayarak azalan dozlar şeklinde 9 farklı (256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 μM) doz belirlendi (Şekil 3.3.). Hücrelere belirlenen dozlarda Ribosiklib, (MedChem Express; #1211441-98-3) veri sayfasında yer alan protokol doğrultusunda 10 mM'lık ana stok şeklinde DMSO içerisinde çözdürüldü ve dozlar bu ana stoktan %1 FBS içeren DMEM besiyerinde hazırlandı. Takiben 96-kuyucuklu kültür tabaklarına her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde hücre ekildi ve 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri çekilerek, farklı dozlarda Ribosiklib uygulandı. Başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek için T0 okuması alındı. T0 okuması ve 4 set halinde kurulan 24, 48, 72, 96 saatlik periyotlarda inkübe edilen U87MG hücrelerinin 580 nm'de okuması MTT protokolüne göre TMZ ile aynı şekilde yapıldı.

Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi, kendi içerisinde 8 tekrarlı, birbirinden bağımsız üç ayrı deney sonucunun ve Ribosiklib uygulaması yapılmamış kontrol hücreleri ile kıyaslanarak gerçekleştirildi. Bu deney basamağı sonucunda Ribosiklib'in U87MG hücreleri üzerindeki etkin dozunun belirlenmesi için doz taraması yapılarak elde edilen veriler doğrultusunda IC_{50} değeri belirlendi.



Şekil 3.3. U87MG hücrelerinde yapılan doz taraması için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Ribosiklib dozlarının uygulanması gösterilmektedir (RBS: Ribosiklib).

3.5. U87MG Hücrelerine Kemoterapi ve Radyoterapi Uygulanması

Kliniği birebir taklit etmek amacıyla kurgulanan bu iş paketinde, TMZ ve TMZ tedavisine ek olarak uygulanan Ribosiklib, radyoterapi uygulamasından 1 saat önce bireysel ve eş zamanlı olarak hücrelere uygulandı. Takiben hücreler, literatürdeki bilgiler doğrultusunda belirlenen dozda (günlük 2 Gy) ardışık 5 gün boyunca ışınlanarak toplam doz 10 Gy ışıma yapıldı. Bu iş paketi Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Aylin Fidan KORCUM ŞAHİN gözetiminde ve asistanlarının yardımıyla gerçekleştirildi. Kültür tabakların ışınlanmasında daha önce uygulanmış ve doğrulanmış bir teknik kullanıldı (Zhuang vd., 2016).

Kültür tabaklarına ışınlama yapılmayan deney grubunda ise U87MG hücrelerinde “kemoterapi” etkisi değerlendirildi. TMZ tedavisine ek olarak Ribosiklib, hem bireysel hem de TMZ ile kombine olarak uygulandı. Tablo 3.1’de gösterilen deney grupları ışınlama yapılmayacak gruplar olup; bir önceki iş paketinde TMZ ve Ribosiklib için doz taraması sonucundan elde edilen veriler ile belirlenen IC₅₀ değerleri doğrultusunda uygulamalar yapıldı. U87MG hücrelerine uygulanacak olan TMZ ve Ribosiklib dozları, belirlenen IC₅₀ değerleri, IC₅₀ değerinin yarısı ve iki katı dozlar olacak şekilde planlandı (Tablo 3.2.). Planlanan bu dozlar ışınlama yapılacak olan hücreler için de aynı şekilde dizayn edildi.

Tablo 3.1. Kemoterapi uygulanacak deney grupları gösterilmektedir.

Kontrol ve <u>Deney Grupları</u>	
U87MG	Kontrol grubu olup, <u>herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamıştır.</u>
U87MG+DMSO	Çözücü grubu olup, <u>herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamıştır.</u>
U87MG+TMZ	Hücrelere belirlenen dozlarda bireysel olarak TMZ uygulanmıştır.
U87MG+Ribosiklib	Hücrelere belirlenen dozlarda bireysel olarak Ribosiklib uygulanmıştır.
U87MG+TMZ+Ribosiklib	Hücrelere TMZ ve Ribosiklib’in kombine olarak uygulanmıştır.

Tablo 3.2. Kemoterapi ve radyoterapi aşamasında TMZ ile Ribosiklib için belirlenen ilaç dozları gösterilmektedir.

<u>TMZ için belirlenen dozlar</u>	<u>Ribosiklib için belirlenen dozlar</u>
60 μ M (Belirlenen IC ₅₀ değerinin yarısı)	5 μ M (Belirlenen IC ₅₀ değerinin yarısı)
120 μ M (Belirlenen IC ₅₀ değeri)	10 μ M (Belirlenen IC ₅₀ değeri)
240 μ M (Belirlenen IC ₅₀ değerinin 2 katı)	20 μ M (Belirlenen IC ₅₀ değerinin 2 katı)

İlk olarak, hücreler 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri çekilerek farklı konsantrasyonlarda %1 FBS içeren DMEM besiyeri ile hazırlanan TMZ ve Ribosiklib uygulandı. Hücrelerin ardışık 5 gün boyunca (24, 48, 72, 96 ve 120. saat olarak etiketlenen ve bu periyotları temsil eden kültür tabakları) kemoterapi etkisi değerlendirileceği için toplam 5 adet 96-kuyucuklu kültür tabağına hücre ekildi. Bu hücrelere etkin değeri belirlenen Ribosiklib ve TMZ dozları uygulandı. Hücreler, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ koşullarındaki steril halde bulunan etüvde 24, 48, 72, 96 ve 120. saat periyotları boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, TMZ tedavisine ek Ribosiklib uygulanmasının U87MG hücreleri üzerine etkisinin canlılık açısından yorumlanması için MTT kiti ile analiz edildi. MTT kit protokolüne göre bir önceki iş paketinde olduğu gibi her bir kuyucuğa 10 μ L MTT uygulandı ve inkübasyona kaldırıldı. Dört saat sonra MTT uygulanan hücrelere 100 μ L solübilizasyon tamponu eklenerek hücreler gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültür tabakları ELISA okuyucusunda 580 nm’de okundu ve deney sonlandırıldı. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu istatistiksel olarak değerlendirildi ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak yorumlandı.

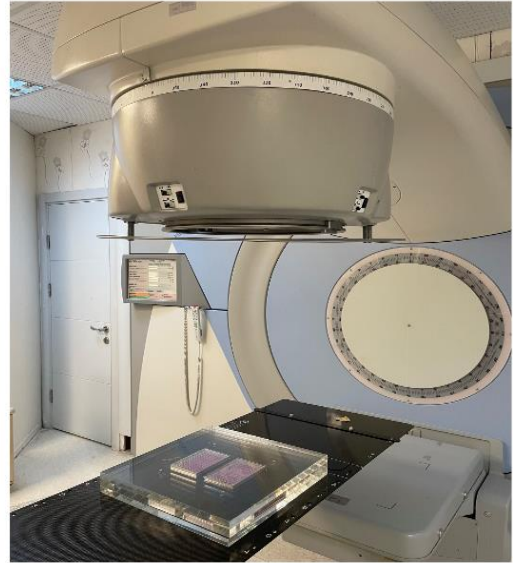
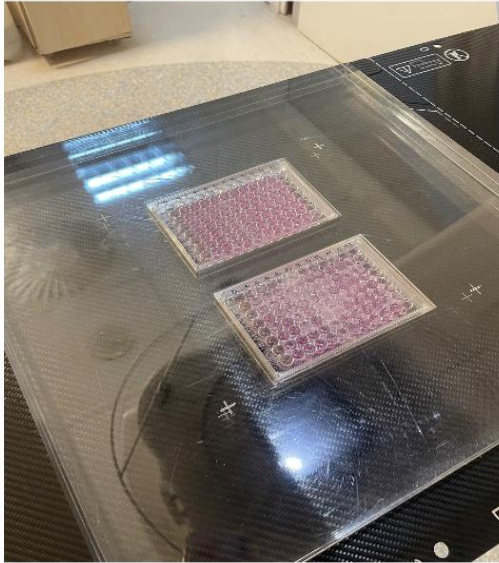
Tablo 3.3.’de gösterilen deney grupları ışınlama yapılan gruplar olup; hücre kültürü için kullanılan 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarında bu işlem yapıldı. Bu işlem Lineer akseleratör tabanlı bir cihaz olan Synergy (ELEKTA) ile 6 MeV ışını kullanılarak gerçekleştirildi. Üretilen 6 MeV foton enerjisi, suda maksimum derinlik dozuna 16 mm’de ulaşmaktadır ve TPR_{20.10}=0.680’e sahiptir. 96-kuyucuklu steril tabakların ışınlaması

hücre kültürlerinde yeterli doza ulaşmak amacıyla posteriyor tek alandan minimum 16 mm su eşdeğeri malzeme (14.29 mm pleksiglas) ile alttan desteklenerek yapıldı.

Tablo 3.3. Radyoterapi uygulanacak deney grupları gösterilmektedir.

Kontrol ve Deney Grupları	
U87MG+Radyoterapi	Kontrol grubu olup, herhangi bir ilaç uygulamasının yapılmadığı sadece ışınlamanın yapıldığı gruptur.
U87MG+DMSO+Radyoterapi	Çözücü grubu olup, herhangi bir ilaç uygulamasının yapılmadığı, sadece çözücü ve ışınlamanın yapıldığı gruptur.
U87MG+TMZ+Radyoterapi	Hücelere belirlenen dozlarda TMZ uygulanan ve 1 saat sonra ışınlamanın yapıldığı gruptur.
U87MG+Ribosiklib+Radyoterapi	Hücelere belirlenen dozlarda Ribosiklib uygulanan ve 1 saat sonra ışınlamanın yapıldığı gruptur.
U87MG+TMZ+Ribosiklib+Radyoterapi	Hücelere TMZ ve Ribosiklib'in kombine olarak uygulandığı ve 1 saat sonra ışınlamanın yapıldığı gruptur.

Kültür tabakları yan saçılmaları engellemek amacıyla aynı malzeme ile yanlardan destekleyecek olan “pleksiglas” malzemeden bir kutu içerisinde ışınlandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. U87MG hücrelerinin olduğu steril kültür tabaklarının “pleksiglas” içerisinde radyoterapi uygulanması gösterilmektedir.

Bir önceki iş paketinde, TMZ ve Ribosiklib için doz taraması sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri ile radyoterapi basamağına devam edildi (Tablo 3.2.).

Belirlenen dozlar radyoterapi uygulamasından 1 saat önce bireysel ve eş zamanlı olarak hücrelere uygulandı. Bu aşamadan önce hücreler 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri çekilerek farklı konsantrasyonlarda %1 FBS içeren DMEM besiyeri ile hazırlanan TMZ ve Ribosiklib dozları uygulandı. Hücrelere ardışık 5 gün boyunca (24, 48, 72, 96 ve 120. saat olarak etiketlenen ve bu periyotları temsil eden kültür tabakları) ışına yapılacağı için toplam 5 adet 96-kuyucuklu kültür tabağına hücre ekildi ve dozlar tüm kültür tabaklarına aynı gün arka arkaya uygulandı. TMZ ve Ribosiklib uygulamasından 1 saat sonra, tüm kültür tabakları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalında 2 Gy dozda ışınladı. Işınlama işlemi bittikten sonra hücreler 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ koşullarındaki steril halde bulunan etüvde 24, 48, 72, 96 ve 120. saat periyotları boyunca inkübe edildi. Işınlama işlemi 5 gün boyunca günde 2 Gy olmak üzere toplam 10 Gy şeklinde gerçekleşti. Her bir kültür tabağı, günlük ışınlamasının ardından inkübasyon süresi sonunda, TMZ ve Ribosiklib uygulanmasına ek radyoterapinin hücreler üzerine etkisinin canlılık açısından yorumlanması için MTT kiti ile değerlendirildi. MTT kit protokolüne göre tüm basamaklar uygulandı ve inkübasyon süresi sonunda kültür tabakları ELISA okuyucusunda 580 nm’de okundu ve deney sonlandırıldı. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu istatistiksel olarak değerlendirilerek kontrol grubu ile karşılaştırılarak, yorumlandı.

3.6. U87MG Hücrelerinde Koloni Oluşturma Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Bu iş paketinde Ribosiklib ve TMZ’nin hem bireysel hem de kombine uygulamasından sonra, U87MG hücrelerinde hareket potansiyellerini değerlendirebilmek amacıyla klonojenik test yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hücrelerin koloni oluşturma süreleri ve proliferasyon hızları karşılaştırıldı.

Altı kuyucuklu kültür tabaklarına kuyucuk başına 1500 hücre olacak şekilde U87MG hücrelerinin ekimi yapıldı. Kontrol ve deney grupları: Kontrol, DMSO, Ribosiklib, TMZ ve Ribosiklib+TMZ olarak planlandı. Birkaç gün boyunca hücrelerin yapışması ve

morfolojilerini düzeltmeleri için takip edildi ve Ribosiklib ve TMZ için belirlenen etkin dozlar (IC_{50} değeri) bireysel ve kombine olacak şekilde uygulandı, etkin oldukları saat boyunca (24 saat) etüvde inkübe edildi. 24 saat inkübasyon sonunda uygulanan dozlar kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve yerine %1 FBS'li DMEM eklendi. 13-14 gün boyunca 2-3 günde 1 medyum tazelendi ve hücreler kontrol edilerek koloni oluşturmaları takip edildi. Kontrol grubu yeterli hücre sayısına ulaşınca (%70 konfluensiye ulaşma durumu) deney sonlandırıldı. 0.2 gr kristal violet (Sigma; #C0775) 40 ml Metanol (Merk; #1060092500)'de çözülerek ana boya stoğu hazırlandı. Hazırlanan boyadan 5 ml alınarak 45 ml distile suda dilüe edildi ve karanlık ortamda muhafaza edildi. Tüm kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı ve kristal violet ile kuyucukların üzeri tamamen kapanacak şekilde inkübe edildi. Hücrelerin boyanmasını takiben, boya çekilerek kuruması beklendi. Kuruma işleminden sonra fotoğrafları çekildi, kristal violet ile mavi-mor boyanmış koloniler ImageJ programı ile işaretlendi ve elde edilen değerler kontrol grubuyla kıyaslanarak GraphPad Prism ile istatistiksel olarak analiz edildi.

3.7. Western Blot Yöntemi

Çalışmamızda, TMZ ve Ribosiklib'in belirlenen etkin dozlarının bireysel ve kombine uygulanması sonrası, U87MG hücreleri üzerine etkisini hücre siklusu ve TAp73 aracılı apoptotik yolak açısından değerlendirmek için western blot analizi gerçekleştirildi. Planlanan deney gruplarından lizat elde edebilmek için U87MG hücreleri steril petri kaplarına ekildi. 24 saat boyunca Ribosiklib ve TMZ ile inkübe edilen U87MG hücrelerinde planlanan şekilde kontrol ve deney grupları olmak üzere toplam beş grup oluşturuldu.

3.7.1. U87MG Hücrelerinden Lizat Eldesi ve Protein Miktarının Tayini

Hücrelerden lizat eldesi için steril petri kaplarına 8×10^6 hücre olacak şekilde U87MG hücreleri ekildi ve hücrelerin tutunması için $37^{\circ}C$ sıcaklıkta, %5 CO_2 koşullarındaki steril etüvde bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelere TMZ ve Ribosiklib'in belirlenen etkin dozları (IC_{50} değerleri) bireysel ve kombine uygulandı. Belirlenen etkin dozlar 24. saatte en anlamlı sonuç verdiği için ilaç uygulaması sonrası 24 saat beklendi. 24 saatin sonunda kontrol grubunda bulunan %1 FBS'li DMEM besiyeri ve diğer gruplarda bulunan ilaç dozları petri kabından uzaklaştırılıp, hücreler soğuk steril PBS ile

2 kez yıkandı. Takiben tripsinizasyon işlemi yapıldı ve hücrelerin kalkması sağlanarak, grup isimlerinin belirtildiği falkonlara toplandı. Falkonlar 2.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek üstte ayrılan süpernant kısmı, hücre peletinden uzaklaştırıldı. Hücrelerdeki proteinler arasındaki zayıf etkileşimleri bozmak ve protein ekstraksiyonu için, falkonda bulunan peletin yaklaşık 2 katı olacak şekilde liziz tamponu eklendi ve 10 dakikada bir, 3 kez 30-40 saniye vorteks yapıldı. Bu aşamada falkonlar buz içerisinde gömülü halde tutuldu. Vorteks işleminden sonra falkonlar 13.500 rpm’de, 10 dakika, 4 °C’de santrifüj edildi ve süpernatant kısmı lizat olarak, grup bilgilerinin ve tarihin yazılı olduğu ilgili ependorflara toplandı. Lizatlar, -80 °C’de muhafaza edildi.

Elde edilen lizatlardan protein miktarlarını tayin edebilmek için BCA (Bikinkoninik asit) (Thermo Fisher; #23225) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde 96 kuyucuklu kültür tabağı kullanıldı ve standart protein olarak BSA hazırlandı. BSA hazırlığı; 1 mg/ml BSA (S0) şeklinde hazırlandı ve hazırlanan S0’dan distile su (dH₂O) ile seyreltilerek S1-S7 standart proteinler elde edildi. Daha sonra -80 °C’de bulunan lizatlar 1:50 oranında lizis/PIK tamponu ile dilüye edilerek gruplar ayrı ayrı vortekslendi. “Blank (Kör)” kuyucuğu için lizis/PIK tamponu kullanıldı. 96 kuyucuklu kültür tabağında her biri, 2 tekrarlı olacak şekilde ve hazırlanan protein standartları ve dilüye edilen lizat örnekleri 25 µl olarak eklendi. BCA kiti içerisinde bulunan Reagent A (10 ml) ve Reagent B (100 µl) solüsyonlarından karanlık ortamda hazırlandı. Takiben standartların ve örneklerin üzerine hazırlanan bu solüsyon karışımından, 200 µl eklenerek 96 kuyucuklu kültür tabağı alüminyum folyoya sarıldı ve 30 dakika 60 °C’deki etüvde inkübe edildi.

İnkübasyon bitince örneklerin ölçümü için spektrofotometrede 580 nm dalga boyunda okuması alındı. Spektrofotometreden elde edilen sonuçlar doğrultusunda örneklerin değerleri, standart protein değerleri ile oranlanarak her bir örnekte 30 µg protein olacak şekilde western blot için kullanılacak örneklerin miktarları hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda çıkan protein değerlerine göre, Laemli (Sigma; #S-3401) ve dH₂O ile örnekler hazırlandı. Son olarak tüm örneklerin protein yapılarının açılabilmesi için, 95 °C’de kuru ısıtıcıda 5 dakika boyunca ısıtılarak denatüre edildi.

3.7.2 Western Blot Yöntemi ile Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Hazırlanan örneklere ek olarak, bu aşamada kullanılacak solüsyonlar önceden hazırlandı (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. Western blot yöntemi için kullanılan solüsyonlar.

%30 Akrilamid-Bisakrilamid	• 15.4 gr Akrilamid-Bisakrilamid (Biorad; #161- 01-25) • 40 ml dH₂O
4X Tris-HCl/SDS (pH: 6.8)	• 3.025 gr Tris (Biorad; #1.08387.2500) • 20 ml dH₂O • HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. • dH₂O ile toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı. • 0.2 gr SDS (Biorad; #161-0301)
4X Tris-HCl/SDS (pH: 8,8)	• 9.75 gr Tris (Merck; #1.08387.2500) • 20 ml dH₂O • HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. • dH₂O ile toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı. • 0.2 gr SDS (Biorad; #161-0301)
APS (Amonyum Persülfat) (%10)	• 0.1 gr APS (Amresco; #7727- 54) • 1 ml dH₂O
5X Yürütme Tamponu (Elektroforez Solüsyonu)	• 9 gr Tris (Bio-Rad; #161-0719), • 43.2 gr Glisin (Bio-Rad; #161-0718) • 3 gr SDS (Sigma Aldrich; #L4390) • 600 ml dH₂O
10X PBS	• 16 gr NaCl, • 0.8 gr KH₂PO₄ • 2.856 gr Na₂HPO₄ • 2000 ml dH₂O
1X PBS	• 100 ml 10X PBS • 1000 ml dH₂O
1X PBS-T	• 1000 ml 1X PBS • 1000 µl Tween 20 (Merck; #8.22184.0500)
TEMED (N, N, N', N' - Tetrametiletildiamin)	• 10 µl TEMED (Ayrıcı jel için) (Sigma Aldrich; #T-7024) • 5 µl TEMED (Toplayıcı jel için)
Transfer Solüsyonu (Blotlama solüsyonu)	• 14.3 gr Glisin (Bio-Rad; #161-0718) • 3 gr Tris (Bio-Rad; #161-0719) • 700 ml dH₂O • 200 ml Metanol (Merck; #1.06009.2511) • dH₂O ile toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı.
Bloklama Solüsyonu	• 2 gr süt tozu (Bio-Rad; #170-6404) • 40 ml PBS-T

Solüsyonlar hazırlandıktan sonra sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile p21, p53, siklin D, pRB, aktif kaspaz-3 ve TAp73 antikorlarının protein düzeyleri kilo dalton (kDa) ağırlıkları dikkate alınarak, %10'luk poliakrilamid jel hazırlandı.

Tablao 3.5. %10'luk poliakrilamid jelde kullanılan ayırıcı ve toplayıcı jellerin solüsyonları gösterilmektedir.

Ayırıcı %10'luk poliakrilamid jel için kullanılan solüsyonlar:	Toplayıcı poliakrilamid jel için kullanılan solüsyonlar:
• %30 Akrilamid-bisakrilamid: 5 ml • 4X Tris-HCl/SDS (pH: 8.8): 3.75 ml • dH₂O: 6.25 ml • %10 Amonyum Persülfat (APS): 50 µl • TEMED: 10 µl	• %30 Akrilamid-bisakrilamid: 650 µl • 4X Tris-HCl/SDS (pH: 6.8): 1250 µl • dH₂O: 3.050 µl

Hazırlanan ayırıcı poliakrilamid jelin donmasını takiben üzerine toplayıcı jel döküldü ve taraklar takılarak bir süre (yaklaşık 35-40 dk) toplayıcı jelin de donması beklendi. Donan jelden taraklar çıkarıldı ve ilk olarak proteinlerin yerlerini tayin etmede kullanılacak belirteç olan “protein ladder”dan 4µl (Thermo Fisher, #26619), takiben de her kuyucuğa 20 µl örnek yüklendi. Örnekler oda sıcaklığında elektroforez solüsyonu içerisinde 100 voltta 100-120 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel ve 5 dakika metanolde bekletilen polivinilidin florid (PVDF) membran sandviç yöntemiyle hazırlanarak kasetlere yerleştirildi. Transfer solüsyonu ile gece boyu 4 °C’de 20 voltta proteinlerin jelden membrana transfer olması sağlandı. PVDF membrana proteinlerin aktarılması gerçekleştikten sonra membran, PBS-T ile yarım saat boyunca 10 dakikada bir (toplamda 3 kez) yıkandı. Yıkama işleminden sonra özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi için membran 1 saat oda ısısında PBS-T ile hazırlanmış %5’lik süt tozu ile blokladı. Bloklama işlemi esnasında, üretici firmanın önerisi doğrultusunda bloklama solüsyonunda (PBS-T) uygun dilüsyon oranında çözölmüş olan primer antikorlar %3’lük süt tozu ile hazırlandı (Tablo 3.6.) ve ilgili kDa aralığındaki kesilen membranların üzerine eklendi ve gece boyu 4 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar 10 dakikada bir 30 dakika boyunca PBS-T ile yıkandı. Yıkama sonunda membranlar, primer antikorlara uygun dilüsyonda ve bloklama solüsyonu ile hazırlanmış olan uygun sekonder antikorla

oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmek üzere çalkalayıcı üzerine alındı (Tablo 3.6.). İnkübasyon sonunda PBS-T ile 30 dakika boyunca 10 dakikada bir tekrar yıkandı. Yıkama işlemini takiben membranlardaki protein düzeyleri, kemilüminesan western blot görüntüleyicisinde görüntülendi.

Tablo 3.6. Western blot yönteminde kullanılan primer/sekonder antikor bilgisi ve dilüsyon oranları.

Primer Antikorlar (Katalog Numarası)	Üretildiği Hayvan	Dilüsyon	Molekül Ağırlığı (kDa)
aktif kaspaz-3 (Cell Signaling, #9661)	Tavşan	1:1000	17-19
p21 (Elabscience, #E-AB-66357)		1:1000	21
siklin D1 (Invitrogen, #MA5-16356)		1:200	36
p53 (Elabscience, #E-AB-32469)		1:1000	44
pRB (Invitrogen, #PA5-12682)		1:1000	106
TAp73 (Novus Biologicals, # NBP2-24737)	Fare	1:200	73
Sekonder Antikorlar (Katalog Numarası)	Üretildiği Hayvan	Dilüsyon	
Biyotinlenmiş Anti-Tavşan IgG (Vector lab., #BA-1000)	Keçi	1:3000	
Biyotinlenmiş Anti-Fare IgG (Vector lab., #BA-9200)		1:5000	

Membranlardaki bantların görünür hale gelebilmesi ve protein tespiti için, kemilüminesan (ECL) (Thermo, #34580) firma önerisi doğrultusunda 1:1 oranında falkonda hazırlandı. Falkon içerisindeki solüsyonun ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyoya sarıldı. Görüntüleyici cihazın içerisine yerleştirilen membranların üzerine ECL damlatılarak yaklaşık 2-3 dakika inkübe edildi ve Azure c280 Jel Görüntüleme Cihazı ile görüntüleme yapıldı. Elde edilen görüntülerde primer antikorların bağlandığı bantlar, çalışmamızdaki antikorların kDa ağırlığına göre seçilen yükleme kontrolü ile (Vinkulin ya da β -Aktin) ImageJ programıyla analiz edildi. ImageJ programındaki değerler, gruplar arasında istatistiksel olarak GraphPad Prism ile değerlendirildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen tüm deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve grafiklendirilmesi GraphPad Prism 9.5.1 programı ile gerçekleştirildi. Tüm deney grupları gruplar arasında tek yönlü varyans analizi (tek yönlü ANOVA) ve post-hoc testler kullanılarak değerler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak belirtildi. $p < 0.05$ 'in altında bulunan değerler, istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. U87MG Hücrelerinde Temozolomid (TMZ) ve Ribosiklib'in Etkin Dozlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda U87MG hücrelerinde TMZ ve Ribosiklib'in etkin dozlarının belirlenebilmesi ve deneylere bu dozlarla devam edilebilmesi için, kendi içerisinde 8 tekrarlı, birbirinden bağımsız 3 ayrı deney sonucu elde edilerek kapsamlı bir doz taraması yapıldı. Sonuçlar herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol U87MG hücreleriyle kıyaslanarak değerlendirildi.

4.1.1. TMZ'nin Etkin Dozunun Belirlenmesi

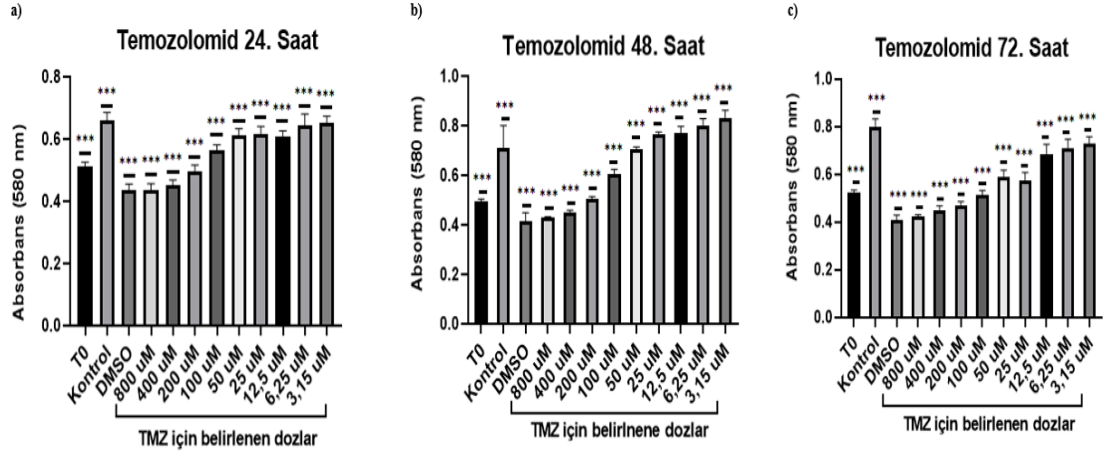
TMZ için doz taramasında belirlenen dozlar 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 μM konsantrasyonlar hazırlanarak U87MG hücrelerine 24, 48 ve 72. saatlik periyotları içerecek şekilde uygulandı. Elde edilen veriler, istatistiksel olarak kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

TMZ ile 24 saat muamele edilen U87MG hücrelerinde; 800, 400, 200, 100, 50, 25 ve 12.5 μM dozlarında kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görülmesine rağmen, 6.25 ve 3.125 μM dozlarda uygulanan TMZ kontrole göre hücrelerin azalmasına rağmen, anlamlı bir sonuç ifade etmemektedir ($p<0.001$) (Şekil 4.1a.).

TMZ ile 48 saat muamele edilen U87MG hücrelerinde; 800, 400, 200, 100 ve 50 μM uygulanan dozlarda hücre canlılığının azaldığı görüldü. 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 μM dozlarda ise kontrol hücrelerine göre hücre proliferasyonunun arttığı görüldü ($p<0.001$) (Şekil 4.1b).

TMZ ile 72 saat muamele edilen U87MG hücrelerinde ise hücre sayılarındaki azalışın 800, 400, 200, 100, 50, 25 μM uygulanan dozlarda daha fazla olduğu belirlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.1c).

Elde edilen inkübasyon süreleri sonucunda, TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel anlamlılık açısından en fazla olduğu 24. saat esas alınarak deneylere bu inkübasyon süresi ile devam edildi.



Şekil 4.1. Etkin dozun belirlenmesi için yapılan doz taramasında, U87MG hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin; 24 (a), 48 (b) ve 72 (c) saat sonundaki etkisinin hücre canlılığı açısından değerlendirildiği grafikler gösterilmektedir (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.1.2. Ribosiklib'in Etkin Dozunun Belirlenmesi

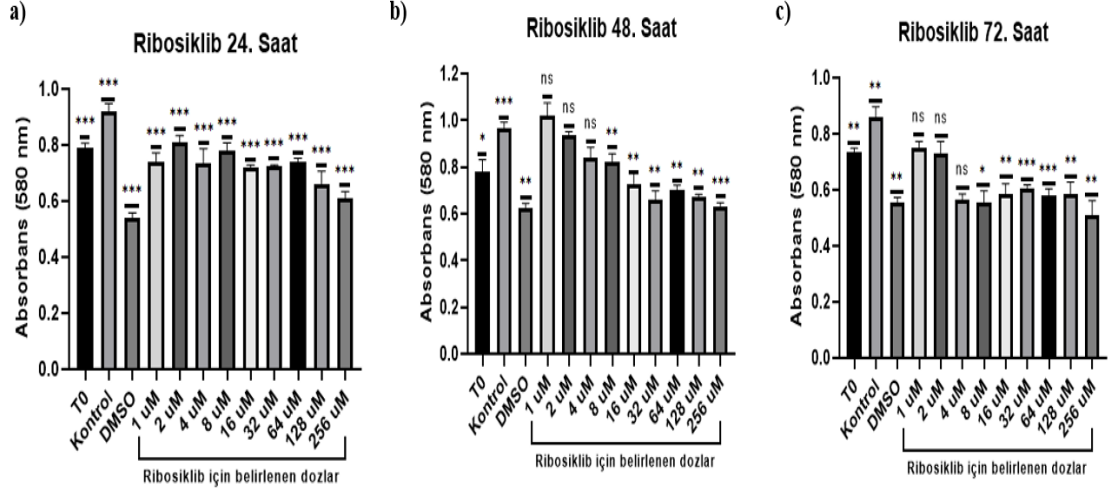
Ribosiklib için doz taramasında 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µM konsantrasyonlardaki dozlar, U87MG hücrelerine 24, 48 ve 72. saatlik periyotları içerecek şekilde uygulandı. Elde edilen veriler, istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi (Şekil 4.2.).

Ribosiklib ile 24 saat muamele edilen U87MG hücrelerinde; uygulanan tüm doz konsantrasyonlarının (256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µM) kontrol hücreleriyle kıyaslandığında anlamlı bir azalışa neden olduğu görüldü ($p<0.001$) (Şekil 4.2a.).

Ribosiklib ile 48 saat muamele edilen U87MG hücrelerinde, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µM konsantrasyonlardaki doz uygulamalarının, kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak azaldığı; 1, 2 ve 4 µM konsantrasyonlardaki dozların ise istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmediği belirlendi (ns: $p>0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$) (Şekil 4.2b.)

Ribosiklib ile 72 saat muamele edilen U87MG hücrelerinde ise 48 saat inkübe edilen U87MG hücrelerine benzer bir sonuç elde edildi (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.2c.).

İnkübasyon süreleri sonucunda, Ribosiklib'in hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel anlamlılık açısından en fazla olduğu 24. saat esas alınarak deneylere bu inkübasyon süresi ile devam edildi.



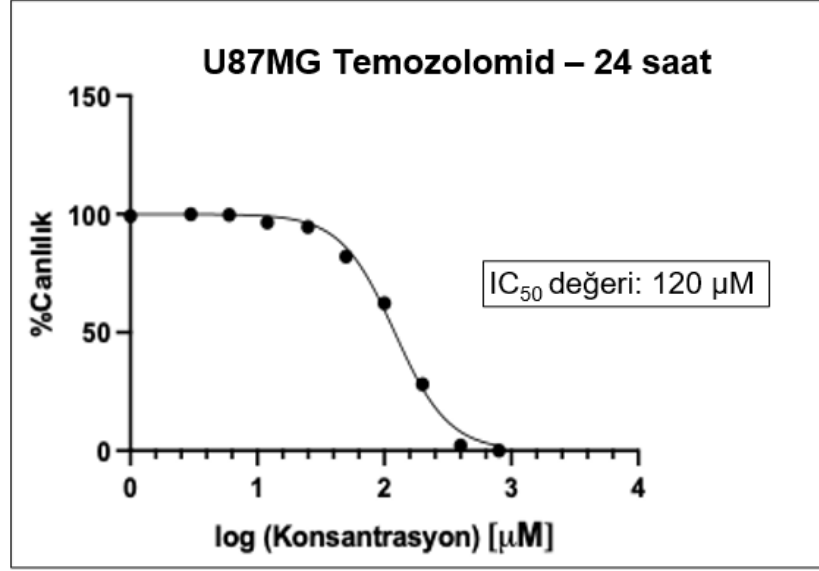
Şekil 4.2. Etkin dozun belirlenmesi için yapılan doz taramasında, U87MG hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan Ribosiklib'in, 24 (a), 48 (b) ve 72 (c) saat sonundaki etkisinin hücre canlılığı açısından değerlendirildiği grafikler gösterilmektedir (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.2. U87MG Hücrelerinde TMZ ve Ribosiklib'in IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

IC₅₀ değeri, bir ilacın ya da inhibitörün hücreler üzerindeki etkinliğini belirlemek için kullanılan farmakolojik bir parametre olup hücrelerdeki etkisini yarıya indiren konsantrasyon olarak ifade edilmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda TMZ ve Ribosiklib için yapılan doz taramasının ardından, U87MG hücrelerinin canlılıkları MTT kit protokolüne göre değerlendirildi ve her iki ilaç için IC₅₀ değerleri belirlendi. Deneylere belirlenen IC₅₀ ile devam edildi.

4.2.1. TMZ'nin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

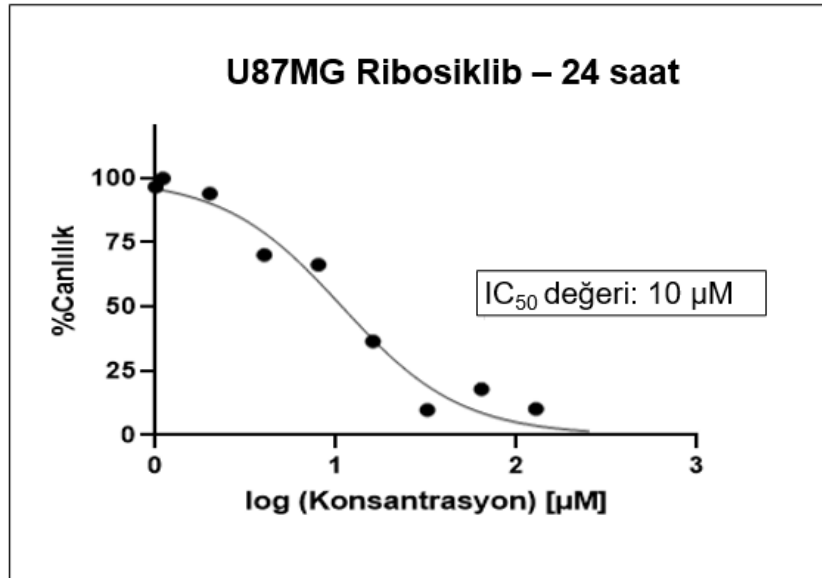
U87MG hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki TMZ dozlarının 24, 48 ve 72. saatlerdeki değişimleri ve hücrelerin canlılıkları MTT kiti ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, TMZ için en etkin saat periyodunun 24. saat olduğu ve buna bağlı olarak IC₅₀ değerinin ise 120 µM olarak belirlendi.



Şekil 4.3. U87MG hücrelerinde yapılan doz taraması sonucunda, TMZ'nin hücreler üzerinde etkin saat ve buna bağlı olarak hesaplanan IC₅₀ değeri gösterilmektedir.

4.2.2. Ribosiklib'in IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

U87MG hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki Ribosiklib dozlarının 24, 48 ve 72. saatlerdeki değişimleri ve hücrelerin canlılıkları MTT kiti ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Ribosiklib için de en etkin saat periyodunun 24. saat olduğu ve IC₅₀ değerinin de 10 μ M olduğu belirlendi.



Şekil 4.4. U87MG hücrelerinde yapılan doz taraması sonucunda, Ribosiklib'in hücreler üzerinde etkin saat ve buna bağlı olarak hesaplanan IC₅₀ değeri gösterilmektedir.

4.3. Kemoterapi ve Radyoterapi Uygulamasının Değerlendirilmesi

Çalışmamızın bu aşamasına, Ribosiklib ve TMZ için belirlenen etkin dozlar (IC_{50} değerleri) esas alınarak devam edildi. U87MG hücrelerine Ribosiklib ve TMZ'in IC_{50} değeri, IC_{50} değerinin 2 katı ve IC_{50} değerinin yarısı olacak şekilde hem bireysel hem de kombine uygulaması yapıldı.

Bu aşamada ışınlama yapılmamış kültür tabaklarından elde edilen sonuçlar, Ribosiklib'e ek olarak kemoterapötik olan TMZ uygulanması sebebiyle "U87MG Hücrelerinde Kemoterapinin Değerlendirilmesi" olarak analiz edildi. İlaç uygulamasının ardından 1 saat sonra kültür tabaklarına günde 2 Gy olacak şekilde toplam 10 Gy beş gün boyunca ardışık olarak ışınma yapıldı. Bu aşamada da elde edilen sonuçlar kültür tabaklarına Ribosiklib ve TMZ'ye ek olarak, ışınlama yapılması sebebiyle "U87MG Hücrelerinde Radyoterapinin Değerlendirilmesi" olarak analiz edildi. Her iki değerlendirme için de sonuçlar 24, 48, 72, 96 ve 120. saat periyotları şeklinde kendi aralarında değerlendirildi.

4.3.1. U87MG Hücrelerinde Kemoterapi Etkisinin Değerlendirilmesi

Ribosiklib ve TMZ için belirlenen IC_{50} değerleri doğrultusunda, U87MG hücrelerine IC_{50} değerleri, IC_{50} değerlerinin yarısı, 2 katı şeklinde hücrelere bireysel ve kombine olacak şekilde Ribosiklib ve TMZ uygulaması yapıldı. Takiben deney setleri 24, 48, 72, 96 ve 120. saatleri içerecek şekilde kuruldu. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; 24 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde; Ribosiklib'in bireysel uygulandığı gruplarda, IC_{50} değeri ve yarısının anlamlı bir sonuç ifade etmediği, IC_{50} değerinin 2 katı olan dozdaki uygulamada hücrelerdeki canlılığın kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı görüldü. TMZ'nin bireysel uygulandığı gruplarda, tüm konsantrasyonlardaki dozların kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlendi. Ribosiklib'in TMZ ile kombine olarak uygulandığı gruplarda ise IC_{50} değerlerinin yarısının uygulandığı grup anlamlı bir sonuç ifade etmezken, IC_{50} değeri ve 2 katının kombine olarak uygulandığı gruplarda azalma görüldü. Ayrıca, Ribosiklib ve TMZ'nin çözücüsü olduğu DMSO grubunda da kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir sonuç elde edilmedi ve bu da Ribosiklib ile TMZ'in U87MG hücreleri üzerine olan etkisinin DMSO'dan kaynaklı olmadığını gösterdi (Şekil 4.5a.).

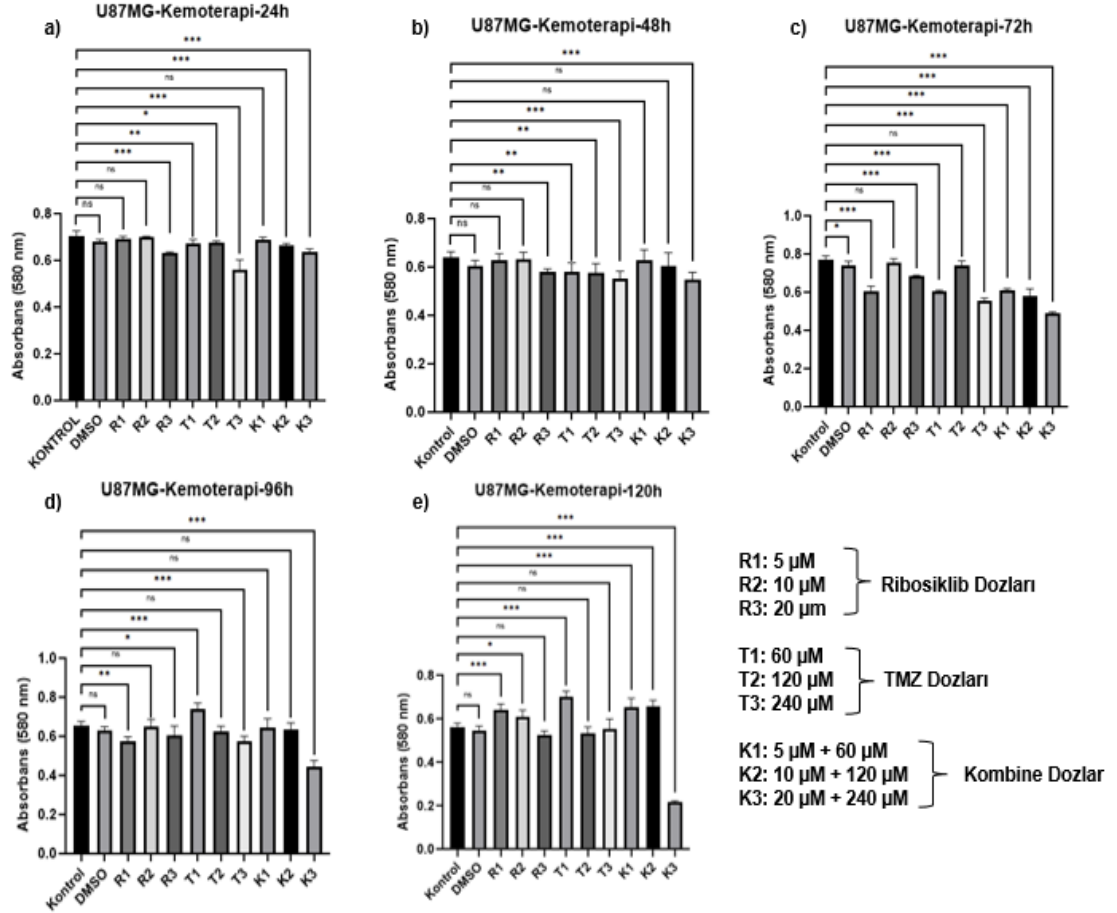
48 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde, Ribosiklib ve TMZ'nin bireysel uygulandığı gruplarda, 24 saat inkübe edilen deney grubuyla benzer sonuçlar elde edildi. Ribosiklib'in TMZ ile kombine olarak uygulandığı gruplarda ise IC₅₀ değerlerinin yarısının uygulandığı gruba ek olarak, IC₅₀ değerlerinin uygulandığı grupta da anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Ayrıca DMSO grubunun da kontrol grubuna kıyasla bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 4.5b).

72 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde; Ribosiklib'in bireysel uygulandığı gruplarda, IC₅₀ değerinin etkisi görülmezken, IC₅₀ değerinin 2 katı ve yarısının uygulandığı hücrelerde anlamlı olarak kontrole kıyasla canlılığın azaldığı görüldü. TMZ'nin bireysel uygulandığı gruplarda da yine benzer şekilde IC₅₀ değerinin etkisi görülmezken, IC₅₀ değerinin 2 katı ve yarısının uygulandığı dozlarda azalma olduğu belirlendi. Ribosiklib'in TMZ ile kombine olarak uygulandığı gruplarda ise tüm kombine dozlarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.001$) (Şekil 4.5c).

96 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde; Ribosiklib ve TMZ'nin bireysel uygulandığı gruplarda, IC₅₀ değerinin etkisinin anlamlı bir sonuç ifade etmediği, IC₅₀ değerinin 2 katı ve yarısının uygulandığı U87MG hücrelerinde azalma olduğu belirlendi ($p<0.001$). Ribosiklib'in TMZ ile kombine olarak uygulandığı gruplarda ise sadece etkin dozların 2 katının kombine uygulandığı dozda hücrelerin canlılığında anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.001$). Ayrıca, DMSO grubunun da kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir sonuç ifade etmediği görüldü (Şekil 4.5d).

120 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde ise Ribosiklib'in bireysel uygulandığı gruplarda, IC₅₀ değeri ve yarısının uygulandığı U87MG hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla zamana bağlı olarak canlılığın arttığı görüldü. IC₅₀ değerinin 2 katı uygulama yapılan hücrelerde ise anlamlı bir sonuç elde edilemedi. TMZ'nin bireysel uygulandığı gruplarda, IC₅₀ değerinin yarısındaki dozda yine hücrelerin zamana bağlı olarak proliferasyon olduğu görülürken ($p<0.001$), IC₅₀ değeri ve 2 katındaki dozda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Ribosiklib'in TMZ ile kombine olarak uygulandığı gruplarda ise tüm

konsantrasyonlardaki dozlarda anlamlı bir azalış görülürken, bu azalışın en etkili olduğu doz Ribosiklib ve TMZ'nin IC₅₀ değerinin 2 katında belirlendi ($p<0.001$). Ayrıca, DMSO grubu olarak adlandırılan çözücü grubunda da bir etki gözlenmedi (Şekil 4.5e).



Şekil 4.5. U87MG hücrelerine Ribosiklib'in bireysel ve TMZ ile kombine uygulanmasını takiben 24 (a), 48 (b), 72 (c), 96 (d) ve 120 (e) saatlik inkübasyonlarındaki, hücre canlılığına olan etkisi gösterilmektedir. Uygulanan dozların etkinliği, kontrol grubuyla kıyaslanarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.3.2. U87MG Hücrelerinde Radyoterapi Etkisinin Değerlendirilmesi

Ribosiklib ve TMZ için belirlenen IC₅₀ değerleri doğrultusunda; U87MG hücrelerine IC₅₀ değerleri, IC₅₀ değerlerinin yarısı, 2 katı şeklinde hücrelere bireysel ve kombine olacak şekilde Ribosiklib ve TMZ uygulaması yapıldı. Takiben kültür tabaklarına 1 saat sonra 2 Gy dozda ışınlama yapıldı. Işınlamaya ardışık olarak beş gün boyunca devam edildi. Bu bağlamda deney 24, 48, 72, 96 ve 120. saatleri içerecek şekilde planlandı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; 24 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde; Ribosiklib'in bireysel uygulandığı gruplarda, IC₅₀ değeri,

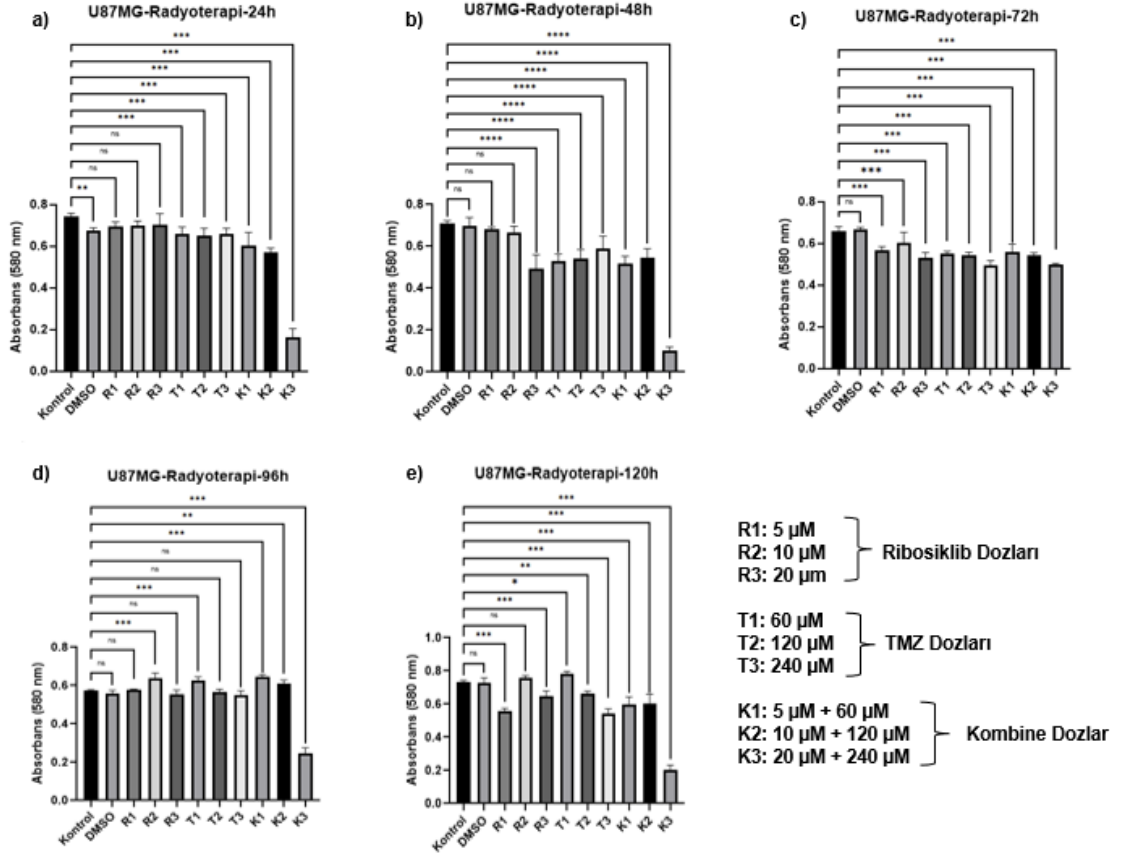
yarısı ve 2 katı konsantrasyonlarının anlamlı bir sonuç ifade etmediği ($p>0.05$), ancak diğer tüm gruplarda uygulanan bireysel ve kombine dozların, kontrol hücrelerine kıyasla canlılıklarını azalttığı görüldü ($p<0.001$). Ayrıca, hücre sayısındaki ciddi azalış Ribosiklib ve TMZ'nin IC_{50} değerlerinin 2 katının kombine olarak uygulandığı grupta görüldü ($p<0.001$) (Şekil 4.6a).

48 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde; yine 24 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlar ile benzer veriler elde edildi. Ribosiklib ve TMZ'nin IC_{50} değerlerinin 2 katının kombine olarak uygulandığı grupta, hücrelerin canlılıklarının ışınlama ile birlikte ciddi şekilde azalması 48. saatte de görüldü ($p<0.001$) (Şekil 4.6b).

72 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde; DMSO dışındaki tüm gruplarda, kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı bir azalışın olduğu belirlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.6c).

96 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde; Ribosiklib'in bireysel uygulandığı gruplarda yalnızca Ribosiklib'in etkin dozunda anlamlılık elde edildi ($p<0.001$) ve hücrelerin çoğaldığı gözlemlendi. Hücrelerin proliferasyonunun görüldüğü diğer gruplar ise bireysel olarak TMZ'nin IC_{50} değerinin yarısının uygulandığı grupta ve Ribosiklib'in TMZ ile birlikte uygulandığı kombine gruplarda görüldü ($p<0.001$) (Şekil 4.6d).

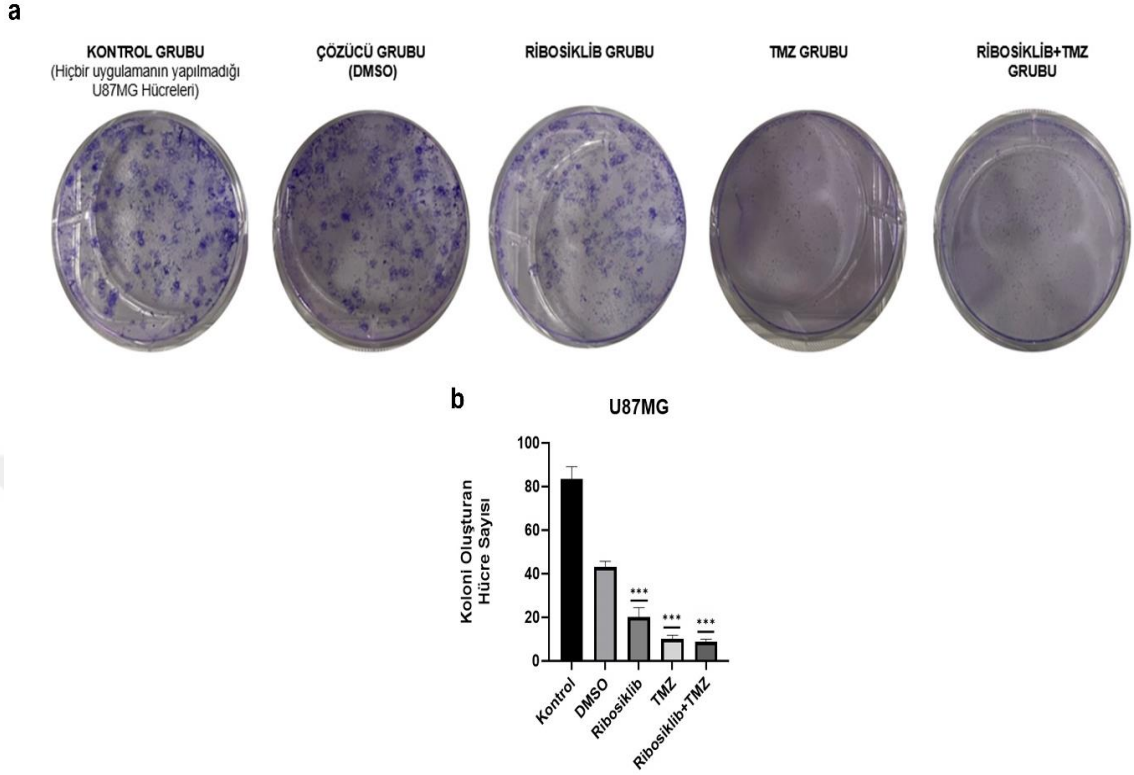
120 saat Ribosiklib ve TMZ ile bireysel ve kombine muamele edilen U87MG hücrelerinde ise Ribosiklib'in etkin dozunun bireysel olarak uygulandığı grup hariç tüm gruplarda anlamlı sonuçlar gözlemlendi ($p<0.001$). Ribosiklib ve TMZ'nin etkin dozlarının 2 katı konsantrasyonda uygulanan grup, ek olarak ışınlamanın yapılması ile tüm saat periyotlarında hücre canlılığın kontrol grubuna kıyasla en az seviyede görüldüğü grup oldu ($p<0.001$) (Şekil 4.6e).



Şekil 4.6. U87MG hücrelerine Ribosiklib'in bireysel ve TMZ ile kombine uygulanmasını takiben 1 saat sonra günde 2 Gy ardışık beş gün boyunca (toplam 10 Gy) ışınlama yapılması sonucu: 24 (a), 48 (b), 72 (c), 96 (d) ve 120 (e) saatlik inkübasyonlarındaki, hücre canlılığına olan etkisi gösterilmektedir. Uygulanan dozların etkinliği, kontrol grubuyla kıyaslanarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (ns: $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4.4. U87MG Hücrelerinde Koloni Oluşturma Potansiyelinin Gösterilmesi

24 saat boyunca bireysel ve kombine Ribosiklib ve TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinde hareket potansiyellerinin değerlendirilebilmesi amacıyla klonojenik test yapıldı. Klonojenik test protokolü doğrultusunda elde edilen sonuçlarda: deney gruplarında, kontrol ve çözücü grubuna göre hücre sayısında azalma, proliferasyon hızında gerileme ve buna bağlı olarak koloni sayılarında da anlamlı olarak bir azalış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7.).

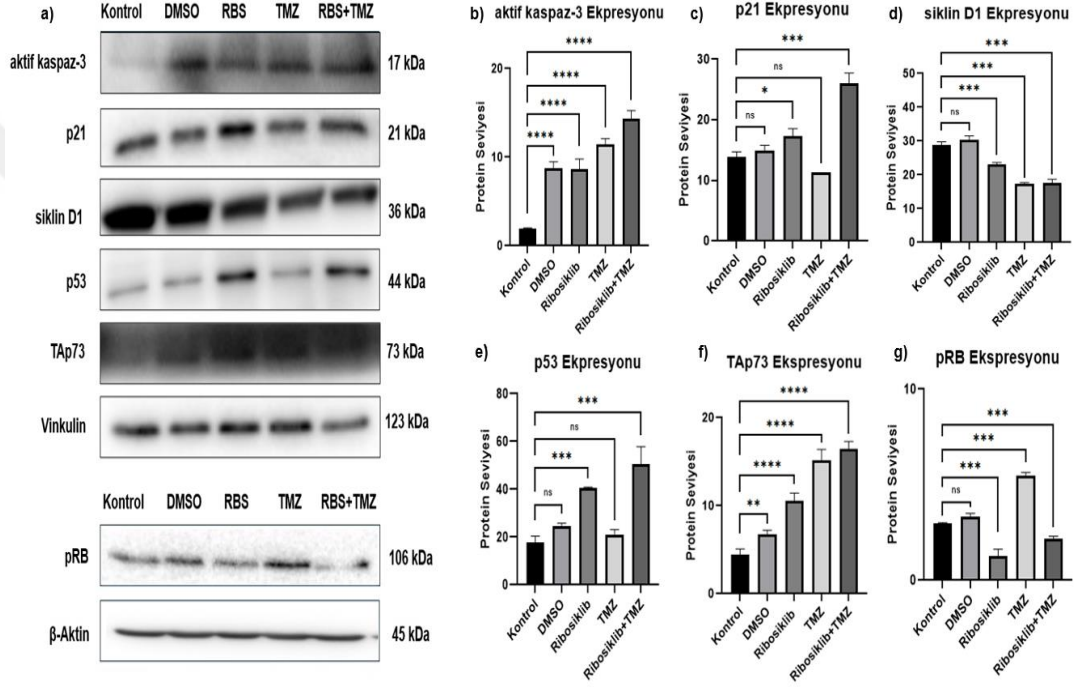


Şekil 4.7. Ribosiklib ile TMZ'nin bireysel ve kombine uygulamasından sonra, U87MG hücrelerinde hareket potansiyellerinin değerlendirildiği klonojenik test ile koloni oluşturan hücreler **(a)** ve koloni oluşturan hücrelerin koloni sayılarının, çözücü grubuna göre kıyaslanarak elde edilen istatistiksel analiz sonuçları gösterilmektedir **(b)** (***) $p<0.001$).

4.5. U87MG Hücrelerinde Ribosiklib ve TMZ Uygulanması Sonrası Protein Seviyesi Değişiminin Gösterilmesi

Çalışmamızda U87MG hücrelerinde Ribosiklib ve TMZ'nin hem bireysel hem de kombine olarak uygulanması sonucu etkisini, hücre siklusu açısından yorumlayabilmek için western blot yöntemi kullanılarak protein seviyelerindeki değişimleri değerlendirildi. Bu bağlamda siklus proteinleri arasında yer alan siklin D1, transkripsiyon aktivitelerini düzenlemede görevli RB ve tümör baskılayıcıları olarak bilinen p21, p53 ve TAp73 proteinleri Ribosiklib ve TMZ ile inkübe edildi. Ayrıca, çalışmamızda Ribosiklib ve TMZ uygulanmasıyla, hücrelerin sıklusta G1 fazında durması ve hücrelerde DNA hasarı oluşturarak apoptoza yönlendirilmesi amaçlandığı için belirtilen proteinlere ek olarak hücre apoptoz sürecinde kritik bir rol oynayan aktif kaspaz-3 proteinin de ekspresyon seviyesi değerlendirildi.

U87MG hücreleri 24 saat boyunca Ribosiklib ve TMZ ile hem bireysel hem de kombine olarak inkübe edildi ve belirlenen beş gruptan (Kontrol, DMSO, Ribosiklib, TMZ, Ribosiklib+TMZ) bu süre sonunda lizatlar elde edildi. Yükleme kontrolü olarak proteinlerin kDa ağırlıklarına göre vinkulin veya β -Aktin proteinleri kullanıldı. Proteinlerden elde edilen bant görüntüleri, ilgili yükleme kontrollere oranlanarak istatistiksel olarak analiz edildi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. U87MG hücrelerine Ribosiklib ve TMZ'nin bireysel ve kombine olarak uygulanması sonrası elde edilen western blot bantlarındaki değişimler gösterilmektedir (a). Buna bağlı olarak aktif kaspaz-3 (b), p21 (c), siklin D1 (d), p53 (e), TAp73 (f), ve pRB (g) protein ekspresyonlarının yükleme (internal) kontrole oranlar olarak oluşturulan grafikler gösterilmektedir. (ns: $p>0.05$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$).

Western blot analizleriyle elde edilen sonuçlara göre: aktif kaspaz-3, TAp73, p21 ve p53 seviyelerinin kontrole kıyasla Ribosiklib ve TMZ'nin kombine uygulandığı grupta anlamlı olarak arttığı, siklin D1 ve pRB'nin ise kontrole kıyasla ekspresyonunun azaldığı görüldü ($p<0.001$). Ribosiklib'in bireysel uygulandığı gruplarda kontrole kıyasla anlamlı şekilde siklin D1 ve pRB seviyesinde azalmanın olduğu ($p<0.001$), aktif kaspaz-3 ($p<0.001$), TAp73 ($p<0.001$), p21 ($p<0.05$) ve p53 ($p<0.001$) seviyesinde ise artışın olduğu belirlendi. TMZ grubunda ise sonuçların Ribosiklib ile benzer şekilde olduğu görüldü. Fakat, p21 ekspresyonundaki azalış ve p53 ekspresyonundaki artış anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.8a, Şekil 4.8b, Şekil 4.8c, Şekil 4.8d).

5. TARTIŞMA

Primer beyin tümörlerinin son derece ölümcül bir türü olan GBM, agresif büyümesi ve geleneksel tedavilere karşı direnci ile karakterize edilmekte ve buna bağlı olarak hastalarda sınırlı hayatta kalma ile sonuçlanmaktadır (Shahcheraghi vd., 2024). Teşhis konulan bireylerin ortalama sağkalımı 12-18 aydır ve bu hastaların yalnızca %5'i beş yıldan fazla hayatta kalmaktadır (Grech vd., 2020). Derece IV beyin tümörü olarak kabul edilen GBM, genellikle ileri evrede teşhis edilmektedir. Bu da cerrahi müdahalelerin ve tedavinin etkinliğini sınırlandırmaktadır (Rios vd., 2024). GBM tedavisini sınırlayan temel problemler arasında tümörün konumu, heterojen yapısı, yüksek büyüme hızı, invazyonu, anjiyogenez ve immün baskılayıcı özellikte olması yer almakta ve bu da nöro-onkoloji alanı için önemli bir sorun haline gelmektedir (Silva vd., 2019). Ayrıca, KBB varlığı da kullanılan kemoterapötiklerin beyine ulaşımını sınırlandırması sebebiyle GBM için önemli sorunlardan bir diğeridir.

Alkilleyici ajanlardan biri olan TMZ, günümüzde GBM tedavisinde kullanılan birincil ilaçtır (Lyakhova vd., 2020). 1970'lerin sonlarında tıbbi kullanım için sentezlenmiştir ve 2000'lerin başında Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da kullanım için klinik onay almıştır. Bir imidazotetrazin lipofilik ön ilacı olan TMZ, KBB'yi geçerek vücudun pH'ı tarafından fizyolojik olarak aktive edilmektedir ve böylece 5-(3-metiltrazen-1-il) imidazol-4-karboksamid (MTIC) aktif metabolitine dönüşmesini sağlamaktadır. MTIC, vücutta hidroliz edilir ve metildiazonyum iyonları üreterek DNA'nın metillenmesine neden olur. Tümör hücrelerinde DNA hasarını tetikleyerek hücre içinde sitotoksisteye yol açan TMZ, apoptozu da indüklemektedir. Bu nedenle GBM için ilk tercih edilen kemoterapötik ajandır (Singh vd., 2020).

Ancak hastaların çoğunda cerrahi sonrası, radyasyon ve TMZ tedavisi uygulanmasına rağmen, bir yıl içinde nüks meydana gelmektedir. İkinci basamak, kemoterapi ve/veya yeniden ışınlamayı içermektedir. Nüks meydana gelen hastalarda TMZ'nin tekrar uygulanması tümör hücreleri tarafından TMZ'ye direnç geliştirmesi nedeniyle ilk kullanımına kıyasla etkinliği büyük ölçüde azalmaktadır (Braun & Ahluwalia, 2017). Bu nedenle TMZ yerine farklı kemoterapötik ajanlar tedaviye eklenmekte ya da yeni

ajanlarla kombine tedaviler geliştirilmektedir. Bu ajanlarla yalnızca apoptotik yollar değil, aynı zamanda hücre döngüsü düzensizliğini hedef alan yolların da kullanılarak tümör hücrelerinin kontrol altına alınması amaçlanmaktadır.

CDK 4/6 inhibitörlerinin siklin-CDK aktivitesini kontrol ederek hücre dışı ve hücre içi sinyallere yanıt olarak hücre siklusunun ilerlemesini kısıtladığı bilinmektedir (Vidal & Koff, 2000; Wade Harper & Elledge, 1996). Son zamanlarda CDK inhibitörlerinin anti-tümör etkisini aydınlatmaya ve ayrıca CDK inhibitör direncini yöneten moleküler mekanizmaları açıklamaya yönelik yapılan birçok çalışma mevcuttur (Klein vd., 2018). Üçüncü nesil CDK4/6 inhibitörü olan Ribosiklib (LEE011), oldukça seçicidir ve ATP bağlanma bölgeleriyle etkileşime girerek CDK4/6'yı inhibe etmektedir. CDK4/6-siklin D-RB-E2F yolağını inhibe edip kontrolsüz hücre bölünmesini ve tümör ilerlemesini durdurmaktadır (Poratti & Marzaro, 2019). Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda, TMZ ve radyoterapi tedavisine Ribosiklib'in eklenmesiyle, bu kombine etkinin U87MG GBM hücreleri üzerindeki etkinliği ilk kez değerlendirildi.

Bu doğrultuda elde ettiğimiz bulgulara göre: U87MG hücrelerinde yaptığımız doz taraması sonucu Ribosiklib'in IC_{50} değeri 10 μ M, TMZ'nin ise 120 μ M olarak hesaplandı. Benzer şekilde literatürde yer alan TMZ'nin etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar ile bulduğumuz IC_{50} değerleri arasında fark bulunmadı (Rotondo vd., 2020). Literatürde tek başına Ribosiklib'in U87MG hücrelerindeki etkisinin gösterildiği çalışmalar kısıtlıdır. 2020 yılında yapılan bir çalışmada, Ribosiklib'in U87MG hücrelerindeki etkisi değerlendirilmiş, fakat IC_{50} değeri ifade edilmemiştir (Cao vd., 2020a). Bu anlamda çalışmamız ile ilk kez Ribosiklib'in IC_{50} değeri belirlenmiş oldu.

Ayrıca, Ribosiklib'in ve TMZ'nin bireysel ve kombine olarak uygulanması sonucu elde edilen bulgulara; Ribosiklib'in etkisinin zamana bağlı olarak bazı gruplarda TMZ'den daha etkin olduğu saptandı. U87MG hücrelerinin TMZ'ye duyarlı olması sebebiyle belirlenen dozlarda uygulanan TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkisinin Ribosiklib'e kıyasla daha düşük olduğu görüldü. Ek olarak, TMZ ve Ribosiklib'in sinerjistik etkisinin yorumlandığı kombine uygulamalarında ise özellikle 72. saat sonunda hücre proliferasyonunda ciddi azalış gözlemlendi. Literatürde de benzer şekilde CDK4/6

inhibitörlerinden bir diğeri olan Abemasiklib'in glioma hücrelerinde TMZ ile birlikte kombine tedavisi sonucu hücre canlılığındaki azalış ifade edilmiş ve kombine uygulamanın terapötik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Cao vd., 2020a).

Yapılan çalışmalar, GBM tedavisinde eş zamanlı radyoterapi ve TMZ'nin birlikte uygulanmasının, tek başına radyoterapi tedavisine kıyasla hasta sağkalımı açısından fayda sağladığını göstermektedir (Stupp vd., 2005e; Yang vd., 2014). Bu temel üzerine, biz de çalışmamızda kliniği birebir taklit etmek amacıyla TMZ tedavisine radyoterapi ekleyerek, literatürde yer alan çalışmalar doğrultusunda günde 2 Gy ardışık 5 gün boyunca hücrelere radyoterapi uyguladık. Elde ettiğimiz sonuçlarda, radyoterapi ile birlikte TMZ'nin zamana ve doza bağlı olarak tümör hücrelerinde sağkalımı azalttığı görüldü. Elde ettiğimiz bu veri TMZ etkinliği için literatürde yer alan çalışmalar ile paralel sonuç göstermektedir (Barker vd., 2012; Mirimanoff vd., 2004). Ancak literatürde Ribosiklib'in TMZ ve radyoterapi ile birlikte kombine olarak uygulandığı bir çalışma yer almamaktadır. Çalışmamızda U87MG hücrelerinde Ribosiklib'in, TMZ ve radyoterapi ile beraber uygulanması sonucunda; özellikle yüksek doz kombine gruplardaki hücre sağkalımlarının kontrole ve ilaçların bireysel etkisine kıyasla ciddi şekilde azaldığı görüldü. Buradan yola çıkarak çalışmamızla literatüre kazandırılacak önemli bir veri elde edilmiş olup; Ribosiklib'in tümör hücrelerinin sağkalımına etkisi ve GBM hastaları için yeni bir tedavi seçeneği olma potansiyeli taşıdığını göstermektedir.

U87MG GBM hücrelerinde Ribosiklib ile TMZ'nin bireysel ve kombine uygulanması sonucu hücrelerin hareket potansiyelinin değerlendirildiği klonojenik test ile elde ettiğimiz parametrelere göre: hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol hücrelerine kıyasla bireysel Ribosiklib ve TMZ uygulanan hücre gruplarında koloni sayılarında azalma tespit edildi. Buna ek olarak kombine uygulanan grupta da benzer şekilde hücrelerde koloni oluşturma potansiyelinin sınırlandığı görüldü. Literatürde yer alan birçok çalışmada farklı GBM hücre hatlarında uygulanan TMZ gruplarında, kontrole göre koloni sayılarındaki azalma görülmektedir (Köritzer vd., 2013; Sun vd., 2012; Vengoji vd., 2019). Ribosiklib'in GBM hücreleri üzerinde koloni oluşuma etkisinin değerlendirildiği literatür çalışması yer almamaktadır. Ancak hepatoselüler karsinom

hücre hatlarının kullanıldığı bir çalışmada, benzer şekilde kontrol grubuna göre koloni sayılarında azalmanın olduğu gösterilmiştir (Digiacommo vd., 2022). GBM hücre hatlarının kullanıldığı bir diğer çalışmada ise CDK4/6 inhibitörü Abesiklib'in koloni kısıtlayıcı etkisi vurgulanmıştır (Cao vd., 2020b). Medullablastoma hücrelerinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise bir diğer CDK4/6 inhibitörü olan Palbosiklib'in; hücrelerin koloni sayılarını sınırlandırdığı gösterilmiştir (Buzzetti vd., 2021). Elde edilen bu literatür taraması sonuçları ile çalışmamızın bulgularını arasında fark gözlenmedi ve Ribosiklib'in tek başına ve TMZ ile birlikte uygulanmasının U87MG hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelini kısıtlayıp kısıtlamadığı ilk kez değerlendirildi.

Çalışmamızda bireysel ve TMZ ile kombine uygulanan Ribosiklib'in, U87MG hücrelerinde hücre siklusundaki değişimlerinin belirlenmesi için siklin D1/RB/TAp73 yolağı ve bu yolak aracılı alt yolakta bulunan p21, p53 proteinlerinin ekspresyonları değerlendirildi. Bu proteinlere ek olarak apoptotik mekanizmadaki etkisini yorumlamak için ise aktif kaspaz-3 ekspresyonu western blot yöntemi ile analiz edildi.

Buradan yola çıkarak literatürde yer alan bilgilere göre: Malign gliomalar sıklıkla G1/S faz geçişinin kontrolünde rol oynayan hücre siklusunu düzenleyici proteinleri kodlayan genlerde genetik anormallikler göstermektedir (Büsches vd., 1999). Siklinler, hücre siklusu kontrolü ve çoğalmasında rol oynayan protein kinaz ailesinin düzenleyici alt birimleri olarak bilinmektedir (J. Wang vd., 2012). Özellikle siklin D1, hücre farklılaşmasının başlatıldığı ve çoğalmanın baskılandığı G1 fazının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Draetta, 1994). Siklin D1'in aşırı ekspresyonu, laringeal, özofagus, mide, kolorektal, pankreas ve ayrıca glioma hastalarında kötü prognoz ile ilişkilidir (Liu vd., 2008; Sallinen vd., 1999). Literatürde yer alan bilgilere göre derece IV astrositomlarda, derece II ve III astrositomlara göre daha yüksek siklin D1 ekspresyonu olduğu ifade edilmiş ve aşırı ekspresyon, daha kısa hasta sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir (Prados & Levin, 2000). Yapılan son çalışmalar, siklin D1'in proto-onkogen olduğunu ortaya koymuş olup; amplifikasyonunun ve aşırı ekspresyonunun, birçok kanser türünde kontrolsüz hücre büyümesine katkıda bulunabileceğini ortaya koymaktadır (Prados & Levin, 2000). Literatürde C666-1 hücre hattı kullanılarak

Ribosiklib'in hücrelerdeki etkisinin siklin D1 proteini açısından değerlendirildiği bir çalışmada, ekspresyon seviyesinin azaldığı ifade edilmiştir (Donnellan & Chetty, 1998). Çalışmamız ile elde ettiğimiz sonuçlarda ise literatürdeki bilgilere ve çalışmalara benzer şekilde, siklin D1 ekspresyonunun kontrole kıyasla azaldığı gözlenmiştir. TMZ ile kombine şekilde uygulanmasında ise yine kontrole kıyasla ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma görülmüştür.

RB ise hücre siklusunu düzenleyerek hücre proliferasyonunda merkezi bir rol oynamaktadır (Giacinti & Giordano, 2006b). Temel olarak siklin D1, CDK4/6 kompleksi ve E2F ile etkileşim halinde bulunan RB, CDK/siklin D1 kompleksi tarafından fosforile edilmektedir. Fosforile olmuş RB, G1/S geçişinde yer alan genleri aktive eden E2F transkripsiyon faktörünün salınmasını indüklemektedir (Fischer & Müller, 2017).

Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonların ya da bu genlerin silinmesinin, gliomaların oluşumunda ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (T.-J. Wang vd., 2001) ve gliomaların %30'undan fazlasında p53 mutasyonları mevcut olduğu literatürde yer almaktadır (Sidransky vd., 1992). Bu nedenle GBM çalışmalarında p53 (TP53 olarak da bilinmektedir.) genetik değişiklikler için hedef haline gelmektedir (Hollstein vd., 1991). Ayrıca, p53 doğrudan p21 geninin ekspresyonunu indüklemektedir (El-Deiry vd., 1993). *p21* geni ise G1 ve G2 hücre siklusu kontrol noktalarında yer alan hücre büyümesinin negatif bir düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır. Siklusta yer alan siklin/sikline bağımlı kinaz komplekslerine bağlanarak komplekslerin fonksiyonunu engellemektedir (Agarwal vd., 1995).

Literatürde yer alan bir çalışmada nazofaringeal karsinom hücreleri (C666-1 ve HK1 hücre hatları) kullanılarak, 24 ve 48 saat boyunca 2 µM ve 10 µM Ribosiklib uygulaması yapılmış ve bunun sonucunda da hücrelerde p53 ve p21 ekspresyonlarının arttığı, pRB ekspresyonunun ise özellikle 10 µM Ribosiklib uygulanan hücrelerde azaldığı gözlenmiştir (Wong vd., 2018c). Biz de çalışmamızda, benzer şekilde 10 µM Ribosiklib uygulanması sonrası U87MG hücrelerinde p53 ve p21 seviyelerinin arttığını, pRB seviyesinin ise azaldığını elde ettiğimiz sonuçlar ile gösterdik.

p53 protein ailesinin bir üyesi olarak bilinen TAp73 proliferasyonu, apoptozu ve anjiyogenezi kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır (Amelio & Melino, 2015). Literatürde TAp73 geninin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ancak Ribosiklib'in U87MG hücrelerinde bireysel ve TMZ ile kombine uygulanmasının *TAp73* genine etkisinin değerlendirildiği bir çalışma ise henüz literatürde yer almamaktadır. Bu doğrultuda "Ribosiklib'in bireysel ve TMZ ile kombinasyonu, U87MG hücrelerinde hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreleri apoptoza yönlendirir." şeklinde kurguladığımız hipotezimizde hücrelerin TAp73 aracılı apoptotik yola girip girmediği ilk kez yorumlanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarda ise TAp73 proteininin Ribosiklib'in bireysel uygulamasına kıyasla TMZ ile kombine şekilde uygulanması sonucu ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. TAp73 proteinindeki bu seviye, aktif kaspaz-3 ekspresyonunun seviyesi ile benzerlik göstermektedir. Elde ettiğimiz bu veriler, Ribosiklib ve TMZ uygulanan U87MG hücrelerinin, p53'ten bağımsız olarak, TAp73 aracılı apoptoz yolağını kullandığını düşündürmektedir. Ancak sınırlı sayıda çalışma bulunan TAp73 mekanizmasının daha kapsamlı bir şekilde aydınlatılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde U87MG hücreleri kullanılarak Ribosiklib'in TMZ ile birlikte kombine uygulanması sonucu; hücre siklusuna etkisi ve apoptozdaki rolüne yönelik bir veri yer almamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda TMZ duyarlı U87MG hücreleri kullanılarak Ribosiklib'in bireysel ve TMZ ile kombine uygulanması sonucu, hücreler üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar ve öneriler maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır.

- Ribosiklib'in ve TMZ'nin U87MG hücrelerinde etkin olduğu saat ve doz (IC₅₀ değeri) belirlendi.
- Kliniği taklit etmek üzere ışınlamanın dahil edildiği radyoterapi uygulamaları literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda gerçekleştirildi. U87MG hücreleri, Ribosiklib ve TMZ kombine olarak muamale edildikten 1 saat sonra radyoterapinin de eklenmesiyle hücre proliferasyonunu ciddi şekilde azalttığı görüldü.
- Ribosiklib ve TMZ'nin bireysel ve kombine olarak uygulanmasıyla U87MG hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerini sınırlandığı ilk kez çalışmamız ile değerlendirildi.
- Çalışmamız Ribosiklib'in bireysel ve TMZ ile birlikte uygulanması sonucu, siklus üzerine etkisini ve siklin D/RB/TAp73 ile tümör baskılayıcı genler olan p53/p21 yollarının aydınlatılmasını içerdiğinden, elde edilen veriler ilk kez belirlendi. Ek olarak aktif kaspaz-3 ekspresyonunun değerlendirilmesi ile apoptotik mekanizmanın p53'ten bağımsız olarak TAp73 aracılı olduğu yorumlandı.

Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak, Ribosiklib'in TMZ ile kombine olarak uygulanması sonucu agresif karakterli GBM hücrelerinin proliferasyonunu azaltabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, çalışmamız Ribosiklib'in bireysel etkisinin yanı sıra, TMZ ile kombine olarak uygulanmasının GBM tedavisi için yeni bir terapötik ajan olarak kullanılabilmesi için kapsamlı bir ön çalışma niteliğindedir. Bu nedenle çalışmamız ile elde ettiğimiz bulgular, yeni *in vitro* ya da *in vivo* projelerin planlanmasını ve Ribosiklib'in GBM hücreleri üzerine etkinliğinin ayrıntılı olarak araştırılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Abadi, B., Ahmadi-Zeidabadi, M., Dini, L., & Vergallo, C. (2021). Current status and challenges of stem cell-based therapy for the treating of glioblastoma multiforme. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 14(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.08.001>

Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., & Stark, G. R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8493-8497. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8493>

Agarwala, S. S., & Kirkwood, J. M. (2000a). Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma. *The Oncologist*, 5(2), 144-151. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-2-144>

Agarwala, S. S., & Kirkwood, J. M. (2000b). Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma. *The Oncologist*, 5(2), 144-151. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-2-144>

Amelio, I., Antonov, A. A., Catani, M. V., Massoud, R., Bernassola, F., Knight, R. A., Melino, G., & Rufini, A. (2014). TAp73 promotes anabolism. *Oncotarget*, 5(24), 12820-12834. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2667>

Amelio, I., & Melino, G. (2015). The p53 family and the hypoxia-inducible factors (HIFs): determinants of cancer progression. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), 425-434. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.04.007>

Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., Chaudhary, A., Dhanjal, J. K., Dewanjee, S., Vallamkondu, J., & Pérez de la Lastra, J. M. (2023). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases*, 10(4), 1367-1401. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007>

Anton, K., Baehring, J. M., & Mayer, T. (2012). Glioblastoma Multiforme. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 26(4), 825-853. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2012.04.006>

Arcella, A., Limanaqi, F., Ferese, R., Biagioni, F., Oliva, M. A., Storto, M., Fanelli, M., Gambardella, S., & Fornai, F. (2020). Dissecting Molecular Features of Gliomas: Genetic

Loci and Validated Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 685. <https://doi.org/10.3390/ijms21020685>

Arroyo, M., & Raychaudhuri, P. (1992). Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 5947-5954. <https://doi.org/10.1093/nar/20.22.5947>

Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., & Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 130-146. <https://doi.org/10.1038/nrd4504>

Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(23), 5591-5596. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>

Barker, C. A., Chang, M., Chou, J. F., Zhang, Z., Beal, K., Gutin, P. H., & Iwamoto, F. M. (2012). Radiotherapy and concomitant temozolomide may improve survival of elderly patients with glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 109(2), 391-397. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0906-4>

Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00024>

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012a). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193-199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012b). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193-199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012c). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193-199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>

Bastiancich, C., Da Silva, A., & Estève, M.-A. (2021a). Photothermal Therapy for the Treatment of Glioblastoma: Potential and Preclinical Challenges. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.610356>

Bastiancich, C., Da Silva, A., & Estève, M.-A. (2021b). Photothermal Therapy for the Treatment of Glioblastoma: Potential and Preclinical Challenges. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.610356>

Bastiancich, C., Danhier, P., Pr  at, V., & Danhier, F. (2016). Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma. *Journal of Controlled Release*, 243, 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.034>

Beeram, M., Tolaney, S. M., Beck, J. T., Dickler, M. N., Conlin, A. K., Dees, C., Helsten, T. L., Conkling, P. R., Edenfield, W. J., Richards, D. A., Kambhampati, S. R. P., Costigan, T. M., Chan, E., Pant, S., Kalinsky, K., Burris, H. A., Becerra, C. H., Rexer, B. N., Puhalla, S. L., & Goetz, M. P. (2016). A phase 1b study of abemaciclib, an inhibitor of CDK4 and CDK6, in combination with endocrine and HER2-targeted therapies for patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 27, vi556. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw435.08>

Bei, R., Marzocchella, L., & Turriziani, M. (2010). The Use of Temozolomide for the Treatment of Malignant Tumors: Clinical Evidence and Molecular Mechanisms of Action. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 5(3), 172-187. <https://doi.org/10.2174/157489210791760526>

Brada, M., Judson, I., Beale, P., Moore, S., Reidenberg, P., Statkevich, P., Dugan, M., Batra, V., & Cutler, D. (1999). Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *British Journal of Cancer*, 81(6), 1022-1030. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690802>

Brain Kart. (t.y.). Definition, Phases, Duration - Cell Cycle. *11th Botany*.

Braun, K., & Ahluwalia, M. S. (2017). Treatment of Glioblastoma in Older Adults. *Current Oncology Reports*, 19(12), 81. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0644-z>

Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., & Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029-3030. <https://doi.org/10.1002/cnrc.33587>

Burnette, B., & Weichselbaum, R. R. (2013). Radiation as an Immune Modulator. *Seminars in Radiation Oncology*, 23(4), 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2013.05.009>

Butler, M., Prasad, S., & Srivastava, S. K. (2020). *Targeting Glioblastoma Tumor Microenvironment* (ss. 1-9). https://doi.org/10.1007/978-3-030-59038-3_1

Butowski, N. A. (2015a). Epidemiology and Diagnosis of Brain Tumors. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 21, 301-313. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000464171.50638.fa>

Butowski, N. A. (2015b). Epidemiology and Diagnosis of Brain Tumors. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 21, 301-313. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000464171.50638.fa>

Butowski, N. A. (2015c). Epidemiology and Diagnosis of Brain Tumors. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 21, 301-313. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000464171.50638.fa>

Buzzetti, M., Morlando, S., Solomos, D., Mehmood, A., Cox, A. W. I., Chiesa, M., D'Alessandra, Y., Garofalo, M., Topham, C. H., & Di Leva, G. (2021). Pre-therapeutic efficacy of the CDK inhibitor dinaciclib in medulloblastoma cells. *Scientific Reports*, 11(1), 5374. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84082-3>

Büsches, R., Weber, R. G., Actor, B., Lichter, P., Collins, V. P., & Reifenberger, G. (1999). Amplification and Expression of Cyclin D Genes (*CCND1 CCND2 and CCND3*) in Human Malignant Gliomas. *Brain Pathology*, 9(3), 435-442. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00532.x>

Cao, Y. (2017). Tumorigenesis as a process of gradual loss of original cell identity and gain of properties of neural precursor/progenitor cells. *Cell & Bioscience*, 7(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0188-9>

Cao, Y., Li, X., Kong, S., Shang, S., & Qi, Y. (2020a). *Retracted*: CDK4/6 inhibition suppresses tumour growth and enhances the effect of temozolomide in glioma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(9), 5135-5145. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15156>

Cao, Y., Li, X., Kong, S., Shang, S., & Qi, Y. (2020b). *Retracted*: CDK4/6 inhibition suppresses tumour growth and enhances the effect of temozolomide in glioma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(9), 5135-5145. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15156>

CATANI, M. V., COSTANZO, A., SAVINI, I., LEVRERO, M., DE LAURENZI, V., WANG, J. Y. J., MELINO, G., & AVIGLIANO, L. (2002). Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. *Biochemical Journal*, 364(2), 441-447. <https://doi.org/10.1042/bj20011713>

Cha, G. D., Kang, T., Baik, S., Kim, D., Choi, S. H., Hyeon, T., & Kim, D.-H. (2020). Advances in drug delivery technology for the treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of Controlled Release*, 328, 350-367. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.002>

- Chen, L., Endler, A., & Shibasaki, F. (2009). Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Experimental & molecular medicine*, 41(12), 849-857. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.12.103>
- Chhabda, S., Carney, O., D'Arco, F., Jacques, T. S., & Mankad, K. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of tumours of the Central Nervous System: what the paediatric neuroradiologist needs to know. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 6(5), 486-489. <https://doi.org/10.21037/qims.2016.10.01>
- Clarke, A. R., Gledhill, S., Hooper, M. L., Bird, C. C., & Wyllie, A. H. (1994). p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene*, 9(6), 1767-1773.
- Coates, P. (2006). Regulating p73 isoforms in human tumours. *The Journal of Pathology*, 210(4), 385-389. <https://doi.org/10.1002/path.2080>
- Corona, S. P., & Generali, D. (2018a). Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2⁻; advanced breast cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 321-330. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S137783>
- Corona, S. P., & Generali, D. (2018b). Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2⁻; advanced breast cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 321-330. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S137783>
- Corona, S. P., & Generali, D. (2018c). Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2⁻; advanced breast cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 321-330. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S137783>
- Corona, S. P., & Generali, D. (2018d). Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2⁻; advanced breast cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 321-330. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S137783>
- Cristian Prieto-Garcia. (2022). *USP28 regulates Squamous cell oncogenesis and DNA repair via ΔNp63 deubiquitination*.
- DANDY, W. E. (1928). REMOVAL OF RIGHT CEREBRAL HEMISPHERE FOR CERTAIN TUMORS WITH HEMIPLEGIA. *Journal of the American Medical Association*, 90(11), 823. <https://doi.org/10.1001/jama.1928.02690380007003>
- Davis, M. (2016a). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 20(5), S2-S8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>
- Davis, M. (2016b). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 20(5), S2-S8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>

Day, S. E., & Waziri, A. (2012). Clinical Trials of Small Molecule Inhibitors in High-Grade Glioma. *Neurosurgery Clinics of North America*, 23(3), 407-416. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2012.04.004>

de Oliveira, S. A., Borges, R., dos Santos Rosa, D., de Souza, A. C. S., Seabra, A. B., Bains, F., & Marchi, J. (2021). Strategies for Cancer Treatment Based on Photonic Nanomedicine. *Materials*, 14(6), 1435. <https://doi.org/10.3390/ma14061435>

Denysenko, T., Gennero, L., Roos, M. A., Melcarne, A., Juenemann, C., Faccani, G., Morra, I., Cavallo, G., Reguzzi, S., Pescarmona, G., & Ponzetto, A. (2010). Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochemistry and Function*, 28(5), 343-351. <https://doi.org/10.1002/cbf.1666>

DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643-8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>

Dickler, M. N., Tolaney, S. M., Rugo, H. S., Cortes, J., Diéras, V., Patt, D. A., Wildiers, H., Frenzel, M., Koustenis, A., & Baselga, J. (2016). MONARCH1: Results from a phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as monotherapy, in patients with HR+/HER2- breast cancer, after chemotherapy for advanced disease. *Journal of Clinical Oncology*, 34(15_suppl), 510-510. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.510

Dickson, M. A. (2014). Molecular Pathways: CDK4 Inhibitors for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(13), 3379-3383. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1551>

Digiacomo, G., Fumarola, C., La Monica, S., Bonelli, M., Cavazzoni, A., Galetti, M., Terenziani, R., Eltayeb, K., Volta, F., Zoppi, S., Bertolini, P., Missale, G., Alfieri, R., & Petronini, P. G. (2022). CDK4/6 inhibitors improve the anti-tumor efficacy of lenvatinib in hepatocarcinoma cells. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.942341>

D'Mello, S., & Chin, P. (2005). Treating Neurodegenerative Conditions Through the Understanding of Neuronal Apoptosis. *Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders*, 4(1), 3-23. <https://doi.org/10.2174/1568007053005118>

Domínguez, G., García, J. M., Peña, C., Silva, J., García, V., Martínez, L., Maximiano, C., Gómez, M. E., Rivera, J. A., García-Andrade, C., & Bonilla, F. (2006). Δ TAp73 Upregulation Correlates With Poor Prognosis in Human Tumors: Putative In Vivo Network Involving p73 Isoforms, p53, and E2F-1. *Journal of Clinical Oncology*, 24(5), 805-815. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.2350>

Donnellan, R., & Chetty, R. (1998). Cyclin D1 and human neoplasia. *Molecular Pathology*, 51(1), 1-7. <https://doi.org/10.1136/mp.51.1.1>

Draetta, G. F. (1994). Mammalian G1 cyclins. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(6), 842-846. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90054-X)

Du, W., Jiang, P., Mancuso, A., Stonestrom, A., Brewer, M. D., Minn, A. J., Mak, T. W., Wu, M., & Yang, X. (2013). TAp73 enhances the pentose phosphate pathway and supports cell proliferation. *Nature Cell Biology*, 15(8), 991-1000. <https://doi.org/10.1038/ncb2789>

Duffau, H. (2016). Long-term outcomes after supratotal resection of diffuse low-grade gliomas: a consecutive series with 11-year follow-up. *Acta Neurochirurgica*, 158(1), 51-58. <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2621-3>

Durante, M., & Loeffler, J. S. (2010). Charged particles in radiation oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(1), 37-43. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.183>

Duwa, R., Emami, F., Lee, S., Jeong, J.-H., & Yook, S. (2019). Polymeric and lipid-based drug delivery systems for treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 79, 261-273. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.06.050>

EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). (2014). Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *The Lancet*, 383(9935), 2127-2135. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60488-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60488-8)

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), 817-825. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90500-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90500-P)

Elizabeth S Wenzel, A. T. S. (2018). Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo*, 32(1). <https://doi.org/10.21873/invivo.11197>

El-Sayes, N., Vito, A., & Mossman, K. (2021). Tumor Heterogeneity: A Great Barrier in the Age of Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 13(4), 806. <https://doi.org/10.3390/cancers13040806>

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (2000). Inactivation of the DNA-Repair Gene *MGMT* and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *New England Journal of Medicine*, 343(19), 1350-1354. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011093431901>

Fan, C.-H., Liu, W.-L., Cao, H., Wen, C., Chen, L., & Jiang, G. (2013). O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell Death & Disease*, 4(10), e876-e876. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.388>

Fischer, M., & Müller, G. A. (2017). Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(6), 638-662. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1360836>

Fisher, P. G., & Buffler, P. A. (2005). Malignant Gliomas in 2005. *JAMA*, 293(5), 615. <https://doi.org/10.1001/jama.293.5.615>

Flores, E. R., Sengupta, S., Miller, J. B., Newman, J. J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F., & Jacks, T. (2005). Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: Evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*, 7(4), 363-373. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.02.019>

Fornier, M. N., Rathkopf, D., Shah, M., Patil, S., O'Reilly, E., Tse, A. N., Hudis, C., Lefkowitz, R., Kelsen, D. P., & Schwartz, G. K. (2007). Phase I Dose-Finding Study of Weekly Docetaxel Followed by Flavopiridol for Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 13(19), 5841-5846. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1218>

Freeman, J. A., Playford, E. D., Nicholas, R. S., & Thompson, A. J. (1996). A neurological rehabilitation unit: audit of activity and outcome. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 30(1), 21-26.

Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W. R., Pryer, N. K., & Toogood, P. L. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics*, 3(11), 1427-1438.

Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A., & Cavenee, W. K. (2007a). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21(21), 2683-2710. <https://doi.org/10.1101/gad.1596707>

Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A., & Cavenee, W. K. (2007b). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21(21), 2683-2710. <https://doi.org/10.1101/gad.1596707>

Gao, Q., Feng, J., Liu, W., Wen, C., Wu, Y., Liao, Q., Zou, L., Sui, X., Xie, T., Zhang, J., & Hu, Y. (2022). Opportunities and challenges for co-delivery nanomedicines based

on combination of phytochemicals with chemotherapeutic drugs in cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 188, 114445. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114445>

Giacinti, C., & Giordano, A. (2006a). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220-5227. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>

Giacinti, C., & Giordano, A. (2006b). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220-5227. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>

Giotta Lucifero, A., & Luzzi, S. (2021). Against the Resilience of High-Grade Gliomas: The Immunotherapeutic Approach (Part I). *Brain Sciences*, 11(3), 386. <https://doi.org/10.3390/brainsci11030386>

Goel, S., DeCristo, M. J., McAllister, S. S., & Zhao, J. J. (2018). CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends in Cell Biology*, 28(11), 911-925. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.07.002>

Gousias, K., Theocharous, T., & Simon, M. (2022). Mechanisms of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma. *Biomedicines*, 10(3), 564. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030564>

Grech, N., Dalli, T., Mizzi, S., Meilak, L., Calleja, N., & Zrinzo, A. (2020). Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.8195>

Groenland, S. L., Martínez-Chávez, A., van Dongen, M. G. J., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H., Huitema, A. D. R., & Steeghs, N. (2020). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Cyclin-Dependent Kinase 4 and 6 Inhibitors Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib. *Clinical Pharmacokinetics*, 59(12), 1501-1520. <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00930-x>

Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>

Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>

Hill, C. I., Nixon, C. S., Ruehmeier, J. L., & Wolf, L. M. (2002). Brain Tumors. *Physical Therapy*, 82(5), 496-502. <https://doi.org/10.1093/ptj/82.5.496>

Hochegger, H., Takeda, S., & Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(11), 910-916. <https://doi.org/10.1038/nrm2510>

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 Mutations in Human Cancers. *Science*, 253(5015), 49-53. <https://doi.org/10.1126/science.1905840>

Hoover, J. M., Chang, S. M., & Parney, I. F. (2010). Clinical Trials in Brain Tumor Surgery. *Neuroimaging Clinics of North America*, 20(3), 409-424. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2010.04.006>

Hortobagyi, G. N., Stemmer, S. M., Burris, H. A., Yap, Y.-S., Sonke, G. S., Paluch-Shimon, S., Campone, M., Blackwell, K. L., André, F., Winer, E. P., Janni, W., Verma, S., Conte, P., Arteaga, C. L., Cameron, D. A., Petrakova, K., Hart, L. L., Villanueva, C., Chan, A., ... O'Shaughnessy, J. (2016). Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(18), 1738-1748. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609709>

Huang, B., Li, X., Li, Y., Zhang, J., Zong, Z., & Zhang, H. (2021). Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603911>

Huang, X., Di Liberto, M., Jayabalan, D., Liang, J., Ely, S., Bretz, J., Shaffer, A. L., Louie, T., Chen, I., Randolph, S., Hahn, W. C., Staudt, L. M., Niesvizky, R., Moore, M. A. S., & Chen-Kiang, S. (2012). Prolonged early G1 arrest by selective CDK4/CDK6 inhibition sensitizes myeloma cells to cytotoxic killing through cell cycle-coupled loss of IRF4. *Blood*, 120(5), 1095-1106. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415984>

Hurley, J. H., Dean, A. M., Koshland, D. E., & Stroud, R. M. (1991). Catalytic mechanism of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: implications from the structures of magnesium-isocitrate and NADP⁺ complexes. *Biochemistry*, 30(35), 8671-8678. <https://doi.org/10.1021/bi00099a026>

Igarashi, Y., & Sasada, T. (2020). Cancer Vaccines: Toward the Next Breakthrough in Cancer Immunotherapy. *Journal of Immunology Research*, 2020, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2020/5825401>

Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000a). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510-513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>

Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000b). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510-513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>

Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000c). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510-513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>

Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000d). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510-513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>

Iwamoto, F. M., Abrey, L. E., Beal, K., Gutin, P. H., Rosenblum, M. K., Reuter, V. E., DeAngelis, L. M., & Lassman, A. B. (2009). Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma. *Neurology*, 73(15), 1200-1206. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181bc0184>

Jelski, W., & Mroczko, B. (2021). Molecular and Circulating Biomarkers of Brain Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7039. <https://doi.org/10.3390/ijms22137039>

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., & Thun, M. J. (2007). Cancer Statistics, 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57(1), 43-66. <https://doi.org/10.3322/canjclin.57.1.43>

Jiang, P., Du, W., & Yang, X. (2013). A critical role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in TAp73-mediated cell proliferation. *Cell Cycle*, 12(24), 3720-3726. <https://doi.org/10.4161/cc.27267>

Jin, M.-Z., & Jin, W.-L. (2020). The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 166. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00280-x>

Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., & Roos, W. P. (2007). MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair*, 6(8), 1079-1099. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.03.008>

Kanu, O. O., Mehta, A., Di, C., Lin, N., Bortoff, K., Bigner, D. D., Yan, H., & Adamson, D. C. (2009). Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(6), 701-718. <https://doi.org/10.1517/14728220902942348>

Kim, Y. T., & Zhao, M. (2005). Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. *Yonsei Medical Journal*, 46(5), 597. <https://doi.org/10.3349/ymj.2005.46.5.597>

Klein, M. E., Kovatcheva, M., Davis, L. E., Tap, W. D., & Koff, A. (2018). CDK4/6 Inhibitors: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought. *Cancer Cell*, 34(1), 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.023>

Koh, H.-J., Lee, S.-M., Son, B.-G., Lee, S.-H., Ryoo, Z. Y., Chang, K.-T., Park, J.-W., Park, D.-C., Song, B. J., Veech, R. L., Song, H., & Huh, T.-L. (2004). Cytosolic NADP+-

dependent Isocitrate Dehydrogenase Plays a Key Role in Lipid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39968-39974. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402260200>

Koray ÖZDUMAN, M. H. M. N. P. (2019). Glioblastoma. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 29(3):305-334, 2019.

Köritzer, J., Boxhammer, V., Schäfer, A., Shimizu, T., Klämpfl, T. G., Li, Y.-F., Welz, C., Schwenk-Zieger, S., Morfill, G. E., Zimmermann, J. L., & Schlegel, J. (2013). Restoration of Sensitivity in Chemo — Resistant Glioma Cells by Cold Atmospheric Plasma. *PLoS ONE*, 8(5), e64498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064498>

Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes & Cancer*, 2(12), 1117-1133. <https://doi.org/10.1177/1947601911423654>

Kumar, G., Virmani, T., Sharma, A., & Pathak, K. (2023). Codelivery of Phytochemicals with Conventional Anticancer Drugs in Form of Nanocarriers. *Pharmaceutics*, 15(3), 889. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030889>

Kwapisz, D. (2017). Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast Cancer Research and Treatment*, 166(1), 41-54. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4385-3>

Lather, M., & Singh, P. (2020a). Investigating Brain Tumor Segmentation and Detection Techniques. *Procedia Computer Science*, 167, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2020.03.189>

Lather, M., & Singh, P. (2020b). Investigating Brain Tumor Segmentation and Detection Techniques. *Procedia Computer Science*, 167, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2020.03.189>

Lather, M., & Singh, P. (2020c). Investigating Brain Tumor Segmentation and Detection Techniques. *Procedia Computer Science*, 167, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2020.03.189>

Lather, M., & Singh, P. (2020d). Investigating Brain Tumor Segmentation and Detection Techniques. *Procedia Computer Science*, 167, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2020.03.189>

Lather, M., & Singh, P. (2020e). Investigating Brain Tumor Segmentation and Detection Techniques. *Procedia Computer Science*, 167, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2020.03.189>

Laws, E. R., & Thapar, K. (1993a). Brain tumors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 43(5), 263-271. <https://doi.org/10.3322/canjclin.43.5.263>

- Laws, E. R., & Thapar, K. (1993b). Brain tumors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 43(5), 263-271. <https://doi.org/10.3322/canjclin.43.5.263>
- Leal-Esteban, L. C., & Fajas, L. (2020). Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165715. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165715>
- Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198-210. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
- Leibel, S. A., & Sheline, G. E. (1987). Radiation therapy for neoplasms of the brain. *Journal of Neurosurgery*, 66(1), 1-22. <https://doi.org/10.3171/jns.1987.66.1.0001>
- Leighton, F., Poole, B., Lazarow, P. B., & De Duve, C. (1969). THE SYNTHESIS AND TURNOVER OF RAT LIVER PEROXISOMES. *The Journal of Cell Biology*, 41(2), 521-535. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.2.521>
- Li, J., Fu, F., Yu, L., Huang, M., Lin, Y., Mei, Q., Lv, J., & Wang, C. (2020). Cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors in hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2 negative advanced breast cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Breast Cancer Research and Treatment*, 180(1), 21-32. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05528-2>
- Liang, X.-R., Liu, Y.-F., Chen, F., Zhou, Z.-X., Zhang, L.-J., & Lin, Z.-J. (2023). Cell Cycle-Related lncRNAs as Innovative Targets to Advance Cancer Management. *Cancer Management and Research*, Volume 15, 547-561. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S407371>
- Lim, Z.-F., & Ma, P. C. (2019). Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0818-2>
- Lin, J., Liu, G., Chen, L., Kwok, H. F., & Lin, Y. (2022). Targeting lactate-related cell cycle activities for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 1231-1243. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.10.009>
- Liu, B., Ren, Z., Shi, Y., Guan, C., Pan, Z., & Zong, Z. (2008). Activation of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 and Overexpression of its Target Gene CyclinD1 in Laryngeal Carcinomas. *The Laryngoscope*, 118(11), 1976-1980. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e31817fd3fa>
- Loibl, S., & Furlanetto, J. (2022). Integrating CDK4/6 inhibitors in the treatment of patients with early breast cancer. *The Breast*, 62, S70-S79. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2021.12.008>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007a). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007b). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007c). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007d). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Łukasik, P., Załuski, M., & Gutowska, I. (2021). Cyclin-Dependent Kinases (CDK) and Their Role in Diseases Development–Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2935. <https://doi.org/10.3390/ijms22062935>

Lyakhova, I., Piatkova, M., Gulaia, V., Romanishin, A., Shmelev, M., Bryukhovetskiy, A., Sharma, A., Sharma, H. S., Khotimchenko, R., & Bryukhovetskiy, I. (2020). *Alkaloids of fascaplysin are promising chemotherapeutic agents for the treatment of glioblastoma: Review* (ss. 299-324). <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2020.03.010>

Madala, H., Punganuru, S., Arutla, V., Misra, S., Thomas, T., & Srivenugopal, K. (2018). Beyond Brooding on Oncometabolic Havoc in IDH-Mutant Gliomas and AML: Current and Future Therapeutic Strategies. *Cancers*, 10(2), 49. <https://doi.org/10.3390/cancers10020049>

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 222-231. <https://doi.org/10.1038/35106065>

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630-641. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005>

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153-166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>

Mansouri, A., Hachem, L. D., Mansouri, S., Nassiri, F., Laperriere, N. J., Xia, D., Lindeman, N. I., Wen, P. Y., Chakravarti, A., Mehta, M. P., Hegi, M. E., Stupp, R., Aldape, K. D., & Zadeh, G. (2019). MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-Oncology*, 21(2), 167-178. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy132>

Manzoor Ahmad Mir & Burhan Ul Haq. (2023). CDK1 Dysregulation in Breast Cancer. *Therapeutic potential of Cell Cycle Kinases in Breast Cancer* , 195-210.

Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., & Grupp, S. A. (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 371(16), 1507-1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407222>

McGirt, M. J., Chaichana, K. L., Gathinji, M., Attenello, F. J., Than, K., Olivi, A., Weingart, J. D., Brem, H., & Quiñones-Hinojosa, A. redo. (2009). Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. *Journal of Neurosurgery*, 110(1), 156-162. <https://doi.org/10.3171/2008.4.17536>

Mesfin, F. B., & Al-Dhahir, M. A. (2024). *Gliomas*.

Mhaidat, N. M., Zhang, X. D., Allen, J., Avery-Kiejda, K. A., Scott, R. J., & Hersey, P. (2007). Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *British Journal of Cancer*, 97(9), 1225-1233. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604017>

Mirimanoff, R., Mason, W., Kortmann, R., Van den Bent, M., Fisher, B., Taphoorn, M., Reni, M., Curschmann, J., Villa, S., Cairncross, G., Gorlia, T., & Stupp, R. (2004). Radiotherapy (RT) and concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) versus radiotherapy alone for newly diagnosed glioblastoma (GBM): Overall results and recursive partitioning analysis (RPA) of a phase III randomized trial of the EORTC brain tumor and radiotherapy groups and the NCIC clinical trial group. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 60(1), S162. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.06.081>

- Mita, M. M., Joy, A. A., Mita, A., Sankhala, K., Jou, Y.-M., Zhang, D., Statkevich, P., Zhu, Y., Yao, S.-L., Small, K., Bannerji, R., & Shapiro, C. L. (2014). Randomized Phase II Trial of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib (MK-7965) Versus Capecitabine in Patients With Advanced Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 14(3), 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2013.10.016>
- Müller Bark, J., Kulasinghe, A., Chua, B., Day, B. W., & Punyadeera, C. (2020). Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. *British Journal of Cancer*, 122(3), 295-305. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0603-6>
- Nataraj, A. J., II, J. C. T., & Ananthaswamy, H. N. (1995). p53 GENE MUTATIONS AND PHOTOCARCINOGENESIS. *Photochemistry and Photobiology*, 62(2), 218-230. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb05262.x>
- Nemunaitis, J. J., Small, K. A., Kirschmeier, P., Zhang, D., Zhu, Y., Jou, Y.-M., Statkevich, P., Yao, S.-L., & Bannerji, R. (2013). A first-in-human, phase 1, dose-escalation study of dinaciclib, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, administered weekly in subjects with advanced malignancies. *Journal of Translational Medicine*, 11(1), 259. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-259>
- Newlands, E. S., Stevens, M. F. G., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., & Brock, C. (1997a). Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews*, 23(1), 35-61. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(97\)90019-0](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(97)90019-0)
- Newlands, E. S., Stevens, M. F. G., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., & Brock, C. (1997b). Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews*, 23(1), 35-61. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(97\)90019-0](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(97)90019-0)
- Nirmala, M. J., Kizhuveetil, U., Johnson, A., G. B., Nagarajan, R., & Muthuvijayan, V. (2023). Cancer nanomedicine: a review of nano-therapeutics and challenges ahead. *RSC Advances*, 13(13), 8606-8629. <https://doi.org/10.1039/D2RA07863E>
- Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2009). IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. *Clinical Cancer Research*, 15(19), 6002-6007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0715>
- Nygren, P. (2001). What is cancer chemotherapy? *Acta Oncologica*, 40(2-3), 166-174. <https://doi.org/10.1080/02841860151116204>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(4), 764-772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>

OKADA, M., MIYAKE, K., & TAMIYA, T. (2017). Glioblastoma Treatment in the Elderly. *Neurologia medico-chirurgica*, 57(12), 667-676. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2017-0009>

Omuro, A. (2013a). Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. *JAMA*, 310(17), 1842. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>

Omuro, A. (2013b). Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. *JAMA*, 310(17), 1842. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>

Oronsky, B., Reid, T. R., Oronsky, A., Sandhu, N., & Knox, S. J. (2021). A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.574012>

Ortiz, R., Cabeza, L., Perazzoli, G., Jimenez-Lopez, J., García-Pinel, B., Melguizo, C., & Prados, J. (2019). Nanoformulations for Glioblastoma Multiforme: A New Hope for Treatment. *Future Medicinal Chemistry*, 11(18), 2461-2482. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0521>

Ostermann, S., Csajka, C., Buclin, T., Leyvraz, S., Lejeune, F., Decosterd, L. A., & Stupp, R. (2004). Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clinical Cancer Research*, 10(11), 3728-3736. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0807>

Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014a). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology*, 16(7), 896-913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>

Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014b). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology*, 16(7), 896-913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>

Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014c). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology*, 16(7), 896-913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). *Epidemiology of Intracranial Gliomas* (ss. 1-11). <https://doi.org/10.1159/000464374>

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S. M., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). *Epidemiology of Gliomas* (ss. 1-14). https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5_1

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018a). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*, 20(suppl_4), iv1-iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018b). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*, 20(suppl_4), iv1-iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Xu, J., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2016). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology*, 18(suppl_5), v1-v75. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov207>

Ozono, E., Yamaoka, S., & Ohtani, K. (2013). To Grow, Stop or Die? – Novel Tumor-Suppressive Mechanism Regulated by the Transcription Factor E2F. İçinde *Future Aspects of Tumor Suppressor Gene*. InTech. <https://doi.org/10.5772/54510>

Pandith, A. A., Qasim, I., Zahoor, W., Shah, P., Bhat, A. R., Sanadhya, D., Shah, Z. A., & Naikoo, N. A. (2018). Concordant association validates MGMT methylation and protein expression as favorable prognostic factors in glioma patients on alkylating chemotherapy (Temozolomide). *Scientific Reports*, 8(1), 6704. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25169-2>

Perry, A., & Wesseling, P. (2016). *Histologic classification of gliomas* (ss. 71-95). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0>

Perry, J., Okamoto, M., Guiou, M., Shirai, K., Errett, A., & Chakravarti, A. (2012a). Novel Therapies in Glioblastoma. *Neurology Research International*, 2012, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2012/428565>

Perry, J., Okamoto, M., Guiou, M., Shirai, K., Errett, A., & Chakravarti, A. (2012b). Novel Therapies in Glioblastoma. *Neurology Research International*, 2012, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2012/428565>

Piezzo, M., Cocco, S., Caputo, R., Cianniello, D., Gioia, G. Di, Lauro, V. Di, Fusco, G., Martinelli, C., Nuzzo, F., Pensabene, M., & Laurentiis, M. De. (2020). Targeting Cell Cycle in Breast Cancer: CDK4/6 Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6479. <https://doi.org/10.3390/ijms21186479>

- Pokorná, M., Hudec, M., Juříčková, I., Vácha, M., Polívková, Z., Kútina, V., Pala, J., Ovsepian, S. V., Černá, M., & O'Leary, V. B. (2021). All-Trans Retinoic Acid Fosters the Multifarious U87MG Cell Line as a Model of Glioblastoma. *Brain Sciences*, 11(6), 812. <https://doi.org/10.3390/brainsci11060812>
- Poratti, M., & Marzaro, G. (2019). Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 172, 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.064>
- Pozzilli, C., Grasso, M. G., Bastianello, S., Anzini, A., Salvetti, M., Bozzao, L., Von Heland, M., & Fieschi, C. (1992). Structural brain correlates of neurologic abnormalities in multiple sclerosis. *European neurology*, 32(4), 228-230. <https://doi.org/10.1159/000116829>
- Prados, M. D., & Levin, V. (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Seminars in oncology*, 27(3 Suppl 6), 1-10.
- Prasetyanti, P. R., & Medema, J. P. (2017). Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Molecular Cancer*, 16(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0600-4>
- Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019a). Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *ecancermedicalscience*, 13. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
- Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019b). Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13, 961. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
- Rader, J., Russell, M. R., Hart, L. S., Nakazawa, M. S., Belcastro, L. T., Martinez, D., Li, Y., Carpenter, E. L., Attiyeh, E. F., Diskin, S. J., Kim, S., Parasuraman, S., Caponigro, G., Schnepf, R. W., Wood, A. C., Pawel, B., Cole, K. A., & Maris, J. M. (2013). Dual CDK4/CDK6 Inhibition Induces Cell-Cycle Arrest and Senescence in Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(22), 6173-6182. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1675>
- Ramalho, M. J., Andrade, S., Coelho, M. Á. N., Loureiro, J. A., & Pereira, M. C. (2019). Biophysical interaction of temozolomide and its active metabolite with biomembrane models: The relevance of drug-membrane interaction for Glioblastoma Multiforme therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 136, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.01.015>

Rasmussen, B. K., Hansen, S., Laursen, R. J., Kosteljanetz, M., Schultz, H., Nørgård, B. M., Guldberg, R., & Gradel, K. O. (2017). Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. *Journal of Neuro-Oncology*, 135(3), 571-579. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2607-5>

Riccardo Ridolfi. (2018). *Study of the track reconstruction in the FOOT experiment for Hadrontherapy*.

Rios, S. A., Oyervides, S., Uribe, D., Reyes, A. M., Fanniel, V., Vazquez, J., & Keniry, M. (2024). Emerging Therapies for Glioblastoma. *Cancers*, 16(8), 1485. <https://doi.org/10.3390/cancers16081485>

Roda, N., Blandano, G., & Pelicci, P. G. (2021). Blood Vessels and Peripheral Nerves as Key Players in Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers*, 13(17), 4471. <https://doi.org/10.3390/cancers13174471>

Rotondo, R., Oliva, M. A., Staffieri, S., Castaldo, S., Giangaspero, F., & Arcella, A. (2020). Implication of Lactucopicrin in Autophagy, Cell Cycle Arrest and Oxidative Stress to Inhibit U87Mg Glioblastoma Cell Growth. *Molecules*, 25(24), 5843. <https://doi.org/10.3390/molecules25245843>

Sales, A., Beck, J., Schnell, O., Fung, C., Meyer, B., & Gempt, J. (2022). Surgical Treatment of Glioblastoma: State-of-the-Art and Future Trends. *Journal of Clinical Medicine*, 11(18), 5354. <https://doi.org/10.3390/jcm11185354>

Sallinen, S. L., Sallinen, P. K., Kononen, J. T., Syrjäkoski, K. M., Nupponen, N. N., Rantala, I. S., Helén, P. T., Helin, H. J., & Haapasalo, H. K. (1999). Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *The Journal of pathology*, 188(3), 289-293. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199907\)188:3<289::AID-PATH351>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199907)188:3<289::AID-PATH351>3.0.CO;2-X)

Samant, T. S., Dhuria, S., Lu, Y., Laisney, M., Yang, S., Grandeur, A., Mueller-Zsigmondy, M., Umehara, K., Huth, F., Miller, M., Germa, C., & Elmeliegy, M. (2018). Ribociclib Bioavailability Is Not Affected by Gastric pH Changes or Food Intake: *In Silico* and Clinical Evaluations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 104(2), 374-383. <https://doi.org/10.1002/cpt.940>

Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I., & Overington, J. P. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 19-34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>

Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, 35(6), 461-478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>

Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(9), 494-503. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0289>

Shahcheraghi, S. H., Alimardani, M., Lotfi, M., Lotfi, M., Uversky, V. N., Guetchueng, S. T., Palakurthi, S. S., Charbe, N. B., Hromić-Jahjefendić, A., Aljabali, A. A. A., Gadewar, M. M., Malik, S., Goyal, R., El-Tanani, M., Mishra, V., Mishra, Y., & Tambuwala, M. M. (2024). Advances in glioblastoma multiforme: Integrating therapy and pathology perspectives. *Pathology - Research and Practice*, 257, 155285. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155285>

Shakil, M. S., Mahmud, K. M., Sayem, M., Niloy, M. S., Halder, S. K., Hossen, Md. S., Uddin, Md. F., & Hasan, Md. A. (2021). Using Chitosan or Chitosan Derivatives in Cancer Therapy. *Polysaccharides*, 2(4), 795-816. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2040048>

Shapiro, W. R., Green, S. B., Burger, P. C., Mahaley, M. S., Selker, R. G., VanGilder, J. C., Robertson, J. T., Ransohoff, J., Mealey, J., Strike, T. A., & Pistenmaa, D. A. (1989). Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. *Journal of Neurosurgery*, 71(1), 1-9. <https://doi.org/10.3171/jns.1989.71.1.0001>

SHEHU, I. A., ISLAM, M., & SINGH, V. (2021). NOSE-TO-BRAIN DELIVERY, A ROUTE OF CHOICE FOR TARGETING BRAIN TUMORS. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 39-46. <https://doi.org/10.22159/ijap.2021v13i3.40602>

Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsin, N., & Neamati, N. (2018a). Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacological Reviews*, 70(3), 412-445. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014944>

Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsin, N., & Neamati, N. (2018b). Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacological Reviews*, 70(3), 412-445. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014944>

Sidransky, D., Mikkelsen, T., Schwechheimer, K., Rosenblum, M. L., Cavanee, W., & Vogelstein, B. (1992). Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature*, 355(6363), 846-847. <https://doi.org/10.1038/355846a0>

Silva, T. C. C., de Faria Lopes, G. P., de J. Menezes-Filho, N., de Oliveira, D. M., Pereira, E., Pitanga, B. P. S., dos Santos Costa, R., da Silva Velozo, E., Freire, S. M., Clarêncio, J., Borges, H. L., Rehen, S. K., Moura-Neto, V., & Costa, S. L. (2019). Specific Cytostatic

and Cytotoxic Effect of Dihydrochelerythrine in Glioblastoma Cells: Role of NF- κ B/ β -catenin and STAT3/IL-6 Pathways. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18(10), 1386-1393. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180412122101>

Singh, N., Miner, A., Hennis, L., & Mittal, S. (2020). Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resistance*. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.79>

Stephenson, J. J., Nemunaitis, J., Joy, A. A., Martin, J. C., Jou, Y.-M., Zhang, D., Statkevich, P., Yao, S.-L., Zhu, Y., Zhou, H., Small, K., Bannerji, R., & Edelman, M. J. (2014). Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 83(2), 219-223. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.11.020>

Stevens, M. F. G., Hickman, J. A., Stone, R., Gibson, N. W., Baig, G. U., Lunt, E., & Newton, C. G. (1984). Antitumour imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 27(2), 196-201. <https://doi.org/10.1021/jm00368a016>

Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M. J., Tonn, J.-C., & Pentheroudakis, G. (2014). High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25, iii93-iii101. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu050>

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005a). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005b). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005c). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide

for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005d). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005e). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Sun, S., Lee, D., Lee, N. P., Pu, J. K. S., Wong, S. T. S., Lui, W. M., Fung, C. F., & Leung, G. K. K. (2012). Hyperoxia resensitizes chemoresistant human glioblastoma cells to temozolomide. *Journal of Neuro-Oncology*, 109(3), 467-475. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0923-3>

Teixeira, L. K., & Reed, S. I. (2013). Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 387-414. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060410-105307>

Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 23(10), 1985-1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>

Tomar, M. S., Kumar, A., Srivastava, C., & Shrivastava, A. (2021). Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1876(2), 188616. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188616>

Tripathy, D., Bardia, A., & Sellers, W. R. (2017a). Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 23(13), 3251-3262. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3157>

Tripathy, D., Bardia, A., & Sellers, W. R. (2017b). Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in

Various Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 23(13), 3251-3262. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3157>

Upadhaya, P. G., Pulakkat, S., & Patravale, V. B. (2020). Nose-to-brain delivery: exploring newer domains for glioblastoma multiforme management. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(4), 1044-1056. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00747-y>

van Solinge, T. S., Nieland, L., Chiocca, E. A., & Broekman, M. L. D. (2022). Advances in local therapy for glioblastoma — taking the fight to the tumour. *Nature Reviews Neurology*, 18(4), 221-236. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00621-0>

Vengoji, R., Macha, M. A., Nimmakayala, R. K., Rachagani, S., Siddiqui, J. A., Mallya, K., Gorantla, S., Jain, M., Ponnusamy, M. P., Batra, S. K., & Shonka, N. (2019). Afatinib and Temozolomide combination inhibits tumorigenesis by targeting EGFRvIII-cMet signaling in glioblastoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1264-2>

Vidal, A., & Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*, 247(1-2), 1-15. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00092-5)

Villalva, C., Cortes, U., Wager, M., Tourani, J.-M., Rivet, P., Marquant, C., Martin, S., Turhan, A. G., & Karayan-Tapon, L. (2012). O6-Methylguanine-Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation Status in Glioma Stem-Like Cells is Correlated to Temozolomide Sensitivity Under Differentiation-Promoting Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6983-6994. <https://doi.org/10.3390/ijms13066983>

Virmani, T., Kumar, G., Sharma, A., Pathak, K., Akhtar, M. S., Afzal, O., & Altamimi, A. S. A. (2023a). Amelioration of Cancer Employing Chitosan, Its Derivatives, and Chitosan-Based Nanoparticles: Recent Updates. *Polymers*, 15(13), 2928. <https://doi.org/10.3390/polym15132928>

Virmani, T., Kumar, G., Sharma, A., Pathak, K., Akhtar, M. S., Afzal, O., & Altamimi, A. S. A. (2023b). Amelioration of Cancer Employing Chitosan, Its Derivatives, and Chitosan-Based Nanoparticles: Recent Updates. *Polymers*, 15(13), 2928. <https://doi.org/10.3390/polym15132928>

Vito, A., El-Sayes, N., & Mossman, K. (2020a). Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells*, 9(4), 992. <https://doi.org/10.3390/cells9040992>

Vito, A., El-Sayes, N., & Mossman, K. (2020b). Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells*, 9(4), 992. <https://doi.org/10.3390/cells9040992>

Wade Harper, J., & Elledge, S. J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(1), 56-64. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(96\)90011-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(96)90011-8)

Wang, J., Wang, Q., Cui, Y., Liu, Z. Y., Zhao, W., Wang, C. L., Dong, Y., Hou, L., Hu, G., Luo, C., Chen, J., & Lu, Y. (2012). Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 106(3), 473-484. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0692-4>

Wang, T.-J., Huang, M.-S., Hong, C.-Y., Tse, V., Silverberg, G. D., & Hsiao, M. (2001). Comparisons of Tumor Suppressor p53, p21, and p16 Gene Therapy Effects on Glioblastoma Tumorigenicity in Situ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(1), 173-180. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5565>

Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine*, 359(5), 492-507. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126>

Wilson, T., Karajannis, M., & Harter, D. (2014a). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*, 5(1), 64. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>

Wilson, T., Karajannis, M., & Harter, D. (2014b). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*, 5(1), 64. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>

Wong, C.-H., Ma, B. B. Y., Hui, C. W. C., Lo, K.-W., Hui, E. P., & Chan, A. T. C. (2018a). Preclinical evaluation of ribociclib and its synergistic effect in combination with alpelisib in non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma. *Scientific Reports*, 8(1), 8010. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26201-1>

Wong, C.-H., Ma, B. B. Y., Hui, C. W. C., Lo, K.-W., Hui, E. P., & Chan, A. T. C. (2018b). Preclinical evaluation of ribociclib and its synergistic effect in combination with alpelisib in non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma. *Scientific Reports*, 8(1), 8010. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26201-1>

Wong, C.-H., Ma, B. B. Y., Hui, C. W. C., Lo, K.-W., Hui, E. P., & Chan, A. T. C. (2018c). Preclinical evaluation of ribociclib and its synergistic effect in combination with alpelisib in non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma. *Scientific Reports*, 8(1), 8010. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26201-1>

Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., & Berger, M. S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology*, 4(4), 278-299. <https://doi.org/10.1093/neuonc/4.4.278>

Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 221, 107753. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107753>

Yamahara, T., Numa, Y., Oishi, T., Kawaguchi, T., Seno, T., Asai, A., & Kawamoto, K. (2010). Morphological and flow cytometric analysis of cell infiltration in glioblastoma: a comparison of autopsy brain and neuroimaging. *Brain Tumor Pathology*, 27(2), 81-87. <https://doi.org/10.1007/s10014-010-0275-7>

Yang, L.-J., Zhou, C.-F., & Lin, Z.-X. (2014). Temozolomide and Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Systematic Review. *Cancer Investigation*, 32(2), 31-36. <https://doi.org/10.3109/07357907.2013.861474>

Yao, S.-L., Akhtar, A. J., Mckenna, K. A., Bedi, G. C., Sidransky, D., Mabry, M., Ravi, R., Collector, M. I., Jones, R. J., Sharkis, S. J., Fuchs, E. J., & Bedi, A. (1996). Selective radiosensitization of p53-deficient cells by caffeine-mediated activation of p34cdc2 kinase. *Nature Medicine*, 2(10), 1140-1143. <https://doi.org/10.1038/nm1096-1140>

Young, J. S., Kidwell, R. L., Zheng, A., Haddad, A. F., Aghi, M. K., Raleigh, D. R., Schulte, J. D., & Butowski, N. A. (2022). CDK 4/6 inhibitors for the treatment of meningioma. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.931371>

Young, R. M., Jamshidi, A., Davis, G., & Sherman, J. H. (2015). Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of translational medicine*, 3(9), 121. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10>

Zetterberg, A., Larsson, O., & Wiman, K. G. (1995). What is the restriction point? *Current Opinion in Cell Biology*, 7(6), 835-842. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80067-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80067-0)

Zhuang, Q., Yaosheng, H., Yu, M., Wenhui, Z., Weimin, S., Daxin, Z., Ziyin, C., & Elfed, L. (2016). Embedded structure fiber-optic radiation dosimeter for radiotherapy applications. *Optics Express*, 24(5), 5172. <https://doi.org/10.1364/OE.24.005172>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merzuka	Uyruğu	T.C.
Soyadı	KALAY	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	A. Fevzi Alaettinoğlu Anadolu Lisesi	2013
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2018
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı	2024

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	61.25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Fare Meme Kanseri Modelinde Rottlerin Eef2 Kinaz Üzerine Etkisinin İmmün ve Metastatik Yanıtlar Açısından Değerlendirilmesi	TÜBİTAK-1001 (Proje No: 119S564)	2019-2022
Vortiooksetinin, Enterik Sinir Sisteminde Rotenon Maruziyeti ile İndüklenen Patofizyolojik Değişiklikler Üzerine Etkilerinde TLR2/S100B Sinyal Yolağının Rolü	TÜBİTAK-1002 (Proje No: 121R103)	2022-2023
Üçlü Negatif Meme Kanseri Abemasiklib Yüklü Lipid-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Terapötik Etkisinin Araştırılması	TÜBİTAK-3501 (Proje No: 321S077)	2022-2024

Fare Metastatik Meme Kanserinde IDO İnhibitörü ve Melatonin Uygulamasının <i>In Vitro</i> ve <i>In Vivo</i> Etkilerinin Tümörün İmmün ve Metastatik Yanıtları Açısından Değerlendirilmesi	TÜSEB-A (Proje No: 28251)	2023-2024
Temozolomid Duyarlı Glioblastoma Hücre Hattında, TMZ-Radyoterapi Kombine Tedavisine Ek Ribosiklib İlaç Uygulamasının Hücre Siklusu Açısından Değerlendirilmesi	TÜBİTAK-1002B (Proje No: 223Z067)	2023-2024
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 (Proje No: 123Z289)	2023-Devam ediyor.

Burslar-Ödüller:

TÜBİTAK-1002 Kodlu Araştırma Proje Bursu, 2022

TÜSEB-A Grubu Araştırma Proje Bursu, 2023

Yayınlar ve Bildiriler:

- Merzuka KALAY**, Emine YAZICI, Aleya ŞİŞANECİ, Orhan KOÇAK, Ece ŞİMŞEK, Gamze TANRIÖVER. “Is Melatonin Administration with Indoximod Effective in Stopping the Viability and Migration of GBM Cells?” - 15th National and 1st International Congress of Histology and Embryology (THED). 16-28 May 2022 Online (Sözlü Bildiri).
- Sendegül YILDIRIM İLDEM, Ece OYLUMLU, Sayra DİLMAÇ, Aleya ŞİŞANECİ, Emine YAZICI, **Merzuka KALAY**, Gamze GÜNEY ESKİLER, Gamze TANRIÖVER. “Indoximod Restricts Tumor Growth by Targeting Breast Cancer Viability” - 3rd International Multidisciplinary Cancer Research Congress. 7-10 Sep 2023 Istanbul, Türkiye (Sözlü Bildiri).