



LİPOPOLİSAKARİT VE TEMOZOLOMİD
İLE MUAMELE EDİLMİŞ GLİOBLASTOMA
HÜCRESİNDE GREMLİN -1 EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Özge KEDİK

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLJİSİ
ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. Savaş GÜZEL

Yıl:2020

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LİPOLİSAKKARİT VE TEMOZOLOMİD İLE MUAMELE EDİLMİŞ
GLİOBLASTOMA HÜCRESİNDE GREMLİN -1 EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Özge KEDİK

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANA BİLİMDALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Savaş GÜZEL

TEKİRDAĞ-2020



**Bu Tez Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
NKUBAP.02.YL.199 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

ÖZGE KEDİK



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen, güvendiğim, danıştığım, emeklerini asla unutamayacağım akademik duruşu ve karakteri açısından örnek olarak aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışman hocam sayın Prof. Dr. Savaş GÜZEL'e

Lisansüstü öğrenimim boyunca bilimsel ve manevi yönden yetişmemde anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Burhan TURGUT'a

Akademik çalışmalarımın her bir aşamasında bilgi ile yolumu aydınlatan, iyilik ve anlayış ile heyecanıma ortak olan, her konuda desteği ile beni yönlendirerek desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım sayın Dr. Öğr. Üyesi Berna ERDAL ve Dr. Öğr. Üyesi Bahadır BATAR'a,

Çalışmamızı destekleyen Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

Desteği ve sabrı için eşime, aileme ve çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Glioblastoma (GB) bilinen en maling beyin tümörüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalar gremlin 1'i belirli kanser türlerinde potansiyel bir terapötik hedef olarak göstermektedir. Gremlin 1'in tümör dokularında kanserle ilişkili stromal hücreler tarafından eksprese edildiği ve bu şekilde mikroçevre tarafından regüle edilen tümör büyümesine ve invazyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Glioblastoma Multiforma'nın kemoterapi tedavisinde sıklıkla temozolomid (TMZ) kullanılır ve anti-tümör etkisi olan tek alkilleyici ajandır. Lipopolisakkarit (LPS) tümör hücrelerini uyaran bir bakteri hücre duvar elemanı olup, gliomalar üzerinde anti-tümör etkisi bulunmaktadır. Bu deneysel çalışmada; U-118 insan glioblastoma multiforme hücre hattı, hücre kültürü ortamında çoğaltılarak, yaklaşık %95 yoğunluk gözlemlendiği gün flastktan hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Hücre süspansiyonu hazırlanarak 60 mm2lik petrilere hücreler eklenerek çoğalması beklendi. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücelere 200 µM, 100µM, 50 µM, 25 µM konsantrasyon aralıklarında TMZ ve 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml konsantrasyon aralıklarında LPS uygulandı. 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinin hemen ardından protein izolasyonu yapıldı. Gremlin 1 protein düzeyleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blot ile analiz edildi. Çalışmamızda, 24 saat 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda TMZ muamele edilen glioblastoma hücre hatlarında Gremlin-1 ekspresyonlarında artış ve 24 saat 0.1 µg/ml konsantrasyonda LPS uygulanan glioblastoma hücrelerinde gremlin-1 ifadesi seviyelerinde bir azalma gösterdik. Bu bulgular glioblastomada gremlin-1 düzeylerinin önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir. Glioblastoma tümörlerinde direnç gelişme sıklığı ve sağ kalım süresinin kısalığı düşünüldüğünde gremlin-1'in etkinliğinin araştırılmasının oldukça önemli sonuçlar ortaya çıkarılabileceği kanısındayız.

Anahtar kelimeler: 1.Tümör 2.Temozolamid 3.Gremlin-1 4.Glioblastoma 5.Lipopolisakkarit

ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is the most known malignant brain tumor. Recent studies have shown gremlin 1 as a potential therapeutic target for certain types of cancer. Gremlin 1 is thought to be expressed in tumor tissues by cancer-related stromal cells, thereby contributing to tumor growth and invasion regulated by microenvironment, and gremlin1 expression has been associated with tumor development. Temozolomide (TMZ) is often used in chemotherapy treatment of Glioblastoma Multiforme and is the only alkylating agent with an anti-tumor effect. Lipopolysaccharide is a bacterial cell wall element that stimulates tumor cells and has an anti-tumor effect on gliomas. In this experimental study; U-118 human glioblastoma multiforme cell line was replicated in cell culture medium, and cells were removed from the flask with trypsin-EDTA on the day when approximately 95% density was observed. The cell suspension was prepared and the cells were added to 60 mm² petri dishes and they were allowed to multiply. The cells reaching the desired density were applied at 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M concentration ranges, TMZ and LPS at 10 μ g / ml, 1 μ g / ml, 0.1 μ g / ml, 0.01 μ g / ml concentration ranges. Protein isolation was performed immediately after the incubation times of 24 hours and 48 hours. Gremlin 1 protein levels were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot. In our study, we showed an increase in gremlin-1 expressions in 24-hour 25 and 50 μ M concentrations of TMZ-treated glioblastoma cell lines, and a decrease in Gremlin-1 expression in glioblastoma cells that received LPS at a concentration of 0.1 μ g / ml for 24 hours. These findings indicate that gremlin-1 levels play an important role in glioblastoma. Considering the frequency of resistance development and shortness of survival in glioblastoma tumors, we believe that investigating the effectiveness of gremlin-1 can be quite significant.

Key words: 1, Tumor 2.Temozolomide3. Gremlin-1 4. Glioblastoma 5. Lipopolysaccharide

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Beyin Tümörleri	3
2.2.Glioblastoma Multiforme.....	4
2.2.1.Gliomaların Sınıflandırılması.....	5
2.2.1.1.Diffüz astrositom ve anaplastik astrositom	7
2.2.1.2.Glioblastomlar	7
2.2.1.2.1.Primer glioblastomlar (IDH-vahşi tip) :	7
2.2.1.2.2.Sekonder glioblastomlar (IDH-mutant) :	7
2.2.1.2.3.Sınıflandırılmamış glioblastomlar (NOS):	7
2.2.1.3.Oligodendrogliomlar	8
2.2.1.4.Oligoastrositoma	8
2.2.2.Glioblastome Multiformenin Genetik Özellikleri	8
2.2.2.1.Sekonder GBM’da Görülen Genetik Değişiklikler	9
2.2.2.2.Primer Glioblastoma Multiforme’de Görülen Genetik Değişiklikler	10
2.2.2.3. Metil Guanin Metil Transferaz (MGMT).....	11
2.2.3.Glioblastoma Multiforme Epidemiyoloji	13
2.2.4.Glioblastoma Multiforme Yerleşim Bölgeleri	13
2.2.5.Glioblastoma Tedavisi İçin Moleküler Hedefler.....	13
2.2.5.1.Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)	14
2.2.5.2.İzositrat Dehidrogenaz	15
2.2.5.3.Poli-ADP-riboz polimeraz 1 (PARP1)	16
2.2.5.5.PTEN.....	16
2.2.5.6.MikroRNA’lar.....	17
2.2.6.Glioblastoma İçin Perspektif Biyobelirteçler	17

2.2.6.1. Proteinler	18
2.2.6.2. Küçük Moleküller	18
2.2.6.3. Dolaşımdaki Tümör Hücreleri.....	18
2.2.7. Glioblastoma Multiforme Tedavisi	19
2.2.7.1. Glioblastoma Tedavisinde Cerrahi	19
2.2.7.2. Glioblastoma Tedavisinde Radyoterapi	19
2.2.7.3. Glioblastoma Tedavisinde Kemoterapi	20
2.3. Temozolomid	21
2.3.1. Temozolomid Aktivasyonu	22
2.3.2. Temozolomid'in Sitotoksik Etkisine Direnç	23
2.4. Lipopolisakkarit	25
2.4.1. Toll Like Reseptör.....	26
2.4.2. Toll Like Reseptör 4'ün Aktivasyonu	26
2.5. GREMLİN 1	28
2.6. Kemik Morfogenetik Protein Ailesi	29
2.7. Gremlin-1 Biyolojik Fonksiyonları	29
2.7.1. Tümörlerde Gremlin 1 Ekspresyonu	31
2.7.2. Gremlin 1 Ve Anjiogenez	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	34
3.2. Uygulanan Yöntemler	37
3.2.1. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması	37
3.2.2. U118 Glioblastoma Hücrelerine Temozolomid Muamelesi.....	38
3.2.3. U118 Glioblastoma Hücrelerine Lipopolisakkarit Muamelesi.....	40
3.2.4. Protein İzolasyonu	41
3.2.5. Bradford Yöntemi	41
3.2.6. Western-Blot Yöntemi	41
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇLAR	51
KAYNAKÇA.....	54
ÖZGEÇMİŞ	67

TABLO DİZİNİ

Tablo 3. 1: Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre serisi.	34
Tablo 3. 2: Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve menşei.....	35
Tablo 3. 3: Çalışmalarda kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve menşei.....	36
Tablo 3. 4: Temozolomid Konsantrasyonlarının Hazırlanması	39
Tablo 5. 1: Temozolomid uygulanmış glioblastoma hücrelerinde Gremlin 1 protein ifadesi seviyeleri	51
Tablo 5. 2: Lipopolisakkarit uygulanmış glioblastoma hücrelerinde Gremlin 1 protein ifadesi seviyeleri	52



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2. 1:Yetişkinlerde Merkezi Sinir Sistemi Tümör Histolojisi.....	4
Şekil 2. 2:Yaşa Göre Glioma İnsidansı	5
Şekil 2. 3: Gliomların Histolojik ve Genetik Özelliklere Göre Sınıflandırılması	6
Şekil 2. 4: Glioblastomada Görülen Moleküler Değişiklikler.....	9
Şekil 2. 5:A) MGMT tamiri ve transisyon mutasyonunun oluşumu. B) MGMT'nin metilasyon ile sessizleştirilmesi sonucu transisyon mutasyonu oluşumu. MGMT, hücrel genomu alkileyici ajanların mutajenik etkilerinden koruması.....	12
Şekil 2. 6:Normal ve kanser hücresinde izositrat metabolizması.....	15
Şekil 2. 7:Temozolomid mekanizması ve Temozolomid direnci.....	21
Şekil 2. 8:Temozolomid'in aktivasyon mekanizması.	22
Şekil 2. 9:Temozolomid Dirençli Mekanizma	24
Şekil 2. 10:Lipopolisakkarit, Myd88 bağımlı ve bağımsız yollarda TLR4 sinyalini etkinleştirir.....	27
Şekil 2. 11:-N-Gremlin-1'in kristal yapısı.....	28
Şekil 2. 12:Hücrelerde gremlin 1 sinyal mekanizmaları	30
Şekil 2. 13:Gremlin1'in kanserdeki rolü.....	31
Şekil 3. 1: %90 Yoğunluğa Ulaşmış Glioblastoma Hücresi	38
Şekil 3. 2:U118 Glioblastoma Hücrelerine Temozolomid eklenen 48 saatlik 60 mm ² lik petriler	39
Şekil 3. 3:U118 Glioblastoma Hücrelerine Lipopolisakkarit eklenen 24 saatlik 60 mm ² lik petriler	40
Şekil 3.4:Temozolomid ve Lipopolisakkarit uygulanmış hücre hatlarının dikey elektroforezde yürütülmesi.....	42
Şekil 5.1:Temozolomid uygulanmış glioblastoma hücrelerinde gremlin 1 protein ifadesi düzeyleri ...	53
Şekil 5.2:Lipopolisakkarit uygulanmış glioblastoma hücrelerindeki Gremlin 1 protein ifadesi düzeyleri	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-HG	:2-hidroksigluteratın
α-KG	: alfa-ketogluterata
AMPK	: AMP ile Aktifleştirilmiş Protein Kinaz,
APNG	: Alkilpurin-DNA-N-glikosilaz
ATM	: Ataksi Telanjiektazi Mutasyon
AVO	: Asidik Veziküler Organller
BBB	: Kan Beyin Bariyeri
BER	: Baz Eksizyon Onarımı
BMP	: Kemik Morfogenetik Proteinleri
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKN2A	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2
CH3	: Metil
CTC	: Dolaşımdaki Tümör Hücreleri
DBT	: Gecikmiş beyin tümör
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	: Epiteyal-Mezenkimal Geçışı
GBM	:Glioblastoma Multiforme
GSC	: Glioblastom Kök Hücresi
HR	:Homolog Rekombinasyon
IDH	:İzositrat Dehidrojenaz
KKH	:Kanser Kök Hücreleri

LBP	: Lipopolisakkarit bağlayıcı protein
LC3	: Mikrotübül ilişkili Protein Hafif Zinciri 3
LOH	: Heterozigosite Kaybı
LPS	: Lipopolisakkarit
MD	: Miyeloid Farklılaşma Faktörü
MDM2	: Murine Double Minute 2
MGMT	: Metil Guanin Metil Transferaz
MMR	: Yanlış eşleşme-onarım
MSS	:Merkezi Sinir Sistemi
MTIC	:MetilTriazen-midazol-Karboksamid
NOS	:Sınıflandırılmamış Glioblastomlar
PAMPs	: Patojen ilişkili Moleküler Kalıplar
PARP1	:Poli-ADP-riboz polimeraz 1
PDGFRA	: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü A
PI3K	:Fosfatidilinositol 3-kinaz
PTEN	: Fosfataz Tensin Homoloğu
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
TCGA	: Kanser Genom Atlası
TGF- β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
TLR4	: Toll-like reseptör 4
TMZ	: Temazolamid
TP53	: Tümör Baskılayıcı Protein 53
ULK	: unc51 Benzeri Kinaz

1.GİRİŞ

Glioblastom tüm primer malign merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri arasında en yaygın olanıdır ve kötü prognoza sahiptir. Glioblastoma hastalarının kötü prognozuna; yüksek derecede intratümöral hücrel heterojenite, glioblastom hücrelerinin infiltratif büyümesi, hızlı yayılım göstermesi ve yüksek nüks oranı sebep olmaktadır. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) sınıflamasına göre glioblastoma multiforme evre IV astrositom olarak da bilinir. Hastalığın görülme sıklığı yaşla birlikte artar, erkekler de kadınlara oranla daha sık görülür. Yapılan birçok çalışmada glioblastoma multiforme'de (GBM) hastalık ilerlemesi ve prognozunda önemli bir yere sahip olacak yeni biyobelirteçler aramaktadır. Malign gliomalar genellikle tedavi edilemez olarak kabul edilir, ancak yeni biyobelirteçlerin keşfi ile tanı ve tedavide ilerlemeler kaydedilmiştir. Şu anda uygulanan glioma genetik biyobelirteçlerinden en önemlileri IDH1/2 mutasyon durumu, MikroRNA'lar, MGMT promotör metilasyonu, BRAF mutasyonları, Poli-ADP-riboz polimeraz 1 (PARP1) inhibisyonudur. Fakat elde edilen sonuçlara göre hedefe yönelik glioma tanı ve prognozunda kullanılan bu biyobelirteçlerin çoğu tek başlarına etkisiz kalmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar gremlin1'i belirli kanser türlerinde ve glioma tanı ve prognozu için potansiyel bir terapötik hedef olarak göstermektedir.

Gremlin-1, DAN gen ailesinin bir üyesi olan gremlin 1 geninin bir ürünüdür. Gremlin-1, kemik morfogenezik protein (BMP) antagonistidir ve BMP-2, BMP-4 ve BMP-7'yi inhibe eder. BMP'ler transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesinin bir üyesidir. BMP-2, BMP-4 ve BMP-7 anti-enflamatuar aktiviteye sahiptir ve dolayısıyla bu BMP'lerin Gremlin-1 tarafından baskılanması proenflamatuar etkiye sahiptir. Gremlin-1 embriyonik gelişim sırasında böbrek, akciğer, kemik, kıkırdak, deri ve kalp oluşumunda önemli bir düzenleyici rol oynar. Anjiyogenezin vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2'ye (VEGFR2) bağlı indüksiyonunun modülasyonu ve makrofaj göç önleme faktörünün (MIF) inhibisyonu gibi BMP-bağımsız fonksiyonlar da gremlin-1 için tarif edilmiştir. Son zamanlarda, gremlin-1 ekspresyonu tümör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Gremlin-1'in tümör dokularında kanserle ilişkili stromal hücreler tarafından eksprese edildiği ve bu şekilde mikroçevre tarafından regüle edilen tümör büyümesine ve invazyonuna katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Glioblastomalar kendilerini yenileyen kanser kök hücrelerinden oluştuğu için, tümör hiyerarşisinde glioma kanser kök hücreleri kendilerini korunmalarını desteklemek için gremlin 1 salgılar ve salgılanan bu protein kanser kök hücrelerinin (KKH) korunmasında rol

oynar. Yapılan alışmalarda KKH'lerde gremlin 1 ekspresyonunun çok yüksek olduğu gösterilmektedir. Salgılanan bu protein BMP sinyallerini azaltıp hücrelerde tümör büyümesini ve oluşumunu daha da arttırır.

Glioblastoma hastalarına günümüzde uygulanan tedavi biçimleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Cerrahi rezeksiyon ile görünür tümörün tamamının alınabilmesi invaziv ve göç eden hücreler sebebiyle hemen hemen imkansızdır. Bu sebeple cerrahi mdehalenin ardından radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Glioblastoma tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötikler alkilasyon ajanlarıdır. Temozolomid (TMZ), hastalığın tedavisinde kullanılan anti-tümör etkisi olan ve oral olarak uygulanan tek alkilleyici ajan olup, hayatta kalma süresini 14.6 aya kadar çıkarır. Küçük boyutu ve lipofilik özellikleri nedeniyle kan-beyin bariyerini kolayca geçer, daha sonra guanin ve adenin bazlarındaki belirli bölgelerde DNA'yı metillendirir ve çift iplik kopuşlarına neden olan O6 metilguanin DNA eklentilerini üretir. TMZ'nin kullanımı sürecinde karşılaşılan en büyük zorluk hastaların ilaca direnç göstermesidir. Bu durumda GBM'nin başarılı tedavisi için büyük bir engel oluşurmaktadır.

Lipopolisakkarit (LPS) sepsise sebep olabilecek bakteriyel bir endotoksindir. Lipopolisakkarit doğal bağışıklık tarafından algılanan bir immün sistemi uyarıcı ajanı olup çeşitli aracilar oluşturarak zararlı tepkileri çoğaltabilir ya da teşvik edebilir. Toll like reseptörler (TLR) hem doğal hem de adaptifbağışıklığı dzenleyebildiğinden, TLR ligandları beyin tümörü immünoterapisi için umut veren bir yaklaşımdır. TLR4 glioblastoma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir ve fonksiyoneldir. Lipopolisakkaritler glioblastoma hücrelerinde iyi bilinen bir TLR4 ligandı olup, glioma hücrelerinin immüno-fenotipini TLR4 aracılığıyla immünosupresif olandan immünoreaktif olana çevirir, bu durumda glioma immünojenitesini arttırır ve anti-tümöral bağışıklığı ortaya çıkarır, sonuç olarak glioma immünoterapisi için yeni bir perspektif sağlar.

Glioblastoma tümörlerinde Gremlin -1 düzeylerinin rol oynayabileceği yönünde çalışmalar bildirilmektedir. Lipopolisakkarit ve Temozolamid ile muamele edilmiş Glioblastoma hücrelerinde Gremlin-1 ekspresyonunun araştırılması günümüze kadar olan literatürde bir ilktir. Bu çalışmada amacımız glioma U118 hücre hattında temozolamid ve lipopolisakkarit uygulamasına yanıt olarak gremlin 1 ekspresyonunun değerlendirilmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Beyin Tümörleri

Vücudun işleyişi için beyin önemli bir yere sahiptir. Beynin sahip olduğu bu önemli işlev, beyin tümörleri veya gliomlar için iyileştirici tedavi yöntemlerinin oluşturulmasını sağlar (Irmak, 2018).

Beyin tümörü, beyne metastaz yapmış çeşitli kanserlerin veya beyin içindeki farklı primer tümör hücrelerinin bir araya gelerek oluşmasıdır. Dünya üzerinde yayılış gösteren kanser türlerinin %1,5'ini oluşturur ve var olan tüm kansere bağlı kayıpların %2'sinden sorumludur (Delibaş, 2020). Hastalarınbeyninde en çok görülen tümör türü metastazlardır ve primer beyin tümörüne oranla 10 kat daha fazladır (Nicholas A. Butowski, MD. , 2015).

Batı popülasyonunda beyin tümörleri en ölümcül kanserlerden biri olarak gösterilmiştir (DeAngelis L. M., 2001). Bu tümörlerin üçte biri malign geriye kalanı iyi huyludur (Irmak, 2018), görülme sıklığı ırka, yaşa ve cinsiyete göre değişir (Ostrom QT, 2014). Yapılan araştırmalara göre beyin tümörünün oluşumunun nedenleri ile ilgili çok az şey bilinmektedir (Nicholas A. Butowski, MD. , 2015). Tümör oluşumuna sebep olan en önemli risklerden biri radyasyondur ve yüksek dozda alınan radyasyon glioblastom ve meningioma riskini artırır (Omuro A, DeAngelis LM. , 2013). İkinci önemli risk cep telefonları yani elektromanyetik alanlara maruz kalmaktır. Alerjiler, enfeksiyon ve bağışıklık sistemi, genetik etkenler vb. birçok risk tam olarak kanıtlanmasada beyin tümörüne sebep olan etkenler arasındadır (Nicholas A. Butowski, MD. , 2015).

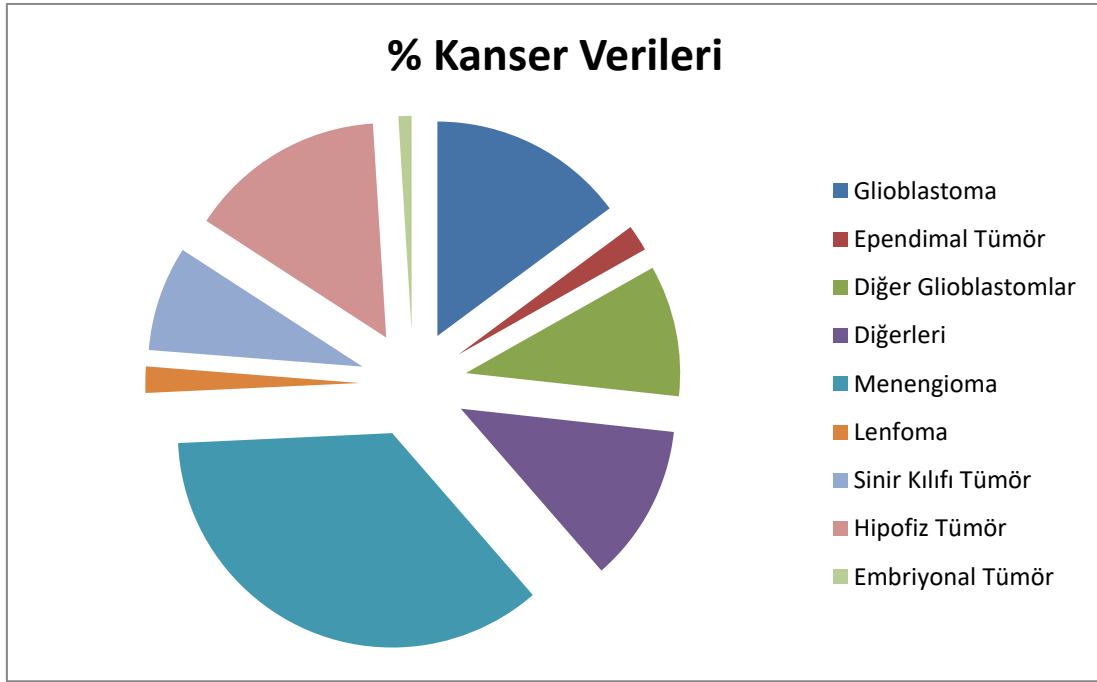
Beyin tümörü ölümcül kanserlerin özellikle çocuk kanserleri arasındaki ölüm nedenlerinin en önde gelen sebebidir. 20-39 yaş aralığındaki erkekler için ikinci, kadınlar için ise beşinci sıradadır (Mazzara, 2004).

Dünya Sağlık Örgütü beyin tümörlerini I ve IV arasında derecelendirmiştir. Dünya Sağlık Örgütüne göre IV derecedeki glioblastoma oldukça sık görülen ve en ölümcül beyin tümörü olarak gösterilmiştir (Van Landeghem, 2009). İnfiltrasyon doğası sebebiyle glioblastomanın ortalama sağ kalım süresi cerrahi, radyasyon ve kemoterapi gibi tedavi yöntemlerine rağmen yaklaşık 15 aydır (Krex, 2007).

2.2.Glioblastoma Multiforme

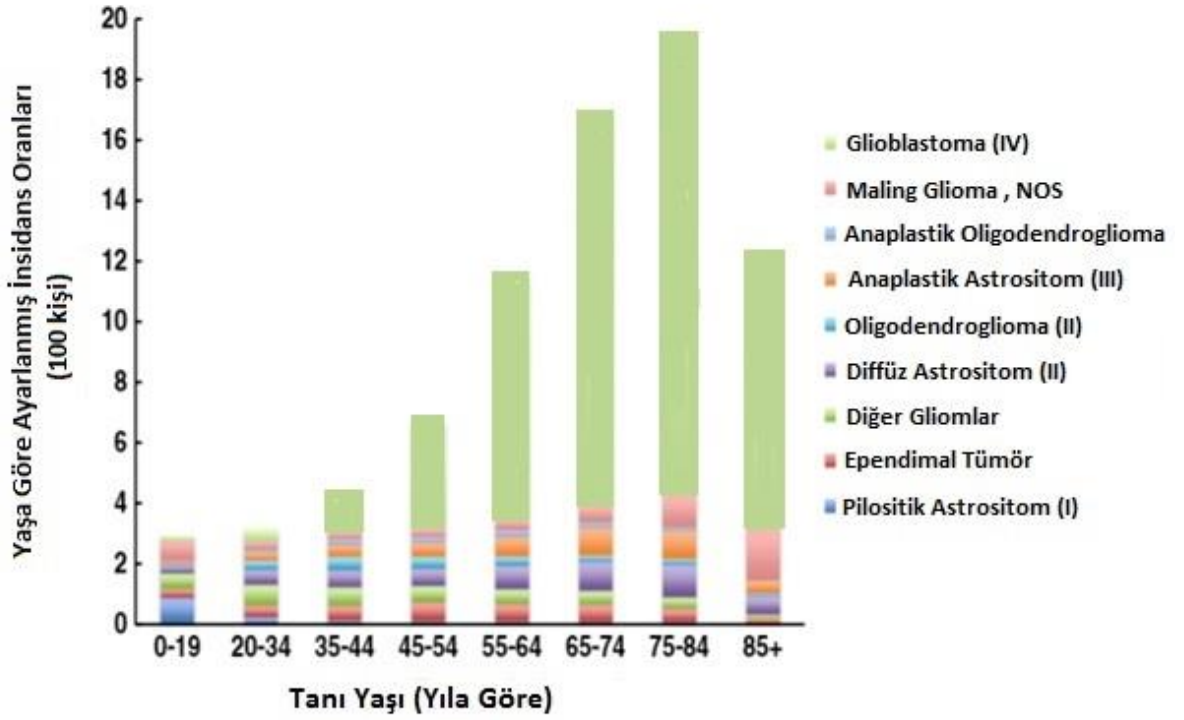
Glioblastoma multiforme, beyin tümörleri içerisinde en yaygın olup hızlı seyir gösteren, ölümcül, malign bir merkezi sinir sistemi kanser türüdür (Alagoz M, 2018);(Silantyev A.S. F. L., 2019).

Primer malign beyin tümörlerinden olan glioblastom; yetişkinlerde en sık görülüp primer tümörler içerisinde %20-30 oranında oluşum gösterir (Tabouret E., 2014).



Şekil 2. 1:Yetişkinlerde Merkezi Sinir Sistemi Tümör Histolojisi (McNeill, 2016).

Malign gliomalar, 15 ile 34 yaş arasındaki insanlar için kanserden ölümlerde üçüncü önde gelen nedenidir ve küresel kanser ölüm oranının % 2.5'ünü oluşturur. Gliomalar arasında, GBM % 50 oranındadır ve en çok 65 yaşın üzerindeki hastalarda görülür (Mallick S., Hakim, & Rath, 2016); (Westermarck, 2012). GBM, yeni kan damarı oluşturma, beyin dokusuna invazyon yapabilme, apoptatik uyarıma direnç gösterme, kendi kendine çoğalma vb. malign fenotipik özelliklere sahiptir (Sathornsumetee, S., Rich, JN., 2007).



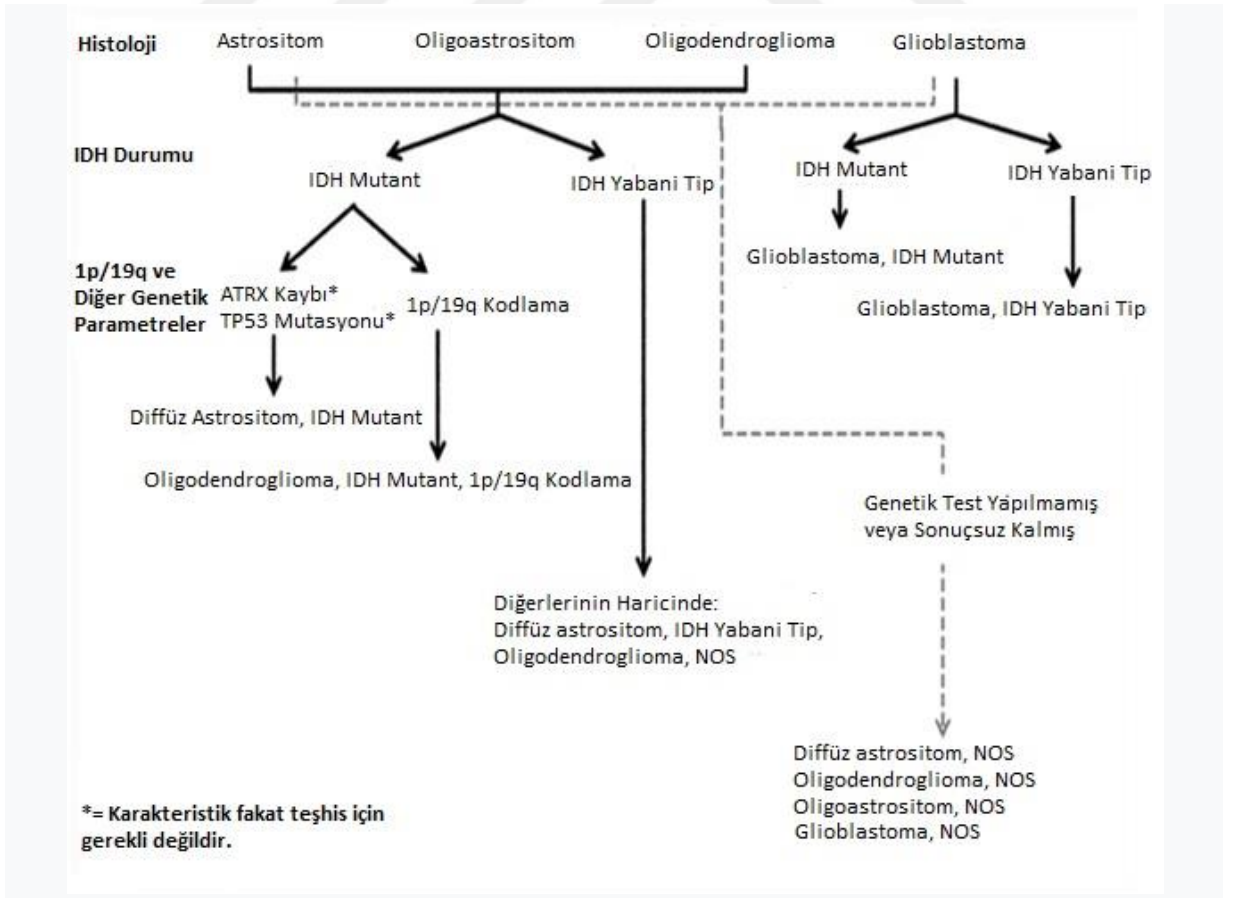
Şekil 2. 2:Yaşa Göre Glioma İnsidansı (Ferris S.P., 2017).

2.2.1.Gliomaların Sınıflandırılması

Gliomlar 2007 yılından mayıs 2016 tarihine kadar yalnızca histolojik olarak sınıflandırılmıştır (Davis, 2018). Histoloji ile doğru sınıflandırma, yetersiz veya temsili olmayan doku örnekleme ile daha da karmaşık olabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü 2016 sınıflandırmasına göre, son 10 yılda gliomalar ile ilgili sınıflandırma şeması, bu tümörlerin moleküler analizlerdeki değişiklikler sebebiyle büyük ölçüde değişmiştir. Özellikle klinisyenlerin tedavilerini daha doğru ve etkili yapabilmelerini, uyguladıkları tedavinin göstereceği etkiyi tahmin edebilmelerini ve hasta için kişisel tedavi uygulayabilecek planlar yapabilmelerini sağlayacak, hastaların yaşamında iyileşmeye yol açacak olan bu sınıflandırma histolojik ve moleküler genetik bilgileri içerecek şekilde yeniden düzenlenmiştir (Davis, 2018); (Ferris S.P., 2017). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2016 sınıflandırması genel olarak beyin tümörü olan hastaların yaşamlarında iyileşmelere sebep olacak klinik, deneysel ve epidemiyolojik çalışmaları kolaylaştıracağı umulmaktadır (Louis D.N., 2016).

DSÖ sınıflandırmasının 2007 versiyonundaki histolojik alt tipler (astrozitoma, oligodendroglioma ve oligoastrozitoma) yerine, yeni kriterler *IDH* mutasyonu, kromozom 1p / 19q delesyonu ve histon mutasyonları için testleri içerir. Böylece astrozitomlar ve GBM, *IDH* mutantı ve *IDH* vahşi tipine ayrılır. Moleküler test mevcut değilse, tümörler histolojiye (astrozitoma, oligodendroglioma ve oligoastrozitoma) dayalı olarak 2007 sınıflandırmasına benzer şekilde sınıflandırılır. Ancak tanıdan moleküler kriterlerin eksik olduğunu göstermek için “NOS” ifadesi kullanılır (Chen R., 2017).

Astrozitomlar, glioma olarak isimlendirilen beyin tümörü grubunda en sık görülen primer beyin tümörü türüdür. DSÖ’ye göre astrozitomlar histolojik ve klinik olarak dört evrede sınıflandırılmaktadır: Piloitik Astrozitom (I.evre), diffüz Astrozitom (II.evre), Anaplastik Astrozitom (III.evre) ve GBM (IV.evre) (Cao, Wang, & Li, 2017); (Sontheimer, 2008). Bu sıralamada I.evre tümörler en düşük şiddetli tümör olarak tanımlanırken, IV.evre tümörler en agresif tümör olarak bilinirler (Delibaş, 2020). 2016 yılında yapılan sınıflandırmada diffüz gliomalar, DSÖ derece II ve derece III astroitik tümörleri, derece II ve III oligodendrogliomaları, derece IV glioblastomları içerir.



Şekil 2. 3: Gliomların Histolojik ve Genetik Özelliklere Göre Sınıflandırılması (Louis D.N., 2016)

2.2.1.1. Diffüz astrositom ve anaplastik astrositom

Evre II ve III olan yaygın astrositomlar ve anaplastik astrositomların hepsi şimdi IDH-mutant, IDH-vahşi tip ve NOS kategorilerine ayrılmıştır. IDH gen testi bakılabiliyorsa büyük çoğunluk IDH-mutant kategorisine, IDH testi mevcut değilse veya tam olarak bakılamıyorsa ortaya çıkan tanı yaygın astrositom, NOS veya anaplastik astrositoma olarak bilinir. Bu tümörlerde IDH-vahşi tip nadir bir tanı olduğunu bilmek gereklidir (Louis D.N., 2016).

2.2.1.2. Glioblastomlar

DSÖ, GBM' i (evre IV) olarak vasküler ve nekroz poliferasyon özelliklerine göre sınıflandırmıştır. Glioblastomlar, İzositrat dehidrojenaz (IDH) gen mutasyonunun durumuna bağlı olarak üç alt tipe sınıflandırılır:

2.2.1.2.1. Primer glioblastomlar (IDH-vahşi tip) : Gliomalı hastaların %90'ı primer glioblastoma olarak tanımlanmıştır ve çoğunlukla 55 yaşın üstündeki hastalarda görülür (DeWitt, Mock, & Louis, 2017);(Louis D.N., 2016). Bu tümörler, ilk histopatolojik incelemede glial öncü hücrelerden direkt olarak gelişen tümörlerdir. İlk 3 ay içinde hızlı geliştiklerinden dolayı hemen klinik belirtileri gösterirler (Krakstad C, Chekenya M., 2010).

2.2.1.2.2. Sekonder glioblastomlar (IDH-mutant) : Beyin hücrelerinin IDH1 ya da IDH2 genlerinde meydana gelen mutasyon ile oluşur. Gliomalı hastaların %10'u sekonder glioblastoma olarak tanımlanmıştır ve daha önce diffüz glioma öyküsü olan genç hastalarda görülür (DeWitt, Mock, & Louis, 2017);(Louis D.N., 2016). Bu tümörler, düşük dereceli gliomlardan gelişerek ortalama 4-5 yıl sonunda düşük dereceli gliomların, sekonder glioblastomaya dönüşmesi beklenir (Krakstad C, Chekenya M., 2010).

Morfolojik olarak primer ve sekonder glioblastoma ayırt edilemez. İki glioblastoma türünde hastaların yaş aralığından bağımsız olarak maling prognoza sahiptir (Sarkar C, 2009).

2.2.1.2.3. Sınıflandırılmamış glioblastomlar (NOS): Tam olarak IDH değerlendirmesi yapılamayan tümörleri ifade eder. NOS'un tanısal ve genetik heterojenlikleri göz önüne alındığında spesifik bir glioblastom kategorisine ait olmadığına dikkat etmek önemlidir. Bu nedenle başka bir grupta sınıflandırılmazlar (DeWitt, Mock, & Louis, 2017);(Louis D.N., 2016).

2.2.1.3.Oligodendroglomlar

Anaplastik oligodendrogloma ve oligodendrogloma için yapılan moleküler testler, hem bir IDH gen ailesi mutasyonunun hem de 1p ve 19q (1p / 19q codeletion) kombine tam kol kayıplarının gösterilmesini ifade eder. Histolojik olarak tipik bir oligodendrogloma NOS ifadesi, test edilemeyen veya sonuçsuz kalan genetik testlerin varlığında kullanılmalıdır (Louis D.N., 2016).

2.2.1.4.Oligoastrozitoma

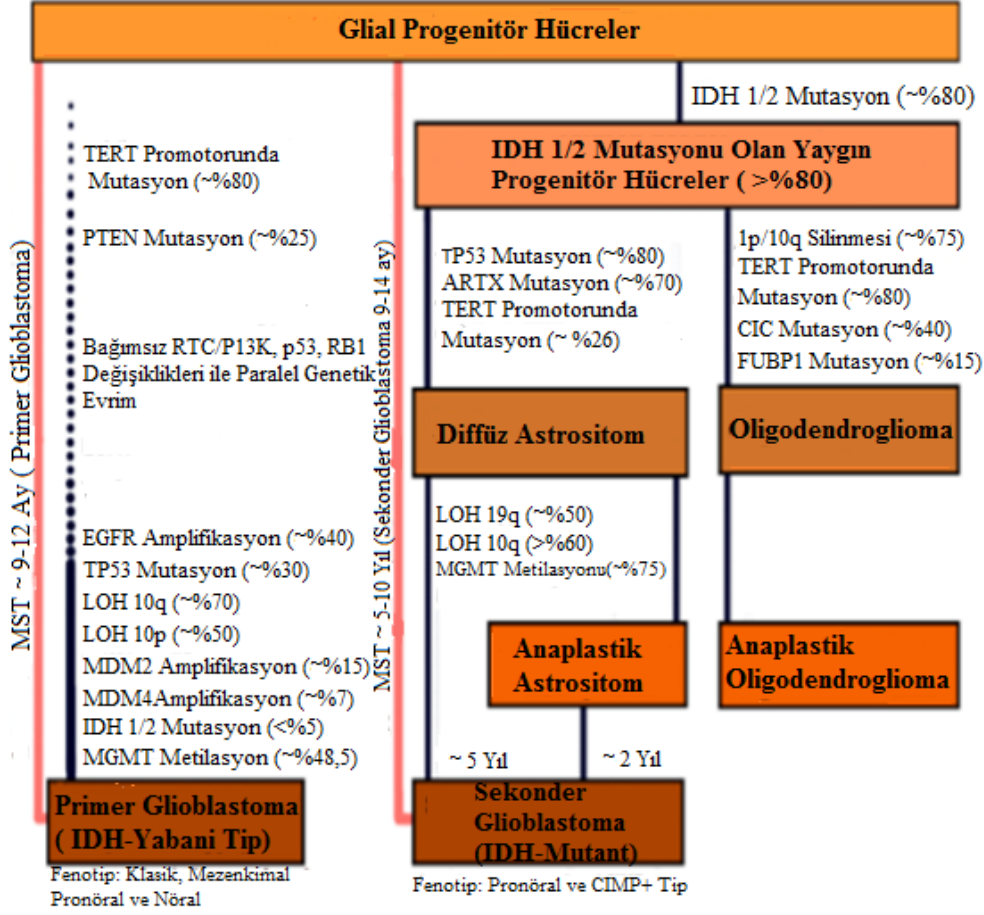
Oligoastrozitoma ifadesi 2016 sınıflandırmasına göre kesinlikle uygun bir ifade değildir çünkü; astroitik ve oligodendroglial bileşeni akla getiren histolojik özelliklere sahip hemen hemen bütün tümörler, genetik test kullanılarak astrozitoma veya oligodendrogloma olarak sınıflandırılabilir. Bu sebepten DSÖ II.evre oligoastrozitoma ve III.evre anaplastik oligoastrozitoma tanısı, sadece uygun tanısal moleküler testlerin yokluğunda sınıflandırılmamış glioblastomlar olarak ifade edilmiştir (Louis D.N., 2016).

2.2.2.Glioblastome Multiformenin Genetik Özellikleri

Tümördeki doku büyümesi tümör baskılayıcı genlerin ve protoonkogenlerin gözetimi altında gerçekleşir. Canlının doku jenerasyonu, gelişimi ve tamiri esnasında büyüme faktörlerini kodlayan, fizyolojik proliferasyondan sorumlu genlere proto-onkogen denir. Proto-onkogenlerin delesyonu, yeniden düzenlenmesi, amplifikasyonu ve mutasyonu sonucu onkogenler oluşur. En iyi bilinen onkogenler:1)Hücre içi iletim yolunda yer alan molekülleri kodlayanlar 2)büyüme faktörleri 3) transkripsiyonel faktörler 4) sinyal molekülleri 5) hücre zarı reseptörlerini kodlayan onkogenlerdir. Hücreye yeni fonksiyon kazandıran ise onkogenlerin kodladığı proteinlerdir. Fizyolojik şartlarda tümör baskılayıcı genler çoğalmayı durduran proteinlerin transkripsiyonunda görevlidirler. Fakat tümör baskılayıcı genlerin yeniden düzenlenmesi, amplifikasyonu, delesyonu ve mutasyonu sonunda işlevlerini yitirmesi büyüme baskılayıcı etkilerinin ortadan kalkması ile sonuçlanır.

GBM heterojen bir genetik yapıya sahiptir. Hastalığın ‘multiform’ olarak isimlendirmesinin sebebi farklı hastalara ait tümör örneklerinde ve aynı tümör dokusundaki genetik yapının değişmesidir (Adamson, 2009). IV. evre gliomlar, tümör gelişimini tetikleyen

birbirinden farklı genetik mutasyonların birikimiyle oluşur. Primer ve sekonder glioblastom olarak genetik parametrelerin değerlendirilmesi sonucu oluşur (Furnari, et al., 2007).



Şekil 2. 4: Glioblastomada Görülen Moleküler Değişiklikler (Silantyevev A.S. F. L., 2019).

GBM olgularından sıklıkla değişen genlerin PTEN (%30), p53 (%40), EGFR (%37) genlerinin olduğunu genom analizlerine bakılarak görülmüştür (PARSONS, 2008).

2.2.2.1. Sekonder GBM'da Görülen Genetik Değişiklikler

Sekonder glioblastomda erken dönemde saptanabilen en sık rastlanan genetik değişiklikler; tümör baskılayıcı protein 53 (TP53), platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (PDGFRA) ve PDGFRA ligandında görülür. Ayrıca kromozom 10 delesyonları, murine double minute 2 (MDM2) genlerinin amplifikasyonu, P16^{INK4}, siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK),

pRB1 genlerinde mutasyonlar sekonder GBM'da görülen genetik değişikliklerdir (Kalkan R.,Atlı E.İ., 2014) ;(Ohgaki H K. P., 2007). Sekonder GBM gelişiminde TP53 yolağı yüksek bir insidansa sahip olup kritik bir rol oynamaktadır. Sekonder glioblastomda primer glioblastoma oranla EGFR gen amplifikasyonu daha nadir görülür (Kalkan R.,Atlı E.İ., 2014).

2.2.2.2.Primer Glioblastoma Multiforme'de Görülen Genetik Değişiklikler

Primer GBM; PTEN mutasyonu (%25), EGFR amplifikasyonu (%36), P16^{INK4A} delesyonu (%31) ve 10q kaybı (%70) en çok görülen değişikliklerdir (Ohgaki H K. P., 2007).

Primer GBM'de kromozom 10q23'te heterozigosite kaybı, siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (CDKN2A), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) genlerindeki mutasyonlar sık görülen genetik değişikliklerdir. Primer GBM'daki genin yapısal değişiklikleri EGFR gen amplifikasyonu ile yakından ilişkilidir. Primer GBM'larda MDM2 proteininin aşırı ekspresyonu %50'den fazlasında görülürken, olguların %60-80'inde kromozom 10q23 heterozigosite kaybı (LOH) meydana gelmekte ve bu bölgede fosfat ve tensin homolog (PTEN) bir tümör baskılayıcı geni görülmektedir (Krakstad C, Chekenya M:, 2010). Primer ve sekonder GBM'nin P16^{INK4A}/RB1 yolağı her ikisi içinde önemlidir. Homozigot P16^{INK4A} delesyonu primer GBM'de daha sık bulunmaktadır (Ohgaki H K. P., 2007). Primer ve sekonder glioblastoma tedavisinde PTEN tümör baskılayıcı gen delesyonu, kromozom 10 kaybı, EGFR ve INK4 amplifikasyonu, HDM2, p16^{INK4A} gen delesyonu veya mutasyonu ortak genetik değişikliklerdir (Saraç, 2014).

GBM oldukça karışık bir sitogenetik yapıya sahiptir. Yapısal ve sayısal kromozom anomaliler glioblastomlarda fazla gözlemlenir. Kırılmalar, delesyonlar ve translokasyonlar yapısal kromozom bozukluklarından en çok karşılaşılanlarıdır. Translokasyonlardan t(15;19) ve t(10;19), kayıplardan 9p, 10p veya q, 19q, 17p ve 13q bölgelerindeki kayıplar en çok rastlanan kromozomal anomalilerdir (Durmaz R., 2007). Ancak kromozomal kayıpların, glioblastomlarda kromozomal kazanımlardan daha fazla olduğu belirtilmektedir (Durmaz R., 2007). Alternatif tedavi geliştirme çalışmaları, GBM'de klinik uygulamalar ile moleküler genetik değişiklikler arasında ilişki kurarak büyük bir hızla devam etmektedir (Khasraw, 2010). Birçok genetik değişiklikler bu bağlamda saptanmıştır.

Tedaviyle ilişkilendirilen GBM'de meydana gelen en önemli genetik değişiklik O⁶-metil-guanin-DNA-metiltransferaz (MGMT) olarak adlandırılan tamir enziminin

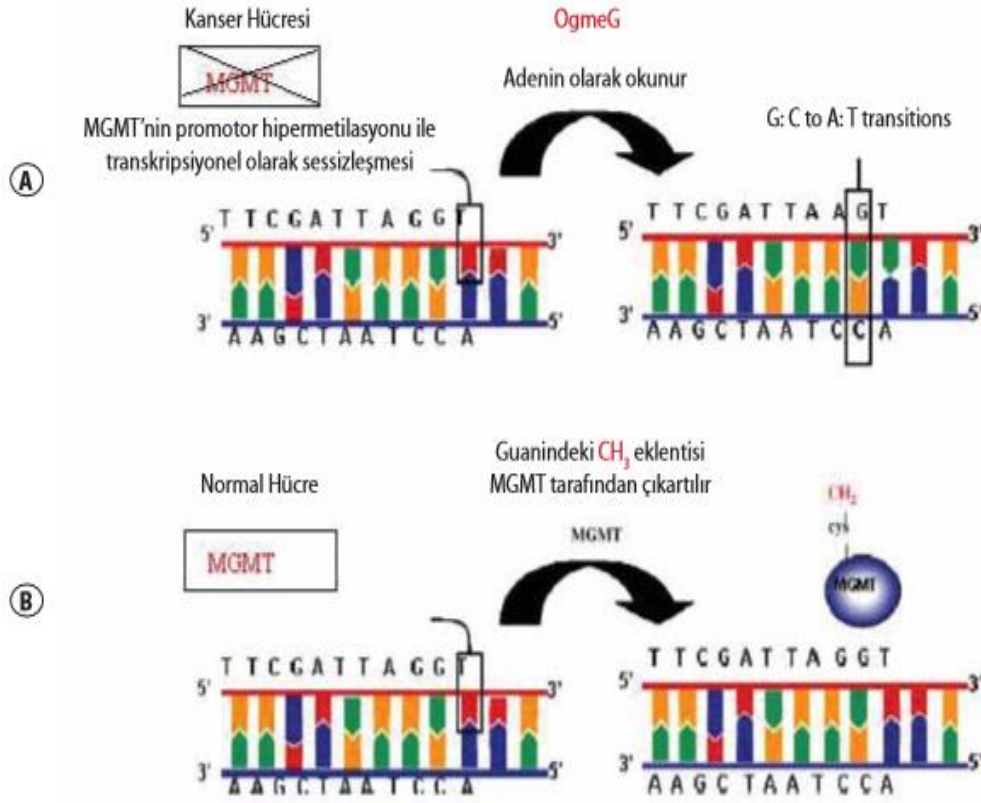
metilasyonudur. Primer glioblastomların %36'sında, tüm GBM'lerin ortalama %45'inde MGMT metilasyonu belirlenmiştir (Taşpınar, 2010). GBM tedavisini MGMT metilasyonunun doğrudan etkilediği bildirilmekte ve bu nedenle GBM tedavisinde MGMT metilasyonu belirteç olarak gösterilmektedir (Taşpınar, 2010).

2.2.2.3. Metil Guanin Metil Transferaz (MGMT)

DNA tamiri ve genom bütünlüğü ile ilgili genidir. Birçok sanayi ürünüde (gıda, ilaç vb.) görülen çeşitli kimyasallar kansere sebep olmaktadır. Bu kimyasal maddelerde bulunan alkilleyici ajanlar hayatımıza girerek hücrelerimizin biyolojik etkilerini değiştirmektedir. Alkilleyici ajanlar (temozolamid gibi) ultraviyole radyasyona benzer bir DNA bozulmasına (genellikle DNA' daki O6-G (Guanin), O4-T (Timin) ve O2-T pozisyonları) sebebiyet verirler. DNA hasarına sebep olan lezyonları düzeltmek için DNA tamir mekanizmaları bulunmaktadır (Dinçer,2000). Memeli hücrelerinde DNA hasarının tamiri için uygulanan mekanizma, DNA'daki alkil gruplarını uzaklaştıran ayrıca DNA onarım proteini olan MGMT'yi (O6-Metilguanin-DNA metiltransferaz) içermektedir (Kaina B., 2010).

MGMT proteininin fonksiyonu, kendisinin parçalanmasıyla sonuçlanır. Bu sebepten dolayı "intihar" enzimi olarak tanımlanır. Bir MGMT aracılı onarım mekanizması yalnızca bir alkil eklentisi tamir edebilir. Bu yüzden canlıda bulunan hücrelerin tamir kapasitesi toplam MGMT molekül sayısı ile orantılıdır. MGMT aracılı DNA tamirinin devamı için hücre içinde yeni MGMT proteinleri sentezlenir. Böylece ne kadar fazla sentez gerçekleşirse o kadar çok tamir gerçekleşmiş olur. Alkil grubunun çeşidine göre MGMT tamir hızı değişmektedir. Bu yüzden molekül büyüklüğü sebebiyle bir alkil grubu olan metil (CH₃) eklentileri daha hızlı tamir edilmektedir (Kaina B, 2007). MGMT molekülü, guanin O6 pozisyonundaki metil grubunu özel olarak ayırır, böylece DNA ipliğinde kırığa neden olmadan nükleotidi doğal şekline göre onarır. Eğer hücre bölünmesinden önce metil grubu kaldırılmaz ise, bu yapılar DNA yanlış eşleşme-onarım (MMR) yolağını tetiklemektedir ve bu durum oldukça sitotoksiktir. Sitotoksik alkilleyici bileşiklerle karşılaşan MGMT molekülü, alkilasyonun mutajenik etkisini yok etmek için hücrelerdeki alkil bağlantılarını bünyesinde bulunan sistein amino asidine transfer etmektedir (Kaina B., 2010). MGMT, TMZ gibi alkilleyici ajanlardan dolayı meydana gelen DNA hasarını onarırken aynı zamanda bu alkilleyici ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmalarından birini oluşturur. MGMT onarım mekanizması alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkilerinden sağlıklı hücreleri korurken, tümör hücrelerinde MGMT

aktivitesinin yüksekliğinden dolayı alkilleyici ajanların tedavi etkilerine karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Alkilleyicilerin oluşturdukları O6 DNA eklentileri ve guanin bazının O6 pozisyonundaki alkilasyonu, kanserin başlamasına ve transisyon mutasyonlarının oluşmasına sebep olur (Kalkan R.,Atlı E.İ., 2014).



Şekil 2. 5:A) MGMT tamiri ve transisyon mutasyonunun oluşumu. B) MGMT'nin metilasyon ile sessizleştirilmesi sonucu transisyon mutasyonu oluşumu. MGMT, hüresel genomu alkilleyici ajanların mutajenik etkilerinden koruması (Jacinto FV, 2007).

MGMT ekspresyonu normal dokularda hücre-tiplerine ve dokulara göre düzenlenirken, kanserli dokularda ise daha farklı ekspresyonlar görülmektedir. Beyin tümörleri ve malign melanomada MGMT aktivitesi diğer kanser türlerine göre daha düşüktür (Kaina B., 2010). MGMT gliomalı kişilerde, kimyasal ajanların indüklediği alkil gruplarının çıkarılmasında görevi vardır. Metillenme sonucunda MGMT proteininin eksilen ekspresyonu, DNA onarım aktivitesinde düşüşe ve TMZ gibi alkilleyici ajanlara karşı hassasiyet artırmaktadır. Gliomalı kişilerde oluşan bu hassasiyet artışı "kemosensitivite sensörü" olarak isimlendirilir. Glioblastomalı hastalarda, hipermetillenmiş MGMT promotoru olan tümörlü kişiler 2yılıda%49 ve 5 yılda %14 sağkalım gösterirken, MGMT promotor metilasyonu olmaya hastaların sağkalımı 2 yılda %15 ve 5 yılda %8'e düşmüştür (Kalkan R.,Atlı E.İ., 2014).

2.2.3.Glioblastoma Multiforme Epidemiyoloji

Epidemiyolojik veriler, Avrupa ve Kuzey Amerika'da kaydedilen GBM vakalarının sayısının her yıl 100.000 yetişkin başına 2-3 olduğunu göstermektedir (Verdecchia A, 2002) ve erkeklerde kadınlara kıyasla insidans oranı 1.26: 1 düzeyindedir (Mahvash M, 2011). Çocuklarda ve yenidoğanlarda GBM vakaları da bildirilmiştir.

Bu tümörün insidansının 100.000 bebekte 1.1 ile 3.6 olduğu tahmin edilmektedir (Winters JL, 2001). Çocuklarda ve yetişkinlerde GBM arasında morfolojik bir fark yoktur. Bildirilen farklılıklar sadece glioma hücrelerinin proliferatif aktivitesi ile ilişkilidir. Proliferasyon indeksi (Ki-67 indeksi) çocuklarda daha yüksektir (Mahvash M, 2011). GBM insidansı beyaz ırk arasında, özellikle sanayi bölgelerinde yaşayanlarda daha yüksektir (Ohgaki H K. P., 2005).

2.2.4.Glioblastoma Multiforme Yerleşim Bölgeleri

GBM'ler serebral hemisferin genellikle derin beyaz maddesinde yerleşim gösterirler. Bu tümörler en çok perietal lob, frontal lob ve oksipital lob sınırında gözlenirler ve hemisferlerde bu tümörlerin çoğu geniş dağılım göstermektedir. Genellikle derin ve dağınık yerleşim göstermelerinden dolayı birçok işlevsel beyin bölgesinde bulunurlar. Meydana gelen bu durum da cerrahi müdahaleyi oldukça zorlaştıran asıl sebeptir. GBM'ler serebral metastazları beyaz-gri cevher sınırında yerleşerek taklit edebilirler (Saraç, 2014).

2.2.5.Glioblastoma Tedavisi İçin Moleküler Hedefler

Glioblastomanın genetik yapısının meydana çıkarılmasını hedefleyen çalışmalar tümöre ait olan farklı moleküler alt tiplerin belirlenmesini sağlamıştır. Bu yeni moleküller glioblastomada hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yararlı olacaktır (Erbayraktar Z., 2015).

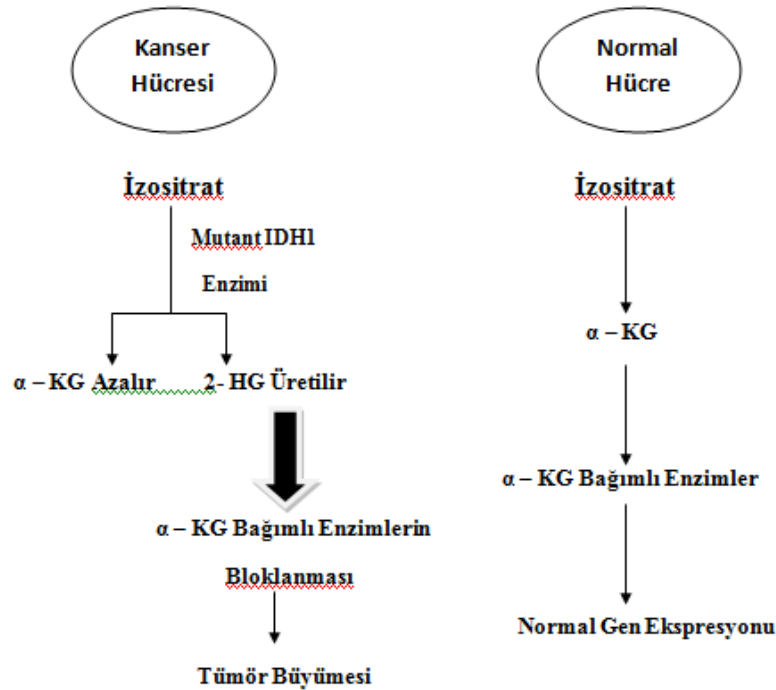
2.2.5.1.Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)

Primer glioblastomada epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gen amplifikasyonu ve aşırı ifadesi en çok görülen ve en karakteristik genetik değişikliklerin başında gelir. Primer glioblastomda EGFR gen amplifikasyonu (%40-80) görülmektedir (Garbe, 2010). EGFR ve EGFR ailesi ile ilgili ortaya çıkan bazı hücrel yolaklardaki değişimler, glioblastomanın gelişiminde iyi bir sinyal ileti sistemi oluşturarak anjiogenezi ve tümör büyümesini arttırıcı etki gösterir (Lopez-Gines C, 2010).

EGFR aşırı ifadesi, hasta yaşamının daha kısa süreceğini ve glioblastoma için kötü bir prognostik faktör yapısına sahip olduğunu gösterir (Shinojima N, 2003). EGFR geninin varyantlarından EGFRvIII için EGFR aşırı ifadesinin tam tersi bildirilmektedir. EGFRvIII'ün hasta yaşamının daha uzun olduğunu göstermektedir. EGFR geninin varyantlarından EGFRvIII genomik seviyede ekson 2-7'deki delesyon sonucu oluşur. Anormal protein ve transkript ekspresyonu meydana gelir. Bu genomik delesyon sonucunda reseptör yapısal olarak otofosforillenmekte, tümör neovaskülarizasyonu artmakta ve tümör büyümesi görülmektedir. Kemoterapi direncinden bu etkilenmiş reseptör sorumlu tutulmaktadır (Kanu OO, 2009). Yapılan çalışmalar temazolomid uygulanmış kemoterapi ve radyoterapi sonrasında hastalığın tekrar etmesi halinde, EGFRvIII ifadesi daha düşük saptanmış EGFRvIII-pozitiflerin, EGFRvIII-negatiflere oranla TMZ'ye daha az direnç gösterdikleri gözlemlenmektedir (Montano N, 2011). EGFR gen amplifikasyonunun tümör için sadece belli bir bölgesini ifade ettiğini düşündüğümüzde, tümör içindeki heterojenliğin tedaviye cevap verilmesini zorlaştıran etkenlerden biri olduğu görülmektedir. İyi bilinen bir tümör baskılayıcı gen olan fosfataz tensin homoloğu (PTEN) üzerinde, EGFR inhibitörlerinin inaktive edici mutasyonlara sebep olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, EGFR inhibitörlerinin glioblastoma da dahil olmak üzere diğer kanser türlerinde de tedaviye direnç gelişimine sebep olacağını göstermektedir (Erbayraktar Z., 2015).

2.2.5.2. İzositrat Dehidrogenaz

İzositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geni, normal fonksiyonu olan izositratı alfa-ketoglutarata çevirmesini katalizleyen enzimi kodlar. IDH genindeki mutasyonlar, enzimin supstrata olan afinitesini bozarak onkometabolit olan 2-hidroksiglutaratın (2-HG) çok fazla üretilmesine ve kanserli hücrelerde bu metabolitin birikmesine sebep olur (Dang L, 2009). Beyinde görülen 2-HG artışı sonucu ROS (Reaktif oksijen türleri) artarak tümör ilerlemesi riskinde de artışa sebebiyet verir. 2-HG hücreler için toksik olup bu toksisiteyi alfa-ketoglutarat ve glutamat enzimlerinin inhibisyonuna neden olarak sağlamaktadır (Ferrolı P, 2010); (Lee CH, 2010). Mutant IDH1/ IDH2'ye özel inhibitörler uygulanarak 2-HG birikimini engellenebilir (Rohle D, 2013). 2-HG, histon demetilaz ailesinden dioksigenazları inhibe ederek DNA ve histon modifikasyonlarına ve tümör mikroçevresinin değişmesinde rol oynar (Zhang C, 2013). IDH1 mutasyonu tümöre özgüdür ve glioma çeşitlerinde özellikle histolojik olarak sınıflandırılmış sekonder glioblastom ve düşük derece gliomalarda görülür (Lei Y, 2010). IDH inhibitörleri glioblastoma gibi kanser türlerinde denenmekte ve elde edilen veriler, inhibitörlerin etkinliği ve tedaviye direnç gelişimi hakkında bilgi vermektedir (Erbayraktar Z., 2015).



Şekil 2. 6: Normal ve kanser hücresinde izositrat metabolizması (Garber, 2010).

2.2.5.3.Poli-ADP-riboz polimeraz 1 (PARP1)

PARP1, homolog rekombinasyon (HR) aracılığıyla tek zincir üzerindeki DNA kırıklarının tamirinde rol oynayan bir enzimdir. PARP1 aşırı ifadesi, birçok kanser türünde görüldüğü gibi, PARP1'in engellenmesi tamir edilemeyen DNA hasarının oluşmasına ve hücre ölümüne yol açar. Bu sebepten, kanser tedavisi için PARP1 inhibisyonu önemli olup, bu inhibisyon glioblastoma hücrelerini radyoterapiye duyarlı hale getirmektedir. PARP inhibitörlerinden Olaparib ve PJ34 glioblastoma hücrelerini apoptotik hücre ölümüne götürdüğü ve PARP inhibitörlerinin glioblastoma tedavisi için uygulanabilecek alternatif bir strateji olduğu görülmektedir (van Vuurden DG, 2011).

2.2.5.4.Notch Sinyal İletim Yolağı

Notch sinyal iletim yolağı aktifleştiginde hücre türüne ve fizyolojik duruma bağlı olarak iki farklı etki meydana gelir. Bunlar tümör büyümesinin baskılanması veya uyarılmasıdır. Bu sinyal yolağı primer glioblastomlarda aktif iken, sekonder veya düşük dereceli astrositomlarda inaktiftir (Stockhausen MT, 2010).

2.2.5.5.PTEN

PTEN geni kromozom 10q23.3 bölgesinde yer alan tümör baskılayıcı bir genidir. Hücrede sitoplazma veya hücre çekirdeğinde bulunarak farklı aktiviteler gösterir. PTEN'nin hücre çekirdeğindeki görevi; kromozom stabilitesinin ve apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde ve DNA tamiridir. Stoplazmadaki görevi ise; fosfataz aktivitesi ile fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal iletiminin önemli negatif düzenleyicisidir (Erbayraktar Z., 2015). PTEN mutasyonları beyin tümörlerinde ve birçok kanser türünde gözlemlenir. PTEN mutasyonları sonucunda fosfotaz aktivitesi kaybolup, hücre membranında madde birikimine neden olur. Bu durumda oradaki sinyal iletim yolunu aktifleştirerek hücre büyümesi ve çoğalması gibi olaylara sebep olur. Bundan dolayı, kanser tedavisinde görülen PTEN mutasyonları için sinyal iletim yolağında görevli bazı proteinleri hedef alan stratejiler geliştirilmektedir (Cloughesy TF, 2014).

2.2.5.6.MikroRNA'lar

Son 10 yılda yapılan glioblastoma kanser türüne ait genetik değişiklikler artmıştır. Özellikle Kanser Genom Atlası (TCGA) veri tabanında tutulan transkriptomik ve genomik veriler, glioblastomada meydana gelen değişiklikleri moleküler düzeyde iyi bir şekilde kavramamızı sağlar. mikroRNA'ların glioblastoma patogenezi üzerindeki etkisinin anlaşılmasına TCGA veritabanı, büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Glioma ve glioblastoma tanı ve prognozu ile ilgili spesifik miRNA'lar tanımlanmıştır. Spesifik miR-21, glioblastoma ve çeşitli kanserlerde devre dışı (regüle) edilemediği için hücre döngüsünü baskılayarak, p53-bağımlı apoptotik sinyal iletimini engelleyerek glioblastoma tümör hücrelerinin bölünmesini arttırdığı bilinmektedir (Papagiannakopoulos T, 2008). Bazı araştırmalarda standart glioblastoma tedavisi olan TMZ'in etkinliğini mikroRNA'ların düzenlendiği bildirilmektedir. Glioblastoma tümör büyümesinde ve gelişiminde aktif rol alan mikroRNA'ların ifadelerinin baskılanması, nüks eden glioblastoma tedavisinde kullanılabilir (Erbayraktar Z., 2015). Fakat miRNA'lar tümör ve çeşitli hastalıklar için erken tanı konmasında yenilikçi bir strateji olarak görülsede, düşük spesifitesi ve seçiciliği düşünüldüğünde kanser tanısının konması için henüz güvenilir bir belirteç olarak düşünülemez (Wang H., 2018).

2.2.6.Glioblastoma İçin Perspektif Biyobelirteçler

Tümör belirteçlerinde ideal bir biyobelirteç kolayca ulaşılabilen, hastalığın önemi ve varlığı hakkında doğru bilgi verebilen olup, aynı zamanda rutin analizlerde kullanılabilmesi için ekonomik olmaları, duyarlılığa, özgüllüğe tümör yükünü aktif olarak yansıtmaya yeteneğine sahip olmalıdır (Cheng, et al., 2014). Glioblastoma için hem doku hem de dolaşımdaki biyobelirteçler kullanılarak klinik anlamda karakterize edilebilir ve çeşitli fiziko-kimyasal analizlerle belirlenebilir (Lombardi, et al., 2015).

Beyin tümörlerinin erken teşhisi ve sınıflandırılması için nükleik asit biyobelirteçleri kullanılmaktadır. Bu nükleik asitler; kanda ve diğer biyolojik sıvılarda, serbest veya hücre dışı veziküllerle ilişkili hareket eden nükleik asitlerdir. Şu anda uygulanan glioma genetik biyobelirteçlerinden en önemlileri IDH1/2 mutasyon durumu, MGMT promotör metilasyonu, 1p/19q silinmesidir. Bu ileri düzeydeki biyobelirteçlerin kullanılması ile histolojik olarak ayırt edilemeyen glioblastomayı genetik mutasyonların varlığı veya yokluğu ile sınıflandırarak tedavinin yönünü belirlemek mümkündür. Fakat bu biyobelirteçler tek

başlarına yetersizdir özellikle düşük konsantrasyonlar, kan beyin bariyerinin (BBB) zayıf penetrasyonu gibi etkiler moleküler düzeydeki belirteçlerin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır (Silantsev A.S. F. L., 2019).

2.2.6.1. Proteinler

Proteinler glioblastoma için teşhis ve prognostik belirteç olarak kullanılıp, glioblastomanın sıvı matriksinde ve dokularında tespit edilirler: beyin omirilik sıvısı (BOS), idarar, kan ve türevleri. Günümüzde glioblastoma multiforme protein tümör belirteçlerini araştırmak için kullanılan ana yaklaşım, gen ekspresyon çalışmasıyla birlikte proteomik profilin incelenmesidir (Swartling, 2012).

Tek tümör hücresi düzeyinde gerçekleştirilen protein ekspresyonları, tümörün sahip olduğu içsel direnci oluşturmakta ve tüm tümör kütle için bakıldığında proteomik profilin tam etkinliğini göstermemektedir. Tam proteomik tümör profili, kanser gelişimi için kullanılan nesnenin tamamen adapte olup karakterize edilmesine izin verir. Protein markırlarının özgüllüğünden dolayı yanlış sonuç vermektan kaçınmak için birkaç farklı protein markırlarıyla çoklu değerlendirmeler yapılmaktadır. Glioblastomalar dahil olmak üzere tüm beyin tümörlerinde protein sonrası translasyonel modifikasyonların çalışmasının, hastalığın tedavisinde yeni belirteçlerin ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır. (Petushkova, et al., 2017); (Singh, et al., 2016).

2.2.6.2. Küçük Moleküller

Küçük moleküller hücre membranları arasında hızlı geçiş yapan ve hücre içi ve dışı alanlara ulaşabilen monomerleri, organik bileşikleri, hücre lipitlerini içerir. Glioblastom hücrelerindeki bu küçük moleküllerde gerçekleşen farklılıkların bilinmesi, glioblastomun sınıflandırılması ve prognostik belirteç olarak kullanılmasını sağlar. Fakat düşük spesifiteleri ve moleküler ağırlıkları nedeniyle hastaya konan tanıyı düzeltmek için tek başlarına bir marker olarak kullanılması zordur (Longuespée, et al., 2018).

2.2.6.3. Dolaşımdaki Tümör Hücreleri

Primer tümör veya metastazdan ayrılıp, sistemik dolaşıma katılan tümör hücreleridir. Glioma tümör hücrelerinin, büyük invazivlik sebebiyle kan dolaşımına nüfuz ettiği ve

sonucunda kan beyin bariyerinin üstesinden gelip, tümör gelişimi esnasında BBB fonksiyonunun bozulmasına sebep olduğu bilinmektedir (Krol, et al., 2018). Kan numunelerinde dolaşımında kanser hücrelerinin belirlenmesi, kan numuneleri kullanılarak merkezi sinir sistemi malign neoplazmlarında hastalık tanısı ve prognozu gerçekleştirme avantajından dolayı önemli bir klinik potansiyele sahiptir (Cohen, et al., 2017).

2.2.7.Glioblastoma Multiforme Tedavisi

GBM, tedavisi oldukça zor olan kanserlerden biridir, yüksek mortalite ve morbitide özelliklerine sahiptir. Son yıllarda önemli terapötik ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, glioblastom hastalarının prognozu hala kasvetli kalmaktadır. Cerrahi, eşzamanlı radyokemoterapi ve adjuvan kemoterapi gibi yoğun tedavilere rağmen glioblastomun ortalama sağkalımı 15 ayın altındadır (Tabouret E., 2014).

2.2.7.1.Glioblastoma Tedavisinde Cerrahi

GBM tedavisinde cerrahi müdahalenin amacı, tümörün nörolojik yıpranmaya sebebiyet vermeden alınmasıdır (Levin, 2001). Cerrahi, kısmi veya total rezeksiyon şeklinde tümörün boyutu ve lokalizasyonuna göre yapılmaktadır (Sathornsumetee, 2008). Fakat, tümörün tamamının çıkartılması GBM'in infiltratif yapısından dolayı imkansızdır (Kim, 2006). Başarılı bir cerrahi operasyon sonrasında ufak bir mikroskobik tümör kalıntısı bile GBM 'in nüksüne sebep olmaktadır. Radyoterapi ve kemoterapi, cerrahi müdahale sonrasında kalan tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemek ve etkinliğini ortadan kaldırmak için uygulanmaktadır (Sathornsumetee, 2008).

2.2.7.2.Glioblastoma Tedavisinde Radyoterapi

Radyoterapi uygulaması GBM hastalarında sağkalıma ve nörolojik yaşam kalitesine katkı sağladığı gösterilmiştir (Omay, 2009). En sık karşılaşılan problem radyoterapi dozunun belirlenmesidir. Güncel radyoterapi, tümör yatağına 60 Gray (Gy)'lik dozun 6 haftada düzenli şekilde verilmesidir (SMITH, 2008). Fakat uygulama şeklinde bazı farklılıklar görülmektedir.

Ortalama 2.5 Gy X 20 veya 7Gy X 4 şeklinde düzenlenen radyasyonun, lokal veya tüm beyne farklı sürelerde uygulandığı görülmüştür (Clarke, 2008).

2.2.7.3.Glioblastoma Tedavisinde Kemoterapi

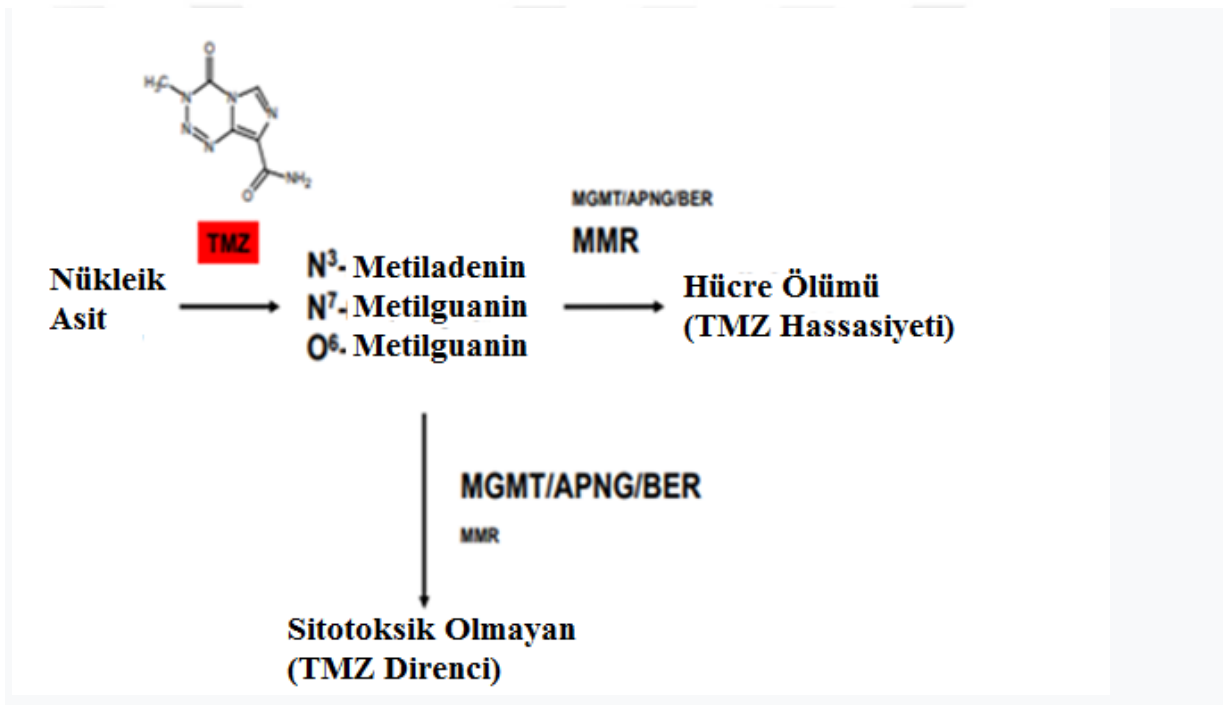
GBM'in yapısından dolayı cerrahi sonrası tüm tümör hücrelerinin alınamaması sebebiyle, primer GBM olgularında aynı anda veya sırasıyla cerrahi sonrası radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır (Taşpınar, 2010). Kemoterapi uygulamasının gliomlarda yalnızca radyoterapi uygulamasına oranla hayatta kalımı %10 oranında arttırdığı görülmüştür (Sathornsumetee, 2008). Bu sebeple kemoterapi uygulaması GBM olgularında, tedavideki başarının artmasında önemli bir basamaktır (Stupp R. H., 2007). Kemoterapi sürecini hastanın genetik yapısı, kemoterapik maddenin seçimi, uygulama süresi ve dozu doğrudan etkileyen unsurlardır (Hegi, 2008). Kemoterapötik ajanlarla yapılan beyin tümörlerinin tedavisinde karşılaşılan en önemli sorun kan beyin bariyeridir (Stupp R. H., 2007). Kemoterapötikler, MSS içerisinde istenilen doku konsantrasyonuna kan beyin bariyeri bozuk olsa dahi ulaşamazlar çünkü difüzyonları yavaştır.

Kemoterapötiklerin kullanılması için kan beyin bariyerini kolay ve hızlı şekilde geçmesi gereklidir. Kemoterapötiklerin in vitro araştırmalar sonucunda radyasyonun etkisini glioma hücrelerinde arttırdığı yönündedir. Bu sebeple radyoterapi ve kemoterapötiklerin birlikte uygulanması gerekmektedir (Stupp R. M., 2005). GBM tedavisinde alkaloitlerden alkilasyon ajanları en sık kullanılan kemoterapötiklerdir. Alkilasyon ajanları genel kanser tedavisinde kullanılmasının yanı sıra son zamanlarda, özellikle GBM tedavisinde tercih edildikleri görülmektedir (Adamson, 2009). Son zamanlarda alkilasyon ajanları olarak Dakarbazin ve Karmustin'in yanı sıra GBM tedavisinde hastaların büyük bir kısmında temozolomid kullanılmaktadır (Taşpınar, 2010).

2.3. Temozolomid

Temozolamidin anti-tümör aktivitesi 1987 yılında keşfedilmiştir (Stevens vd.,1987). Oral veya intravenöz olarak uygulanabilen, orta dereceli toksisite yapan ve hücre siklusunda etkili nonspesifik alkilleyici bir ajandır (Cengiz F.P.,Emiroğlu N.,, 2014).

TMZ, alkilleyici ajanlardan imidazotetrazin'in türevi olup kimyasal adı 3-metil-4-oksoimidazo [5,1-d] [1,2,3,5] tetrazin-8-karboksamidtir. Anti-kanser ilacı Temodar ve dacarbazin'in bir ön ilacıdır. (Moody CL, Wheelhouse RT., 2014);(Lee, 2016).GBM hastalarının klinik tedavisinde birinci basamak kemoterapik ajan olarak kullanılır ve glioma hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek, apoptozu indükleyerek malign gliomların tedavisinde kullanılmıştır (Çıtışlı V., 2015);(Jiapaer S., 2018).



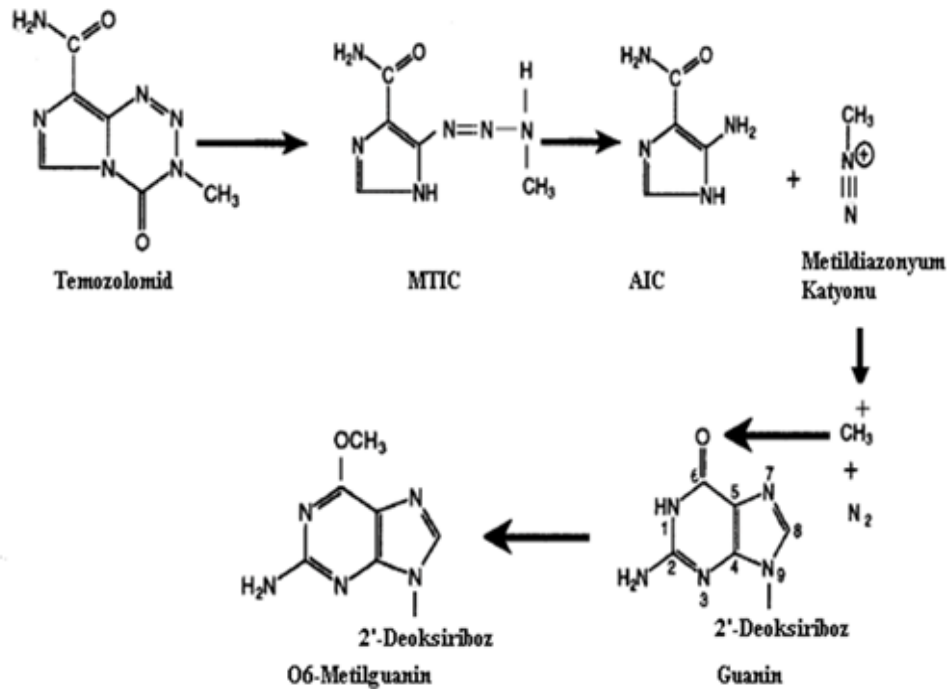
Şekil 2. 7: Temozolomid mekanizması ve Temozolomid direnci (Lee, 2016).

Temozolomid, metil grupları eklenerek guanin üzerindeki N⁷ ve O⁶ bölgelerinde ve adenin üzerindeki N³'teki DNA veya RNA'yı modifiye eder. Metillenmiş bölgeler mutasyona uğramış kalabilir. DNA uyuşmazlığı ile sabitlenebilir onarım (MMR), baz eksizyon onarımı (BER) ile alkilpurin-DNA-N-glikosilaz (APNG) gibi bir DNA glikosilazın etkisiyle uzaklaştırılabilir veya O⁶-metilguanin metiltransferaz (MGMT) gibi bir metilleyici enzimin etkisi ile deasile edilebilir. MMR eksprese edildiğinde ve aktif olduğunda hücreler TMZ'ye duyarlıdır. MGMT, APNG ve BER proteinleri söz konusu olduğunda, GBM hücreleri TMZ'ye karşı dirençli olduğu şekil 1 de ifade edilmektedir (Lee, 2016).

2.3.1. Temozolomid Aktivasyonu

TMZ, kendiliğinden enzimatik olmayan reaksiyonla fizyolojik pH'taki sıvı solusyonlarda aktif hale gelir. Tamponda çözülduğünde, pH değeri 5'ten küçük ise stabildir. Ancak pH değeri 7'den büyük olduğunda hızlı bir şekilde (5-(3-)metiltriazen-1-il) imidazol-4-karboksamid (MTIC) hidrolize edilir (Reid JM, 1997);(Taşpınar, 2010). TMZ'in lipofilik karakterde olması, kan yoluyla kan beyin bariyerine (BBB) kolayca nüfus etmesi, bu kimyasal ajanın oral yoldan alınmasını kolaylaştırır ve iyi bir şekilde tolere edilebildiği için diğer alkilasyon ajanlarına göre daha avantajlıdır (Lee, 2016); (Taşpınar, 2010). TMZ, aynı zamanda aktivasyon için hepatik metabolizma gerektirmez (Shen W., 2013).

TMZ, DNA'nın en önemli yerindeki guanin'in O6 pozisyonuna metil grubu ilave ederek bazı hasarlar oluşmasına sebep olur (Silber JR, 2012). Bu hasarlar kanser hücrelerinin G2/M hücre siklusunun durdurulmasını sağlayarak apoptoza yol açar (Alonso MM, 2007). Hidrolitik halka açılır fizyolojik pH'da açık zincirli triazen MTIC (MetilTriazen-midazol-Karboksamid) ilk önemli ara madde olarak oluşur. MTIC, Metildiazonyum ve AIC katyonunu oluşturur (Denizler Ebiri, 2019).



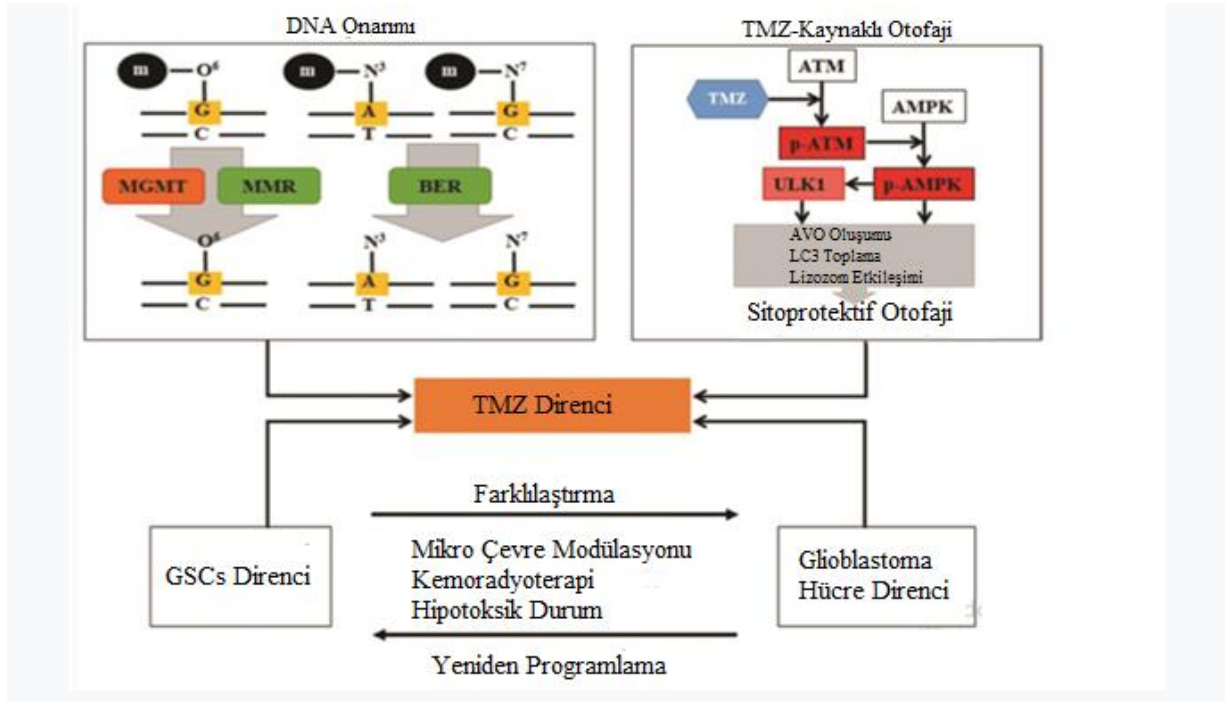
Şekil 2. 8: Temozolomid'in aktivasyon mekanizması (MARCHESI, 2007).

MTIC'nin DNA üzerindeki etkisi DNA'da metil eklentilerinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Özellikle metil eklentileri O⁶- guanin ve N⁷ guaninde oluşur (Denizler Ebiri, 2019).

TMZ, GBM tümörlerini yok edebileceği ana sitotoksik mekanizma: N³-metiladenin (N3-MA), O6-metilguanin (O6-MG) ve N7-metilguanin (N7-MG) oluşturmak için N7 ve O6 pozisyonlarında guanine bağlanan bir metil grubunu ve DNA repikasyonu sırasında N3 pozisyonunda adenini taşıyarak sitotoksiteyi ortaya çıkarır (Jıapaer S., 2018). DNA'ya aktarılan metil gruplarının büyük bir kısmı (%70) N3-guanin bölgelerinde, yalnızca %10'u N3-adeninde ve daha az ölçüdeki (%5)'i O6- guanin'de görünmektedir (Denizler Ebiri, 2019);(Spiro TP, 2001); (Zhang J, 2012).

2.3.2. Temozolomid'in Sitotoksik Etkisine Direnç

TMZ, GBM tedavisinde kullanılan standart bir kemoterapi ilacıdır ve kemoterapinin sonucunda alınan cevaplarda farklılıklar gözlemlenmektedir (Alagoz M, 2018);(Hegi ME, 2005); (Stupp R. M., 2005). Ayrıca GBM hastalarının tedavileri sırasında temozolamid'e direnç gösterdikleri ve bazı GBM hastalarının tedaviye hiç cevap vermediği görülmüştür (Alagoz M, 2018). TMZ direncindeki artış tedavide başarısızlığa sebep olmakta ve tümör nüksünü veya ilerlemesini engellemek giderek zorlaşmaktadır (Nakada M, 2012); (Perazzoli G, 2015);(Van Meir EG, 2010). TMZ direncinden sorumlu DNA tamir sistemleri MGMT, MMR (uyumsuzluk onarım sistemi) ve baz çıkarım yoluyla tamir (BER)'dir (Jıapaer S., 2018).



Şekil 2. 9: Temozolomid Dirençli Mekanizma (Jıapaer S., 2018).

MGMT ve MMR sistemleri O⁶-guanin metilasyonunu, ardından normal DNA replikasyonunu giderir. Aktif hale getirilmiş BER ayrıca N⁷-guanin ve N³-adenin metilasyonunun giderilmesiyle DNA onarımına katkıda bulunur. ATM / AMPK yolu ile TMZ'nin neden olduğu otofaji, otofagosom ve lizozom etkileşimi için gerekli olan ve sitoprotektif otofajiyi ve hücre sağkalımını kolaylaştıran AVO oluşumunu, LC3 agregasyonunu indükleyebilir. GSC'ler fenotiplerini TMZ'ye dirençli GSC'lere değiştirebilir veya tümör mikro-ortam modülasyonu, kemoradyoterapi veya hipoksik durum yoluyla TMZ'ye dirençli GBM hücrelerine farklılaşabilir. Öte yandan, farklılaşmış GBM hücreleri, tümör mikro-ortam modülasyonu ile yeniden programlanarak kök hücre kapasitesini yeniden elde edebilir (Jıapaer S., 2018).

GBM hücrelerinde TMZ etkisiyle oluşan DNA hasarının onarımını O⁶-metil guanin transferaz (MGMT) enzimi gerçekleştirmektedir. MGMT enzimi yapısındaki O⁶-metil guanin ve sistin grubuna eklenmiş olan metil grubu arasında kovalent bağ kurarak TMZ ile oluşturulan bu metil grubunu DNA'dan uzaklaştırarak hasarlı DNA'yı onarır (Alagoz M, 2018);(Taioli E, 2009).

GBM hastalarının birçoğu TMZ tedavisine cevap vermemektedir. Tedavi başarısızlığı, GBM hücrelerinde MGMT enzimlerinin fazla sentezlenmesi sebebiyle kanser hücrelerinde

oluşan DNA hasarının hızlı bir şekilde tamir edilmesi ve TMZ ile öldürülmemesidir. Yapılan araştırmalar, TMZ tedavisi uygulanıp cevap alınamayan hastalarda MGMT düzeylerinin yüksek olmasından kaynaklanan DNA hasarlarının hızlıca tamir edilmesini sağlayarak kanser hücrelerinin ölümünü engellediklerini göstermişlerdir. GBM tedavisinden daha iyi sonuç alabilmek için MGMT enzimini inhibe etmek amaçlanmıştır ve bu sebepten MGMT inhibitörleri geliştirilmektedir (Alonso MM, 2007); (Van Nifterik KA, 2010). Glioblastoma hastalarının TMZ tedavisinde karşılaşılan başka bir sorun ise hastaların TMZ sitotoksitesine oluşturdukları direnç gelişimidir (Fan TY, 2014).

2.4. Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit gram (-) negatif bakterilerin hücre zarının bir bileşenidir ve endotoksinler olarak isimlendirilirler. Endotoksinler gram (-) bakterilerin ana bileşenidirler (Gündoğan F, 2018); (Korkmaz, 2019). LPS doğal bağışıklık tarafından algılanan bir immün sistem uyarı ajanı olup çeşitli araçlar oluşturarak zararlı tepkileri çoğaltabilir ya da teşvik edebilir (Yap K.S., 2018). LPS sepsise sebep olabilecek bakteriyel bir endotoksindir (Beheshti F., 2018). Yüksek dozlarda, LPS septik şoka sebep olur, fakat düşük dozlarda birçok enflamatuvar duruma da yol açar (Doğanyigit Z., 2019). Organizma LPS'lere sistemik veya aşırı miktarda maruz bırakıldığında sistemik bir inflamatuvar reaksiyon oluşabilir ve bu durumda doku hasarı, endotoksin şok ve ölüm gibi birden fazla fizyopatolojik etkilere neden olabilir (Gündoğan F, 2018); (Anspach, 2001); (Ogikubo, 2004).

LPS iki kısım içerir: lipit A ve bir oligasakkarit (Cihankaya H., 2019). Lipit A, LPS'nin asıl toksik etkisinden sorumludur ve birçok enflamatuvar öncü hücrenin yanıt vermesine sebep olan LPS'nin temel parçasıdır (Korkmaz, 2019); (Magrone, T.; Jirillo, E., 2011). Lipid A; Nitrik oksit ve IL-12 benzeri antimikrobiyal küçük moleküllerin üretimini başlatır. Hastaların kliniğine bakıldığında fazla miktarda oluşan LPS, endotoksemiye sebep olabilir. LPS'i hücre yüzeyinde tutan ve CD14 olarak isimlendirilen bir protein tanımlanmıştır. CD14'e, Lipid A'nın bağlanmasıyla birlikte septik şok sendromunun oluştuğu gösterilmiştir (Kundakcı A., 2012). LPS, birbirinden farklı iki sinyal yolundan ilerleyen toll-like reseptör 4 (TLR4) tarafından fark edilir (Kim H.Y., 2018).

2.4.1. Toll Like Reseptör

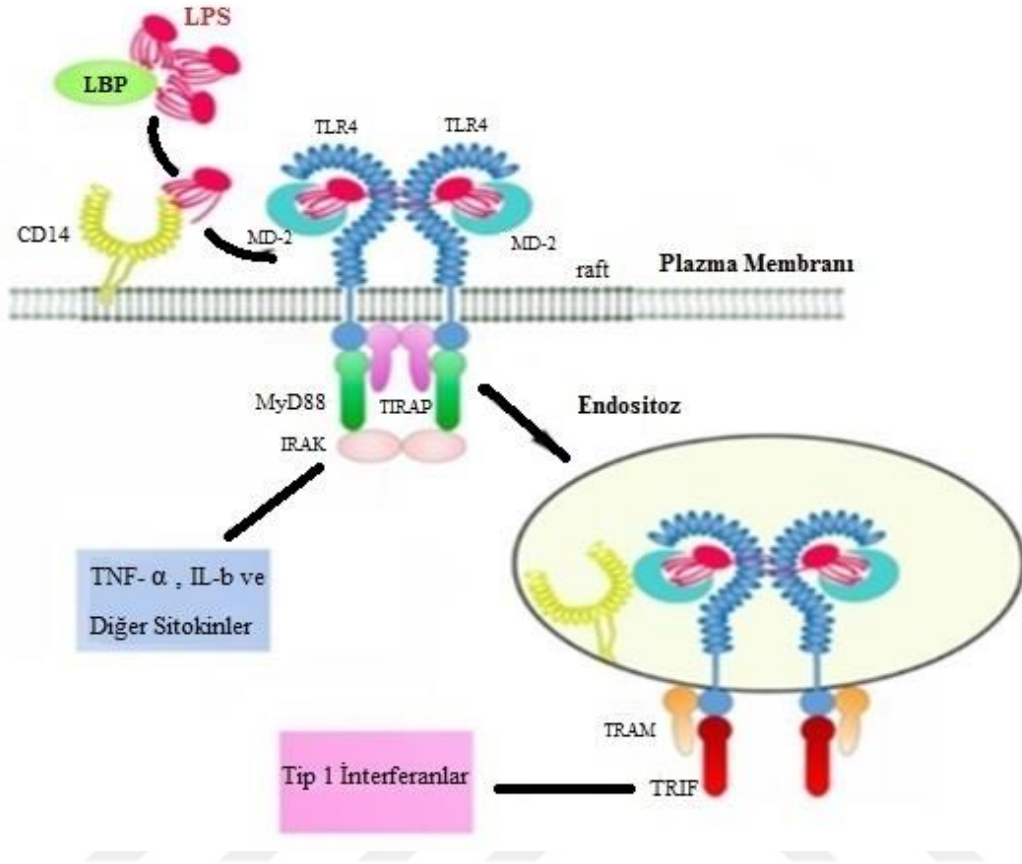
Toll like reseptör 4, LPS ve lipopeptitler gibi mikrobiyal protein bileşenleri ve bakteri, mantar, virüsler gibi patojene bağlı çeşitli moleküler modelleri tanıyarak onlara karşı immun yanıt geliştirilmesinde görev alan reseptörlerdir. Bu reseptörler hem bağışıklık hemde tümör hücrelerinde rol oynarlar (Han S., 2017).

Günümüzde bulunan TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 genellikle hücre yüzeyinde lokalize olup patojenlere özel molekülleri tanırlar. TLR 3, 7, 8 ve 9 ise intraselüler organelerin içinde lokalize olurlar (Kundakcı A., 2012). İlk olarak TLR'lerin enfeksiyon ve sepsisin hücrel aktivasyondaki görevleri ve bakteriyel ligandlar ile olan etkileşimleri bilinmektedir. Bu reseptörler üzerinde yapılan son çalışmalarda patojen ilişkili moleküler kalıpları (PAMPs) dışında TLR2 ve TLR4'ün belli endojen molekülleri de ligand olarak tanıyabildikleri gösterilmiştir (Ohashi K, 2000). TLR4'ün gram-negatif bakterilerde bulunan lipopolisakkaritleri algılayan bir reseptör olduğu, makrofaj hücrelerine sinyal iletimini sağladığı bilinmektedir. Enfeksiyon esnasında makrofajlar PAMPs TLR tarafından tanırlar. TLR'ler, sinyal transdüksiyon kaskadını kendi bünyesinde bulunan ligandları ile etkileşime geçerek aktive ederler ve sonuçta immün cevaptan sorumlu genlerin ekspresyonunu gerçekleştirirler. Bu reseptörlerin ligandlarına bağlanma şekli her zaman doğrudan değildir. Örneğin TLR4 ligandlarına doğrudan bağlanmaz. MD-2 olarak isimlendirilen molekül, ekspresyonunu TLR4 ile gerçekleştirip, reseptörün ekstraselüler kısmına bağlanıp, TLR4'ün ligandları ile etkileşimini kolaylaştırır. TLR4'ün aşırı ekspresyonu sonucu sitokin üretimi artar (Kundakcı A., 2012).

2.4.2. Toll Like Reseptör 4'ün Aktivasyonu

TLR4 reseptörü LPS'yi, LPS bağlayıcı protein (LBP) aracılığıyla tanır. LBP, LPS'yi kendine bağlar ve hücre membranında bulunan TLR4'e ulaştırır. Farklılaşma kümesi 14 (CD14) LBP ile etkileşime girer ve LPS-LBP-CD14 üçlü kompleksi meydana gelir (Cihankaya H., 2019).

CD14'ler LPS'nin TLR4 ile ilişkili miyeloid farklılaşma faktörü (MD) 2'ye ulaşmasını sağlarlar (Plociennikowska,2015;Slivka,2009). LPS'nin TLR4 tarafından fark edilmesine MD2 yardımcı olur ve LPS bağlanır (Plociennikowska A., 2015).



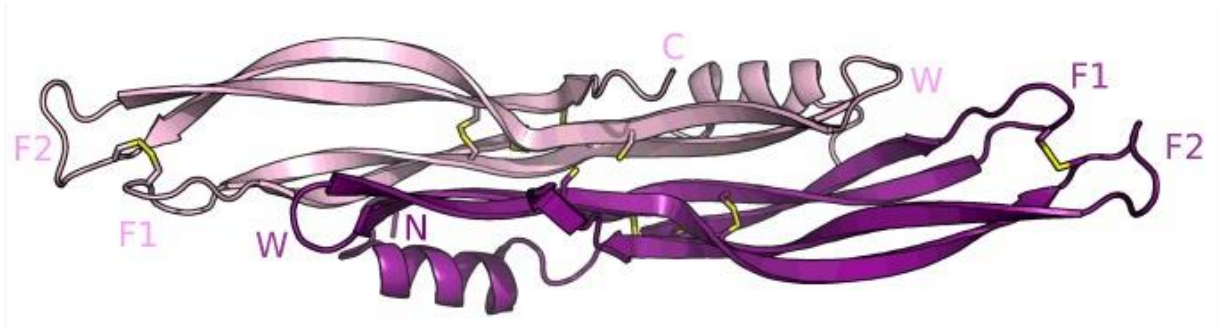
Şekil 2. 10: Lipopolisakkarit, Myd88 bağımlı ve bağımsız yollarda TLR4 sinyalini etkinleştirir (Plociennikowska A, 2015).

CD14 ve LBP yardımıyla LPS, TLR4 / MD2 kompleksine aktarılır. Aktif TLR4, IRAK ve TIRAP molekülleri ile etkileşime girerek TNF α ve diğer sitokinlerin ekspresyonuna yol açabilen Myd88 proteinini toplayabilir. Öte yandan, aktif TLR4 endositoza girebilir ve tip I interferonların ekspresyonuna yol açan TRAM ve TRIF molekülleri ile etkileşime girebilir (Cihankaya H., 2019). Esas olarak TLR4 ekspresyonu mikroglial hücrelerde gerçekleştiğinden, TLR4 sinyalizasyon çalışmaları için LPS mikroglia da yaygın olarak kullanılır (Lehnardt, et al., 2002); (Lively & Schlichter, 2018).

2.5.GREMLİN 1

Gremlin 1, hücre ile ilişkili (dış hücre yüzeyinde) ve salgılanmış formda (Appiah, 2016), golgi bölümleri içinde ve endoplazmik retikulumda yer alan bir glikoproteindir (Smerdel-Ramoya A, 2011). İmmünoyblotlama gibi protein analizleri ile moleküler ağırlığının 20-30 kDa olduğu saptanmıştır (Wordinger RJ, 2008) ; (Topol LZ, 2000). Gremlin1, DAN (nöroblastomun ayırt edilmesinde tarama testi olarak seçilen bir gen) gen ailesinin bir üyesi olan gremlin 1 geninin bir ürünü olup, kemik morfogenezik proteinin (BMP) antagonistidir (Church RH K. A., 2015).

Tümör hiyerarşisinde, salgılanmış bir glikoprotein olarak kanser kök hücrelerinin korunmasında görev alır (Guan Y., 2016) ve kanser hücresi büyümesini düzenler (Park, 2018). Gremlin 1 kanser kök hücresi olmayan hücrelerde aşırı ekspresyon göstererek, kök benzeri özellikleri desteklemek için endojen BMP sinyallerini azaltıp, hücrelerdeki büyümeyi ve tümör oluşumunu daha da artırır (Yan K, 2014). Özellikle embriyonik gelişim ve doku farklılaşması sırasında böbrek, akciğer, kemik, kıkırdak, deri ve kalp oluşumunda önemli bir düzenleyici role sahiptir. (Topol LZ, 2000).



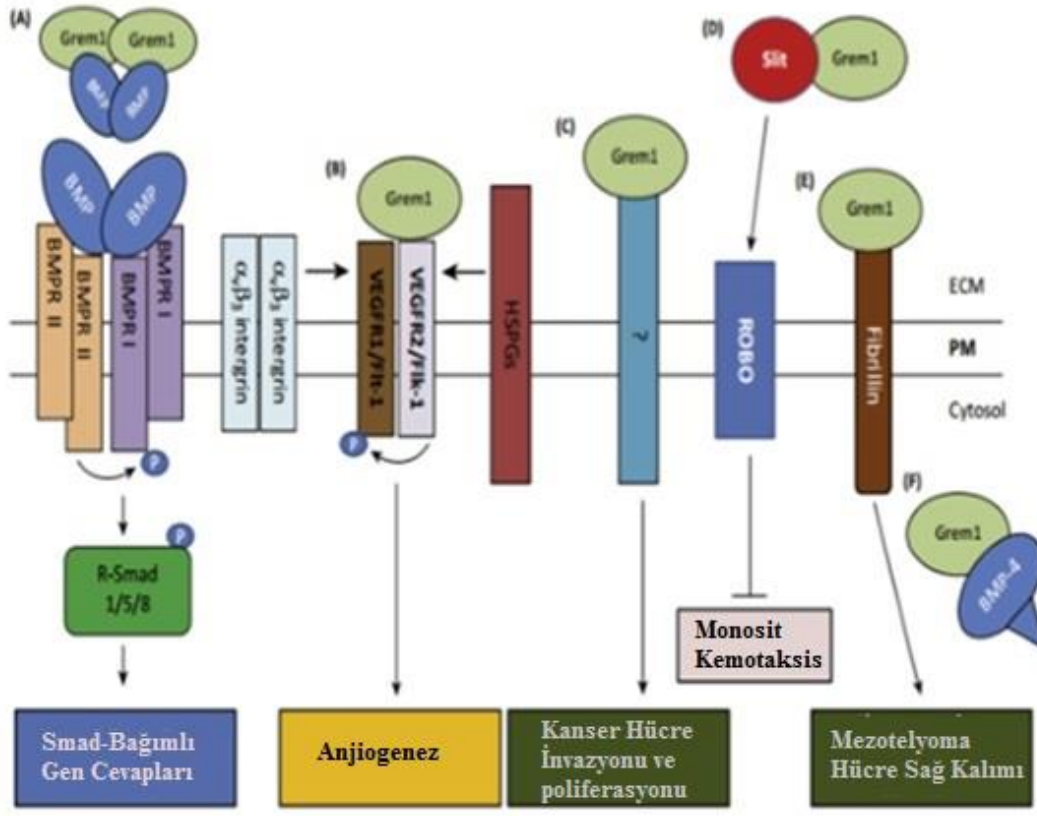
Şekil 2. 11:-N-Gremlin-1'in kristal yapısı (Migle Kisonaite, 2016).

2.6.Kemik Morfogenetik Protein Ailesi

BMP'ler, transforme edici büyüme faktörü- β 'nin (TGF- β) en büyük alt familyasını oluşturan hücre dışı proteinleri olup, kemik ve kıkırdak oluşumunda rol oynayan sitokinlerdir (Bragdon B, 2011) ;(Karagiannis GS, 2014); (Rothhammer T, 2005). BMP'lerin ilk olarak kemik oluşumunda aktif bir şekilde rol oynadığı düşünülürken; hücre büyümesi, farklılaşması ve kök hücre özelliklerinin tanımlanmasında, organ gelişimi ve doku farklılaşması dahil olmak üzere biyolojik süreçlerde çeşitli faaliyetlerde buldukları bilinmektedir (Wang RN, 2014). BMP'ler ayrıca tümör invazyonunda ve ilerlemesinde belirleyici olan tümör hücrelerinin epitelyal-mezenkimal transisyonu (EMT)'sini kontrol eden ekzojen bir uyarıcı olarak kurulmuştur (Kalluri R, Zeisberg M. , 2006). BMP ligandlarından BMP4,glioblastoma kök hücrelerinin negatif olarak düzenlenmesinde görev alır ve; BMP4 anti-proliferatif farklılaşmanın indüklenmesiyle BMP reseptörü aracılı Smad aktivasyonu yoluyla tümör büyümesini engeller. BMP7 ise TMZ etkinliğini artırarak glioblastoma kök hücreleri tarafından TMZ'ye karşı oluşturulan direncin kırılmasında rol oynar. (Jiapaer S., 2018).

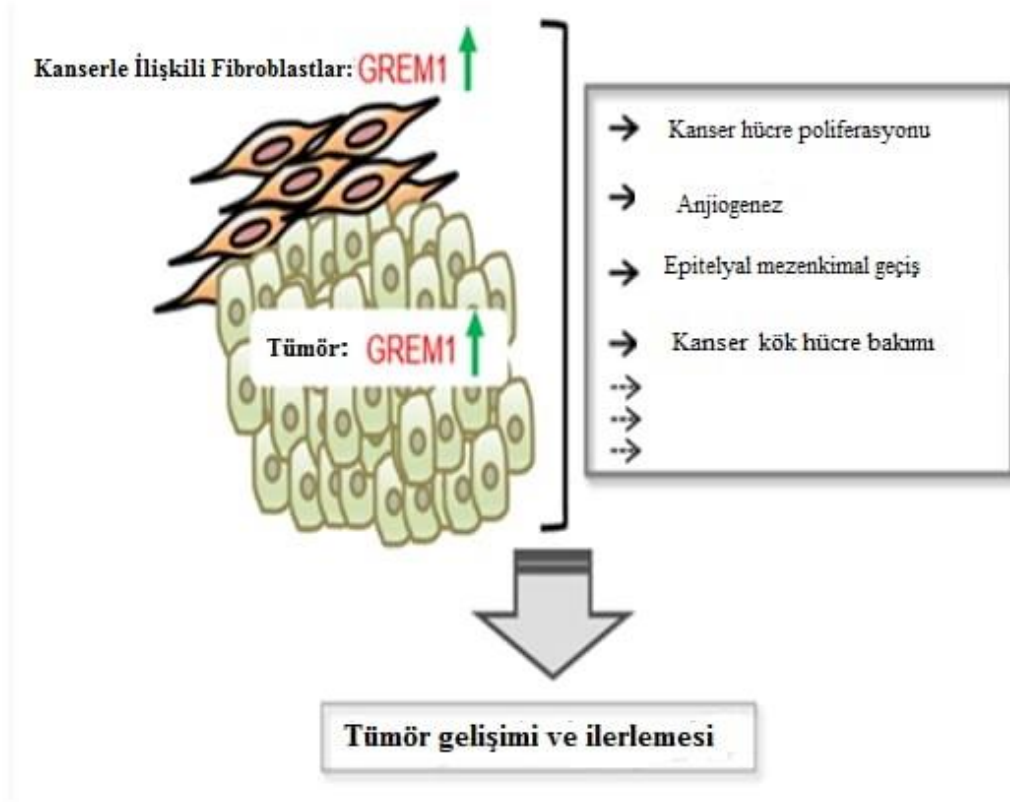
2.7.Gremlin-1 Biyolojik Fonksiyonları

Gremlin 1, BMP antagonistlerinden olup (Church RH K. A., 2015) , BMP-2, BMP-4 ve BMP-7 ile direkt olarak bağlanıp (Li G., 2013), etkisini bu ligandların yüzey reseptörleri ile etki yapma yeteneklerini engelleyerek gösterir ve bu olayın sonrasında TGF- β sinyali baskılanır (Stabile H, 2007);(Yamasaki Y., 2018). BMP'nin neden olduğu sinyal yolları gremlin 1 tarafından inhibe edilir. Bunlar doğrudan BMP ligandlarına bağlanır ve daha sonra BMP reseptörleri ve ligandları ile etkileşimi önler (Canalis E, 2003) ; (Ali IH, Brazil DP. , 2014).



Şekil 2. 12:Hücrelerde gremlin 1 sinyal mekanizmaları (Brazil D.P., 2015).

BMP proteinlerinin bir antagonisti olan gremlin 1; apoptoz, angienez, ekstraselüler matriks üretimi, proliferasyon gibi fonksiyonları vardır. Organ gelişimi için de büyük önem arz etmektedir (Stabile H, 2007). Gremlin 1'in düşük ekspresyonu veya aşırı ekspresyonunun akciğer (Cahill E, 2012) veya böbrek (Church RH A. I., 2017) anormalliklerine sebep olduğu bildirilmektedir. Organogenezdeki rolüne ek olarak, birden fazla araştırmada gremlin-1'in doku fibrozunun indüksiyonunda önemli bir molekül olduğu anlaşılmıştır (Myllarniemi M, 2008) ; (Heron M, 2011). Çoklu tümörlerde gremlin-1 düzeyinin bu tümörlerin stromalarında aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir (Namkoong H, 2006) ; (Sneddon JB, 2006). Gremlin-1 ayrıca BMP antagonizminden bağımsız olarak diğer sinyalizasyon yeteneklerine de sahiptir (Brazil DP, 2015). Aynı zamanda; BMP'den bağımsız olarak VEGFR2'ye bağlanmaya çalışır (Mitola S, 2010);(Yamasaki Y., 2018), kanser hücreleriyle doğrudan etkileşir ve muhtemelen angiogenezi uyaran geni modüle eder (Kara S., Karakok M., 2016). Angiogenezi BMP'den bağımsız olarak VEGFR2 üzerinden indükler ve buraya etki yapar (Chen MH, 2013). Ek olarak EMT indüklediği bildirilmiştir (Park, 2018).



Şekil 2. 13:Gremlin1'in kanserdeki rolü (Park, 2018).

Son dönemlerde Gremlin 1 ekspresyonu tümörögenез ile ilişkilendirilmiştir. Gremlin1'in tümör dokularında kanserle ilişkili stromal hücreler tarafından eksprese edildiği ve bu şekilde mikroçevre tarafından regüle edilen tümör büyümesine ve istilasına katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Birçok araştırmacı tümör hücreleri tarafından gremlin 1'in eksprese edildiğini kanıtlamıştır (Namkoong H, 2006); (Sneddon JB, 2006);(Yin M ., 2017).

2.7.1.Tümörlerde Gremlin 1 Ekspresyonu

Birçok araştırma tümör hücrelerinin normal çevre dokularla kıyaslandığında gremlin 1'in aşırı eksprese edildiğini göstermiştir. Karsinomlarda (Galamb O, 2012);(Pelli A, 2016);(Li J, 2017), gastrik (Yamasaki Y., 2018), meme (Schuetz CS, 2006)akciğer (Mulvihill MS, 2012). MRNA ve protein seviyelerinin her ikisinin de insan malign mezotelyoma dokularının çoğunda kontrol deneklerine kıyasla arttığı gösterilmiştir (Wang DJ, 2012). Örneğin; özofagus kanseri tanısı için bazı hedef genlerin analizi yapılmıştır ve bu hedef genlerden biri gremlin1 olarak tanımlanmıştır. Sonrasında, özofagus tümörlerinde

normal dokulara oranla gremlin1 ekspresyonunun büyük oranda arttığı gösterilmiştir (Cai X, 2018).

Gremlin1 ekspresyonu yalnızca kanserli tümör hücrelerinde değil, fibroblastlarda, etrafındaki stromal hücrelerde de görülmüştür (Sneddon JB, 2006). Ayrıca, kolorektal kanserlerde gremlin1 eksprese eden fibroblastlar sıklıkla gözlenir, bu durum biyobelirteç olarak stromal gremlin1 ve kolorektal kanserlerin tedavisinde iyi bir kaynak olduğunu gösterir (Jang BG, 2017).

Elde edilen veriler gösteriyor ki; yüksek gremlin 1 ekspresyonunun tümör hücrelerinin biyolojik özelliklerini etkilemektedir. Wnt sinyali ile sinerjik bir şekilde, anormal epitel gremlin1 ekspresyonu koloni kanser oluşumunu başlattığı görülmüştür. Özellikle, in vivo çalışmalarda gremlin1 geni nakavt edilmesinin Wnt güdümlü tümör ilerlemesini yüksek oranda azalttığı gösterilmiştir (Davis H, 2015). ShRNA uygulanarak gremlin1 yıkılması sonucunda malign mezotelyoma hücrelerinin inhibisyonu olmuştur (Wang DJ, 2012). Gremlin1, BMP'den bağımsız olarak çeşitli kanser hücreleriyle etkileşime girerek kanser hücrelerinin migrasyonu, çoğalmasını ve de istilasını teşvik etmiştir (Kim M, 2012). Kanser kök hücrelerini özellikle glioma ve servikal kanserde gremlin1'in teşvik ettiği gösterilmiştir. Gliomanın dışındaki kanser kök hücrelerinde gremlin 1'in aşırı ekspresyonu, kök hücreye benzeri özellikleri ortaya çıkarmak için endojen BMP sinyalini azalttığı ve böylece tümör oluşumunu, büyümeyi arttırdığı gösterilmiştir (Yan K, 2014) ; (Sato M, 2016).

2.7.2.Gremlin 1 Ve Anjiogenez

Anjiogenez, tümörün agresifliğini büyük ölçüde destekleyen bir süreçtir. Anjiogenezin, endotelial hücrelerin göçünü aynı zamanda istilasını rekombinant gremlin1 tedavisi için uyardığı bilinmektedir. Mikrodamar yoğunluğu ile gremlin1'in ifadesi korele edildi sonuç olarak pankreatik nöroendokrin tümörlerde pro-anjiyojenik rolünü düşündürmüş olup (Chen MH, 2013), gremlin1 yıkımının sinoviyositlerin istilasını, göçünü ve çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (Han EJ, 2016). Gremlin1'in, metastaz yapma olasılığı yüksek olan tümörlerde aşırı eksprese edildiği ve laboratuvar ortamındaki çalışmalarda mezotelyoma hücre yenilenmesini ve invazyonunu desteklediği gösterilmiştir (Yin M ., 2017). Diğer önemli bir konu ise; anjiyojenik VEGFR2 ile gremlin 1 ilişkisidir.

VEGFR2'ye bağlı anjiyojenik yanıtları aktive eden BMP'den bağımsız bir şekilde gremlin1 ile bağlanmıştır (Mitola S, 2010). Diğer çalışmada ise; sıçan örneklerine rekombinant gremlin-1'in uygulanmasının, VEGFR2 sinyallesinin devamlı olarak aktivasyonunu indüklediğini göstermiştir (Lavozy C, 2015). Bu sonuçlara göre, gremlin 1-VEGFR2 ekseninin kanser de dahil olmak üzere birde fazla hastalık için umut vaat eden bir hedef olabileceği düşünülmektedir (Erdmann R, 2015).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu yüksek lisans tez projesi Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayından sonra Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Hematoloji-Arge ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1.Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışma süresince kullanılan glioblastoma hücre hattı Tablo 1'de verildi. Kullanılan cihazlar, markaları ve menşei Tablo 2' de verildi. Kullanılan sarf ve diğer malzemelerin markaları ve menşei Tablo 3' de belirtildi.

Tablo 3. 1: Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre serisi.

HÜCRE	U118 GBM
ORGANİZMA	İnsan
DOKU	Beyin
MORFOLOJİ	Astrosit
YÜZEY TUTUNUMU	Yapışan hücreler
TÜMÖROJENİK	Evet
BESİ YERİ	DMEM ,% 10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin
BESİ YERİ YENİLEME SÜRESİ	Haftada 2-3 kez
PASAJ METODU	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA
BİYOGÜVENLİK DÜZEYİ	1

Tablo 3. 2: Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve menşei.

Kullanılan Cihazlar	Marka	Ülke
Biyogüvenlik Kabini	Biobase	Almanya
İnvert Mikroskop	Olympus CKX53	Japonya
CO2' li İnkübatör	Heal Force/HF90 Smart cell	Çin
Santrifüj	Eppendorf centrifuge 5810R	Almanya
DerinDonduruculu Buzdolabı (+4 ° c Ve -20 ° c)	Arçelik	Türkiye
Derin Dondurucu (-80 ° c)	Arçelik	Türkiye
Hassas Analitik Terazı	Denver Instrument	A. B. D
Vorteks	Isolab	Almanya
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipet Seti	Dragon-med	Almanya
Power bloter XL	İnvitrogen	Almanya
Mini gel tank	İnvitrogen	A. B. D
Shacker	IKA KS 260 basic	

Tablo 3. 3: Çalışmalarda kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve menşei

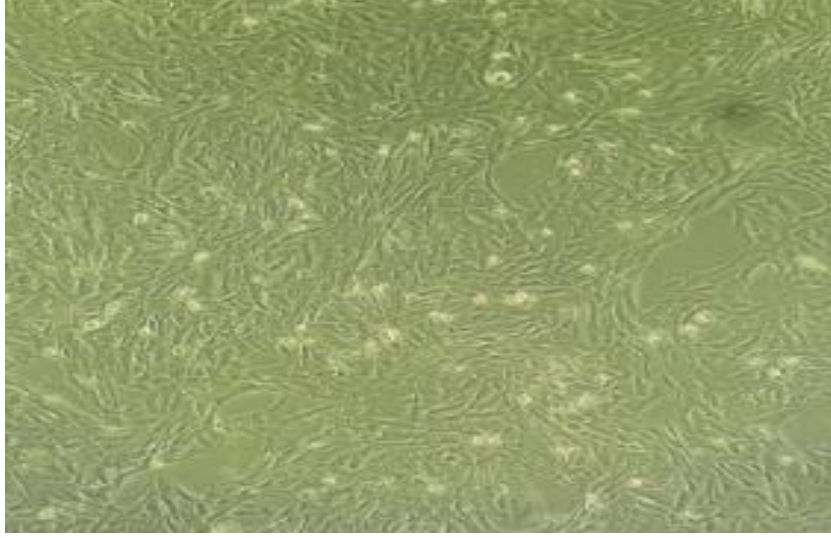
Malzeme	Marka	Ülke
Membran filtreleri (0.2 µm)	Minisart® NMI Syringe Filter	Almanya
Standart 25 ve 75 cm ² hücre kültür flasksları	VWR/SPC	Kanada
15 ve 50 mL hacimli steril falkon tüpler	Isolab	Türkiye
10 ve 25 mL hacimli steril serolojik pipetler	SPL	Güney Kore
Çeşitli hacimlerde (0. 1- 1000 µL) steril pipet uçları	Isolab	Türkiye
Hücre Kazıyıcı (290mm/200mm)	SPL	Güney Kore
DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco	ABD
%0.25 Trypsin EDTA	Gibco	ABD
FBS, Fetal Sığır Serumu	Gibco	ABD
DMSO, Dimetil Sülfoksit	Merck	ABD
DPBS	Gibco	ABD
Steril Eldiven	Sterix	Türkiye
Temazolamid	Sigma	Almanya
Lipopolisakkarit	Sigma	Almanya
Gremlin 1	Invitrogen	
Actin beta	Invitrogen	
Sekonder Antikor	Invitrogen	ABD
BSA(from bovine serum)	Sigma	Almanya

3.2.Uygulanan Yöntemler

3.2.1.Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'dan temin edilen U-118 insan multiforme glioblastoma (MG) hücre hattı kullanıldı. İnsan U118 MG hücre hattı, astrositoma hücre kaynaklı IV evre özelliğindeki maling karakterli bir glioblastoma hücreleridir. Çalışmamıza öncelikle donmuş haldeki U118 glioblastoma hücreleri -80 C° den alınarak çözdürüldü. Hücre kültürü ortam hazırlığı; 500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), %10 FBS (Fetal Sığır Serum), %1 Penisilin-Streptomisin karıştırılarak U118 glioblastoma hücrelerini çoğaltacağımız medium (besiyeri) hazırlandı. Öncelikle amacımız hücreleri çoğaltıp canlılığını kontrol etmek olduğu için 75cm² flaska hazırladığımız medium ve hücre süspansiyonu eklenerek hücreler kültüre edildi. 37 C° de, %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. 2-3 güne bir medium değişikliği yapılarak hücre çoğalması gözlemlendi. Hücre yoğunluğu %80-90 oranına ulaştığında yani 75cm² lik flaskın tamamı dolduğunda, hücrelerin üzerindeki medium atılarak flaskın içi 5 ml DPBS ile yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında 75cm² lik flaska 10 ml tripsin-EDTA konularak hücrelerin kaldırılması gerçekleştirildi. Bu işlemlerin ardından hücreler steril serolojik pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüplerine alındı ve 4C⁰ 'de 1200 rpm'de 3 dk. Santrifüj edildikten sonra tüpün üst kısmındaki süpernatant kısmı atıldı ve 1 ml medium ile hücreler pipetaj yapıp sayılacak hale getirildi. Hücreler tripan mavisini kullanılarak thoma lamında sayım işlemi yapıldı. Sayım yapılan hücrelerin bir kısmı için pasaj ve diğer test aşamalarına geçildi. U118 hücrelerinin dondurularak stoklama yapılması sürecinde ise uygun sayıdaki hücre popülasyonunun üzerine (50 µl DMSO, 950 µl FBS, 1 X 10⁶ hücre için) dondurma solüsyonumuzu hücreyle pipetaj yaparak özel dondurma tüplerine (cryovial) paylaştırıldı. Bu tüpleri, buz içerisinde -20°C'de 1 saat bekletildi ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'e kaldırıldı.

Bir kısmı -80°C'e kaldırılan ve diğer kısmı elimizde olan glioblastoma hücreleri 75 cm² lik flaskta önceden hazırladığımız DMEM besisi içerisinde 37°C de, %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmaya başlandı. 2-3 güne bir hücrelerin besin kaynağı olan ve çoğalmasını sağlayan taze besiyeri flaslara eklenerek inkübasyona devam edildi. Glioblastoma hücrelerinin TMZ ile muamele edilebilmesi için %90 yoğunluğa ulaşması beklenildi.



Şekil 3. 1: %90 Yoğunluğa Ulaşmış Glioblastoma Hücresi

3.2.2.U118 Glioblastoma Hücrelerine Temozolomid Muamelesi

İlk olarak TMZ için 24 ve 48 saatlik inkübasyonların yapılmasına karar verildi. 75 cm² lik flaskın %95 yoğunlukta glioblastoma hücresi ile dolduğu gözlemlendiği gün flasktan hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Toplam hacim 5.5 ml olan hücre süspansiyonundan her bir 60 mm²lik petriye 500 µl eklenerek kontrol grubunda dahil olmak üzere toplamda 9 adet petri hazırlandı. 5 gün boyunca petri kaplarındaki hücrelerin %70 yoğunluğa ulaşılması beklendi. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücrelerin üzerine önceden belirlediğimiz TMZ konsantrasyonlarından (200 µM,100µM, 50 µM,25 µM) eklendi.

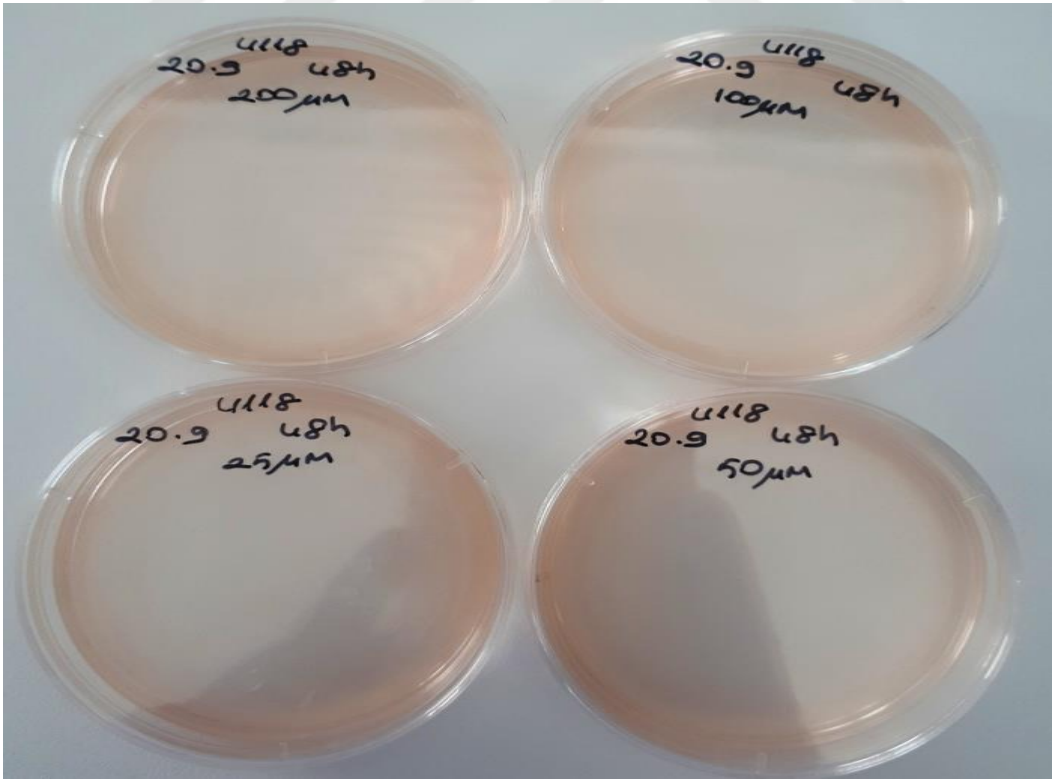
Uygun konsantrasyonların hazırlanması için öncelikle uygun çözücüler kullanılarak ana ve ara stoklar hazırlandı. Çözücü olarak DMSO (Dimethyl Sulphoxyde), kullanılan TMZ konsantrasyonlarında DMSO oranının %1 olarak kalması sağlandı.

Çalışmalar için 10 ml içerisinde %1'lik DMSO hazırlandı.

Tablo 3. 4: Temozolomid Konsantrasyonlarının Hazırlanması

0. (kontrol grubu)	300 µl (%1 DMSO)
200 µM	stok 300 µl (%1DMSO +TMZ)
100 µM	150 µl stok + 150 µl %1 DMSO
50 µM	75 µl stok +225 µl %1 DMSO
25 µM	37,5 µl stok + 262,5 µl %1 DMSO

Tablodaki değerler kullanılarak konsantrasyonlar hazırlanmış oldu. 60 mm²lik petrilerin her birinin içinde toplamda 3 ml olacak şekilde 2,7 ml besi yeri (DMEM), 300 µl TMZ konsantrasyonlarından eklendi. Hem 24 hem de 48 saatlik inkübasyona bırakacağımız petriler hazırlandı. 24 saat inkübasyon sonunda invert mikroskofta hücre canlılığı kontrol edildi. Hemen ardından hücre kültürlerinden protein izolasyonuna başlandı.



Şekil 3. 2:U118 Glioblastoma Hücrelerine Temozolomid eklenen 48 saatlik 60 mm²lik petriler

3.3.3.U118 Glioblastoma Hücrelerine Lipopolisakkarit Muamelesi

LPS için 24 ve 48 saatlik inkübasyonların yapılmasına ve lipopolisakkaritin Fosfat Buffer Salin(PBS) tamponunda çözüleceğine karar verildi. 75 cm² lik flaskın %95 yoğunlukta glioblastoma hücresi ile dolduğu gözlemlendiği gün flasktan hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Toplam hacim 5.5 ml olan hücre süspansiyonundan her bir 60 mm²lik petriye 500 µl eklenerek kontrol grubunda dahil olmak üzere toplamda 9 adet petri hazırlandı. 5 gün boyunca petri kaplarındaki hücrelerin %70 yoğunluğa ulaşılması beklendi. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücrelerin üzerine önceden belirlediğimiz LPS konsantrasyonlarından (10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml) eklendi. LPS konsantrasyonları için petrilere ne kadar LPS koyacağımız 60 mm²lik petrilerin hacmine uygun şekilde hesaplandı. Her bir petrinin içerisine 2,7 ml DMEM, 300 µl LPS eklendi. 0. kontrol grubuna 2,7 ml DMEM, 300 µl PBS eklendi.

Böylece 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakacağımız petriler hazırlandı. 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonunda invert mikroskopta hücre canlılığı kontrol edildi. Hemen ardından hücre kültürlerinden protein izolasyonuna başlandı.



Şekil 3. 3:U118 Glioblastoma Hücrelerine Lipopolisakkarit eklenen 24 saatlik 60 mm²lik petriler

3.3.4. Protein İzolasyonu

TMZ konsantrasyon aralıkları için 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerinin hemen ardından 60 mm²lik petripler 37 C° de, %5 CO₂ içeren inkübatörden alındı, medium uzaklaştırıldı ve DPBS ile yıkandı. Takiben çalışmalar buz üzerinde yapılmaya başlandı. Her bir petrinin içine 300 µl RIPA (hücre membranini parçalayıcı buffer) ve 3 µl inhibitor (proteinlerin parçalanmamasını sağlayan proteaz inhibitörü) hücre lizis karışımından 50 µl eklendi ve kazıyıcı yardımıyla yüzeyden kaldırılan hücreleri ependorflara aktardık. +4 C° de 10 dk. en yüksek devirde santrifüj edildikten sonra supernatant kısmını aldık ve total proteinleri ependorflara koyarak protein izolasyonu tamamlanmış oldu.

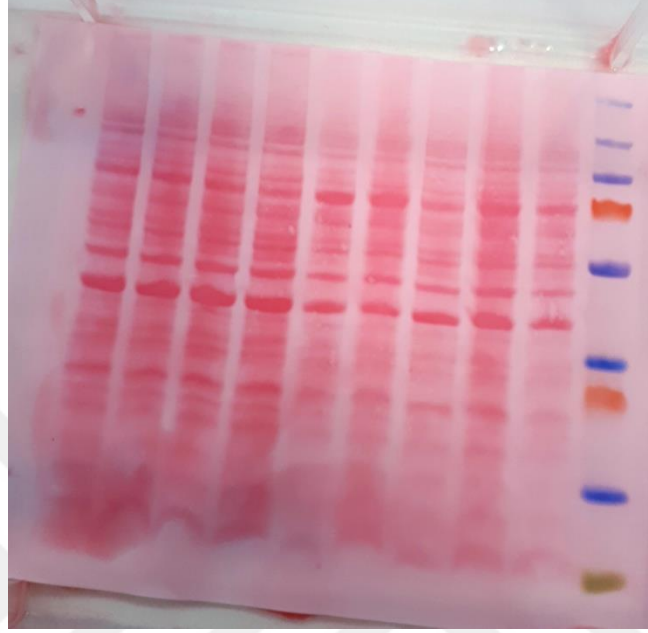
3.3.5. Bradford Yöntemi

Protein izolasyonu sonrası elde edilen total proteinlerin konsantrasyonunu ölçmek için konsantrasyon ölçüm yöntemi olan "Bradford" yöntemini kullandık. Ependorfların içerisine 5 µl protein, 45 µl distile su konularak 1:10 oranında dilisyon elde ettik. Böylece 50 µl protein hazırlamış olduk. Ayrı olarak başka bir yerde hazırladığımız ependorfların içerisine 1.5 µl Bradford reaktitinden üzerine 50 µl dilue ettiğimiz proteinden koyarak 10 dk. inkübe ettik. 595 nm dalga boyunda okuma yaparak proteinlerimizin konsantrasyonlarını elde ettik.

3.3.6. Western-Blot Yöntemi

Gremlin 1 ve Actin-Beta (housekeeping) primer antikörlerinin ve sekonder antikörünün çalışma prensiplerine bakılarak uygun oranlardaki antikörlerin proteinlerin üzerine uygulanmasına karar verildi. Bradford yöntemiyle ölçülen konsantrasyon aralıklarına göre 30 µg protein üzerinden çalışmaya başlandı. Konsantrasyon aralıkları kadar ependorflar hazırlandı ve içerisine Rıpa+inhibitor, yükleme tamponu (SDS, B-merkaptotanol, brom fenol mavisi ve gliserol icren tampon) ve son olarak hesaplanan protein miktarından konuldu. Ependorfların ağızları parafinlenerek 10dk boyunca kaynayan suyun içinde tutuldu. Dikey elektroforez cihazının içine jelin içinde rahat bir şekilde yürümesini sağlayan Runing-Buffer solusyonu eklendi ve elektroforez cihazının içine jel plaka yerleştirildi. Başta marker olmak üzere proteinler konsantrasyon aralıklarına uygun şekilde sırasıyla jelin kuyucuklarına aktarıldı.

Elektrik akımı verilerek proteinlerin dikey elektroforez cihazında yürümesi sağlandı. Jel plakanın içinden jel alınarak üstüne membran konuldu ve proteinlerin Power Blotter XL cihazıyla 40 dk. boyunca membrana aktarılması sağlandı. Daha sonra membranı Ponceau S boyasıyla boyadık ve total proteinlerin görünümünü, sıralanışını gözlemlendi.



Şekil 3. 4: Temozolomid ve Lipopolisakkarit uygulanmış hücre hatlarının dikey elektroforezde yürütülmesi

Daha sonra membranı gremlin 1 ve actin-beta 'nın moleküler büyüklüklerine (kD) uygun şekilde ikiye böldük üzerini PBST ile yıkandı. Böylece membrandaki proteinleri boyadan ve başka kalıntılardan uzaklaştırdık. Membran üzerindeki PBST döküldü ve %5'lik BSA ile hazırladığımız Blocking Buffer solusyonu membranların üzerine eklendi ve non spesifik bağlanmalar engellenmiş oldu. 1 saat shaker'da Blocking Buffer'da kalan proteinler 1 saat sonunda primer antikolar eklendi.

Primer Antikolar için; 2 adet 15'lik falkon tüp içerisine

Gremlin 1: %5 BSA 'da 1:500 oranında

Actin- Beta: %5 BSA 'da 1:1000 oranında hazırlandı.

Membranların üzerine primer antikolar eklenerek 24 saat boyunca shaker'da +4 C° 'te beklemek üzere kaldırıldı. 24 saatin sonunda membrane üzerindeki primer antikolar 15'lik falkon tüplere alınarak +4 C°'ye kaldırıldı. Membran üzerine PBST eklenerek 3 kez 10 dk.lık yıkamalar yapıldı.

Sekonder Antikor için; 2 adet 15'lik falkon tüp içerisine

Gremlin 1 : %5 BSA 'da 1:3000 oranında

Actin- Beta : %5 BSA 'da 1:3000 oranında hazırlandı.

Bu karışımlar membranların üzerine eklenerek 1 saat boyunca shaker 'dabeklenildi. Dahasonra sekonder antikorlar dökülerek tekrar membran üzerine PBST eklenerek 3 kez 10 dk.lık yıkamalar yapıldı. 15'lik falkon tüp içerisine 3000 µl kemilüminesans boyasından konuldu. 1500 µl gremlin 1 membran üzerine 1500 µl actin-beta membrane üzerine kemilüminesans boyasından eklenerek 5 dk. Beklenildi ve karanlık odada developer-fikser yıkama cihazında x-ışını filminde protein görüntüleri alındı.

4.TARTIŞMA

GBM beyin tümörleri içerisinde; en agresif tümör olup, hayatta kalım süresi 12-14 ay kadardır. Hastaların yaş aralığı 45- 70 olarak bilirse de, her yaşta gözlenebilir (Bayram, 2012) ; (Sezer, 2010). GBM'li hastaların prognozu; kemoterapi, radyoterapi gibi uygulanan tedavi yöntemlerine rağmen kötüdür (Sezer, 2010). Gremlin-1 protein ifadesinin GBM'de rol oynayabileceği yönünde çalışmalar bildirilmektedir (Guan Y., 2016);(Laurila R., 2013); (Seoane, 2014); (Yan K, 2014). Ancak uyarılmış glioblastoma hücrelerinin Gremlin-1 ekspresyonları ile ilgili yeterince veri bulunmamaktadır. Bu çalışma ile amacımız LPS ve TMZ ile muamele edilmiş glioblastoma hücrelerinde Gremlin-1 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesidir. Bildiğimiz kadarıyla LPS ve TMZ ile muamele edilmiş glioblastoma hücrelerinde gremlin-1 ekspresyon düzeylerinin araştırılması literatürde bir ilktir.

Çalışmamızda Gremlin 1 protein ifadesi ile ilişkili olarak glioblastoma hücre hatlarında TMZ etkisini değerlendirdiğimizde özellikle 24 saat 25 ve 50 μ MTMZ uygulanmış glioblastoma hücrelerinde yanıt olarak TMZ uygulanmamış glioblastoma hücrelerine göre Gremlin 1 ifadesi seviyelerinde yaklaşık 3 kat artış saptadık. Gremlin 1; BMP'in antagonistisi olarak tanımlanır. BMP ligandlarının, BMP reseptörü aracılı Smad aktivasyonu yoluyla anti-proliferatif farklılaşmayı indükleyerek tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir (Jiapaer S., 2018). Glioblastomalar kendilerini yenileyen kanser kök hücrelerinden oluştuğu için, tümör hiyerarşisinde glioma kanser kök hücreleri (KKH) kendilerini korunmalarını desteklemek için gremlin 1 salgılar ve salgılanan bu protein KKH korunmasında rol oynar. Yapılan çalışmalarda KKH'lerde gremlin 1 ekspresyonunun çok yüksek olduğu gösterilmektedir. Salgılanan bu protein BMP sinyallerini azaltıp hücrelerde tümör büyümesini ve oluşumunu daha da arttırdığı bulunmuştur (Yan K, 2014). Bizim çalışmamızda da U118 glioblastoma hücreleri üzerine uyguladığımız belirli konsantrasyonlardaki TMZ sonucunda KKH'nin korunmasını ve artışı sağlayan gremlin 1 seviyesinin azalması beklenmekteydi. Ancak gremlin 1 seviyelerinde yaklaşık 3 kat artış gözlemlenmiştir. Bu artışın glioblastoma kanser kök hücrelerinin TMZ'ye karşı direnç göstererek kendilerini korumak için gremlin 1 ekspresyonunda artışa neden olduğunu düşündürmektedir.

TMZ, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmış bir kemoterapötik ilaçtır ve GBM için birinci basamak tedavi olarak kullanılır. TMZ direnci glioblastom tedavisinde önemli bir sorundur ve hastanın medyan sağkalımını yaklaşık 1 yıla sınırlar (Khazaei M., 2019). Şu anda birden fazla ilaçla kombinasyonu TMZ'e dirençli kanserlerin tedavisinde

birincil strateji haline gelmiştir. Özellikle *in vitro* çalışmalar, diğer anti-kanser ajanlarla birleştirildiğinde TMZ'nin terapötik aktivitesinin arttığını göstermiştir (Khazaei M., 2019). Literatürde TMZ'nin glioma hücreleri üzerine olan etkileri incelendiğinde: Mozafar Khazaei ve arkadaşları (2019) insan GBM hücre hatlarına (U87MG) 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyon aralıklarında TMZ etkisini araştırmıştır. Kontrol hücreleride DMSO içeren medium ile muamele edilmiştir. Hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat inkübe edildiğinde, hücrelerin % 16'sının apoptotik olduğu görülmüştür. TMZ uygulamasının hücre sağkalımını azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara benzer şekilde Emily Schlee Villodre ve arkadaşları (2018); U87 glioblastoma hücre hattı üzerine 1 ile 10 nM Doxorubisin (DOX) ile 5 µM TMZ uygulamışlardır. Hücreler 24 saat muameleden sonra toplanmış ve sonuçlara bakıldığında çok düşük dozlarda bile, sadece 24 saatlik tedaviden sonra doku ölümü net bir şekilde gözlemlenmiştir. Günlerce tedaviden sonra hücre sayısında azalma olduğu ve düşük dozlarda uygulanan DOX ve TMZ 'nin hücre ölümü ve yaşlanmayı başlattığı görülmüştür.

U118 glioma hücre hatlarını kullanan Quan Cheng ve arkadaşları da (2017), insan GBM hücrelerinde miR-223 / PAX6 sinyal yolağı ile TMZ direnci ilişkisini araştırmıştır. U118 ve U251 hücre hatlarına 48 saat boyunca (100, 200 ve 400 µM) TMZ uygulanmış her iki glioma hücre hattında hücre çoğalmasının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. TMZ'nin miR-223'ü inhibe ederek bir tümör baskılayıcı protein olan PAX6'nın ekspresyonunu arttırdığı ve GBM hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada TMZ'nin, tümör büyümesini ve çoğalmasını teşvik eden miR-223 inhibe etmesine rağmen bizim çalışmamızda tümör büyümesini ve çoğalmasını teşvik eden gremlin 1 ekspresyonunu inhibe edilemediği görülmektedir.

Wei Shen ve arkadaşları (2013); U251 insan glioma hücre hattı üzerindeki etkileri incelenmiş ve 24, 48, 72 ve 96 saatlik TMZ uygulanmıştır. 24 saat boyunca 100 µmol / l TMZ ile muameleden sonra, TMZ grubunda hücre canlılığının, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. TMZ ile muamele edilen U251 hücrelerin, kontrol U251 hücrelerine kıyasla hücre canlılığının azaldığı, hücre göçünün engellendiği ve U251 hücrelerinde otofajinin desteklendiği görülmüştür. TMZ, U251 hücrelerinde otofajik, fakat apoptotik olmayan süreçleri indükledi ve böylece canlılıklarını ve yer değiştirmelerini azaltmıştır.

Bu sonuçların aksini gösteren çalışmalarda bildirilmiştir (Alagoz M, 2018); (Carmo A., 2011). A. Carmo ve arkadaşları (2011); U118 glioma hücrelerine 24 ve 48 saatlik

sürelerde ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 20, 100, 250, 500 uM) TMZ uygulanmış ve yüksek konsantrasyonlarda belirgin bir şekilde glioma hücre çoğalmasının azaldığı görülmüştür. TMZ dozu 250 uM ile inkübe edildiğinde, proliferasyon oranı, kontrol hücrelerinde gözlenen kiyasla % 43.2 oranında inhibe olduğu bildirilmiştir. TMZ'nin hücre ölümünü indükleme yeteneğinin azaldığı ve G2/M'de hücre döngüsü durmasını indüklemediği görülmüştür. TMZ tedavisi sırasında Pi3K / Akt ve ERK1 / 2 MAP kinazın fosforilasyon yolağının korunduğu gösterilmiştir. Bu durum da glioma hücrelerinin TMZ'nin neden olduğu hücre ölümden kaçtığını düşündürmektedir. Pi3K / Akt ve ERK1 / 2 MAP kinaz sinyal yolaklarının inhibitörleri glioma hücrelerine TMZ ile birlikte uygulanarak hücre ölüm yüzdelere bakılmış ve sinyal yolaklarının inhibitörleri ile TMZ kombinasyon tedavisinin apoptoz yüzdesini artırdığı görülmüştür. Bu da hayatta kalma yolları ve TMZ arasında sinerjistik bir etkinin varlığını göstermektedir. GBM kemoterapi tedavisinde birinci basamak olarak kullanılan TMZ'in yanında moleküler tabanlı özelliklerde sinyal yolakları ile birleştirilmiş bir tedavinin uygulanması gerektiği vurgulanmaktadır. Çalışmalarında kullanılan U118 hücrelerinin TMZ'ye direncinin; Pi3K / Akt ve ERK1 / 2 MAP kinaz sinyal yolaklarının inhibitörleri ile TMZ'nin tedavide birlikte kullanılmasıyla kısmen ortadan kalkacağı düşünülmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde TMZ'nin, U-118 hücre hattında hücre ölümünü indüklemeye etkili olmadığı ve U118 glioma hücrelerinin TMZ'e direnç gösterdiği görülmektedir.

Meryem Alagöz (2018) yaptığı çalışmada; Glioblastoma U118 ve U87 hücreleri üzerine 50, 100, 200 µM konsantrasyon aralıklarında TMZ uygulamıştır. Uygulamadan 4 gün sonra hücre canlılık testi ile TMZ'nin sitotoksitesini değerlendirmek için yapılmıştır. U87 hücre hattına en yüksek seviyede TMZ verildikten sonra kanser kök hücrelerinin farklılaşmış kanser kök hücrelerine oranla canlılıklarının neredeyse 2 katı olduğu görülmüştür. U118 glioblastoma hücre hattı TMZ uygulaması sonrasında ise U87 hücrelerine kıyasla farklılaşmış ve kök hücre popülasyonlarında daha düşük hücre ölümü gözlemlenmiştir. U118 hücre hattın da kanser kök hücrelerinin farklılaşmış kanser hücrelerine oranla daha dirençli olduklarını ve TMZ'in kanser kök hücrelerini daha az öldürdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda glioblastoma kök hücrelerinin TMZ'ye karşı gösterdikleri direnç ortaya konmuştur. Bu bulguları destekler şekilde başka bir çalışmada da TMZ ile tedavi edilen GBM hücrelerinin çok nadir apoptoz geçirdiğini bildirmiştir (Hirose Y, 2001). Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, U118 hücrelerinin TMZ'e gösterdiği direnç bizim çalışmamızda uyguladığımız TMZ sonrasında ki gremlin 1 protein ekspresyonunda bir azalma olmamasının

sebebini açıklamaktadır. Üstelik glioblastoma hücrelerinde özellikle 24 ve 48 saat uygulanan tüm TMZ dozlarında Gremlin 1 ifadesinin seviyeleri iki katın üzerinde artışlar göstermesi belirtilen çalışma sonuçlarını desteklemektedir. Aynı zamanda Yongchang Guan ve arkadaşları (2016) glioblastoma U87 hücre hattı üzerinde gremlin 1 geni nakavt edilmesinin glioma hücre büyümesinin durdurduğu görülmüştür.

Son yıllarda LPS'nin tümör mikroçevresindeki etkileri giderek daha fazla kanser türünde araştırılmaktadır (Han S., 2017). Çalışmamızda Glioblastoma hücre hatları, 24 ve 48 saat boyunca 0, 0.01, 0.1, 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda LPS ile muamele edildi. Glioblastoma hücrelerinde özellikle 24 saat 0.1 µg/ml LPS uygulamasına yanıt olarak Gremlin 1 ifadesi seviyelerinde LPS uygulanmamış glioblastoma hücrelerine göre yaklaşık 2.3 kat azalma saptandı (Tablo 5.2).

Malign gliomlar vücudun bağışıklık sistemine cevap olarak immüno-supresif bir alan oluşturarak immünoterapinin başarısızlığına sebebiyet verirler (Albesiano E, 2010). TLR; hem doğal hem de adaptif bağışıklığı düzenleyebilen moleküllerdir ve TLR4 glioblastoma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. LPS tümör hücrelerini uyaran bir bakteri hücre duvar elemanıdır ve lipopolisakkaritler glioblastoma hücrelerinde antitümöral etkileri indüklediği iyi bilinen bir TLR4 ligandır. Tümöre sahip olan konakçının bağışıklık fonksiyonu güçlü ise, LPS ile yapılan tedavi in vivo olarak tümör GCS'lerinin belirlenmesinde ve yok edilmesinde görev alır (Han S., 2017). LPS, glioma hücrelerinin immüno-fenotipini TLR4 aracılığıyla immüno-supresif olandan immüno-reaktif olana çevirir. Bu durumda glioma immünojenitesini artırır ve anti-tümöral bağışıklığı ortaya çıkarır, Sonuç olarak glioma immünoterapisi için yeni bir perspektif sağlar (Han S., 2017).

Bizim çalışmamızda U118 glioblastoma hücrelerine uygulanan LPS'nin glioma ve GCS'lerine anti-tümöral etki göstererek tümör aktivitesini azalttığı, bu yüzden GCS'leri gremlin 1 proteinini yeterli miktarda salgılayamayıp kendilerini koruma altına almadıkları düşündürmektedir. Bu yüzden çalışmamızda 24 saatlik 0,1 mg/ml konsantrasyonunda gremlin 1 seviyesi bariz bir şekilde yaklaşık 2,3 kat azalma gözlemlenmiştir. LPS ile muamele edilmiş glioblastoma hücrelerinde gremlin-1 ekspresyonunun araştırılması günümüze kadar olan literatürde bir ilktir.

Literatür araştırması yaptığımızda; glioma tümörlerinde LPS etkisini inceleyen çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır (Chicoine M.R., 2001); (Chicoine M. R., 2007);(Cheng Y-J.

Liu, 2004); (Han S., 2017); (Lisi L., 2014); (Won E.K., 2003). Michael R. Chicoine ve arkadaşları (2001) LPS'nin in vivo malign glioma modelinde tümör gerilemesine sebep olup olmadığı incelemiştir. Gecikmiş beyin tümör (DBT) hücrelerinde 10, 17 ve 24. günlerde LPS (300-500 µg) intratümöral veya subkutan yoldan enjekte edilmiş ve kontrol hayvanlarına sadece PBS verilmiştir. Farelerin 28.günde tümör dokuları çıkarılmıştır. Kontrol grubu ve LPS ile tedavi gören iki grup için tümör kitleleri karşılaştırıldığında; histolojik olarak intratümöral LPS uygulamaları, DBT hücresi fare gliomlarının gerilemesine neden olduğu belirtilmiştir.

Han ve arkadaşları (2017) insan glioblastoma U87 ve sıçan glioma RG2 hücre dizisi ve bunlardan elde ettikleri GSC'ler ile yaptıkları çalışmalarda; 1 mg/mL LPS ile hücreler laboratuvar ortamında 6, 12, 24 saat inkübe edilmiş ve in vivo deneyler için kullanılan hücreler ise 6 saat LPS ile muamele edilmiştir. LPS'nin in vitro ortamda glioma ve glioma kök benzeri (GSC) hücreleri etkileme yeteneğini ve in vivo anti-tümör bağışıklığını indüklemeye yeteneğini ve TLR4'ün bu işlemler üzerindeki etkisine bakılmıştır. Bu çalışmada TLR4'ün glioblastoma örneklerinde yüksek oranda eksprese edildiği, 6 saatlik in vitro LPS uygulamasının RG2 ve U87 GSC'lerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bağışıklık ile ilgili moleküllerin ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirdiğini ve uzun süreli (12,24 saat) LPS uygulamasının bu etkiyi azalttığı western-blot çalışmalarıyla gösterilmiştir. Bu veriler doğrultusunda glioma hücreleri ve GSC'lerinin LPS'ye yanıt verdiği gösterilmektedir. Fakat bu yanıt TLR4 ve zamana bağımlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Ayrıca LPS, glioma hücrelerinin immüno-fenotipini TLR4 aracılığı ile immünosupresif olandan immünoaktif olana zamana bağımlı olarak değiştirdiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda gremlin 1 ekspresyonundaki azalma etkin şekilde 0,1 uM konsantrasyonda ve 24 saat uygulama süresinde ortaya çıkmıştır. Ortaya çıkan gremlin 1 ekspresyonundaki bu azalma 1 uM dozda sürmüştür ancak 10 uM'de artış eğilimine geçmiştir. LPS'nin 48 saatlik uygulama dozlarında gremlin 1 ekspresyonu azalarak devam etmiştir. Bizim sonuçlarımızda Han ve ark. (2017) benzer şekilde dikkat çekici olan LPS etkisinin 0,1 uM gibi düşük dozda ve 24 saat gibi erken dönemde gremlin-1 protein ifadesininin azalmasında daha etkili olduğunu göstermesidir.

Michael R. Chicoine ve arkadaşları (2007) TLR4 nakavt BALB/c farelerinde intratümöral LPS ile tedavisinin tümör ilerlemesi üzerine olan etkilerini değerlendirilmiştir. LPS; vahşi tip farelerde tümörün etkisizleşmesine sebep olmuştur. Ancak TLR4 nakavt farelerde sadece %50 azalma görülmüştür. Bu durumda LPS'nin antitümoral etkisinin TLR4

üzerinden gösterdiğini bildirmişlerdir LPS uygulaması vahşi tip farelerde hayatta kalımı uzatmış, ancak TLR4 nakavt farelerinde hiç etki göstermemiştir. Çalışmamızda LPS uygulamasının Gremlin-1 protein ifadesindeki azalmanın TLR'lerin baskılanmasından kaynaklanıp kaynaklanmadığı ile ilgili araştırmalar planlanabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgulara benzer şekilde Eun Kyung Won ve arkadaşları (2003) LPS'nin glioblastom multiforme'ye karşı anti-tümöral mekanizmalarının etkisini inceledikleri çalışmalarında; BALB/c farelerine intratümöral Lipit A'nın sc DBT tümör kütlesi üzerindeki etkisine bakılmış ve belirli dozlarda uygulanan lipit A sonucunda kontrol grubuna oranla ortalama tümör kütlelerinde %90 a yakın azalma görülmüştür. Bu sonuca göre daha önceki araştırmalarda da yapılan lipit A'nın anti tümöral etkisi bu araştırmada da doğrulanmıştır. Ayrıca lipit A'nın LPS 'ye oranla daha az toksisiteye sahip glioblastom gerilemesine neden olduğu, LPS aracılı anti-tümöral cevabın LPS aracılı lipit A alt birimine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Lisi ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada; 1 mg/ml LPS ve 10 UI / ml - IFN γ ile 24 saat inkübasyon ile glioma hücrelerini aktive olduğunu ve mikroglia hücrelerini uyardığını bildirmiştir. Yu-Jung Cheng ve arkadaşları (2004) bu çalışmada; U-373MG glioma hücre hattı kullanmış ve Pb (kurşun) ve LPS ile tetiklenen TNF-alfa sinyali ile MAPK kinaz (MEK) ve protein kinaz C'nin (PCK) aktivasyonuna bağlı olan fosforilasyon kaskadını aktive ettiği gösterilmiştir.

LPS ön tedavisinin anti-tümör etkileri tümöre sahip olan konakçı bağışıklık sistemine bağlıdır. Glioma taşıyan sıçanlar ile yapılan çalışmalarda sağlam bağışıklığa sahip olanların LPS ön tedavisi sonrasında tümör büyümesinin önemli ölçüde azaldığı ve sağ kalım süresinin uzadığı görülmüştür. Sıçanlar üzerindeki bu etkinin tümör hücrelerinin değiştirilmiş immüno-fenotipinden kaynaklandığı ve bu durumun onları daha immünojenik hale getirdiği düşünülmektedir (Han S., 2017).

Bu çalışma sonuçlarından elde edilen bulgular ışığında LPS uygulanmasının glioma immünojenitesini arttırdığı ve anti-tümöral etkinin ortaya çıkmasına neden olduğu anlaşılmaktadır. Bizim çalışmamızda da LPS uygulanmasının gremlin-1 düzeyinin azalmasına neden olması bu bulgularla uyumluluk göstermektedir. Çünkü gremlin-1 tümör büyümesini ve progresyonunda rol oynayan önemli bir molekül olduğu çok sayıda çalışma ile

desteklenmektedir (Guan Y., 2016); (Hong D., 2018); (Park, 2018); (Pelli A, 2016);(Yan K, 2014).

Sonuç olarak çalışmamızda, 24 saat 25 ve 50 uM konsantrasyonlarda TMZ muamele edilen glioblastoma hücre hatlarında Gremlin-1 ekspresyonlarında artış ve 24 saat 0.1 uM konsantrasyonda LPS uygulanan glioblastoma hücrelerinde Gremlin-1 ifadesi seviyelerinde bir azalma gösterdik. Bu bulgular glioblastomada Gremlin-1 düzeylerinin önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir. Hücre proliferasyonu ve apoptoz çalışmaları glioblastoma hücrelerinde TMZ uygulamalarının Gremlin-1 ifadesindeki değişikliklere etkisini tanımlayacaktır. Glioblastoma tümörlerinde direnç gelişme sıklığı ve sağkalım süresinin kısalığı düşünüldüğünde Gremlin-1'in etkinliğinin araştırılmasının oldukça önemli sonuçlar ortaya çıkarılabileceği kanısındayız.

5.SONUÇLAR

Gremlin 1 protein ifadesi ile ilişkili olarak glioblastoma hücre hatlarında TMZ etkisini değerlendirdik. Glioblastoma hücre hatları, 24 ve 48 saat boyunca 0, 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarda TMZ ile muamele edildi. Glioblastoma hücrelerinde özellikle 24 saat 25 ve 50 μM TMZ uygulamasına yanıt olarak Gremlin 1 ifadesi seviyelerinde TMZ uygulanmamış glioblastoma hücrelerine göre yaklaşık 3 kat artış saptandı (Tablo 5.1).

Tablo 5. 1: Temozolomid uygulanmış glioblastoma hücrelerinde Gremlin 1 protein ifadesi seviyeleri

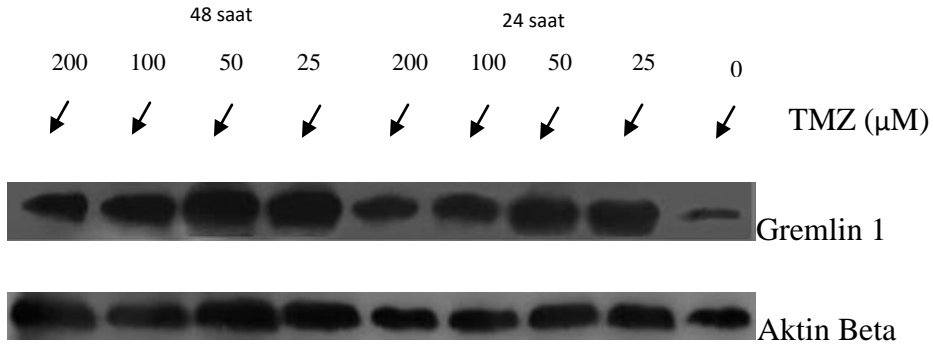
TMZ (μM)	Gremlin 1 protein ifadesi
24 saat	
0	0.49863075
25	1.47466289
50	1.52135033
100	1.0523348
200	0.99198392
48 saat	
0	0.49863075
25	1.10693233
50	0.9501011
100	1.07269791
200	0.67664591

Bu bulgulara ek olarak, Gremlin 1 protein ifadesi ile ilişkili olarak glioblastoma hücre hatlarında LPS etkisini değerlendirdik. Glioblastoma hücre hatları, 24 ve 48 saat boyunca 0, 0.01, 0.1, 1 ve 10µg/ml konsantrasyonlarda LPS ile muamele edildi. Glioblastoma hücrelerinde özellikle 24 saat 0.1 µg/ml LPS uygulamasına yanıt olarak Gremlin 1 ifadesi seviyelerinde LPS uygulanmamış glioblastoma hücrelerine göre yaklaşık 2.3 kat azalma saptandı (Tablo 5.2).

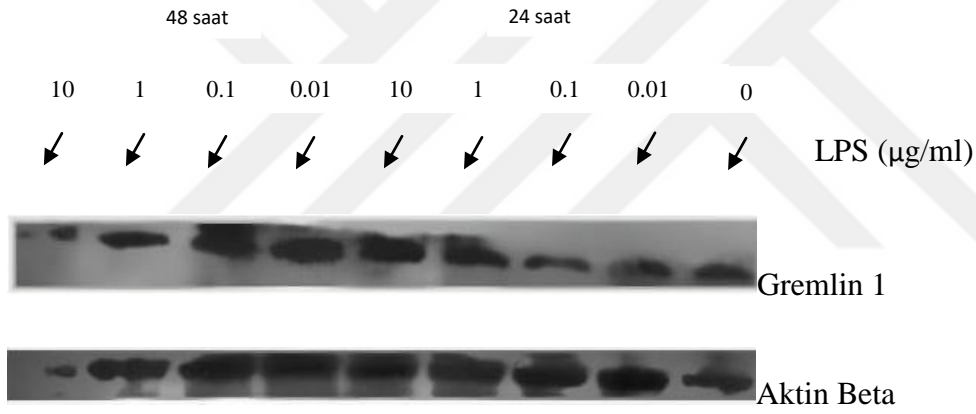
Tablo 5. 2: Lipopolisakkarit uygulanmış glioblastoma hücrelerinde Gremlin 1 protein ifadesi seviyeleri

LPS (µg/ml)	Gremlin 1 protein ifadesi
24 saat	
0	0.83796326
0.01	0.577765
0.1	0.37789109
1	0.64963233
10	0.98961154
48 saat	
0	0.83796326
0.01	0.70671525
0.1	0.57120111
1	0.54825999
10	1.33762441

Farklı dozlarda ve zamanlarda TMZ veya LPS uygulanmış glioblastoma hücrelerindeki Gremlin 1 protein ifadesi düzeyleri sırasıyla Şekil 5.1 ve Şekil 5.2'de gösterilmiştir.



Şekil 5 1: Temozolomid uygulanmış glioblastoma hücrelerinde gremlin 1 protein ifadesi düzeyleri



Şekil 5 2: Lipopolisakkarit uygulanmış glioblastoma hücrelerindeki Gremlin 1 protein ifadesi düzeyleri

KAYNAKÇA

- Adamson, C. K. (2009). Glioblastoma Multiforme: A review of where we have been and where we are going. *Expert Opinion On Investigational Drugs*, 18; 1061-1083.
- Alagoz M. (2018). Glioblastoma Multiforma Tedavisinde Kanser Kök Hücrelerinin Temozolomide karşı oluşturdukları direnç. *Sakarya Tıp Dergisi*, 8(2):379-387.
- Albesiano E, H. J. (2010). Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurg Clin N Am.*, 21(1):17–29.
- Ali IH, Brazil DP. . (2014). Bone morphogenetic proteins and their antagonists: Current and emerging clinical uses. *Br J Pharmacol.*, 171: 3620-3632.
- Alonso MM, G.-M. C. (2007, Dec). Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Cancer research.*, 15;67(24):11499-504.
- Anspach, F. (2001, Met.). Endotoxin removal by affinity sorbents. *J. Biochem. and Biophys.*, 49:665-681.
- Appiah, C. (2016). Bone morphogenetic protein 4 and Gremlin-1 communication between mouse breast cancer cells and fibroblasts (Master's Thesis),. *Norwegian University of Science and Technology (NTNU) Faculty of Medicine, Trondheim, Norwegian.*
- Bayram, F. (2012). *Glioblastomlarda Metil Guanin Metil Transferaz Promoter Bölgesinde Metilasyonun Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemiyle Gösterilmesi, Klinik Ve Histopatolojik Prognostik Faktörlerle İlişkisi (Uzmanlık Tezi)*. Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı .
- Beheshti F., N. F. (2018). Nigella sativa Prevented Liver and Renal Tissue Damage in Lipopolysaccharide-Treated Rats. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 29(3):554-566.
- Bragdon B, M. O. (2011). Bone morphogenetic proteins: A critical review. *Cell Signal*, 23: 609-620.
- Brazil D.P., R. H. (2015). BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol. Elsevier Ltd.*; 1–16.
- Brazil DP, C. R. (2015). BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol [Internet].*, 1-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.004> adresinden alınmıştır
- Cahill E, C. C. (2012). Gremlin plays a key role in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circulation.*, 125: 920-93.

- Cai X, Y. X. (2018). Identification and verification of differentially expressed micrnas and their target genes for the diagnosis of esophageal cancer. . *Oncol Lett.*, 16: 3642-3650.
- Canalis E, E. A. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* , 24: 218-235.
- Cao, H., Wang, F., & Li, X. (2017). Future Strategies on Glioma Research: From Big Data to the Clinic. *Genom. Proteom. Bioinform.* 15, 263–265.
- Carmo A., C. H. (2011). Effect of temozolomide on the U-118 glioma cell line. *ONCOLOGY LETTERS*, 2; 1165-1170.
- Cengiz F.P., Emiroğlu N.,. (2014). Metastatik Melanomda Sistemik Tedaviler. *Turkiye Klinikleri*, 24(1)12-8.
- Chen MH, Y. Y. (2013). Expression of Gremlin 1 correlates with increased angiogenesis and progression-free survival in patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Journal of Gastroenterology*, 48:101-108.
- Chen R., S.-C. M. (2017). Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*, 14:284–297.
- Cheng Y-J. Liu, M.-Y. W.-P.-C. (2004). Regulation of tumor necrosis factor- in glioma cells by lead and lipopolysaccharide: involvement of common signaling pathway. *Toxicology Letters* , 152, 127–137.
- Cheng, L., Davison, D., Adams, J., Lopez-Beltran, A., Wang, L., Montironi, R., & Zhang, S. (2014). Biomarkers in bladder cancer: Translational and clinical implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, 89, 73–111.
- Chicoine M. R., Z. M. (2007). The *in vivo* antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by toll-like receptor 4. . *Neurosurgery*, , (60);372–381.
- Chicoine M.R., M. W. (2001). Intratumoral Injection of Lipopolysaccharide Causes Regression of Subcutaneously Implanted Mouse Glioblastoma Multiforme. . *Neurosurgery*, 48;607–615.
- Church RH, A. I. (2017). Gremlin1 plays a key role in kidney development and renal fibrosis. . *Am J Physiol Renal Physiol.* , 312: F1141-F1157.
- Church RH, K. A. (2015). Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP2) and BMP-4 over BMP-7. *Biochem J.*, 466:55–68.
- Cihankaya H. (2019). *The effect of glibenclamide in lipopolysaccharide stimulated brain microvascular endothelial cells. (yüksek lisans tezi)*. İzmir: Graduate School of Engineering and Science of İzmir Institute of Technology.

- Clarke, J. C. (2008). Optimizing radiotherapy schedules for elderly glioblastoma multiforme patients. *Expert review of anticancer therapy*, 8(5):733-41.
- Cloughesy TF, C. W. (2014). Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol* , 9:1-25.
- Cohen, J., Javed, A., Thoburn, C., Wong, F., Tie, J., Gibbs, P., . . . al., e. (2017). Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, 10202–10207.
- Çıtışlı V., D. Y. (2015). Temozolomide may induce cell cycle arrest by interacting with URG4/URGCP in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Tumor Biol*, 36:6765–6772.
- Dang L, W. D. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274):739-44. <https://doi.org/10.1038/nature08617> adresinden alınmıştır
- Davis H, I. S.-M.-J. (2015). Aberrant epithelial gremlin expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat Med.*, 21: 62-70.
- Davis, M. (2018). Epidemiology and Overview of Gliomas. *Seminars in Oncology Nursing*, 34(5), 420-429.
- DeAngelis L. M. (2001). Brain tumors. *Medical Progress N Engl J Med*, 114 (2): 114– 123 .
- Delibaş, M. (2020). Glioblastoma, kondrosarkoma ve mezotelyoma hücrelerinde zingeron etkisinin in vitro incelenmesi (Yüksek lisans Tezi. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Denizler Ebiri, F. (2019). *leptin ve leptin reseptör antagonistinin glioblastoma temozolomid direncindeki rolü. (yüksek lisans tezi)*. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- DeWitt, J., Mock, A., & Louis, D. (2017). The 2016 WHO classification of central nervous system tumors: What neurologists need to know. *Curr. Opin. Neurol.*, 30, 643–649.
- Doğanyığıt Z., S. S. (2019). Apilarnilin'in erkek sıçanlarda lipopolisakarite (lps) bağlı testis toksisitesine karşı koruyucu rolünün belirlenmesi. *Bozok Tıp Dergisi*, 9(2):146-154.
- Durmaz R., V. M. (2007). Genetics in Primary and Secondary Glioblastoma. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 17(2),80-90.
- Erbayraktar Z., E. S. (2015). Glioblastoma İçin Hedefe Yönelik Tedavi: Mevcut Stratejilerin ve Yeni Hedeflerin Değerlendirilmesi. *Sinir Sistemi Cerrahisi Dergisi*, 5(3-4),59-68.
- Erdmann R, O. C. (2015). Targeting the gremlin-vegfr2 axis - a promising strategy for multiple diseases? *J Pathol.*, 236: 403-406.
- Fan TY, W. H. (2014). Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in glioblastoma. *Int J Clin Exp Pathol.*, 7(10):6662–70.

- Ferris S.P., H. J. (2017). Characterization of gliomas: from morphology to molecules, . *Virchows Arch* , 471, 257–269.
- Ferrolì P, A. F. (2010). From standard treatment to personalized medicine: Role of IDH1 mutations in low-grade glioma evolution and treatment. *World Neurosurgery*, 73(4): 231-238.
- Furnari, F., Fenton, T., Bachoo, R., Mukasa, A., Stommel, J., Stegh, A., . . . al., e. (2007). Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment . *Genes Dev.*, 21, 2683–2710.
- Galamb O, W. B. (2012). Dysplasia carcinoma transition specific transcripts in colonic biopsy samples. . *PLoS One.*, Galamb O, Wichmann B, Sipos F, Spisak S, Krenacs T, Toth K, Leiszter K, Kalmar A, Tulassay Z, Molnar B. *Dyspl7*: e48547.
- Garbe, K. (2010). Oncometabolite? IDH1 discoveries raise possibility of new metabolism targets in brain cancers and leukemia. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 102(13): 926-928.
- Garber, K. (2010). Oncometabolite? IDH1 discoveries raise possibility of new metabolism targets in brain cancers and leukemia. *JNCI J Natl Cancer Inst. JNCI J Natl Cancer Inst* , 102(13): 926-928.
- Guan Y., C. W. (2016). Gremlin1 promotes carcinogenesis of glioma in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 44: 244–256.
- GündoğanF. (2018). *Farklı mikrobiyal kaynaklı lipopolisakkaritlerle stimüle edilmiş monosit hücrelerinde selenosertib'in(GS4997)immün yanıtta etkisi (Yüksek Lisans Tezi)*. Eskişehir: Eskişehir Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Han EJ, Y. S. (2016). Grem1 is a key regulator of synoviocyte hyperplasia and in- vasiveness. *J Rheumatol.*, 43: 474-485.
- Han S., W. C. (2017). LPS alters the immuno-phenotype of glioma and glioma stem-like cells and induces in vivo antitumor immunity via TLR4. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36:83.
- Hegi ME, D. A. (2005, Mar). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine.*, 10;352(10):997-1003.
- Hegi, M. L. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(25):4189-99.
- Heron M, v. M.-v. (2011). Genetic variation in grem1 is a risk factor for fibrosis in pulmonary sarcoidosis. . *Tissue Antigens.*, 77: 112-117.

- Hirose Y, B. M. (2001). p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. . *Cancer Res*, 61: 1957–1963.
- Hong D., L. T. (2018). Gremlin1 Delivered by Mesenchymal Stromal Cells Promoted Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, (47)1785-1799.
- Irmak, E. (2018). 3 dimensional monomodal intensity based medical image registration for brain tumor progression analysis(Doktora Tezi). Karabük: Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Jacinto FV, E. M. (2007). MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)*, 6(8):1155-1160.
- Jang BG, K. H. (2017). Prognostic significance of stro- mal grem1 expression in colorectal cancer. *Hum Pathol.*, 62: 56-65.
- Jiapaer S., F. T. (2018). Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 58,405-421.
- Kaina B, C. M. (2007). MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* , 6(8):1079-1099.
- Kaina B., M. G. (2010). Targeting O-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Science*, 67(21): 3663–3681.
- Kalkan R.,Atlı E.İ. (2014). Geçmişten Günümüze Glioblastoma Genetiği. *Türk Nöroşir Dergisi*, (24)3, 239-249.
- Kalluri R, Zeisberg M. . (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.*, 6(5):392–401.
- Kanu OO, H. B. (2009). Glioblastoma multiforme oncogenomics and signaling pathways. *Clin Med Oncol*, 3:39-52.
- Kara S., Karakok M., (2016). Investigation of Gremlin 1, COL15A1 immunoreactivity and the relationship between microvessel density and Gremlin 1 in papillary renal cell carcinoma and chromophobe renal cell carcinoma. *Medical Science and Discovery*,, 3(4): 184-91.
- Karagiannis GS, T. A. (2014). Expression patterns of bone morphogenetic protein antagonists in colorectal cancer desmoplastic invasion fronts. *Mol Oncol [Internet]*, 8(7):1240–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2014.04.004> adresinden alınmıştır
- Khasraw, M. L. (2010). Advances in the treatment of malignant gliomas. *Current Oncology Reports*, 12(1):26-13.

- Khazaei M., P. M. (2019). Temozolomide and tranilast synergistic antiproliferative effect on human glioblastoma multiforme cell line (U87MG). *Med J Islam Repub Iran.*, 33;235-242.
- Kim H.Y., K. J. (2018). Anti-Inflammatory Effect of Lupinalbin A Isolated from *Apios americana* on Lipopolysaccharide-Treated RAW264.7 Cells. *Molecules*, 23, 583.
- Kim M, Y. S. (2012). Gremlin-1 induces bmp-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion. *PLoS One.*, 7: e35100.
- Kim, L. G. (2006). Chemotherapeutic options for primary brain tumors. *Current treatment options in oncology*, 7(6):467-78.
- Korkmaz, T. (2019). *lipopolisakkarit (lps) ile uyarılmış gökkuşağı alabalığı gonad hücrelerinde (rtg-2) inula viscosa l. 'nin etkilerinin araştırılması.*(yükseklisans tezi). Tunceli: Munzur Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Krakstad C, Chekenya M.: (2010). Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: Opportunities for targeted therapeutics. *Molecular Cancer*, 9:135.
- Krex, D. K. (2007). "Long-term survival with glioblastoma multiforme", *Brain.*, 130 (10): 2596–2606 .
- Krol, I., Castro-Giner, F., Maurer, M., Gkountela, S., Szczerba, B., Scherrer, R., . . . al., e. (2018). Detection of circulating tumour cell clusters in human glioblastoma. *Br. J. Cancer* , 119, 487–491.
- Kundakcı A., P. A. (2012). Toll Benzeri Reseptörler. *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi*, 10: 63-73.
- Laurila R., P. S. (2013). The expression patterns of gremlin 1 and noggin in normal adult and tumor tissues. . *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.*, 6(7);1400-1408.
- Lavoz C, A. M.-D.-O. (2015). Gremlin regulates renal inflammation via the vascular endothelial growth factor receptor 2 pathway. . *J Pathol.*, 236: 407-420.
- Lee CH, J. K. (2010). Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 48(2):145-152.
- Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes&Diseases*, 3,198-210.
- Lehnardt, S., Lachance, C., Patrizi, S., Lefebvre, S., Follett, P. L., Jensen, F. E., . . . Vartanian, T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci*, 22 (7), 2478-86.
- Lei Y, S.-t. Q.-y. (2010). Analysis of isocitrate dehydrogenase-1/2 gene mutations in gliomas. *Chinese Medical Journal*, 123(24):3697-3705.

- Levin, V. L. (2001). *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (6th Ed). V. H. DeVita içinde, *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia* (s. 2100-60.).
- Li G., L. Y. (2013). Gremlin Aggravates Hyperglycemia-Induced Podocyte Injury by a TGF β /Smad Dependent Signaling Pathway . *Journal of Cellular Biochemistry*, 114:2101–2113.
- Li J, L. H. (2017). A functional variant in *grem1* confers risk for colorectal cancer by disrupting a hsa-mir-185-3p binding site. *Oncotarget*, 8: 61318-61326.
- Lisi L., S. E. (2014). Proinflammatory-activated glioma cells induce a switch in microglial polarization and activation status, from a predominant M2b phenotype to a mixture of M1 and M2a/B polarized cells. *ASN NEURO*, 6(3).
- Lively, S., & Schlichter, L. C. (2018). Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL4, IL-10). *Front Cell Neurosci*, 12, 215.
- Lombardi, G., Corona, G., Bellu, L., DellaPuppa, A., Pambuku, A., Fiduccia, P., . . . etal. (2015). Diagnostic value of plasma and urinary 2-hydroxyglutarate to identify patients with isocitrate dehydrogenase-mutated glioma. *Oncologist*, 20, 562–567.
- Longuespée, R., Wefers, A., De Vita, E., Miller, A., Reuss, D., Wick, W., . . . al., e. (2018). Rapid detection of 2-hydroxyglutarate in frozen sections of IDH mutant tumors by MALDI-TOF mass spectrometry. *Acta Neuropathol. Commun.*, 6, 21.
- Lopez-Gines C, G.-b. r.-L. (2010). *New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. Mod Pathol* . <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.62>, 23(6):856-65. adresinden alınmıştır
- Louis D.N., P. A. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131,803–820.
- Magrone, T.; Jirillo, E.,. (2011). The impact of bacterial lipolysaccharides on the endothelial system: pathological consequences and therapeutic countermeasures. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 11 (4), 310-25.
- Mahvash M, H. H. (2011). Glioblastoma multiforme in children: report of 13 cases and review of the literature . *Pediatr Neurol* , 45: 178-80.
- Mallick S., B. R., Hakim, A., & Rath, G. (2016). Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm. *Egypt. Natl. Cancer Inst.*, 28, 199–210.
- MARCHESI, F. T. (2007). Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* , 56(4):275-87. .

- Mazzara, G. V. (2004). "Brain tumor target volume determination for radiation treatment planning through automated MRI segmentation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59 (1): 300–312.
- McNeill, K. A. (2016). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clinik*, 34(4),981-998.
- Migle Kisonaite, X. W. (2016). Structure of Gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2. *Biochem. J.*, 473, 1593–1604.
- Mitola S, R. C.-H. (2010). Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. . *Blood.*, 116:3677–80.
- Montano N, C. T. (2011). Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited. *Neoplasia*. *Neoplasia*, 13(12):1113-21. <https://doi.org/10.1593/neo.111338> adresinden alınmıştır
- Moody CL, Wheelhouse RT. (2014). The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. *Pharmaceuticals (Basel)*, 7: 797-838.
- Mulvihill MS, K. Y. (2012). Gremlin is overexpressed in lung adenocarcinoma and increases cell growth and proliferat- ion in normal lung cells. . *PLoS One.*, 7: e42264.
- Myllarniemi M, L. P.-O. (2008). Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. . *Am J Respir Crit Care Med.* , 177: 321-329.
- Nakada M, F. T. (2012). The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol*, 2: 98.
- Namkoong H, S. S. (2006). The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. . *BMC Cancer.*, 6:74.
- Nicholas A. Butowski, MD. . (2015). Epidemiology and Diagnosis of Brain Tumors. *American Academy of Neurology*, 21(2),301–313.
- Ogikubo, Y. N. (2004). Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines. *Biologicals*, 32:88-93.
- Ohashi K, B. V. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol;*, 164:558-61.
- Ohgaki H, K. P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109: 93-108.
- Ohgaki H, K. P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, 170(5): 1445-1453.
- Omay, S. V. (2009). Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas. *Indian Journal of Cancer*, 46(2):88-95.

- Omuro A, DeAngelis LM. . (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. . *JAMA* , doi:10.1001/jama.2013.280319., 310(17):1842-1850.
- Ostrom QT, G. H. (2014). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol*, 16(4):1-63. doi:10.1093/neuonc/nou223.
- Papagiannakopoulos T, S. a. (2008). MicroRNA-21 targets a network of key tumorsuppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Research* , 68(19):8164-72.
- Park, S. (2018). Role of Gremlin-1 in Cancer. *Biomedical Science Letters*, 24:285-291.
- PARSONS, D. J. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, N.Y.)*,, 321:1807-1812.
- Pelli A, V. J. (2016). Gremlin1 expression associates with serrated pathway and favourable prognosis in colorectal cancer. . *Histo- pathology.*, 69: 831-838.
- Perazzoli G, P. J. (2015). Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 expression. . *PLoS ONE*, 10: e0140131.
- Petushkova, N., Zgoda, V., Pyatnitskiy, M., Larina, O., Teryaeva, N., Potapov, A., & Lisitsa, A. (2017). Post-translational modifications of FDA-approved plasma biomarkers in glioblastoma samples. *PLoS ONE* , 12, e0177427.
- Plociennikowska A, A. H.-J. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*, 72 (3), 557-581.
- Plociennikowska A., H.-J. A. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*, 72 (3), 557-581.
- Reid JM, S. D. (1997). Pharmacokinetics of 3- methyl-(triazen-1-yl)imidazole-4-carboximide following administration of temozolomide to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.*, 3:2393-2398.
- Rohle D, P.-M. J. (2013). An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*, 340(6132):626-30.
<https://doi.org/10.1126/science.1236062> adresinden alınmıştır
- Rothhammer T, P. I.-K. (2005). Bone Morphogenic Proteins Are Overexpressed in Malignant Melanoma and Promote Cell Invasion and Migration. *Cancer Res [Internet]*., 65(2):448–56.
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/2/448.long> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub med/15695386> adresinden alınmıştır
- Saraç, M. (2014). *Glioblastoma multiforme(GBM) 'de hücre öldürücü immunglobulin benzeri reseptör (kır) gen polimorfizminin değerlendirilmesi. (uzmanlık tezi)*. Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi.

- Sarkar C, J. A. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer* , 46(2):108-119.
- Sathornsumetee, S. R. (2008). Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1142; 108-132.
- Sathornsumetee, S., Rich, JN. (2007). Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* , 1142; 108-132.
- Sato M, K. K.-H. (2016). Clinical significance of gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cell maintenance. *Oncol Rep.*, 35: 391-397.
- Schuetz CS, B. M. (2006). Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.*, 66: 5278-5286.
- Seoane, J. (2014). Gremlins Sabotage the Mechanisms of Cancer Stem Cell Differentiation. . *Elsevier Inc.*, 25(6),716-717.
- Sezer, C. (2010). *Glioblastoma Multiforme'de Konkomitant ve Adjuvant Temozolomid'in Prognoz ve Sağkalıma etkisi (Uzmanlık Tezi)* . Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı.
- Shen W., H. J. (2013). Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. *Journal of International Medical Research*, 42(1), 164–172.
- Shinojima N, T. K. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Research* , 63(20):6962-70.
- Silantyev A.S., F. L. (2019). Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells* (s. 8, 863). içinde
- Silantyev A.S., F. L. (2019). Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*, 8, 863,.
- Silber JR, B. M. (2012). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, Aug 1;1826(1):7182.
- Singh, S., Fiorelli, R., Kupp, R., Rajan, S., Szeto, E., Lo Cascio, C., . . . al., e. (2016). Post-translational Modifications of OLIG2 Regulate Glioma Invasion through the TGF- β Pathway. *Cell Rep.* , 16, 950–96.
- Smerdel-Ramoya A, Z. S. (2011). Nephroblastoma overexpressed (Nov) induces gremlin in ST-2 stromal cell lines by posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biochem*, 112:715–722.
- SMITH, K. A. (2008). Prospective trial of gross-total resection with Gliadel wafers followed by early postoperative Gamma Knife radiosurgery and conformal fractionated

- radiotherapy as the initial treatment for patients with radiographically suspected, newly diagnosed glioblastomas. *Journal of Neurosurgery, Supplement*, 109:106-17.
- Sneddon JB, Z. H. (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 14842-14847.
- Sontheimer. (2008). H. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J. Neurochem.*, 105, 287–295.
- Spiro TP, L. L. (2001). Temozolomide: The effect of once- and twice-a-day dosing on tumor tissue levels of the DNA repair protein O(6)alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Clin Cancer Res.*, 7:2309-17.
- Stabile H, M. S. (2007). Bone morphogenetic protein antagonist Drg/gremlin is a novel proangiogenic factor. *Blood.*, 109:1834-1840.
- Stockhausen MT, K. K. (2010). The functional role of Notch signaling in human gliomas. *Neuro-Oncology*, 12(2):199-211. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop022> adresinden alınmıştır
- Stupp, R. H. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 10;25(26):4127-36.
- Stupp, R. M. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10):987-96.
- Swartling, F. (2012). Myc proteins in brain tumor development and maintenance. *Ups. J. Med. Sci.*, 117, 122–131.
- Tabouret E., C. O.-X. (2014). Predictive biomarkers investigated in glioblastoma. *Expert Rev. Mol. Diagn*, 14(7), 883–893.
- Taioli E, R. C. (2009, Dec). Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. *BMC cancer*, 9(1):354.
- Taşpınar, M. (2010). *Primer glioblastoma multiforme tümör hücrelerinde lomeguatrib temozolomid kombinasyonunun mgmt metilasyonu ve ekspresyonu üzerine etkisi. (doktora tezi)*. Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Topol LZ, B. B. (2000). Biosynthesis, Post-translation Modification, and Functional Characterization of Drg / Gremlin*. *J Biol Chem [Internet]*, 275(12):8785–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.12.8785> adresinden alınmıştır
- Van Landeghem, F. K.-H. (2009). "Postmortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles". *Biomater*, 30 (1): 52–57.

- Van Meir EG, H. C. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*, 60: 166–193.
- Van Nifterik KA, V. D. (2010, Jun). Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolamide. *British journal of cancer.*, 103(1):29.
- van Vuurden DG, H. E. (2011). PARP inhibition sensitizes childhood high grade glioma, medulloblastoma and ependymoma to radiation . *Oncotarget*, 2(12):984-96.
- Verdecchia A, D. A. (2002). Estimation and projections of cancer prevalence from cancer registry data. *Stat Med* , 21: 3511-26.
- Wang DJ, Z. X. (2012). The bone morphogenetic protein antagonist gremlin is overexpressed in human malignant mesothelioma. *Oncol Rep.*, 27: 58-64.
- Wang H., P. R. (2018). Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: The advantage and disadvantage. *Clin. Epigenet*, 10, 59.
- Wang RN, G. J. (2014). Bone morphogenetic protein (bmp) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.*, 1: 87-105.
- Westermarck, B. (2012). Glioblastoma—A moving target. *Ups. J. Med. Sci.*, 117, 251–256.
- Winters JL, W. D. (2001). Congenital glioblastoma multiforme: a report of three casus and a review of the literature. . *J Neurol Sci*, 1: 13-9.
- Won E.K., Z. M. (2003). Analysis of the antitumoral mechanisms of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme. *Anti-Cancer Drugs*, 14:457–466.
- Wordinger RJ, Z. G. (2008). Focus on Molecules: Gremlin. *Exp Eye Res.*, 87(2):78–9.
- Yamasaki Y., I. S. (2018). Expression of gremlin1 in gastric cancer and its clinical significance. . *Medical Oncology* , 35:30.
- Yan K, W. Q. (2014). Glioma cancer stem cells secrete gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy. . *Genes Dev.* , 28: 1085-1100.
- Yap K.S., Z. Z. (2018). In vitro treatment of lipopolysaccharide increases invasion of *Pasteurella multocida* serotype B:2 into bovine aortic endothelial cells. *Journal of Veterinary Science*, 19(2)207-215.
- Yin M ., T. M. (2017). Gremlin-1 is a key regulator of the invasive cell phenotype in mesothelioma. *Oncotarget*, 8(58): 98280-98297.
- Zhang C, M. L. (2013). IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma . *Neuro Oncol* , 15(9):1114-26.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/not087> adresinden alınmıştır

Zhang J, S. M. (2012). Temozolomide: Mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*, 5:102-14.



ÖZGEÇMİŞ

13.03.1990 tarihinde Tekirdağ'da doğdu. İlk ve ortaokulu Tekirdağ Fevzi Çakmak İlkokulu'nda, liseyi Tekirdağ Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2013 yılında lisans eğitimini tamamlayarak mezun oldu. 2017 yılında Namık Kemal Üniversite Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

