



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTI-TÜMÖRAL ÖZELLİKLERİNİN
GLİOBLASTOM KÖK HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Gülçin TEZCAN

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2014



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTI-TÜMÖRAL ÖZELLİKLERİNİN
GLİOBLASTOM KÖK HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Gülçin TEZCAN

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Berrin TUNCA

Bursa-2014

Bu tez, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından UAP(T)-2012/2, OUAP(T)-2012/17, HDP(T)-2012/6, HDP(T)-2012/7, HDP(T) 2013/3 ve HDP(T) 2014/39 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Gülçin TEZCAN tarafından hazırlanan “Bitki Özütlelerinin Anti-tümöral Özelliklerinin Glioblastom Kök Hücrelerinde Araştırılması” konulu Doktora tezi 12/12/2014 günü, 11:00-13:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof.Dr. Berrin TUNCA	
Üye	Prof.Dr. Ünal EGELİ	
Üye	Prof.Dr. Ahmet BEKAR	
Üye	Prof.Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ	
Üye	Doç.Dr. Gülşah ÇEÇENER	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Metin PETEK

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	VI
İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. GBM'in Oluşumu, Toplumdaki İnsidansı ve Klasik Tedavi Yaklaşımı.....	3
2.2.GBM Oluşumunda Rol Oynayan Genetik ve Epigenetik Faktörler.....	4
2.2.1. Genetik Faktörler.....	4
2.2.1.1.GBM Oluşumunda <i>EGFR / RAS / NF1 / PTEN / PI3K</i> Sinyal Yolağının Etkisi.....	6
2.2.1.2.GBM Oluşumunda <i>TP53 /MDM2/MDM4/ p14ARF</i> Sinyal Yolağının Etkisi.....	8
2.2.1.3.GBM Oluşumunda <i>p16INK4a/CDK4/RB1</i> Sinyal Yolağının Etkisi.....	8
2.2.1.4.GBM Oluşumunda <i>IDH1</i> Mutasyonlarının Rolü.....	9
2.2.1.5.GBM Oluşumunda Heterozigotluğun Kaybı.....	10
2.2.2. Epigenetik Faktörler.....	11
2.2.2.1.DNA Metilasyonu.....	12
2.2.2.1.1. <i>MGMT</i> Geni Promotör Bölgesi Metilasyonu.....	13
2.2.2.1.2. Metilasyonun Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler.....	14
2.2.2.2.mikroRNA'lar.....	15
2.2.2.2.1. miRNA'ların Biyogenezi.....	16
2.2.2.2.2. mikroRNA'ların Görevleri.....	17
2.2.2.2.3. Kanser Oluşumunda miRNA'ların Rolü.....	18
2.2.2.2.3.1.GBM Patogenezinde Rol Oynadığı Belirlenen miRNA'lar.....	19
2.2.2.2.3.1.1. GBM'de Ekspresyonu Artan miRNA'lar.....	20
2.2.2.2.3.1.2. GBM'de Ekspresyonu Azalan miRNA'lar.....	23
2.2.2.2.3.2.miRNA'ların Kanser Progresyonunda Değerlendirilme Yöntemleri.....	25
2.2.2.2.3.2.1. Kantitatif Real Time PCR (RT-qPCR) Tekniğinden Yararlanılarak miRNA Ekspresyon Analizi.....	26
2.2.2.2.3.2.2. Web Tabanlı miRNA Kütüphaneleri.....	30
2.3.Kanser Gelişiminde Kanser Kök Hücrelerinin Önemi.....	33
2.3.1. GBM Kök Hücreleri.....	37

2.3.1.1.GSC Progresyonunda miRNA'ların Rolü.....	40
2.3.1.2.GSC'lerin GBM Hücre Süspansiyonundan Ayırımında Manyetik Ayırım Yöntemi.....	41
2.4.Terapötik Özellikli Bitkiler.....	41
2.4.1. <i>Viscum album</i> (Ökse otu).....	43
2.4.2. <i>Vitis vinifera</i> (üzüm).....	44
2.4.3. <i>Olea europaea</i> (Zeytin).....	46
2.4.4. <i>Ficus carica</i> (incir).....	48
2.4.5. Bitki Özütlерinin Etken Maddelerinin Belirlenmesine Yönelik Yöntemler.....	49
2.4.5.1.Kütle Spektrometresi (MS).....	49
2.4.5.2.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC/DAD).....	49
2.4.6. Bitki Özütlерinin, Tümör Hücrelerinin Canlılığı Ve Çoğalabilme Yetenekleri Üzerindeki Etkisini Ölçmeye Yönelik Testler.....	50
2.4.6.1.İn-vitro Yöntemler.....	54
2.4.6.1.1. WST-1 Analizi.....	55
2.4.6.1.2. Anneksin V Analizi.....	56
2.4.6.1.3. TUNEL Analizi.....	57
2.4.6.2.Ex-vivo Yöntemler.....	58
2.4.6.2.1. Tavuk Korioallantoik Zar (CAM) analizi.....	58
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	60
3.1. Gereç.....	60
3.1.1. Kullanılan Aletler.....	60
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	61
3.2.Yöntem.....	63
3.2.1. Tez Projesinde Değerlendirilecek Bitki Özütlерinin Hazırlanması.....	63
3.2.1.1. <i>Viscum album</i> (ökse otu) Özütlünün (VA) Hazırlanması.....	63
3.2.1.2. <i>Vitis vinifera</i> (üzüm) Çekirdeği Özütlünün (GSE) Hazırlanması.....	63
3.2.1.3. <i>Olea europaea</i> (zeytin) Yaprağı Özütlünün (OLE) Hazırlanması.....	64
3.2.1.4. <i>Ficus carica</i> (incir) Sütünün (FCL) Hazırlanması.....	64
3.2.2. Tez Projesinde Değerlendirilecek Bitki Özütlерinin İçeriklerinin Belirlenmesi.....	65
3.2.2.1.LC/MS.....	65
3.2.2.2.HPLC/DAD.....	65

3.2.3. İn-vitro Analizler.....	66
3.2.3.1. Tez Projesinde Değerlendirilecek Bitki Özütlerinin ve TMZ'nin Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Hatlarında Denenmesi.....	66
3.2.3.1.1. Hücre Kültür Koşulları.....	66
3.2.3.1.2. Uygulanan Dozlar.....	67
3.2.3.1.2.1. WST-1.....	67
3.2.3.1.2.2. Lenfosit Hücrelerinde Hücre Canlılığı Analizi.....	70
3.2.3.1.2.2.1. Lenfosit İzolasyonu.....	70
3.2.3.1.2.2.2. Tripan Mavis Testi.....	71
3.2.3.2. Bitki Özütlerinin Hangi Yolla Anti-Proliferatif Etki Gösterdiğinin Araştırılması.....	71
3.2.3.2.1. Annexin V Analizi.....	71
3.2.3.2.2. TUNEL Analizi.....	72
3.2.3.3. Hücre Hatlarında Etkili Olduğu Belirlenen Bitki Özütlerinin Primer Tümörlerde Etkilerinin İncelenmesi.....	73
3.2.3.3.1. Hasta Grubu ve Klinik Özellikler.....	73
3.2.3.3.2. Primer Hücre Kültürü.....	74
3.2.3.3.3. Primer Tümörlerin Kök Hücre İçerip İçermediğinin Belirlenmesi.....	75
3.2.3.3.3.1. Magnetik Ayrım.....	75
3.2.3.3.3.2. Akım Sitometrik Analizler.....	76
3.2.3.3.3.2.1. CD133 Pozitifliğinin Kontrolü.....	76
3.2.3.3.3.2.2. Nestin Pozitifliğinin Kontrolü.....	76
3.2.3.3.3.3. Gen Ekspresyon Analizleri.....	77
3.2.3.3.3.3.1. RNA İzolasyonu.....	77
3.2.3.3.3.3.2. cDNA Sentezi.....	77
3.2.3.3.3.3.3. Ekspresyon Analizi.....	78
3.2.3.3.3.4. Primer Tümörlerin MGMT Metilasyonu Açısından Değerlendirilmesi.....	79
3.2.3.3.3.4.1. DNA İzolasyonu.....	79
3.2.3.3.3.4.2. MGMT Metilasyon Analizi.....	80
3.2.3.3.3.5. Kanser Kök Hücrelerde Uygun Bitki Özütü Dozlarının Denenmesi.....	82
3.2.3.3.3.6. Bitki Özütlerinin miRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkilerinin Araştırılması.....	82
3.2.3.3.3.6.1. RNA İzolasyonu.....	82
3.2.3.3.3.6.2. cDNA Sentezi.....	83

3.2.3.3.3.6.3. Ekspresyon Analizi.....	83
3.2.3.3.3.6.3.1.Superarray Yöntemi.....	83
3.2.3.3.3.6.3.2.Single Assay Yöntemi.....	85
3.2.3.3.3.7.miRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi.....	86
3.2.3.3.3.7.1. RT-PCR Reaksiyonu İle Hedef Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	87
3.2.3.3.3.7.2. Western-Blot Analizi.....	87
3.2.4. Ex-Vivo Analizler.....	90
3.2.4.1. CAM Analizi.....	90
3.2.4.1.1. VEGFA Ekspresyon Analizi.....	91
3.2.5. İstatistiksel Yöntem.....	91
4. BULGULAR.....	93
4.1.Bitkisel Özütlerin T98G, U-138MG ve U87MG GBM Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkileri.....	93
4.1.1. VA.....	93
4.1.1.1.VA'nın GBM Hücre Hatlarında Sitotoksik Aktivitesi.....	93
4.1.2. GSE.....	96
4.1.2.1.GSE'nin Yapısında Bulunan Etken Maddeler.....	96
4.1.2.2.GSE'nin GBM Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Aktivitesi.....	97
4.1.2.3.GSE'nin GBM Hücre Hatlarında Hücre Ölüm Yolakları Üzerindeki Etkisi.....	100
4.1.2.4.GSE'nin T98G Hücrelerinde İnvazyon Üzerindeki Etkisi.....	101
4.1.3. OLE.....	106
4.1.3.1.OLE'nin Yapısında Bulunan Etken Maddeler.....	106
4.1.3.2.OLE'nin GBM Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Aktivitesi.....	107
4.1.3.3.OLE'nin GBM Hücre Hatlarında Hücre Ölüm Yolakları Üzerindeki Etkisi.....	109
4.1.3.4.OLE'nin T98G Hücrelerinde İnvazyon Üzerindeki Etkisi.....	111
4.1.3.5.OLE'nin GBM Hücre Hatlarında TMZ İle Kombine Etkisi.....	115
4.1.3.5.1. TMZ'nin GBM Hücre Hatlarında Sitotoksik Olarak Etkin Dozunun Belirlenmesi.....	115
4.1.3.5.2. OLE'nin TMZ İle Kombine Etkisi.....	117
4.1.3.6.OLE'nin T98G Hücrelerinde miRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	120
4.1.3.7.miR-181b, miR-145, miR-153, miR-137 ve Let-7d'nin Hedef Genleri.....	121

4.1.4. FCL.....	122
4.1.4.1.FCL'nin Yapısında Bulunan Etken Maddeler.....	122
4.1.4.2.FCL'nin GBM Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Aktivitesi.....	123
4.1.4.3.FCL'nin GBM Hücre Hatlarında Hücre Ölüm Yolakları Üzerindeki Etkisi.....	127
4.1.4.4.FCL'nin T98G Hücrelerinde İnvazyon Üzerindeki Etkisi.....	128
4.1.4.5.FCL'nin GBM Hücre Hatlarında TMZ ile Kombine Etkisi.....	132
4.1.4.6.FCL'nin T98G Hücrelerinde miRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	135
4.1.4.7.Let-7d'nin Hedef Genleri.....	137
4.2.Bitkisel Özütlerin Glioblastoma Kanser Kök Hücreleri (GSC) Üzerindeki Sitotoksik Etkileri.....	138
4.2.1. Hasta Grubu.....	138
4.2.2. GSC İzolasyonu ve Validasyonu.....	138
4.2.2.1.GCS (+)'liğinin Sağkalım Üzerine Etkisi.....	142
4.2.3. <i>MGMT</i> Metilasyonu.....	143
4.2.4. OLE'nin GSC (+) Tümörler Üzerindeki Etkisi.....	144
4.2.4.1.OLE'nin GSC (+) Tümörlerde miRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi...144	
4.2.4.1.1. miRNA'ların Hedef Genlerinin Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	149
4.2.4.2.OLE'nin GSC (+) Tümörlerde p53 Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi.....	149
4.2.4.3.OLE'nin GSC (+) Tümörlerde İnvazyon Üzerindeki Etkisi.....	151
4.2.5. FCL'nin GSC (+) Tümörler Üzerindeki Etkisi.....	155
4.2.5.1.FCL'nin GSC (+) Tümörlerde miRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi...155	
4.2.5.2.FCL'nin GSC (+) Tümörlerde p53 ve p38MAPK Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi.....	157
4.2.5.3.FCL'nin GSC (+) Tümörlerde İnvazyon Üzerindeki Etkisi.....	159
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	164
KAYNAKLAR.....	183
TEŞEKKÜR.....	226
ÖZGEÇMİŞ.....	227

ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM) yetişkinlerde en yaygın görülen, agresif özellikli bir beyin tümörüdür. GBM hastalarının tanı sonrası ortalama yaşam süresi 1 yıldan azdır. GBM tümörlerinin yapısında kanser kök hücrelerinin varlığı, hastaların uygulanan tedavilere direnç göstermesine ve tümörün nüksetmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle GBM tedavisi için daha etkin yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde pek çok kanser türü için tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında terapötik bitkilerden sıklıkla yararlanılmaktadır.

Gerçekleştirilen çalışmada, *Viscum album* (ökse otu) özütü (VA), *Vitis vinifera* (üzüm) çekirdeği özütü (GSE), *Olea europaea* (zeytin) yaprağı özütü (OLE) ve *Ficus carica* (incir) sütü (FCL)'nin üç GBM hücre hattındaki ve GBM kök hücre (GSC) (+) primer tümör hücrelerindeki anti-kanser etkisinin hücre proliferasyonu, invazyonu ve ölümü açısından araştırılarak bu özütlerin GBM'de moleküler etki mekanizmasının açıklanabilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen verilere göre, VA'nın hücre canlılığında yol açtığı değişimin doza bağlı olarak artan ya da azalan bir değişim olmadığı belirlenmiştir. GSE'nin ise ex-vivo koşullarda tümör invazyonunu arttırıcı yönde etki gösterdiği ortaya konmuştur. OLE'nin apoptoz ve nekroz yoluyla GBM hücre hatlarında hücre ölümüne yol açtığı ve miR-137, miR-145 ve miR-153 ekspresyonlarını etkileyerek GSC (+) tümörlerde temozolomid (TMZ)'in etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. FCL'nin ise let-7d ekspresyonunu düzenleyerek GBM hücre hatlarında invazyonun kontrolünde rol oynadığı, GSC (+) hücrelerde ise TMZ direncinin azalmasına yol açtığı gözlenmiştir.

Mevcut çalışma, OLE'nin miRNA regülasyonu yoluyla GSC(+) hücrelerde pluripotentliği azalttığını ortaya koyan ilk çalışmadır. Ayrıca, gerçekleştirilen çalışmada FCL'nin GBM hücre hatlarındaki anti-invazif etkisi ve GSC (+) hücrelerde TMZ direncini azaltıcı etkisi ilk kez gösterilmiştir. İleri araştırmalar gerekmele birlikte, mevcut bulgular OLE ve FCL'nin GBM tedavisi ile ilgili ilaç araştırmaları için potansiyel birer aday özüt olabileceklerini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: GBM, *Viscum album* (ökse otu), *Vitis vinifera* (üzüm) çekirdeği özütü, *Olea europaea* (zeytin) yaprağı özütü, *Ficus carica* (incir) sütü, miRNA, ilaç direnci

SUMMARY

Investigation of Anti-Tumoral Properties of Plant Extracts in Glioblastoma Stem Cells

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and lethal form of brain tumors. Overall survival time of GBM patients is less than 1 year. The presence of cancer stem cells in GBM tumors (GSC) causes recurrence and drug resistance of these patients. Thus, there is an increasing need for the development of more efficient therapeutic approaches. Induction of tumor cell death by medicinal herbs has become a new frontier for cancer therapy research.

The aims of the current study were to evaluate the anticancer effect of *Viscum album* (VA), *Vitis vinifera* seed extract (GSE), *Olea europaea* leaf extract (OLE) and *Ficus carica* latex (FCL) on three individual GBM cell lines, and GSCs in the aspects of cell proliferation, invasion and death at molecular level. According to obtained data, a dose dependent anti-cancer effect of VA wasn't determined. GSE increased angiogenesis in ex-vivo analysis. OLE caused apoptosis and necrosis in the GBM cell lines and increased the temozolomide (TMZ) response of GSC (+) tumors via regulation of mir-137, miR-145 and miR-153. In addition, FCL relieved invasion on GBM cells by modulating let-7d expression and reduced TMZ resistance in GSC (+) tumors.

This is the first study to indicate that OLE may interfere with the pluripotency of GSC by modulating miRNA expression and the anti-invasive effect of FCL in GBM cell lines and drug resistance modulating ability in GSC (+) tumors. Further studies are required, but we suggest that OLE and FCL may have potentials for advanced therapeutic cancer drug studies in GBM.

Key words: GBM, *Viscum album* (mistletoe), *Vitis vinifera* (grape) seed extract, *Olea europaea* (olive) leaf extract, *Ficus carica* (fig) latex, miRNA, drug resistance

1. GİRİŞ

Beyin tümörleri Türkiye’de en sık gözlenen 10 malignansi içerisinde yer almaktadır (1). Glioblastoma (GBM), grade IV astrositoma olarak tanımlanan, nekroz ve vasküler çoğalma ile karakterize olan ve yetişkinlerde en yaygın görülen primer beyin tümörüdür (2). GBM hastalarında tanı sonrası ortalama yaşam süresi 12 – 15 ayla sınırlı durumdadır (3). Uygulanan cerrahi teknikler, adjuvan radyoterapi ve kemoterapi ile ilgili son 30 yıl içerisinde kaydedilen tüm gelişmelere rağmen, hastaların tedaviye yanıtının iyileşmesi ile ilgili çok az ilerleme kaydedilmiştir (4 – 7). Bu nedenle bu hastalığın tedavisi önemli bir sorun olmaya devam etmektedir.

GBM tümörleri heterojen bir yapıda olup, bazı GBM tümörleri, diğerlerinden daha küçük bir popülasyona sahip, tümör oluşumunu başlatan hücreler oldukları bilinen beyin tümörü kök hücrelerini içermektedirler (7 – 10). Beyin tümörlerinin ortaya çıkış ve yayılımında, kanser kök hücreler etkili olmaktadır (11 – 17). Bu nedenle, GBM kök hücrelerinin (GSC) ortadan kaldırılması ya da kontrol altına alınması, saptanan tümörün öldürülmesinde ve nüksetmeyi önlemede başarıyı arttıracaktır. Günümüzde uygulanan standart GBM tedavisi öncelikli olarak kök hücre özelliği göstermeyen tümör hücrelerini öldürmekte ve GSC’ler üzerine de çok az etki göstermektedir (16, 18). Bu nedenle, GSC’leri hedef alan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi GBM tedavisi için önem taşımaktadır.

Birçok kanser türünde olduğu gibi, GBM tedavisinde de, kemoterapötik ilaçların kullanılması hastalığın seyrini hafifletebildiği gibi, bazı durumlarda tümör üzerinde etkisiz kalabilmekte veya hastalar üzerinde farklı yan etkilere sebep olabilmektedir. Bu nedenle, pek çok kanser türü için tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında bitkilerden de sıklıkla yararlanılmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda vinblastine, vincristin, camptotetecin türevleri, topotecan, irinotecan, etoposide ve pacitaxel gibi bitkisel kökenli terapötik ajanlar geliştirilmiş ve tedavi prosedürlerinde uygulanmaya başlanmıştır (19). Ayrıca, bazı terapötik özelliği belirlenen bitkilerin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımının, kemoterapötik ajanın etkin dozunu düşürürerek, yol açabileceği yan etkilerin azalmasını sağladığını ifade eden çalışmalar mevcuttur (20).

Türkiye 9000’in üzerinde bitki türü ile dünyanın en zengin florasına sahip ülkelerden biridir (21). Bu bitkilerin birçoğu terapötik özellikler taşımaktadır (22). Bu durum kanser tedavisinde söz konusu bitkilerin de kemoterapötik ajanlar olarak veya kemoterapötik ajanlara yardımcı maddeler olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu bitkilerin birçoğunun henüz

tıbbi önemi ispatlanmamış olmasına rağmen halk arasında çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar (22).

Gerçekleştirilen çalışmada, *Viscum album* (ökse otu), *Vitis vinifera* (üzüm) çekirdeği ve *Olea europaea* (zeytin) yaprağı özütleri ile *Ficus carica* (incir) sütü'nün Temozolomid (TMZ) dirençliliği açısından farklılık gösteren üç GBM hücre hattında ve GBM kök hücrelerindeki anti-kanserojen etkileri ve bu etkilerin moleküler mekanizmasının in vitro ve ex vivo yöntemlerden yararlanılarak araştırılması ve ilaç araştırılma potansiyellerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GBM'in Oluşumu, Toplumdaki İnsidansı ve Klasik Tedavi Yaklaşımı

Merkezi sinir sistemi tümörleri, lenfomalar ve nöroblastomdan sonra en sık görülen dördüncü solid tümörlerdir. Bu tümörler arasında en yaygın olarak görülenler gliomalardır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) gliomaları, mitoz, hücresel ve nükleer atipi, ve vasküler çoğalma ve pseudopalisading nekroz gibi patolojik özelliklerden yararlanarak 4 farklı evrede sınıflandırmaktadır (23, 24). Baskın astrositik farklılaşma ile karakterize, tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %12-15'ini ve astrositik tümörlerin % 60-75'ini oluşturan 4. evre olarak sınıflandırılan Glioblastoma multiforme (GBM) tümörleri gliomaların en malign tipi olarak tanımlanmaktadır (25). Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık 51.000 primer beyin tümörü tanısı konulmaktadır. Bu tümörlerin %36'sını gliomalar oluşturmakta olup, teşhis edilen gliomaların %50'si GBM'dir (2). Türkiye'de ise kesin bir rakam verilememekle birlikte oranın benzer olduğu sanılmaktadır (26).

Yüksek evreli gliomaların tedavisinde kullanılan standart yöntem tümörün cerrahi olarak uzaklaştırılması, radyasyon tedavisi (radyoterapi) ve kemoterapidir (27). Ancak, GBM tümörleri beyin dokusuna infiltrasyon gösterdiğinden cerrahi operasyon sırasında görülen tümörün tamamı cerrahi mikroskop yardımı ile çıkartılsa bile belirlenemeyen tümör hücreleri beyin dokusu içerisinde kalabilmektedir (28). Bu nedenle GBM tedavisinde istenilen başarıya henüz ulaşılamamıştır. Bu hastalarda, çoğunlukla ameliyattan sonra beyin dokusunda kalan tümör hücrelerinin tedavisi için radyoterapi kullanılmaktadır (28). Ancak, radyoterapi gören GBM hastalarının genel sağkalım süreleri ortalama 12 aydır. Bu sağkalım süresinin carmustin polifeprosan ile gerçekleştirilen lokal kemoterapi ile 13.9 aya kadar uzatılabildiği ortaya konulmuştur (27). Son dönemde radyasyon tedavisi ile birlikte günlük Temozlomid (TMZ) kullanan hastaların, tek başına radyasyon tedavisi gören hastalara göre ortalama sağ kalım oranında %10-%26 oranında artış olduğu belirtilmektedir (29). Bununla birlikte, GBM tedavisi ile ilgili tüm ileri araştırmalara rağmen, halen 36 ay ve üzerinde sağ kalım gösteren hastalar uzun sağ kalımlı olarak nitelendirilmektedir (30). Günümüzde GBM tedavisine yönelik araştırmalar devam etmekle birlikte tümör dokularının karşılaştırmalı genetik taramaları ve ilişkili sinyal yollarının belirlenmesi sonucu, moleküler tabanlı tedavi protokolleri oluşturulmaya başlanmıştır (31).

2.2.GBM Oluşumunda Rol Oynayan Genetik ve Epigenetik Faktörler

GBM oluşumunda, *EGFR / RAS / NF1 / PTEN / PI3K, TP53 /MDM2/MDM4/ p14ARF* ve *p16INK4a /CDK4 / RB1* gibi sinyal yolları, *IDH1* mutasyonları, heterozigotluğun kaybı gibi genetik faktörler ve gen metilasyonları ve mikroRNA (miRNA) ekspresyonlarının düzenlenmesinde değişimler gibi epigenetik faktörler rol oynamaktadır.

2.2.1.Genetik Faktörler

Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler kanser gelişiminde anahtar rol oynarlar. Bu genler sağlıklı hücrelerde hücre büyümesinde ve çoğalmasında görev alan proteinlerin sentezinde iş görürler. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine yol açarlar (32).

Tümör baskılayıcı genler genellikle hücre çoğalmasını baskılayıcı yönde işlev gören proteinleri kodlarlar. Tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler beş geniş sınıfta toplanabilmektedir (32).

Bu proteinler;

- Hücre döngüsünü düzenleyen veya spesifik bir evrede durdurabilen intrasellüler proteinler,
- Hücre döngüsünü durdurmakta iş gören hormon reseptörleri,
- DNA'da bir hasar ya da kromozomal bir anomali durumunda hücre döngüsünü durduran hücre döngüsü kontrol proteinleri,
- Apoptozisi tetikleyen proteinler,
- DNA tamirinde işlev gören enzimlerdir.

Bu genlerin inaktifleştirici mutasyonlar ya da metilasyon yoluyla susturulması birçok kanser türünün gelişmesine yol açabilmektedir (32).

Hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için aldıkları iletileri, hücre zarından başlamak üzere çekirdeğe kadar sürdürdükleri sinyal ileti mekanizmasında işlev gören birçok proteinin ekspresyonundan sorumlu olan genlere proto-onkogen denir. Hücrelerin normal

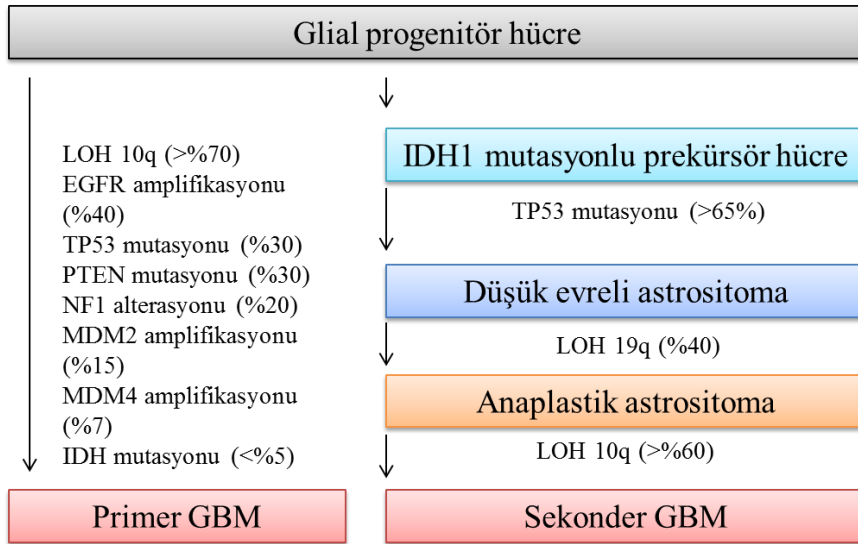
büyüme ve farklılaşmasını destekleyen genler olan proto-onkogenler herhangi bir nedenle mutasyona uğradıklarında onkogenlere dönüşürler. Onkogenler hücrelerin kanserleşmesine neden olurlar (32). Proto-onkogenler 3 farklı mekanizma ile onkogenlere dönüşebilmektedir. Bunlar;

- Proto-onkogenlerden kodlanan proteinlere etki eden nokta mutasyonları,
- Proto-onkogenin ya da proto-onkogeni içeren gen segmentinin amplifikasyonu sonucu kodlanan proteinin aşırı ekspresyonu,
- Kromozomal translokasyon sonucu büyümeyi düzenleyici bir genin, farklı bir genin promotor bölgesinin kontrolüne geçmesi sonucu fonksiyon kazanarak anormal ekspresyonu'dur.

Gen amplifikasyonu sonucu oluşan onkogenlerin protein ürünleri ile ilişkili proto-onkogenin ürünü arasında farklılık bulunmamaktadır. Bu proteinlerin onkogenik etkisi normalden daha yüksek seviyede ekspresyon göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Ancak, fonksiyon kazanımı mutasyonları baskın karakterdedir. Bu nedenle proto-onkogenlerin iki allelinden birinin fonksiyon kazanımı mutasyonuna uğraması kanser oluşumu için yeterlidir (32).

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda GBM hastalarında çeşitli hücrel sinyal yolaklarda görev alan tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenlerde çeşitli genetik değişimler saptanmıştır. Bu değişimler GBM'in moleküler tiplendirilmesine, hastalığın doğru tanımlanması ve tümör dokusunun yapısı hakkında etkin ve güvenilir veriler elde edilmesine katkı sağlamaktadırlar (33, 34).

GBM tümörleri, mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı genlerine ve onkogenlerine göre primer ve sekonder olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadırlar (35, 36). Primer GBM tümörleri de novo olarak oluşmaktadır ve baskın karakterlidirler. Bu tümörlerde çoğunlukla epidermal büyüme faktörü (EGFR) sinyal yolağında *EGFR* geni amplifikasyonu ve tensin homolog tümör baskılayıcı geninde (*PTEN*) delesyon ya da mutasyon görülmektedir. Sekonder GBM ise düşük evreli tümörlerden türevlenmekte ve çoğunlukla p53 sinyal yolağında rol oynayan genlerde mutasyonlar belirlenmektedir. Bu tümörlerde *EGFR* amplifikasyonu ise nadiren görülmektedir (35 – 37). Ayrıca birçok primer ve sekonder GBM hastasında, Retinoblastoma 1 (*RBI*) ve İzositrat dehidrojenaz 1 (*IDH1*) genlerinde ve ilişkili sinyal yolaklarında mutasyonlar gözlenmekte, çeşitli kromozomal bölgelerde yer alan tümör baskılayıcı genlerde heterozigotinin kaybı (LOH) gözlenmektedir (Şekil-1).



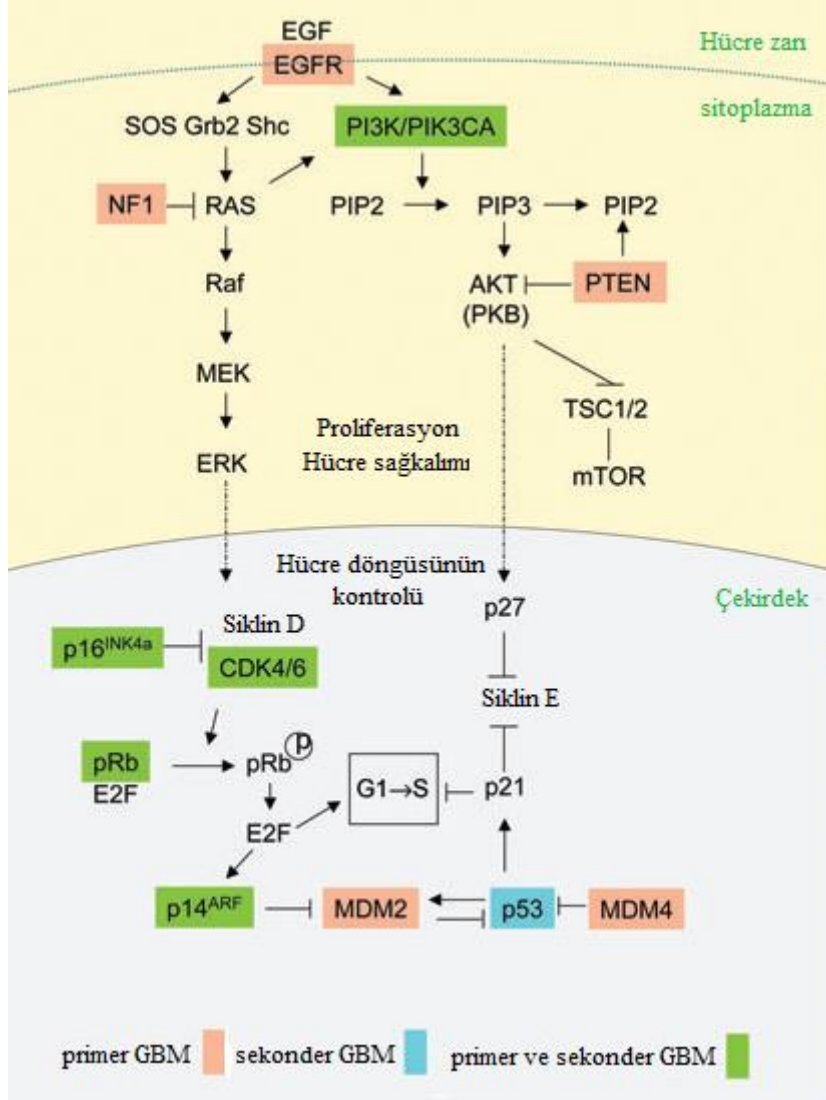
Şekil-1 Primer ve Sekonder GBM gelişiminde meydana gelen değişimler (36)

2.2.1.1. GBM Oluşumunda *EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K* Sinyal Yolağının Etkisi

EGFR, PDGFRA gibi büyüme faktörü reseptörleri, ilgili ligandın hücre dışındaki bölgesine bağlanarak aktifleşmekte, böylece, fosfotidil-3 kinaz (PI3K) kompleksi hücre zarına geçerek fosfotidilinositol-4,5- bifosfat (PIP2)'a bir fosfor eklemekte ve fosfotidilinositol-4,5-trifosfat (PIP3) oluşumunu sağlamaktadır. PIP3, AKT ve mTOR gibi molekülleri aktifleyerek hücre çoğalmasının artmasına ve apoptozisin baskılanmasına yol açmaktadır. *PTEN* geni tarafından kodlanan protein, PIP3 sinyal yolağını ve dolayısıyla hücre çoğalmasını baskılamaktadır (Şekil-2) (33). Ayrıca, *NF1* tümör baskılayıcı geni tarafından kodlanan neurofibromin, RAS'ın negatif düzenleyicisidir ve adenilat siklaz ve AKT-mTOR bağımlı yolakta da iş görmektedir (Şekil-2) (34).

EGFR amplifikasyonu primer GBM'lerin yaklaşık %40'ında görülürken bu değişime sekonder GBM'lerde oldukça nadir rastlanır (35, 36, 38). Yüksek *EGFR* ekspresyonu gözlenen primer GBM tümörlerinin %70-90'ında, bu gendeki yüksek ekspresyon seviyesi, amplifikasyon yoluyla gerçekleşmektedir (37, 39). Bununla birlikte birçok primer GBM hastasında *EGFR* amplifikasyonu çoğunlukla vIII varyantı (exon 7-9'un delesyonu) ile birlikte gözlenmektedir. *PTEN* geni, primer GBM hastalarının %15-40'ında mutasyona uğramakta iken sekonder GBM hastalarında *PTEN* mutasyonlarına sık rastlanmamaktadır (37, 38, 40). *PIK3CA* mutasyonları ve amplifikasyonu ise hem primer hem de sekonder GBM'de

oldukça nadir olarak gözlenmektedir (41). Primer GBM'lerin %63'ü ve sekonder GBM'lerin üçte biri *EGFR*, *PTEN* veya *PIK3CA* genlerinden en az birinde mutasyon taşımaktadırlar (Şekil-2) (41).



Şekil-2 Primer ve sekonder GBM tümörlerinde sıklıkla oluşan genetik mutasyonlar (36)

2.2.1.2. GBM Oluşumunda *TP53/MDM2/MDM4/p14ARF* Sinyal Yolağının Etkisi

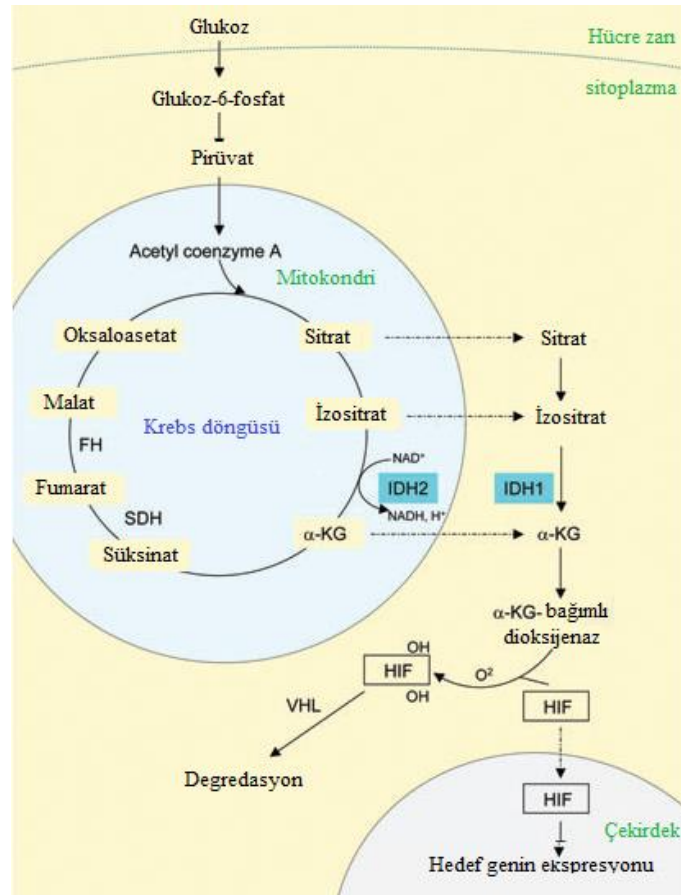
TP53 geni tarafından kodlanan p53 proteini, hücre döngüsü, DNA tamiri, hücre ölümü ve hücre farklılaşması gibi birçok hücrel süreçte rol oynamaktadır (42). DNA'da hasarlanma gerçekleştiğinde *TP53* aktifleşmekte ve *p21Waf1 / Cip1* genlerinin transkripsiyonunu indüklemektedir (43, 44). *TP53*'ün regülasyonu MDM2, MDM4 ve p14ARF tarafından sağlanmaktadır (45 – 48). MDM2 ve MDM4, *TP53*'e bağlanarak p53 proteininin degradasyonunu gerçekleştirerek (45, 46) *p14ARF* ise MDM2 bağımlı *TP53* parçalanmasını ve *TP53* sessizleşmesini baskılayarak *TP53* ekspresyonunu düzenlemektedirler (44, 47). Bundan dolayı, *TP53* fonksiyonunun kaybı *TP53*, *MDM2*, *MDM4* veya *p14ARF* genlerinden birisinde meydana gelen değişimden kaynaklanabilmektedir. *TP53* mutasyonları sekonder GBM'lerde yaklaşık %65 oranında gözlenirken primer GBM'lerde %25 gibi daha düşük sıklıkla gözlenmektedir (37, 38).

2.2.1.3. GBM Oluşumunda *p16INK4a/CDK4/RB1* Sinyal Yolağının Etkisi

RB1 proteini hücrenin G1 fazından S fazına geçişini kontrol etmekle görevlidir. CDK4/ siklin D1 kompleksi RB1 proteinini fosforilleyerek, E2F transkripsiyon faktörünün salınımına yol açmakta ve G1fazından S fazına geçişte rol oynayan genleri aktif hale getirmektedir (43). p16INK4a proteini ise CDK4'e bağlanarak, CDK4/siklin D1 kompleksini baskılamak ve hücrenin G1fazından S fazına geçişini durdurmakla görevlidir (Şekil 2). Bundan dolayı, RB1 genindeki fonksiyon kaybı p16INK4a, CDK4, veya RB1 proteinlerinden herhangi birinde ekspresyon değişimine neden olabilmektedir. Bunun yanısıra, *p16INK4a* geninin homozigot delesyonu, *CDK4* geni amplifikasyonu ve *RB1*'in kaybı GBM tümörlerinde önem taşımaktadır. Bu değişimler, primer GBM'lerde %50, sekonder GBM'lerde ise %40 oranında gözlenmektedirler (49).

2.2.1.4.GBM Oluşumunda *IDH1* Mutasyonlarının Rolü

IDH1 geni tarafından kodlanan IDH1 proteini izositrat'ın ketogluterata oksidatif karboksilasyonunu katalizleyerek NADPH üretimini sağlamaktadır (Şekil-3) (50, 51). Mitokondride yer alan diğer IDH proteinlerinin aksine IDH1 sitozolde yer almaktadır. IDH1 geni mutasyonları, ilgili enzimin substratına olan afinitesinin bozulmasına ve enzim aktivitesinde düşüğe yol açmaktadır (52). Hücre kültür ortamında mutant *IDH1*'in ekspresyonu gerçekleştirildiğinde α -ketoglutarat enzim ürününe azalmaya ve tümör büyümesini tetikleyen bir transkripsiyon faktörü olan Hipoksia tetikleyici faktör-1a (*HIF-1a*)'nın ekspresyon seviyesinde artışa yol açtığı belirlenmiştir (Şekil-3) (53). *IDH1* geni mutasyonları sekonder GBM'de yüksek sıklıkla (>%80) gözlenirken primer GBM'de nadiren görülmektedir (<%5).



Şekil-3 Krebs döngüsünde *IDH1*'in rolü (36)

2.2.1.5. GBM Oluşumunda Heterozigotluğun Kaybı

Somatik hücrelerde biri anne diğeri babadan gelmek üzere genom iki kopya halinde bulunmaktadır. İki kopyadan herbiri yaklaşık 3 milyon baz içermekte olup, bu 3 milyon bazın büyük bir çoğunluğu genomun her iki kopyasında benzerlik göstermektedir. Knudson'un iki vuruş hipotezine göre, bir tümör baskılayıcı genin iki allelinden birisinde bir nokta mutasyon gerçekleştiğinde, bu allel tümör baskılayıcı fonksiyonunu yitirmekte, ancak ikinci allel hala fonksiyon göstermeye devam ettiği için, hücre bu mutasyon açısından heterozigot duruma gelmekte ve kanser gelişimi gözlenmemektedir. Ancak, ikinci allelde de bir mutasyon gerçekleştiğinde, hücre heterozigotluğunu kaybetmekte ve tümör baskılayıcı gen işlevini tamamen kaybettiğinden, hücrede kanser gelişimi gözlenmektedir. Bu durum heterozigotluğun kaybı (LOH) olarak tanımlanmaktadır (54). GBM tümörlerinde sıklıkla LOH gözlenen kromozom bölgeleri aşağıda belirtilmektedir:

- 10. kromozom: Primer GBM'de en sık rastlanılan genetik değişimlerden birisi kromozom 10'da heterozigotinin kaybıdır, bu durum çoğunlukla 10p ya da 10q allellerinden birinin tamamının kaybı olarak gerçekleşmektedir (38, 55 – 58). 10. kromozomda en az 3 tane yaygın olarak delesyona uğrayan lokus bulunmaktadır, bu lokuslar 10p-14-15, 10q23-23 (*PTEN*) ve 10q25-qter'dir (55 – 57). Sekonder GBM hastalarında LOH 10p'de nadir olarak gözlenirken, bu değişim hastaların yaklaşık %70'inde 10q'da görülmektedir. Özellikle, 10q25-qter düşük evreli veya anaplastik astrositomadan yüksek evreli anaplastik GBM fenotipine geçişte yaygın olarak ortaya çıkmakta ve histolojik olarak ayırt edilebilmektedir (58).
- 13. kromozom: *RBI* lokusunu taşıyan 13q'nun kaybı primer GBM'lerin %12'sinde sekonder GBM'lerin ise %38'inde görülmektedir (59).
- 9. kromozom: Tümör baskılayıcı işlev gören bir reseptör protein tirozin fosfataz olan *PTPRD* geninin yer aldığı 9p23-24.1 bölgesi GBM tümörlerinde çoğunlukla değişime uğramaktadır. Hastaların %6'sında bu bölge delesyona uğrarken, %37'sinde metilasyon yoluyla sessizleştirilmiştir (60, 61).
- 22. kromozom: Primer GBM tümörlerinin %41'inde ve sekonder GBM'lerin %82'sinde ise 22q'da LOH görülmektedir (33). Primer GBM'de 22q12.3-13.2'de ve 22q13.31'de iki küçük bölge delesyonu saptanmıştır (33). Ayrıca sekonder GBM'lerde kromozom 22 ve kromozom 23'te doku inhibitörü metalloproteinaz-3 (*TIMP-3*)'ün yer aldığı bölgenin delesyona uğradığı ortaya konmuştur (62).

2.2.2. Epigenetik Faktörler

DNA dizisinde bir değişime yol açmadan gen ifadesini değiştirebilen, geri dönüşümlü ve kalıtsal kontrol mekanizmalarına epigenetik mekanizmalar denir (63 – 64). Aynı DNA'ya sahip olan organizmaların birbirinden farklı fenotipik özellikler göstermeleri epigenetik mekanizmalar ile açıklanabilmektedir. Beslenme ve çevresel faktörler epigenetik düzenlemenin düzeyini ve çeşidini etkileyerek çok sayıda hastalığa yol açabilirler (65). Bununla birlikte, gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi çok sayıda hastalığın ve kanserin temel sebebini oluşturabilmektedir (66, 67). Bu nedenle, DNA'nın epigenetik modifikasyonları kanserin erken tanısında, prognoz ve tedavide belirleyici olabilme potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca, bu değişimlerin geri dönüşümlü olması, bu değişimleri hedef alan terapötik ajanların ve tedavi yöntemlerinin araştırılmasına da olanak sağlamaktadır (68).

Bu güne kadar en iyi araştırılmış olan epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, kromatin yapısında değişime yol açan modifikasyonlar, imprinting kaybı ve protein kodlamayan RNAlardır (69). Gliomalar üzerinde yapılan araştırmalarda, *VHL*, *p16^{INK4a}*, *E-kaderin*, *hMLH1*, *BRCA1* ve *LKB1* tümör baskılayıcı genlerinin hastaların büyük bir çoğunluğunda hipermetilasyon yoluyla sesizleştii gözlenmiştir (70, 71). Ayrıca, tümör patogeneğinde, *p15^{INK4b}*, *p73*, *ER* ve DNA tamir genleri olan *MGMT*, *GSTP1*, *TIMP3* ve *DAPK1* gibi düzenleyici genlerin büyük bir kısmında da promotör hipermetilasyonu gözlenmektedir (72 – 74). Gliomalarda hipometilasyon, hipermetilasyon ya da histon modifikasyonu gibi epigenetik değişimlere uğrayan genler Tablo-1'de belirtilmektedir.

Tablo-1 Gliomalarda gözlenen epigenetik değişimler (75)

Hüresel yolak	Epigenetik değişime uğrayan genler
Ras sinyal yolağı	RASSF1A, RRP22, DIRAS3
Hücre göçü ve adherens	NECL1, E-kaderin, SLIT2, EMP3, TIMP3
Wnt sinyal yolağı	WIF1, FZD9, IGFBP-3, SFRP ailesi, PEG3
Tirozin kinaz yolağı	KIT, SYK, c-ROS
Transkripsiyon faktörleri	SOX2, KLF4, GATA6, ATOH1
Homeobox genler	HOXA9, HOXA10, HOXA11
Sonic hedgehog sinyalizasyonu	PTCH1, Cyclin D2, Plakoglobin, PAX6, NKX2.2
Notch sinyalizasyonu	NEURL1, HES1, HEY1
BMP gelişim yolağı	BMPR1B
Hipermutator yolak	hMLH1, hPMS2, MGMT, WRN
Apoptozis	TMS1, DAPK1, CASP8, DR4, DR5
TP53/ hücre döngüsü	HIC-1, CDKN2A, RB1, p16 ^{INK4a}
MikroRNA'lar	miR-124a, miR-21, miR-7, miR-137, miR-128

2.2.2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen, DNA dizisinde guaninden önce gelen bir sitozine bir metil grubunun bağlanmasına yol açan enzimatik bir modifikasyondur. DNA dizisinde guaninden önce sitozinin yerleşim gösterdiği bölgeler sıklıkla genlerin promotör bölgelerinde, CpG adası denilen bölgede yer almaktadırlar (69).

DNA dizisine metil gruplarının eklenmesi, baz çifti eşleşmelerini etkilememektedir. Fakat, metil grupları, daha çok DNA'nın büyük oluşuna yerleşmeye meğilli olduğundan DNA'nın biyofiziksel özelliklerinde değişikliğe yol açmakta ve DNA-protein etkileşimlerini etkilemektedir (75). Ökaryotlarda işlev gören DNA metilasyon enzimleri Dnmt3a, Dnma3b ve Dnmt1'dir. Dnmt3a ve Dnma3b, de nova reaksiyonları gerçekleştirmekte ve metillenmemiş DNA'yı substrat olarak kullanmaktadır. Dnmt1 ise, metile olan bir DNA kalıbının replikasyonu sonucunda oluşan yarımetillenmiş DNA kalıbını metillemekte işlev görmektedir. Bu enzim, kalıp DNA iplikçisinde var olan metilasyon paternini yeni ipliğe kopyalamaktadır. Bu nedenle DNA metilasyonu kalıtsaldır ve mitotik ve mayotik hücre bölünmeleriyle atasal hücreden yavru hücreye aktarılmaktadır.

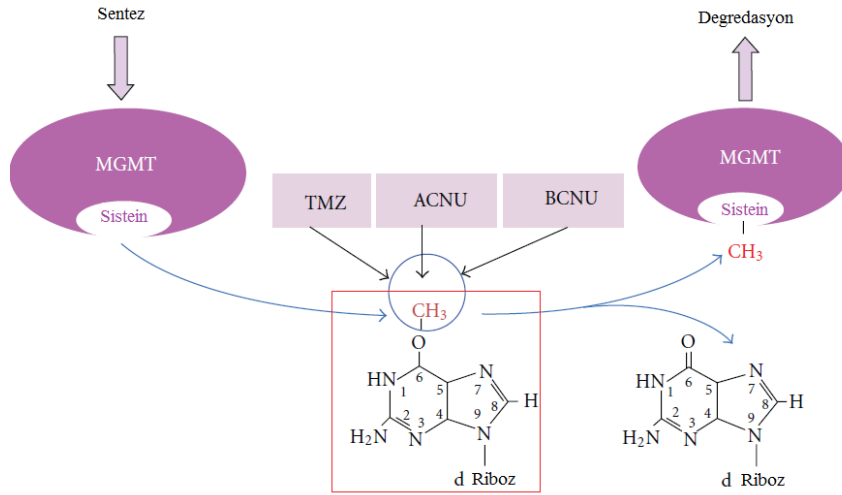
Genlerin yaklaşık %80'inin promotör bölgeleri fizyolojik koşullar altında metile olarak bulunmaktadır. Ancak, fonksiyonel bir proteinin kodlandığı bölgelerde metilasyonun azalması (hipometilasyon) görülmektedir. Bununla birlikte, hipometilasyon mRNA düzeyinde artışa yol açtığından, bazı kanser vakalarında da sıklıkla hipometilasyona rastlanılmaktadır (76). Hipometilasyon genel olarak tümör progresyonunu arttırmaktadır (77). Araştırmalar, hipometilasyonun birçok kanser türünde mitotik rekombinasyona, delesyona, translokasyonlara ve kromozomal yeniden düzenlemelere dolayısıyla da genomik instabiliteye yol açtığını ortaya koymuştur. Ayrıca, c-Jun, c-Myc ve c-Ha-Ras gibi protoonkogenlerin birçok tümör tipinde hipometilasyon yoluyla aktifleştiği gözlenmektedir (78).

Bir genin promotör bölgesinin aşırı metillenmesi (hipermetilasyonu) de, o genin transkripsiyonel olarak sessizleşmesine ve dolayısıyla ilişkili proteinin kaybına yol açmaktadır. Hipermetilasyon, X kromozomunun inaktifleşmesi, yaşlanma ve tekrarlayan DNA dizilerinin transkripsiyonel sessizleşmesi gibi normal fiziksel koşullarda gerçekleşmektedir (75). Bununla birlikte, birçok kanser vakasında da tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyon yoluyla sessizleştiği görülmektedir (79). Ayrıca, hücre döngüsü, DNA tamiri, angiogenez, karsinogenler, apoptozis ve hücre-hücre bağlantılarında gerçekleşen hipermetilasyon da karsinogeneze yol açabilmektedir (80).

2.2.2.1.1. *MGMT* Geni Promotör Bölgesi Metilasyonu

O6 Metilguanin-DNA metiltransferaz (*MGMT*), normal dokularda bulunan hücresel bir DNA tamir proteindir. *MGMT* geni, erken evreli gliomalarda dahi metilasyona bağlı olarak sessizleşebilmektedir. *MGMT* hipermetilasyon oranı tümörün histolojik tipine bağlı olarak yüksek evreli tümörlerde daha yüksektir (81). DNA'nın O6 pozisyonundan metillenmesi, O6-metilguaninin DNA replikasyonu sırasında timin ile yanlış eşleşmesi sonucu, guanin-sitozin (G:C) çiftlerinin adenin-timin'e (A:T) dönüşmesine yol açan ve tümör oluşumun ilk basamaklarında gerçekleşen bir olaydır. *MGMT* geni tarafından kodlanan protein, DNA'nın O6 pozisyonundaki alkil grubunu kendi üzerindeki aktif bir sisteme transfer ederek hücreleri bu değişimden korumaktadır (82) (Şekil-4). *MGMT*'nin sessizleştiği kanser hücreleri *TP53*, *K-ras* gibi genlerde yeni transisyon nokta mutasyonu bölgeleri oluşturarak mutator bir fenotip kazanmaktadır (83). *MGMT* hipermetilasyonu çoğunlukla *TP53*

mutasyonları ile ilişkili olarak sekonder GBM’lerde görülmektedir. Bu mutasyonların hemen hemen tamamı G: C → A: T transisyonu şeklindedir ve CpG adasında bulunmaktadır (84).



Şekil-4 MGMT metilasyonunun alkali ajanlar üzerindeki etkisi (75)

GBM tedavisinde kullanılan Temozolomid (TMZ), Nimustin (ACNU) veya Karmustin (BCNU) gibi alkali ajanlar, hücrede G:C→A:T transisyonuna yol açmaktadırlar (82). *MGMT* promotör bölge metilasyonu sonucu genin sessizleşmesi ise, DNA tamir mekanizmasının alkali kemoterapötik ajanlara karşı olan etkinliğin azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle *MGMT* ekspresyonu ya da aktivitesi gösteren hastaların alkilleyici ajan kemoterapisinden yarar sağlayamadıkları bilinmektedir (84, 85). Bundan dolayı, *MGMT* promotör bölge metilasyonu durumunun saptanması, yeni tanı almış GBM hastalarının TMZ, ACNU veya BCNU gibi alkali kemoterapötik ajanlardan yarar sağlama potansiyelinin anlaşılmasında belirleyicidir (24).

2.2.2.1.2. Metilasyonun Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler

DNA'nın stabil olarak kalıtılması, DNA metilasyonunun belirlenmesinde büyük avantaj sağlamaktadır. 1990'ların başından beri DNA'nın metilasyonunun belirlenebilmesi için bisülfid yöntemi anahtar yöntem olarak kullanılmaktadır. DNA'nın bisülfid ile muamelesi unmetile olan sitozinlerin urasile dönüşmesine yol açmakta, ancak metile olan sitozinlerde herhangi bir değişiklik olmamaktadır.

Bisülfid reaksiyonu ile modifiye edilen DNA ile değiştirilmiş diziye özgü primer seti kullanılarak metilasyon spesifik bir polimeraz zincir reaksiyonu (MSP) gerçekleştirilmektedir. Bu reaksiyon sırasında, DNA kalıbındaki Urasiller Timin olarak amplifiye olurken, metile olan sitozinler değişmeden kalmaktadır (86). MSP reaksiyonu sonucunda metile olan sitozinler için pozitif bir görüntü elde edilmesi bu yöntemin en önemli avantajıdır. Ayrıca, son zamanlarda geliştirilen eş zamanlı kantitatif MSP ile, örneklerde metilasyon yüzdesi de elde edilebilmektedir (80).

2.2.2.2. mikroRNA'lar

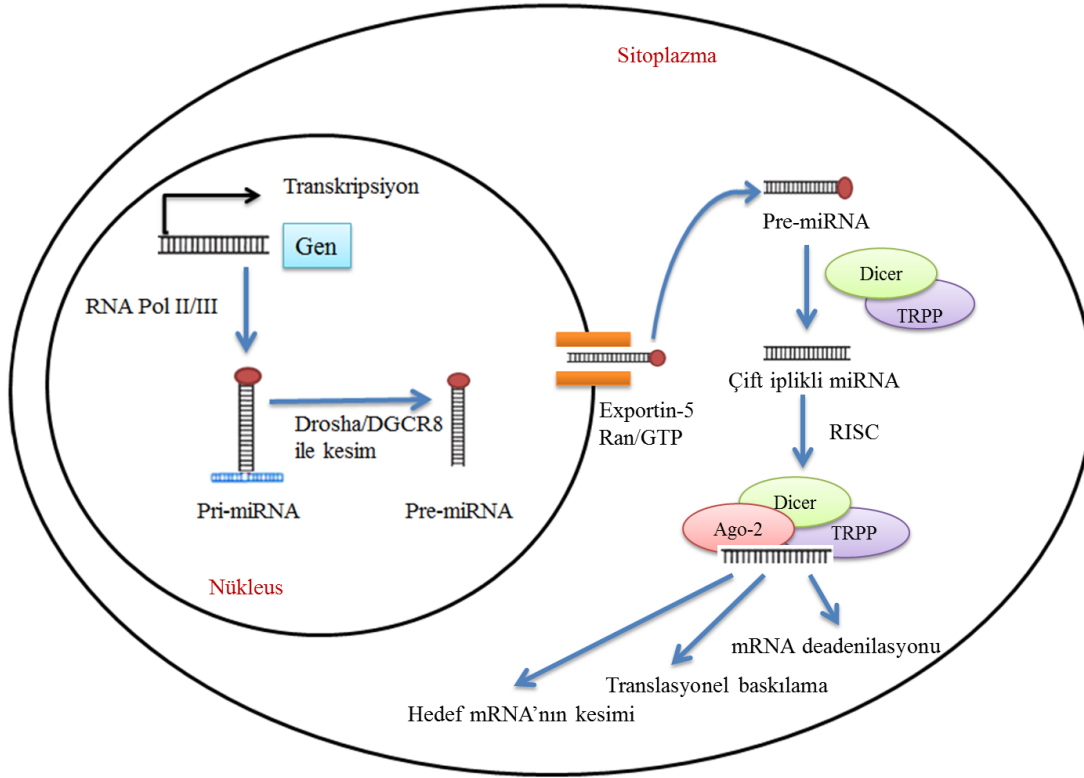
1993 yılında Lee ve çalışma arkadaşları (87) bir yuvarlak solucan türü olan *Caenorhabditis elegans*'in genomunu inceledikleri araştırmalarında lin-4 isimli genin 22 nükleotit uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini ancak bu transkriptin protein karşılığının olmadığını belirlemişlerdir. Bu bulgu, insan genomu da dahil olmak üzere birçok canlı türünün genomunda var olan kodlanmayan gen bölgelerinin keşfine öncülük etmiştir. Bu bölgelerden kodlanan küçük RNA molekülleri için ilk olarak 2001 yılında miRNA ismi kullanılmıştır (88).

miRNA'lar 18-25 nükleotid uzunluğunda olan ve hedef genin 3' ve 5' translasyon olmayan bölgelerine (3' untranslated region, 3' UTR, 5' untranslated region, 5' UTR) eşlenik olarak bağlanan küçük, kodlanmayan tek iplikçikli RNA molekülleridir. Bu RNA'lar hedef genin transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde rol alırlar (89). Günümüze kadar (Haziran 2014) 28500'den fazla miRNA tanımlanmıştır ve insan genomunun %60'ının bu miRNA'lar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (90, 91).

İnsan genomundaki miRNA'ların yaklaşık %40'ı kodlanmayan transkript ürünlerinin intronik bölgelerinde, %10'u kodlanmayan transkript ürünlerinin eksonik bölgelerinde, %40'ı protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde, yaklaşık %10'u ise diğer bölgelerde bulunmaktadır (92). Bir miRNA'nın intronik mi yoksa eksonik mi olduğu alternatif splicing mekanizması tarafından belirlenmektedir. miRNA'ların kesim mekanizması mRNA kesim mekanizması ile benzerlik göstermesine rağmen, özellikle intronik bölgelerde bulunan miRNA'ların mRNA'dan farklı olarak, olgunlaşma sürecinden önce kesime uğradığı düşünülmektedir (93, 94).

2.2.2.2.1. miRNA'ların Biyogenezi

miRNA'lar ilk olarak hücre çekirdeği içerisinde RNA polimeraz II veya RNA polimeraz III tarafından bir 5' cap (başlık) ve 3' poli A kuyruğu ile birlikte oluşturulmaktadır. Oluşan bu yapıya pri-miRNA adı verilmektedir. Pri-miRNA'nın büyüklüğü birkaç yüz nükleotitten birkaç kilobaza kadar değişebilmektedir. Pri-miRNA molekülü, nükleusta bulunan bir Rnaz III endonükleaz enzimi olan "Drosha" ve bu enzimle kompleks halde bulunan bir çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein olan "Pasha" tarafından kesilerek öncül molekül pre-miRNA oluşturulmaktadır. Pre-miRNA molekülü, kesim bölgesinin 2-3 nükleotid uzağından, çekirdek zarında yer alan bir taşıyıcı protein olan Exportin 5'e bağlanmakta ve Ran-GTP aracılığı ile nükleustan sitoplazmaya taşınmaktadır (95, 96). Sitoplazma da pre-miRNA, transaktivasyondan sorumlu RNA bağlayıcı protein (TRBP) ve Dicer tarafından ikinci bir kesime uğramakta ve çift iplikli bir miRNA molekülü oluşmaktadır. Bu çift iplikten bir tanesi kılavuz miRNA'yı, diğeri ise eşlenik diziyi barındırmaktadır. Kılavuz zincirin 5' ucu eşlenik diziyeye göre daha kararlı yapıdadır (97, 98). TRBP, Argonaute protein (Ago 2)'ye ve Dicer'e bağlanarak üçlü bir kompleks oluşturmaktadır. Bu komplekse RNA uyartılı susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex, RISC) adı verilmektedir. Çift iplikli miRNA molekülünün kılavuz zinciri RISC'in yapısında bulunan Ago2 tarafından RISC'in içerisine yerleşilerek olgun miRNA haline getirilirken, eşlenik iplik degrades olmaktadır. miRNA, RISC kompleksinin içerisine yerleştikten sonra, baz çifti eşleşmeleri yoluyla kompleksin hedef RNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanmasını sağlamaktadır (Şekil-5). Hedef mRNA'nın kesime uğraması, degradesyonu ya da translasyonunun baskılanmasında miRNA'nın hedef mRNA ile olan eşleniklik seviyesi belirleyici rol oynamaktadır (99, 100).



Şekil-5 miRNA biyogenezi

2.2.2.2. mikroRNA'ların Görevleri

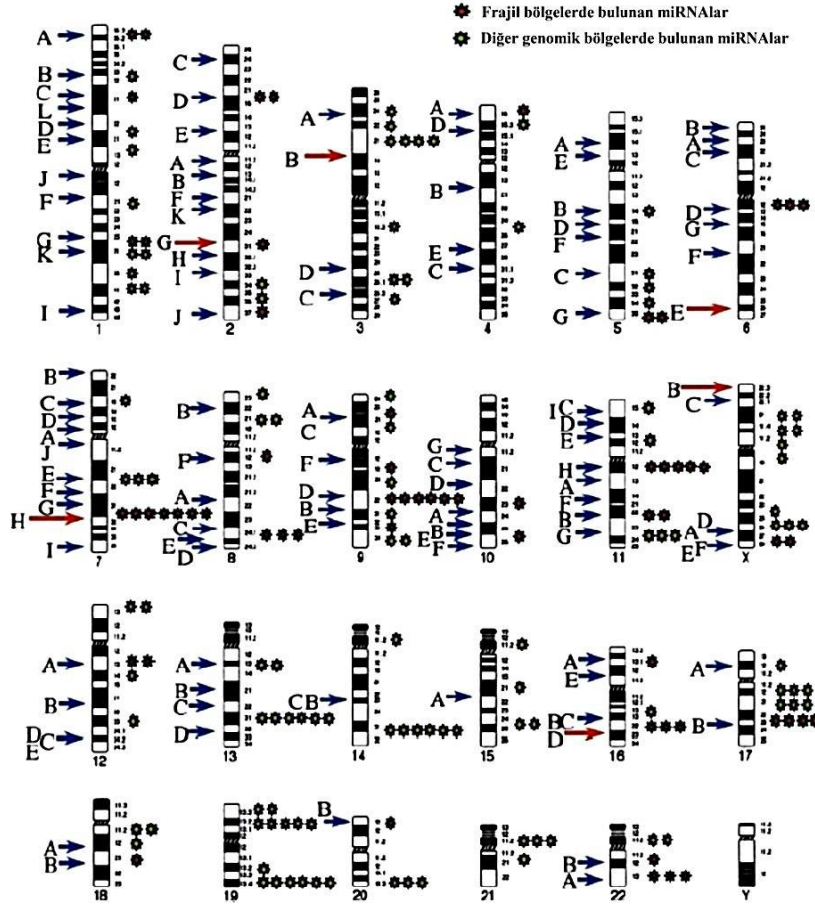
miRNA'lar hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine veya hedeflenen açık okuma alanına (open reading frame, ORF) farklı affiniteler ile bağlanarak protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olmaktadır (101). miRNA, hedef mRNA'nın OFR bölgesine tam eşleniklik ile bağlanabilirken, 3'UTR bölgesine daha düşük bir affinite ile bağlanabilmektedirler. Bu nedenle miRNA, hedef genin ORF bölgesine bağlandığında mRNA'nın RISC kompleksinde yer alan Ago2 enzimi tarafından yıkımı gerçekleşirken, 3'UTR bölgesine bağlandığında mRNA varlığını korumakta, yalnızca hedef proteinin translasyonu baskılanmaktadır (102).

miRNALAR, hüresel gelişim ve farklılaşma, hücre döngüsü, hücre çoğalması, hücre yaşlanması, hücre ölümü, adhezyon ve anjiogenez gibi önemli biyolojik fonksiyonlarda düzenleyici rol oynamaktadırlar (103). Bu nedenle miRNA ekspresyonunun düzenlenmesinde gerçekleşen bozukluklar başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir (104).

2.2.2.2.3. Kanser Oluşumunda miRNA'ların Rolü

Kanser hücreleri, kendi kendilerine büyüme faktörü salgılamaları, büyümeyi durdurucu sinyallere karşı duyarsızlaşmaları, apoptozisten kaçmaları, sınırsız çoğalma potansiyelleri, anjiogenez, doku invazyonu ve metastaz yapmaları ile karakterizedirler (105). Son 10 yılda elde edilen bulgular miRNA ekspresyonlarının düzenlenmesinde gerçekleşen bozuklukların kanser oluşum sürecini tetiklediğini göstermiştir (104). miRNA'ların kanser oluşum sürecine etkisi ile ilgili ilk bulgular 2001 yılında Dr Croce ve çalışma arkadaşlarının (106) Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarında yaptıkları çalışma ile elde edilmiştir. Croce ve çalışma arkadaşları (106), KLL'de, sıklıkla delesyona uğrayan 13q14 bölgesinde miR-15a ve miR-16-1'i kodlayan genlerin bulunduğunu ve bu hastaların %69'unda miR-15a ve miR-16-1'in ekspresyonunun azaldığı ya da olmadığı tespit etmişlerdir. Aynı araştırma ekibi daha ileriki dönemlerde birçok kanser türünde gerçekleştirdiği çalışmalarda onkogenleri baskılamakta işlev gören miRNA'ların çoğunlukla kromozomların frajil bölgelerinde yer alarak delesyona uğradığını (Şekil-6), tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılayıcı işleve sahip olan miRNA'ların ise kromozomun amplifikasyona uğrayan bölgelerinde yer aldığını göstermişlerdir (107). Onkogenleri baskılamakta işlev gören miRNA'lara tümör baskılayıcı miRNA'lar adı verilmektedir. Birçok kanser türünde, tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonu azalmıştır ya da yoktur. Tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu düzenleyen miRNA'lara ise onkomir adı verilmektedir ve bu miRNA'ların ekspresyonu tümör baskılayıcı miRNA'ların aksine birçok kanser türünde artış göstermektedir (107).

miRNA ekspresyon düzeylerinin anormal şekilde değişerek kanserleşmeyi tetiklemesinde bazı genetik ve epigenetik faktörler rol oynamaktadır (104). miRNA ekspresyon seviyesinin değişmesine yol oynayan genetik faktörler, kromozom anomalileri, polimorfizmler gibi yapısal genetik değişimler (106, 108) ve Drosha ve Dicer gibi miRNA biyogenezinde işlev gören enzimlerin aktivitelerindeki anomalilerdir (109 – 111). Epigenetik faktörler ise, miRNA'yı kodlayan genin anormal şekilde metilasyona uğraması (112 – 115) ve histon deasetilaz inhibisyonudur (116).



Şekil-6 İnsan genomunda fragil bölgelerde yer alan miRNA'lar (107)

2.2.2.2.3.1. GBM Patogenezinde Rol Oynadığı Belirlenen miRNA'lar

İlk defa Ciafrè ve arkadaşları (117) GBM tümör dokuları ile normal beyin dokuları arasında çok sayıda miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin farklılık gösterdiğini açıkladılar (117). Daha sonra Chan ve arkadaşları (118) GBM'de yüksek düzeyde ekprese olan miR-21'in, susturulduğunda hücrelerin apoptozise gitmesine yol açtığını belirlediler ve bu nedenle bu miR-21'i mikroonkogen olarak tanımladılar. 2005 yılında elde edilen bu ilk bulgulardan bu yana GBM patogenezinde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi ve fonksiyonlarının araştırılması ile ilgili 250'den fazla çalışma gerçekleştirilmiş olup, bu çalışmaların sayısı artmaya devam etmektedir (119).

2.2.2.3.1.1. GBM'de Ekspresyonu Artan miRNA'lar

Bu güne kadar GBM'de 256 tane miRNA'nın yüksek ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu miRNA'lardan miR-10b, miR-17~92-kümesi, miR-21 ve miR-93'ün GBM tümörlerinde yüksek ekspresyon gösterdiği çok sayıda araştırma tarafından doğrulanmıştır (119).

Yüksek miR-10b ekspresyonunun GBM'in WHO'ya göre derecelendirilmesinde prognostik bir öneme sahip olduğu belirlenmiştir (117, 119 – 126). Yapılan araştırmalara göre hastalığın şiddeti arttıkça miR-10b ekspresyonu da artmaktadır (117, 119 – 126). Ayrıca miR-10b'nin GBM patolojisindeki fonksiyonuna yönelik olarak gerçekleştirilen araştırmalar, bu miRNA'nın bir ürokinaz reseptörü olan uPAR ve Ras homolog gen ailesi üyesi C (Rho C)'nin translasyonunu düzenleyerek tümörün invaziflik kapasitesini artırdığını göstermiştir (126).

miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a ve miR-92a'dan oluşan miR-17~92-kümesi GBM tümör örneklerinde ve hücre hatlarında yüksek seviyede ekspresyon göstermektedir (121 – 123, 127 – 131). Bu miRNA'ların *TGFBR2*, *SMAD4* ve *CAMTA1* genlerini hedef alarak hücre çoğalmasının ve *CTGF* ve *POLD2* genlerini hedef alarak DNA tamir mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca, gerçekleştirilen in-vitro çalışmalar, GBM tümörlerinde miR-17~92-kümesinde yer alan miRNA'ların sessizleştirilmesinin, hücre canlılığının azalmasına ve apoptozise yol açtığını göstermiştir (127, 130, 131).

miR-21 normal ekspresyon düzeylerindeki MMP lerin seviyesini korumaktadır (132, 133). Ancak GBM'in şiddeti arttıkça miR-21'in ekspresyon seviyesi yükselmektedir (118 – 125, 127, 128, 134 – 152). Yapılan araştırmalara göre, miR-21 ekspresyonundaki yükselme *RECK* ve *TIMP3* gen ekspresyonlarını azalmasına ve invazyon oluşumuna yol açmaktadır (132, 133). GBM tümörü oluşturulmuş immun yetersiz farelerde miR-21 baskılandığında *NF-κB* ve *Ras* sinyal yollarının sessizleştiği ve hücre çoğalmasında azalmaya yol açtığı gözlenmiştir (134, 140, 148). Ayrıca, miR-21 ekspresyonundaki azalmanın *HNRPK*, *TAp63* ve *PDCD4* genlerinin ekspresyonunda artışına yol açarak apoptozisi tetiklediğini ifade eden çalışmalar bulunmaktadır (133, 139, 148).

GBM'de yüksek seviyede eksprese olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından gösterilen diğer bir miRNA'da miR-93'tür (120, 121, 123). Gerek in vitro gerek in vivo araştırmalar, miR-93'ün Integrin-β8'i hedef aldığını ve GBM'de gözlenen yüksek ekspresyonunun

endotelyal hücre oluşumuna ve damarlanmaya yol açtığı gösterilmiştir (153). Bu nedenle yüksek miR-93 ekspresyonunun anjiogenez ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (153).

Bahsi geçen miRNA'lara ek olarak, en az üç araştırma ekibi tarafından, yüksek ekspresyon göstererek GBM patogeneğinde rol oynadığı belirlenmiş olan miRNA'lar Tablo-2'de belirtilmektedir.

Tablo-2 GBM patogenezinde yüksek ekspresyon gösterdiği belirlenen miRNA'lar (119, 154 – 156).

miRNA	Hedef geni	Düşük eksprese olduğundaki işlevi
miR-9*	CAMTA1 BCL2L1/Bim, TFAP2C/ AP-2g, CDKN1A/ p21, CDKN2A/p16,	Hücre çoğalması↓, Kök hücre potansiyeli↓ Apoptozis↑, Otofaji↑, Kemorezistans↓, İnvazyon↓, Hücre çoğalması↓,
miR-10a	HOXD10	İn-vivo tümör büyümesi↓
miR-15b	CCNE1	Hücre çoğalması↓
miR-16		
	POLD2, TGFβ-RII, CTGF,	
miR-17	CAMTA1	Hücre canlılığı↓, Apoptozis↑, Hücre çoğalması↓
miR-18	Smad4, CTGF	Hücre canlılığı↓, Apoptozis↑, Hücre çoğalması↓
miR-20a	TGFβ-RII, CTGF	
miR-23a		
miR-24	β-catenin/Tcf-4	Hücre çoğalması↓, İnvazyon↓
miR-25	Mdm2, TSC1	
miR-26a	PTEN	
miR-27a	WEE1	
		İnvazyon↓, Hücre çoğalması↓, Anjiogenez↓, İn vivo tümör büyümesi↓
miR-30e	IκBα	
miR-92	CTGF	Hücre canlılığı↓, Hücre çoğalması↓
miR-106b		
miR-125b	Bmf	
miR-133		Kök hücre potansiyeli↓
miR-146a	Notch1	
miR-155		Hücre canlılığı↓, Apoptozis↑, Kemohassasiyet↑
miR-182		
miR-183		
miR-193		
	PPP2R1A, AP2A1, SIAH1, HAS2, ALS2CR2, CCNE1, SESN1, WEE1, RANBP3, VAT1	
miR-195		Kemoresistans↓
miR-210		
miR-221	P27, Akt, PUMA, P57, PTPμ	Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑, İn vivo tümör büyümesi↓
miR-222	Akt, PUMA, P57, PTPμ	Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑, İn vivo tümör büyümesi↓
miR-296	HGS	Anjiogenez↓
miR-302-367 kümesi	CXCR4/SDF1	İnvazyon↓, Hücre çoğalması↓, Kök hücre potansiyeli↓
miR-335	Daam1	Apoptozis↑, İnvazyon↓, İn vivo tümör büyümesi↓
miR-381	LRRC4	Hücre çoğalması↓
	LHX2, ALS2CR8, DIP2A, DYNLL2, C6orf145, FBXL15, LTBR, ASB1, PNPLA6, RTN4, RUSC1, EI24, HSF1, SMAD2,	
miR-455-3p	GNL1	Kemorezistans↓
miR-502-3p		
miR-584		

2.2.2.3.1.2. GBM'de Ekspresyonu Azalan miRNA'lar

Son dört yıl içerisinde miR-7'nin GBM'de düşük düzeyde eksprese olduğu yedi farklı araştırma ekibi tarafından gösterilmiştir (122, 124, 128, 157 – 160). Lages ve arkadaşları miR-7'yi GBM'de 0.11 kat, oligodendriogliomada ise 0.09 kat düşük eksprese olarak gözlemlemiştir. Bu bulgu miR-7'nin astrositiok orjinli olmayan tümörlerde de önemli olduğunu düşündürmektedir (128). 2008 yılında Kefas ve arkadaşları (160), miR-7'nin hedef geninin IRS-2 olduğunu ve bu miRNA'nın EGFR'den bağımsız olarak gelişen GBM'lerde, fosforile Akt'nin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol aldığını, yüksek ekspresyon gösterdiği durumda ise invazyonda azalmaya yol açtığını göstermişlerdir. Ayrıca, 2011 yılında Wu ve arkadaşlarının (158) gerçekleştirdiği araştırmanın bulguları, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarının da miR-7 tarafından düzenlendiğini ve bu yolla migrasyon ve invazyon da azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur.

GBM'de düşük seviyede ekspresyon gösterdiği çok sayıda araştırmacı tarafından belirlenen diğer bir miRNA'da miR-34a'dır. İn vitro koşullarda, miR-34a'nın GBM hücrelerindeki ekspresyon seviyesi arttırıldığında, Notch1/2 ve c-Met ekspresyonlarını regüle ederek tümör invazyonunun azalmasına ve p53 sinyal yolağının düzenlenmesinde rol alarak apoptoziste artışa yol açtığı belirlenmiştir (161 – 163). Ayrıca, yakın geçmişte gerçekleştirilen çalışmalarda, miR-34a'nın *PDGFRA* ekspresyonunun negatif kontrolünde işlev gördüğü ve GBM tümörlerinde gözlenen düşük miR-34a seviyesinin PDGF sinyalinin artışına yol açtığı saptanmıştır (164).

miR-128, GBM hücre hatlarında ve tümör örneklerinde düşük ekspresyon göstermektedir (117, 121 – 123, 128, 134, 136, 149, 152, 165 – 169). Yapılan araştırmalar miR-128'in kök hücre yenilenmesinde rol oynayan Bmi-1'in, hücre döngüsünün ve çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynayan E2F3a, WEE1 ve Msi1'nin ve EGFR ve PDGFRA büyüme faktörü reseptörlerinin sessizleşmesinde rol oynadığını göstermektedir (166 – 168).

miR-137'nin GBM'de düşük seviyede ekspresyon gösterdiği 2008'den bu yana bilinmektedir. Ayrıca çalışmalar, bu miRNA'nın miR-124 ile kombinasyon halinde bulunduğunu göstermiştir (122 – 124, 134, 142, 149, 165, 170). İn vitro koşullarda miR-137'nin ekspresyon seviyesi arttırıldığında, CDK6, Msi1 ve Cox-2 ekspresyonlarını düzenleyerek hücre çoğalması ve invazyonu baskıladığı görülmüştür (165, 166, 170).

Bahsi geçen miRNAlara ek olarak, en az üç araştırma ekibi tarafından, düşük ekspresyon göstererek GBM patogenezinde rol oynadığı belirlenmiş olan miRNA'lar Tablo-3'te belirtilmektedir.

Tablo-3 GBM'de düşük ekspresyon gösteren miRNA'lar ve fonksiyonları (119)

miRNA	Hedef geni	Yüksek eksprese olduğundaki işlevi
Let-7 kümesi	Pan-RAS, N-RAS, K-RAS	Migrasyon↓, Hücre çoğalması↓
miR-29b	PDPN	İnvazyon↓, Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑
miR-32	Mdm2, TSC1	İnvivo tümör büyümesi↓
miR-100	ATM	Radyohassasiyet↑
miR-101	EZH2, Msi1	Anjiogenez↓, Migrasyon↓, Hücre canlılığı↓, Hücre çoğalması↓
miR-124	SNAI2	Hücre çoğalması↓, Migrasyon↓, İnvazyon↓, Kök hücre potansiyeli↓
miR-125a		İnvazyon↓
miR-129		
miR-132		
miR-135a	STAT6, Smad5, BMPR2	İn vivo tümör büyümesi↓, Apoptozis↑
miR-138	Msi1	Hücre çoğalması↓
miR-139-5p		
miR-146b-5p	EGFR	İnvazyon↓, Migrasyon↓, Hücre çoğalması↓, İn vivo tümör büyümesi↓
miR-149	RAP1B, Wnt yolağı	Hücre çoğalması↓, Migrasyon↓
miR-153	Bcl-2, Mcl-1, Irs-2	Hücre çoğalması↓, Hücre canlılığı↓, Apoptozis↑
miR-181a	Bcl-2	Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑, İnvazyon↓, Radyohassasiyet↑
miR-181b		Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑, İnvazyon↓
miR-181d	Bcl-2, K-Ras	Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑, İn vivo tümör büyümesi↓
miR-184	Akt2	Apoptozis↑, İnvazyon↓
miR-185	DNMT1	DNA metilasyonu↓
miR-218	IKK-β	İnvazyon↓
miR-219	EGFR	Hücre çoğalması↓, Migrasyon↓
miR-326	Notch-1/2, PKM2	Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑, Hücre canlılığı↓, İnvazyon↓, İn vivo tümör büyümesi↓
miR-483-5p	ERK1	Hücre çoğalması↓
miR-491-5p	MMP9	İnvazyon↓

GBM'de yüksek ya da düşük ekprese olduğu belirlenen miRNA'ların yanı sıra, farklı araştırma ekipleri tarafından farklı ekspresyon seviyelerinde gözlemlendiği ifade edilen miRNA'larda bulunmaktadır. Bu miRNA'ların farklı ekspresyon seviyelerindeki işlevleri halen yeterince açıklanamamış olup araştırılmaya devam edilmektedir. Bu güne kadar birden fazla araştırmada farklı ekspresyon seviyelerinde gözlemlenmiş miRNA'lar Tablo-4'te belirtilmektedir.

Tablo-4 GBM’de farklı ekspresyon seviyelerinde gözlenen miRNA’lar (119)

miRNA	Hedef geni	Yüksek eksprese olduğundaki işlevi	Düşük eksprese olduğundaki işlevi
miR-19a	CTGF		Hücre canlılığı↓, Apoptozis↑, Hücre çoğalması↓
miR-26b	EphA2	Hücre çoğalması↓, İnvazyon↓, Anjiogenez↓	
miR-27b	WEE1		Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑, İnvazyon↓
miR-106a	E2F1	Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑	
miR-143			İnvazyon↓
		İn vivo tümör büyümesi↓, Migrasyon↓, Kök hücre potansiyeli↓, Kemohassasiyet↑,	
miR-145	Oct4, SOX2	Radrohassasiyet↑	İnvazyon↓
miR-205	VEGF-A	Hücre çoğalması↓, Apoptozis↑, İnvazyon↓	
		Hücre çoğalması↓, İnvazyon↓, Kök hücre potansiyeli↓, Nörosfer oluşumu↓, Hücre	
miR-451	PI3K/Akt-yolağı, CAB39	çoğalması↑	Migrasyon↑

2.2.2.3.2.miRNA’ların Kanser Progresyonunda Değerlendirilme Yöntemleri

Son on yıl içerisinde miRNA’lar ile ilgili elde edilen veriler ışığında, kanser araştırmalarında miRNA ekspresyon profillerindeki değişimlerden yararlanılmaya başlanmıştır (85). Ayrıca, yöntemsel olarak gen ekspresyon analizi ile karşılaştırıldığında, miRNA’nın mRNA’ya göre daha kararlı bir molekül olması ve parafine gömülü dokulardan yapılan analizler sonucunda da güvenilir veriler elde edilebilmesi, birçok kanser türü ile ilişkili miRNA’ların keşfini kolaylaştırmış, tümörlerin alt tiplerinin ve bireye özgü tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde miRNA ekspresyon profillerinin kullanılmasını cazip hale getirmiştir (172, 173).

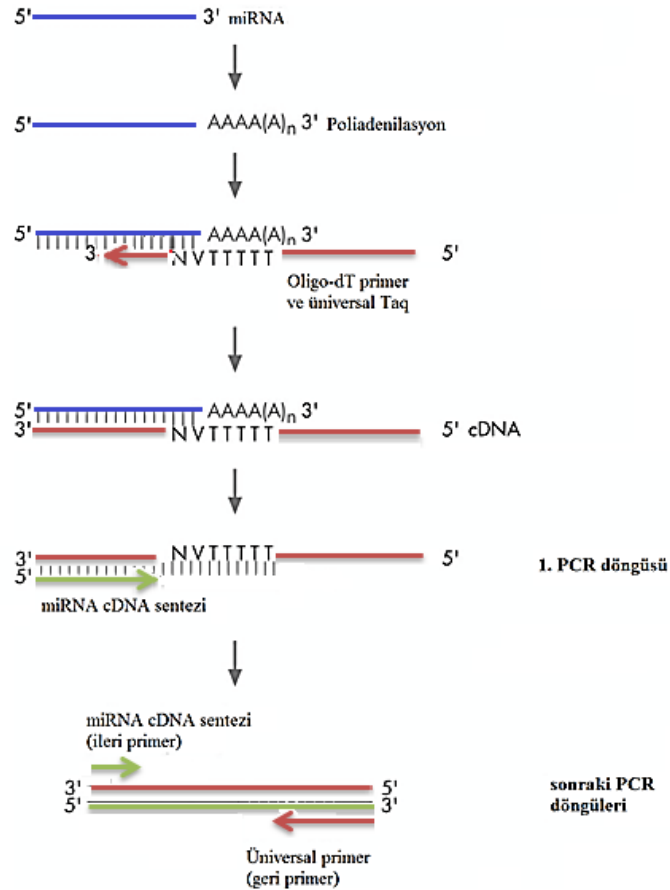
İnsan genomunda bulunan miRNA’ların keşfedilmesi amacıyla klonlama, in situ hibridizasyon, nothern blot ve yeni nesil sekans analiz teknikleri kullanılmaktadır (174). Tümörlerin miRNA ekspresyon profillerinin ortaya çıkarılması amacıyla ise Kantitatif Real Time PCR (RT-qPCR) tekniğinden yararlanılarak Super array ve mikroarray yöntemleri geliştirilmiştir. Ayrıca, son dönemde, standart yöntemlerle keşfedilen miRNA’ların genomdaki yerlerinin, yapısal özelliklerinin, hedef genlerinin ve fonksiyonlarının araştırılabilmesi amacıyla web tabanlı olarak ulaşılabilen miRNA kütüphaneleri oluşturulmaya başlanmıştır (104).

2.2.2.3.2.1. Kantitatif Real Time PCR (RT-qPCR) Tekniğinden Yararlanılarak miRNA Ekspresyon Analizi

miRNA ekspresyon analizi, miRNA izolasyonu, komplementer DNA (cDNA) sentezi ve RT-pPCR olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilmektedir.

- cDNA sentezi:

miRNA'lar mRNA'lardan farklı olarak doğal ortamlarında poliadenilasyon işlemi geçirmemektedirler. Bu nedenle, miRNA ekspresyon analizi amacıyla revers transkripsiyon işlemi ile cDNA sentezlenirken olgun miRNA'lar poli (A) polimeraz enzimi ile poliadenillenir ve oligo-dT primerler kullanılarak c-DNA'ya çevirimleri gerçekleştirilir (Şekil-7). Oligo-dT primerlerin bir 3' ucu çapası ve bir de 5' ucu üniversal taq dizisi bulunmaktadır. Böylece olgun miRNA'ların real-time PCR işlemi sırasında amplifikasyonu mümkün olmaktadır (175).



Şekil-7 miRNA'dan cDNA sentezi

- RT-qPCR

RT-qPCR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sistemi kullanılmaktadır. Bu teknikte standart PCR tekniğinden farklı olarak, kullanılan primerler anlık görüntülemeye olanak tanıyacak şekilde probolar ile işaretlenmektedirler. Problar, florofor denenen ve belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında floresan ışımaya yayabilme özelliğine sahip sentetik oligonükleotidlerdir ve PCR reaksiyonu gerçekleşirken, çoğaltılmış olan hedef cDNA zincirlerine bağlanarak floresan ışımaya oluşmasına neden olmaktadır. Prob, tek zincirli hedef cDNA üzerinde eşlenik olduğu bölgeye bağlandıktan sonra, real-time PCR cihazının ışık kaynağı, PCR tüpü içine uyarıcı kısa dalga boylu ışık göndermektedir. Kısa dalga boylu ışığın absorpsiyonu sonrasında, uzun dalga boylu ışık salınımı oluşmaktadır. Böylece gerçekleşen floresan ışımaya, cihaz tarafından algılanmaktadır. PCR tüpü içerisinde ne kadar çok hedef cDNA varsa o kadar çok prob bağlanacak ve floresan ışımaya miktarı da o derecede fazla olacaktır (176).

Real-time PCR yönteminde kullanılan probolar cDNA'ya bağlanma özgüllüğü açısından farklılık göstermektedirler. Bu güne kadar miRNA ekspresyon analizlerinin değerlendirildiği çalışmalarda çoğunlukla cDNA'nın her iki zincirine de özgül olmadan bağlanma özelliğindeki probolar kullanılmıştır (176). Bu amaçla en sık kullanılan boya molekülleri "SYBR Green I" ve "SYBR Gold"dur. Bu boyaların çift zincirli DNA arasına girerek bağlanması sonucunda 20-100 katlık bir floresan ışımaya artışı olur ve bu ışımaya real-time PCR cihazı tarafından algılanır. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "SYBR green" miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenir (176). Bu yöntemin dezavantajı, probun DNA'ya özgül olmayan şekilde bağlanmasından dolayı ortamda hedef DNA bulunmadığı durumlarda da "SYBR green", primerlerin kendi aralarında gerçekleşebilecek bağlanmaları sonucunda oluşan "primer dimeri" adı verilen yapıya da katılarak floresan oluşumuna neden olabilmesidir. Bu durumda gerçekleştirilen analizin güvenilirliğini arttırabilmek amacıyla "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Bu analiz, her bir çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gereken sıcaklığın hesaplanması esasına dayanmaktadır. Erime eğrisi analizinde, PCR reaksiyonunun amplifikasyon aşaması sonrasında, sıcaklık yavaş yavaş yükseltilmekte ve belirli aralıklarla tüpteki floresan miktarı kaydedilmektedir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirlerinden ayrılmaya başladığında "SYBR green" boyası serbest kalmakta ve floresan miktarı azalmaya başlamaktadır. Elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak Tm derecesi hesaplanmaktadır. Deney grubundaki

örneklerden elde edilen Tm dereceleri, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak PCR reaksiyonunun doğruluğuna karar verilmektedir (176).

Tümör dokuda miRNA ekspresyon profillerinin araştırılmasına yönelik çalışmalarda, “single assay” ya da “super array” yöntemleri kullanılmaktadır. Her iki yöntem de aynı PCR koşullarında gerçekleştirilmekle birlikte, single assay yönteminde araştırılması istenen her bir miRNA için ayrı PCR tüplerinde ayrı reaksiyonlar oluşturulmaktadır. Super array yönteminde ise araştırılmak istenen miRNA'lara özgül primerler cDNA ile kolaylıkla hibridize olma yeteneğindedir ve çalışma planına uygun şekilde 96 veya 384 kuyulu PCR kaplarının her bir kuyusuna ayrı ayrı emdirilmiş şekilde yer almaktadır. Bu yöntemde, bir örnek için çok sayıda miRNA ekspresyonu aynı anda değerlendirilebilmektedir. Super array yönteminde analizin gerçekleştirileceği PCR kapları, bir sinyal yolağına özgü çok sayına miRNA ekspresyonu değerlendirilebilecek şekilde tasarlanabileceği gibi, çalışılması amaçlanan farklı sinyal yollarında rol oynayan miRNA'ların analizine olanak tanıyacak şekilde de dizayn edilebilmektedir.

Super array tekniği ile gerçekleştirilen ekspresyon analizlerinde kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak amacıyla, eksternal, internal ve eksternal kantitasyon kontrolleri kullanılmaktadır. Eksternal kontroller, hedeflenen dizi ile aynı koşullarda amplifiye olan dizilerdir. Bilinmeyen örneğin eklendiği tüpe ek olarak bir başka tüpe örnek ile birlikte bu eksternal kontrol dizileri de eklenmektedir. Aranılan hedef dizi ile eksternal kontrol dizilerinin aynı olması durumunda kontaminasyonun farkedilmesi mümkün değildir. Bu nedenle eksternal kontroller, aranılan hedef dizide insersiyon, delesyon ya da ufak dizi değişiklikleri oluşturularak tasarlanmaktadır.

İnternal kontroller, örneğin çalışıldığı reaksiyon tüpüne eklenen, aynı koşullarda amplifiye olan, fakat aranılan hedeften farklı dizilerdir. Amplifikasyondan sonra iki farklı ürün, farklı problemlerle saptanmaktadır. Eksternal kantitasyon kontrolleri ise, kantitasyonun sağlıklı yapılabilmesi ve standart eğrinin çizilebilmesi için gerekmektedir. Bu kontrollerin dizileri aranılan hedef bölgeyle aynı olmak durumundadır. Ancak bir kontaminasyon durumunu ayırabilmek için özellikle probun bağlanma bölgesinde küçük dizi modifikasyonları yapılabilir (176).

- Veri analizi:

RT-qPCR analizinden elde edilen verilerin değerlendirilebilmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntemler mutlak kantifikasyon ve göreceli kantifikasyondur. Mutlak kantifikasyon ile kalıp cDNA'dan çoğaltılan kopya sayısı, göreceli kantifikasyon ile ise, örneklem grubu ile

kontrol grubuna ait cDNA'lardan çoğaltılan kopya sayılarının oranı hesaplanmaktadır. Bu amaçla geliştirilen ve en yaygın olarak kullanılan yöntem $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemidir (177).

$2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi:

PCR'nin üstel amplifikasyonu,

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n$$

eşitliği ile tanımlanmaktadır. Bu eşitlikte, " X_n ", n sayıda gerçekleşen PCR döngüsü sonucunda oluşan hedef molekül sayısını, " X_0 ", hedef molekülün başlangıç sayısını, " E_X ", hedef molekülün amplifikasyonunun verimliliğini ve "n" de PCR reaksiyonunda gerçekleşen döngü sayısını ifade etmektedir.

RT-q PCR deneylerinde floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına, CT (cycle threshold) değeri adı verilmektedir. Bu nedenle, hedef molekülün CT değeri,

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{CT,X} = K_X$$

eşitliği ile açıklanabilmektedir. Bu eşitlikte, " X_T " ile hedef molekülün CT sayısı, " $C^{T,X}$ " ile de hedef molekülün amplifikasyonu için gerçekleşen döngü sayısı tanımlanmaktadır. " K_X " ise sabit değerdir. İnternal kontrol için de benzer bir eşitlik söz konusudur. Buna göre,

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{CT,R} = K^R$$

eşitliğinde, " R_T " ile referans molekülün CT sayısı, " $C^{T,R}$ " ile de referans molekülün amplifikasyonu için gerçekleşen döngü sayısı tanımlanmaktadır. " K_R " ise sabit değerdir.

Hedef molekülün CT sayısının, referans molekülün CT sayısına bölünmesi ile oluşan,

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{CT,X}}{R_0 \times (1 + E_R)^{CT,R}} = \frac{K_X}{K_R} = K.$$

formülünden elde edilen sonuç ekspresyon değerini yani mutlak kantifikasyon değerini ifade etmektedir.

Görelî kantifikasyon değerinin hesaplanabilmesi için,

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta CT}$$

Eşitliğinden yararlanılmaktadır. Bu eşitlikte yer alan " X_N " değeri örneklemin normalize edilmiş mutlak kantifikasyon değerini (X_T/R_T) ifade etmektedir. " ΔCT " değeri ise hedef molekülün ve referansın eşik döngüleri arasındaki farkı ($CT_{T,X} - CT_{T,R}$) ifade etmektedir.

En son basamakta, "q" adı verilen bir örneklemin " X_N " değeri ($X_{N,q}$), "cb" adı verilen bir kalibratörün " X_N " değerine ($X_{N,cb}$) bölünür.

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta CT_q}}{K \times (1 + E)^{-\Delta CT_{cb}}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta CT}.$$

Elde edilen değer, $-(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$ 'ye eşit olup $-\Delta\Delta CT$ değeri olarak adlandırılmaktadır. 150bç'den daha küçük olan ampikonlarda ve primer ve Mg^{2+} konsantrasyonları optimize edilmiş reaksiyonlarda "E_X" değeri 1'e yakındır. Bundan dolayı, örneklemenin miktarı endojen kontrole ve relatif kalibratöre normalize edilmektedir. Bu nedenle, reaksiyon sonunda elde edilen örneklem miktarı $2^{-\Delta\Delta CT}$ olarak hesaplanmaktadır (177).

2.2.2.2.3.2.2. Web Tabanlı miRNA Kütüphaneleri

Genomda yer alan miRNA'ların keşfi için kullanılan nothern blot, microarray ve insitu hibridizasyon gibi teknikler uzun zaman almakta ve yüksek maliyetler ile gerçekleştirilebilmektedir. Son dönemde geliştirilen yeni nesil sekans analizi teknolojisi, bu maliyeti büyük oranda azaltmıştır. Ancak bu yöntem ile elde edilen verilerin, gerek miRNA'ların yapısal özellikleri gerekse fonksiyonlarının belirlenebilmesi amacıyla kullanılabilmesi için uygun hesaplama altyapısına sahip, bilgisayar destekli tahmin algoritmalarının geliştirilmesi ihtiyaı oluşmuştur. Bu nedenle web tabanlı miRNA kütüphaneleri oluşturulmaya başlanmıştır (178). miRNA'ların genomdaki yerlerinin ve yapısal özelliklerinin belirlenmesine yönelik olarak oluşturulan web tabanlı tahmin algoritmalarında, nükleotid uzunluğu, türler arasında korunmuş nükleotid bölgeleri, sa tokası vb. yapısal özellikler, serbest enerji gibi miRNA'ların temel karakteristik özelliklerinden yararlanılmaktadır (179). Bu güne kadar yeni miRNA'ların tayininde kullanılmak üzere oluşturulmuş olan web tabanlı algoritmalar Tablo-5'te belirtilmektedir.

Tablo-5 Web tabanlı miRNA tahmin algoritmaları (174).

Programın adı	Web adresi	Oluşturulma a yılı	Yapının korunmuşluğu	Yapı	Sekans	Yeni nesil		
						sekanslamaya uygunluğu	(%) hassasiyeti	(%) spesifite
miRscan	www.genes.mit.edu/mirscan	2003	X	X			74	40
miR-Align	www.bioinfo.austsinghua.edu.cn/miralign	2005		X	X		90	98
ProMir	www.bi.snu.ac.kr/ProMIR	2005	X	X	X		73	96
Triplet-SVM	www.bioinfo.austsinghua.edu.cn/software/mimasvm	2005		X	X		93	88
miR-abela	www.mirz.umib.ac.ch/cgi/pred_miRNA_genes.cgi http://www.bioinf.uni-leipzig.de/~jana/index.php/jana-herTEL-software/65-	2005		X	X		71	91
RNAmicro	jana-herTEL-mamicro	2006		X	X		90	99
miR-Finder	www.bioinformatics.org/mirfinder	2007	X	X			90	
miPred	www.bioinf.seu.edu.cn/miRNA	2007		X	X		84	98
MiRRim	www.ncrna.org/software/miRRim https://www.mdc-berlin.de/8551903/en/research/research_teams/syste	2007	X	X			70	90
miRDeep	miRDeep http://web.bioinformatics.cicbiogune.es/microRNA/	2008		X		X	89	-
miRanalyser	miRanalyser.php	2009				X	98	-
SSCprofiler	http://mima.imbb.forth.gr/SSCprofiler.html	2009	X	X	X	X	89	84
HMMiR	http://www.benoslab.pitt.edu/kadiAPBB2009.html	2009		X	X	X	84	88

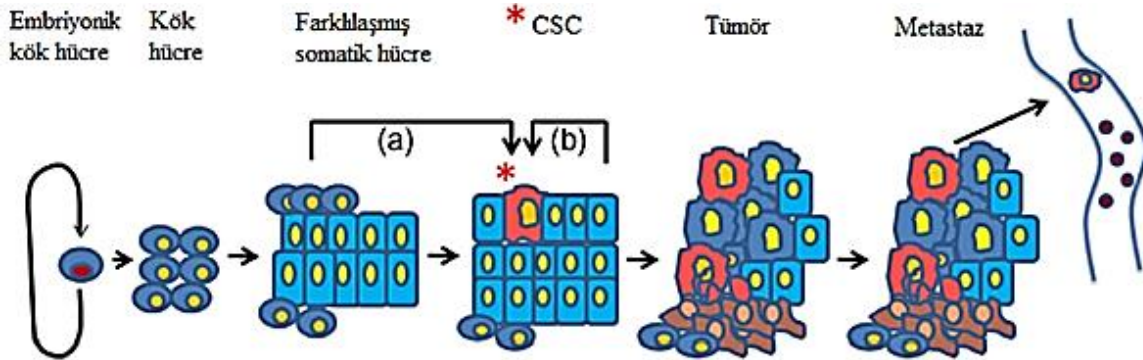
Web tabanlı miRNA kütüphaneleri ile, keşfedilen miRNA'ların genomdaki yerinin ve yapısal özelliklerinin araştırılmasının yanı sıra hedefledikleri genler de tahmin edilebilmektedir. miRNA'ların hedef genlerinin tahmininde mRNA'nın 3'UTR bölgesi ile miRNA'nın çekirdek bölgesi arasındaki baz eşleşme oranı, bağlanma bölgesinin termodinamik kararlılığı, bağlanma bölgesinin evrimsel olarak korunmuşluğu, sekonder yapı ve hedef genin ekspresyon profili gibi özelliklerden yararlanılmaktadır (180 – 184). Bu güne kadar miRNA'ların potansiyel hedef genlerinin tayininde kullanılmak üzere oluşturulmuş olan web tabanlı algoritmalar Tablo-6'da belirtilmektedir.

Tablo-6 miRNA'ların hedef genlerinin tahmininde kullanılacak web tabanlı programlar (185).

Programın adı	Web adresi
TargetScan(S)	http://genes.mit.edu/tscan/targetscanS2005.html
miRanda	http://www.microrna.org
miRWalk	http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/
RNA-hybrid	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid
PicTar	http://pictar.mdc-berlin.de
TargetBoost	http://www.interagon.com/demo
PITA	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/index.html
ElMMo	http://www.mirz.unibas.ch/ElMMo2/
Singh's	http://www.cdfd.org.in/lmg/PDF/imb816.pdf
mirWIP	http://ambroslab.org
microCOSM	
Targets	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/
DIANA-microT	
3.0	http://www.microrna.gr/microT
starBase	http://starbase.sysu.edu.cn/clipSeqIntersection.php
InMiR	http://www.plosone.org
miRTar	http://mirtar.mbc.nctu.edu.tw/human/

2.3. Kanser gelişiminde Kanser Kök Hücrelerinin Önemi

Kök hücreler kendi kendini yenileme ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu hücreler, embriyonik gelişim sırasında doku farklılaşmasında, erişkin evrede ise, hasarlanan dokuların yenilenmesi ve tamirinde önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca bazı tümörlerde, yüksek çoğalma yeteneğine sahip, tedavi ile indüklenen apoptozise karşı direnç gösterebilen hücreler belirlenmiştir (186). Gerçekleştirilen çalışmalar, tümörün diğer hücrelerinden daha farklı özelliklere sahip olan bu hücrelerin, kanser kök hücreleri(CSC) olduğunu ortaya koymuştur (187). CSC'ler ilk kez 1994 yılında akut myeloid lösemi (AML) hastalarında belirlenmiştir. Hem kök hücre hem de kanser hücresi özelliği taşıyan bu hücreler, ağır kombine immun yetmezliği (Severe Combined Immunodeficiency, SCID) olan farelere transplante edildiklerinde yeniden kanser oluşumuna yol açtıkları gözlenmiştir (188). 2003 yılında bu hücrelerin varlığı meme ve beyin tümörleri başta olmak üzere kolon, pankreas, akciğer, prostat kanserleri ve melanomada da belirlenmiştir (189, 190). Kanser kök hücre hipotezine göre tümör oluşumu tek bir kanser kök hücresinden gelişmektedir (7). Tümör doku içerisinde küçük bir hücre popülasyonuna sahip olan bu hücrelerin, tümörlerin radyoterapi ve pro-apoptotik kemoterapiye karşı direnç göstermelerine neden oldukları belirtilmektedir (191). CSC'ler, normal doku kök hücrelerinin transformasyonu ile veya farklılaşmış normal somatik hücrelerin genetik olarak yeniden programlanması ile oluşabilmektedirler (Şekil-8).



Şekil-8 Kanser kök hücre hipotezine göre tümör oluşumu (a) normal doku kök hücrelerinin transformasyonu (b) farklılaşmış normal somatik hücrelerin genetik olarak yeniden programlanması (192)

Bu hücreler, normal kök hücrelerin kullandıkları sinyal yollarını taklit ettiklerinden ölümsüzdürler. Normal kök hücrelerin kanser kök hücresine dönüşmesine yol açan birkaç sinyal yolağı vardır. Bunlar, Notch, Wnt/ β -katenin ve Hedgehog (SHH) sinyal yollarıdır. Bu yollarında gerçekleşen değişimler, kök hücrelerin kanser kök hücreye dönüşmesinde ve sınırsız çoğalma yeteneğı kazanmalarına neden olmaktadır (193, 194) (Şekil-9).

Notch Sinyal Yolağı: Notch sinyal yolağı evrimsel olarak korunmuştur ve hücrenin farklılaşması ile ilgili kaderini değıştirecek görevleri vardır. NOTCH yolağı kök ve öncü hücre katmanlarını kontrol eder. NOTCH yolağında hem bozulma hem de aşırı aktivite kanser gelişimine yol açabilmektedir (195). Memelilerde dört tane Notch reseptörü (Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4) bulunmaktadır. Bu reseptörler hücre yüzeyinde eksprese olurlar ve komşu hücrelerin yüzeyinde eksprese olan ligandlar tarafından aktiflenirler. İnsanlarda bu güne kadar Notch reseptörü ligandı olarak üç tane delta-like ligand (DLL1, DLL3, DLL4) ve iki tane jagged-like ligand (JAG1, JAG2) belirlenmiştir. Hem Notch reseptörleri hem de ligandları transmembran proteinler olduklarından Notch sinyali hücre-hücre etkileşimi ile oluşmaktadır. Ligand Notch reseptörüne bağlandığında ardışık olarak ADAM proteaz tarafından disintegrin ve metalloprotease'ın proteolitik kesimi ve γ -sekretaz tarafından hücre içi bölgenin (NICD) salınımı gerçekleşmektedir. Hücre içine salınan NICD, nukleusa taşınır ve mastermind-like proteinler (MAML1, MAML2 ve MAML3) ve CSL (CBF1/Suppressor of Hairless/LAG1)/RBPJ transkripsiyon faktörleri ile bağlantı kurarak Notch sinyal yolağının hedef genlerini aktifler. Notch sinyalizasyonu sonucunda daha ileriki süreçte aktiflenen bazı genler PI3K, AKT, NF-kB, PPAR, CyclinD1, p21 ve p27'dir (196). Notch sinyalinin yokluğunda ise, CSL/RBPJ ko-represörüne bağlanır ve transkripsiyon baskılanır (197).

Wnt Sinyal Yolağı: Günümüze kadar β -katenine bağımlı ve β -kateninden bağımsız olmak üzere iki farklı Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır. β -kateninden bağımsız yolağın hücrenin hareketi ile ilgili fonksiyonlarda rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca yakın geçmişte, bu sinyal yolağının embriyogenez için de önemli rol oynayabileceğı ileri sürülmüş olmakla birlikte kanser kök hücre biyolojisindeki işlevi henüz yeterince bilinmemektedir (194).

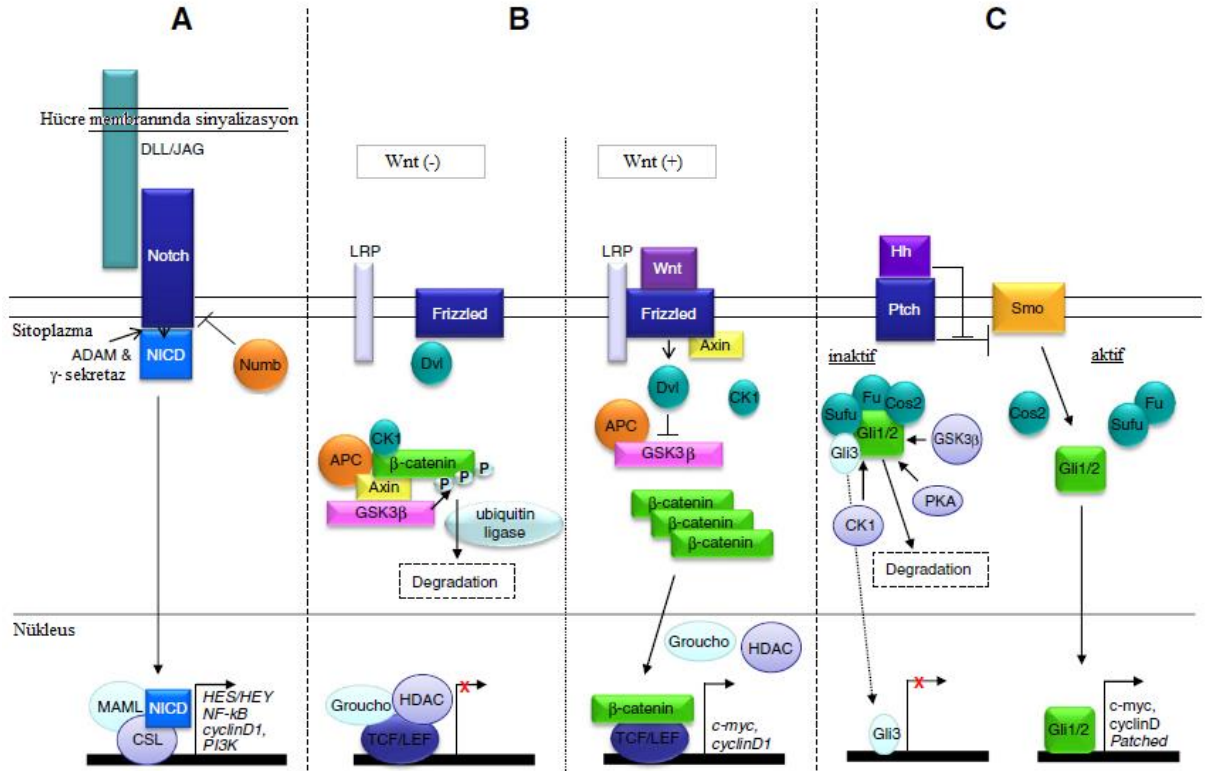
β -katenine bağımlı olan Wnt sinyal yolağı ise omurgasızlardan omurgalılara kadar birçok canlı türünde, evrimsel olarak korunmuştur. Bu sinyal yolağı, erken embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve erişkin dokularda apoptoz, anjiogenez, sinaps oluşumu gibi hücrenin kaderini belirleyecek yaşamsal faaliyetlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Bu sinyal yolağında meydana gelen bozukluklar kök hücrelerin kanser kök hücrelere dönüşmesine yol açabilmektedir (194).

Wnt/ β -katenin sinyali Wnt proteinlerinin hücre zarındaki reseptörleri olan Frizzled ve LRP5/6'ya bağlanması ile aktiflenir. Daha sonra, Dv1 proteininin ve LRP5/6 kompleksinin hücre içi kinaz bölgeleri fosforillenerek sinyalin sitozole aktarımı sağlanır. Hücre içine aktarılan sinyal, β -katenin'in fosforillenerek yıkılmasından sorumlu olan "APC- Axin- GSK3 β -CKI" kompleksini inaktif hale getirir. Fosforillenemeyen β -katenin sitoplazmada birikir ve bir kısmı hücre zarlarına taşınarak hücre bağlantılarında görev alırken, diğer bir kısmı hücre çekirdeğine taşınır ve CCND1 ve MYC gibi genlerin transkripsiyonunu aktifler (197).

Wnt sinyalinin yokluğunda ise, sitoplazmada serbest halde bulunan DV1 proteini ve LRP5/6'nın hücre içi kinaz bölgeleri fosforillenemez. Bu nedenle APC- Axin- GSK3 β -CKI yıkıcı kompleksi aktif olarak kalır ve β -katenin yıkımına yol açar. Sitoplazmada β -katenin birikmediğinden dolayı, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun hedeflediği genlerin transkripsiyonu gerçekleşemez ve sinyal yolu baskılanmış olur (197).

Hedgehog (Hh) Sinyal Yolağı: Hh sinyal yolağı ilk olarak Drosophila'da embriyonik gelişim sırasında segment oluşumu sırasındaki rolü ile bulunmuştur. İnsanda Hh yolağı derinin, saç foliküllerinin ve yağ bezlerinin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (198). Memeli Hh yolağının bileşenleri, ligands Sonic (SHH), Desert (DHH) ve Indian (IHH) Hh, membrane receptor Patched (PTCH1/2), G protein coupled receptor, signal transducer Smoothed (SMO) ve GLI zinc finger transcription faktörlerdir (GLI1, GLI2 ve GLI3). SHH, hücre çoğalmasının, göçünün ve farklılaşmasının düzenlenmesinde görev almaktadır (199). GLI'ler Hh sinyalinin olmadığı durumda repressör görevi görürler. Ligandın yokluğunda, PTCH1 SMO'yu baskılar ve GLI modülasyonunu önler. Ligandın PTCH1'e bağlanması, SMO üzerindeki represyonu kaldırır ve GLI proteinlerinin post transkripsiyonel modifikasyonunu tetikler. Daha sonra GLI1 bir aktivatör olarak, GLI2 aktivatör veya represör olarak ve GLI3 represör olarak iş görür. Bundan dolayı Hh sinyalinin sonuçları ve hedef genlerinin regülasyonu GLI faktörlerinin etkinliğine bağlıdır (199). CSC'de Hh sinyalinin sürekli aktif durumda olduğu belirlenmiştir (200).



Şekil-9 (A)Notch,(B) Wnt ve (C) Hh sinyal yolları (194)

Octamer-binding protein 4 (Oct4), homeobox transcription factor Nanog (Nanog), myc proto-oncogene protein (c-myc), krueppel-like factor (Klf4), transcription factor Sox2 (Sox2), transcription factor E2-alpha (TCF3), high mobility group AT-hook protein 2 (HMGA2), polycomb group RING finger protein 4 (BMI1) ve Lin 28 homolog A (LIN28), tüm CSC hücrelerinin eksprese olan en önemli moleküler belirteçlerdir (201). Ayrıca bu hücreleri diğer tümör hücrelerinden ayıran hücre yüzey antijenleri bulunmaktadır. Bu hücre yüzey antijenlerinin büyük çoğunluğunu CD markırları oluşturmaktadır. Bu nedenle, CSC'lerin tanınarak, diğer tümör hücre popülasyonundan ayrılması amacıyla geliştirilen tekniklerin büyük bir çoğunluğunda, CD markırların oluşturduğu bu hücre yüzey antijenleri belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu hücre yüzey antijenlerinden en çok araştırılmış olanları CD133 ve CD44'tür. CD133 ve CD44 farklı tümör tiplerine ait birçok CSC hücrelerinde görülebilmektedir. Bununla birlikte bazı tümör tiplerine ait CSC'ler birbirinden farklı hücre yüzey antijenleri içerebilmektedir (202, 203) (Tablo-7).

Tablo-7 İnsan CSC hücrelerinde belirteç olarak kullanılan hücre yüzey antijenleri (203)

Tümör tipi	CSC fenotipi
Solid	
Mesane	CD44+, CK5+, CK20+, CD47+
Meme	CD44+, CD24- veya düşük +, CD133+, ALDH1, ESA+, β 1 integrin+, α 6 integrin+
Kolon	CD133+, CD44+, ALDH1+, ESA+, CD166+
Endometrium	CK8+, β -katenin+, BMI1+, NANOG+, SOX2+
Glioblastoma	CD133+
Böbrek	CD105+, NANOG+, Musashi+, OCT4+, CD133-, CD24-
Karaciğer	CD44+, CD90+, CD133+
NSCLC	CD133+
Medullablastoma	CD133+
Melanoma	CD44+, CD133+, CD20+, CD271+, β 1 integrin+, ABCB5+
Ovaryum	CD44+, MyoD88+, Lin28+, OCT4+, CD133+, CD117+
Baş ve boyun	CD44+, ALDH1+
Pankreas	CD44+, CD24+, CD133+, ALDH1+, ESA+
Prostat	CD44+, CD133+, ALDH+, α 2 integrin+, β 1 integrin+, α 6 integrin+, CD177+
Hematopoietik	
Akut myeloid	CD34+, CD38-
Multiple myeloma	ALDH1+, CD34+, CD20+, CD138-
B-ALL	CD34+, CD10-, CD19-, CD38- veya CD19+
T-ALL	CD34+, CD4- veya CD34+, CD7-

2.3.1. GBM Kök Hücreleri

Gliomalar, CSC'lerin ilk belirlendiği solid tümörler arasında yer almaktadır (204). GBM kök hücreleri (GSC) taşıdığı hücre yüzey antijenleri açısından diğer GBM hücrelerinden farklılık göstermektedir (205 – 208). Gerçekleştirilen araştırmalarda GSC'lerin oluşumunda ve tümörü oluşturmalarında rol oynayan birçok sinyal yolağı belirlenmiştir (Tablo-8). Ancak, son dönemde elde edilen bulgular bu sinyal yollarının GSC'lerin mikroçevresinden aldıkları sinyaller tarafından düzenlendiğini ortaya koymaktadır. Bu sinyaller, GSC'nin yakın ve uzak çevredeki dokularla bağlantı kurarak farklılaşmamış GSC'lerin korunmasında ve hemostazisinde önemli rol oynamaktadır.

Tablo-8 GSC ile ilişkili moleküller ve sinyal yolları (209)

Molekül	Hedef molekülleri	GSC hemostazındaki rolü
Ligandlar		
BMP4	BMPR1B, SMAD 1/5/8	Hücre çoğalmasının azalması, farklılaşmanın indüklenmesi
PDGF-B		Hücre çoğalmasının indüklenmesi, kendini yenileme
SHH	Gli1, nanog, PI3K/mTOR	Hücre çoğalmasının indüklenmesi, kendini yenileme, apoptozisin baskılanması
TGFβ	Id-1, Id-3, Sox/Sox2, SMAD 2/4/LIF/JAK-STAT	Kendini yenileme, tümörigenez, hücre çoğalması ve invazyonun tetiklenmesi
WNT	β-katenin, Dvl2, FoxM1, Evi	Hücre çoğalması ve tümörigenez, tetiklenmesi, apoptoz ve farklılaşmanın indüklenmesi, hücre göçünün düzenlenmesi
Reseptörler		
Notch	HES1, nestin, SNAI1, WNT/β-katenin sinyalizasyonu	Apoptozisin inhibisyonu, hücre çoğalmasının artışı, kendini yenileme, invazyon, ilaç direnci
c-MET	Nanog, Akt, MAPK, STAT3	farklılaşmanın baskılanması, hücre büyümesi ve invazyonun indüklenmesi
CXCR4		Hücre çoğalmasının ve anjiogenezin indüklenmesi
EGFR	Akt/SMAD5, Id-3, GRO1, IL-6, IL-8, Ras/ERK, PI3K/Akt/Chk1, NF-κB, AP-1, C/EBP, c-Jun/JNK, VEGF, MMP-13	Hücre çoğalmasının ve tümörigenezde artış, apoptozisin inhibisyonu, anjiogenez ve kök hücre belirteçlerinin düzenlenmesi, oksidatif stres ve iyonize radyasyona karşı direnç
EPOR	STAT3	Kendini yenilemenin indüklenmesi
IL6Rα	STAT3	Kendini yenilemenin indüklenmesi
İntegrin α6		Hücre çoğalması ve tümörigenezde artış, anjiogenez ve kök hücre belirteçlerinin düzenlenmesi
L1CAM	Olig2, p21 ^{WAF1/CIP1}	Hücre çoğalması ve tümörigenezde artış, apoptozisin inhibisyonu, anjiogenez ve kök hücre belirteçlerinin düzenlenmesi
PDGFRβ	STAT3	Kendini yenilemenin indüklenmesi
VEGFR2		Hücre canlılığının, kendini yenilemenin ve tümörigenezin indüklenmesi
Hücre içi moleküller		
A20	NF-κB	Hücre büyümesi ve kendini yenilemenin indüklenmesi, uzun survi
TNFAIP3		Apoptoza karşı direnç, tümörigenez
Akt		Kendini yenilemenin, hücre çoğalmasının, invazyonun indüklenmesi
BMX	STAT3	Kendini yenilemenin indüklenmesi
IGFBP-2	Akt	Kendini yenilemenin, hücre çoğalmasının, invazyonun indüklenmesi
mTOR	Akt, S6	Kendini yenilemenin, hücre çoğalmasının indüklenmesi
NOS-2	CDA1	Kök hücre büyümesi ve tümörigenezin düzenlenmesi
Rac1	Pak	Kök hücre oluşumunun tetiklenmesi, kendini yenileme, hücre göçü, invazyon ve radyorezistans oluşumunun indüklenmesi
Transkripsiyon faktörleri		
Bmi-1		Kendini yenilemenin indüklenmesi, apoptozis ve farklılaşmanın önlenmesi
c-myc		Kendini yenilemenin, hücre çoğalmasının, tümörigenezin indüklenmesi, apoptozis baskılanması
STAT3	Cyclin D1, Bcl-2	Kendini yenilemenin, hücre çoğalmasının, tümörigenezin indüklenmesi, apoptozis baskılanması

Hipoksik Niş: GBM'in en önemli özelliklerinden birisi hipoksidir. Sağlıklı beyin hücrelerinde %7.5 ile %0.5 civarında oksijen bulunurken GBM tümörlerinde bu oran \leq %0.1'e kadar düşebilmektedir (210 – 214). Hipoksi, hypoxia-inducible factor (HIF) ailesine ait transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir (215, 216). GSC'lerde hipoksinin en önemli mediatörleri HIF-1 ve HIF-2'nin α alt birimleridir. GBM biyopsilerinde yapılan araştırmalarda, GSC'lerin oksijenin az olduğu ve HIF-1 α ve HIF-2 α ekspresyonunun yüksek olduğu perinekrotik bölgede yer aldıkları belirlenmiştir (207). HIF-1 α , yalnızca GSC'ler değil, diğer GBM hücre popülasyonunun da büyümesini tetiklerken, HIF-2 α özellikle GSC oluşumu ve pluripotentlikle ilişkili olan *KLF4*, *SOX2*, *OCT4* ve *c-MYC* gibi genlerin ekspresyonunu tetiklemektedir (217 – 221). Ayrıca, hipoksi, *CXCR4* (38), lysyl oxidase (LOX), hypoxia inducible gene 2 (*HIG2*) (212) ve HIF2'nin hedef genlerinden glucose transporter 1 (*GLUT1*) ve proteinaz baskılayıcı *SERPIN B9* ekspresyonlarını etkileyerek GSC homeostazisinin ve ortam pH'sının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (218, 223). Asidik ortamdaki GSC'ler de HIF ailesi üyelerinin ve *VEGF*'nin ekspresyonlarının yüksek olduğu belirlenmiştir (224). Ayrıca, Hipoksi'nin yol açtığı GSC artışı (PI3K)/Akt, ERK1/2 ve Notch sinyal yollarına bağlı olup, bu sinyal yollarının inhibisyonu CD133+ hücre fraksiyonunun azalmasına yol açmaktadır (222).

Perivasküler Niş: Tüm diğer fonksiyonlarının yanı sıra, hipoksi tümör vaskülarizasyonuna yol açmaktadır. Bir tümör büyümeye başladığında, tümörün besin ve oksijen ihtiyacının karşılanabilmesi için damarlanma ihtiyacı ortaya çıkar. Bu durum hipoksi oluşumuna yol açar ve yeni kan damarlarının oluşumu gerçekleşir. GSC'ler in vivo da kılcal kan damarlarına yakın yerlerde, in vitro da ise endotelial hücrelere yakın yerlerde yer alırlar (225). Bu nedenle GSC metabolizmasının düzenlenmesinde perivasküler niş belirleyici niteliktedir. Bu süreçte özellikle Notch sinyal yolağı önemli rol oynar. Nestin + olan GSC'lerde Notch1 ve Notch2 reseptörleri yüksek oranda eksprese olmaktadır (226). Diğer yandan, endotelial hücrelerde, membrana bağlı Notch ligandları DLL4 ve Jagged-1 eksprese olmaktadır. Beyin mikrovasküler endotelial hücrelerinde bu ligandların yokluğu tümör büyümesinin yavaşlamasına yol açmaktadır (226).

GSC'ler çoğunlukla radyoterapi ve kemoterapiye direnç göstermektedir. Bu hücrelerin, radyoterapi sonucu oluşması beklenen oksidatif DNA hasarlarından korunmaları, mikroçevrelerinin hipoksik koşulları ile açıklanabilmektedir. Bu nedenle, GSC'lerin mikroçevresi, GSC popülasyonunu hedefleyen terapötik yaklaşımlara da yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (209).

2.3.1.1.GSC Progresyonunda miRNA'ların Rolü

miRNA'lar embriyonik kök hücrelerin kontrolünde düzenleyici rol oynamakta ve bu miRNA'ların fonksiyonunda gerçekleşen bozukluklar tümörleşmeye yol açmaktadır (227). Günümüze kadar GSC'lerde miRNA ekspresyon profillerin değerlendirildiği çalışmalarda yalnızca birkaç miRNA CSC oluşumu ile ilişkilendirilebilmiştir. Bu çalışmaların bulgularına göre, GSC regülasyonu ile ilişkilendirilen miRNA'lardan biri miR-34a'dır. Gliomalarda düşük düzeyde ekspresyon gösteren miR-34a'nın c-Met, Notch-1, Notch-2 ve DLL-1 ekspresyonlarını baskıladığı ve CD133+ hücre sayısının azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (228, 229). GSC'de baskılanmış olduğu belirlenen diğer bir miRNA, miR-128'dir. miR-128 ekspresyonu glioma hücre çoğalmasını azaltmaktadır. miR-128, BMI1 3'-UTR bölgesine etki ederek ilgili protein düzeyinde azalmaya ve dolayısıyla histon metilasyonunda, AKT fosforilasyonunda ve p21^{CIP1} seviyesinde azalmaya yol açmaktadır (230, 231). miR-34a ve miR-128'ye ek olarak, miR-326 ve miR-199b-5p'nin de GSC'lerde, Notch yolağını direk olarak etkilediği belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, bu miRNA'lar GSC'lerde sitotoksik bir etki yaratarak metabolik aktivitenin azalmasına ve apoptozisin tetiklenmesine yol açmaktadır (231). Notch sinyal yolağı ile ilişkili olduğu belirlenen miRNA'ların yanı sıra, son dönemde miR-145'in de GSC'lerde, Oct-4, Sox-2 ve CD133 ekspresyonlarını düzenleyerek tümörleşmeyi önlediği belirlenmiştir (232).

GCS'lerdeki miRNA profillerinin belirlenmesine yönelik olarak son dönemde gerçekleştirilen birkaç çalışmaya rağmen, GSC'nin düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'lar ve etki mekanizmaları halen araştırılmaya açık bir konudur. GSC progresyonu ile ilişkili miRNA'ların tanımlanmasının bu miRNA'ları hedefleyen yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir (192).

2.3.1.2.GSC'lerin GBM Hücre Süspansiyonundan Ayrımında Manyetik Ayrım Yöntemi

Magnetik ayırım tekniği, manyetik olarak seçilebilen bir maddenin, bir karışımın içerisinde manyetik çekim gücü kullanılarak ayrılmasına dayanır. GSC'lerin GBM tümör hücre popülasyonundan ayrılabilmesi için bu yöntem kullanılabilir. Bu teknikte, GBM hücre popülasyonundan farklı olarak, GSC'lerde bulunan hücre yüzey antijeni CD133'e özgü antikolar manyetik özellikli nanopartiküllerle kaplanmaktadır. Hücre süspansiyonu kültür kaplarından kaldırıldıktan sonra polystrene özellikli bir tüpe konur ve üzerine manyetik nanopartiküller ile kaplı CD133+ hücrelere özgü antikolar ilave edilir. Antikolar CD133+ hücreleri tanır ve bağlanır. Daha sonra, hücre süspansiyonunun içerisinde bulunduğu tüp bir mıknatıs içerisine alınarak, oluşan manyetik çekim gücü yardımıyla nanopartikül kaplı antikolarca bağlanmış olan CD133+ özellikli hücreler mıknatıs tarafından tutulur. Tüp mıknatıs içerisindeyken, mıknatıs ters çevrilerek, antikolara tutunmayan hücreler ortamdan uzaklaştırılır, tüpte kalan süpernatant kısım CD133+ olan hücreleri içerir (233).

Ayrımı gerçekleştirilen CD133+ hücrelerin saflık derecesinin belirlenebilmesi için akım sitometri tekniği kullanılmaktadır (50). Bu yöntemde, hücrenin flourasan boya ile işaretlenmiş CD133 antikoları ile muamele edilerek, hücre zarının dış yüzünde yer alan CD133 antikolarının bu antijenlere bağlanması sağlanır. Daha sonra, hücre süspansiyonu, bir akım sitometri cihazında, sıvı bir sistem içerisinde tek tek geçirilerek hücre zarı CD133+ olan hücrelerin oranı analiz edilir. Hücreler analiz edilirken bilgisayar sisteminde toplanan veriler farklı grafikler kullanılarak ifade edilirler. FSC/SSC grafiğinde analiz edilmek istenen bölge seçilir ve histogram grafiklerinden yararlanılarak hücrelerde gözlenen flourasan yoğunluğuna göre CD133+'lik oranı belirlenir (234).

2.4. Terapötik Özellikli Bitkiler

Tümör gelişimi ve yayılımından sorumlu olan kanser kök hücreleri (8), günümüz glioblastom tedavisinde kullanılmakta olan büyüme faktörlerini, intrasellüler sinyal yollarını veya invazyon gibi süreçleri inhibe etmeyi hedefleyen ilaçlara karşı direnç

göstermektedir (235, 236). Glioblastoma kök hücrelerinin yok edilebilmesine yönelik ilaç geliştirmeyi amaçlayan çalışma sayısı henüz çok azdır. Bu yönde gerçekleştirilen araştırmalardan biri olan Nakano ve arkadaşlarının (8) çalışmalarında Sinomycin A isimli molekül ile MELK bağımlı yolağın baskılanarak beyin tümörü kök hücrelerinin çoğalmasının ve invazyonunun durdurulduğu ileri sürülmüştür. Ancak, glioblastom tümörlerinin birden fazla büyüme faktörü ve sinyal yolağını kullanarak ilerleyişlerini sürdürebilme yeteneklerinin olması, bu tümörlerin tedavisinde yalnızca bir sinyal yolağını hedef alan moleküllerin kullanılmasının yeterli etkinliği sağlayamayacağını düşündürmektedir (236). Ayrıca glioblastom tümörlerinde günümüzde yaygın olarak kullanılan radyoterapi ile kombine TMZ tedavisi, hasta için oldukça sitotoksik etkilere sahiptir (237, 238). Bu tür sitotoksik etkisi fazla olan tedavi yöntemleri tümörün büyük ölçüde yok edilmesinde etkili olsalar da hasta üzerinde çok sayıda olumsuz yan etkiye sebep olabilmektedirler (239). Etkin bir kanser tedavisinde, hasta üzerinde daha az olumsuz yan etkiye sahip olan (238, 239) ve birden fazla sinyal yolağını hedef alarak kanser kök hücrelerinin ölümüne yol açabilen yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (235, 236).

Son yıllarda çeşitli kanser türlerinde yeni tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında sıklıkla bitkilerden yararlanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü geliştirmekte olan ülkelerde insanların %80'inin bu tedavi yöntemlerini kullandığını belirtmektedir (240). Halk arasında kullanılan bitkisel ürünlerin bilimsel çalışmalar ile etki mekanizmalarının değerlendirilmesi sonucu, vinblastin, vinkristin, topotekan, irinotekan, etoposid ve paklitaksel gibi bitkisel kökenli terapötik ajanlar geliştirilmiş ve tedavi protokollerinde kullanılmaya başlanmıştır (19). Ayrıca, bazı terapötik özelliği belirlenen bitkisel özütlerin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımının, ilgili ajanın daha düşük dozlarda etkin olması sonucu muhtemel sitotoksik yan etkilerde azalmanın sağlandığını ifade eden çalışmalar mevcuttur (20). Fakat kanser kök hücrelerini hedef alarak glioblastomanın tedavisinde etkin olabilecek bitkisel kökenli özütlerin değerlendirildiği herhangi bir çalışma literatürde yer almamaktadır.

Türkiye 9000'i aşkın bitki türü ile dünyanın en zengin florasına sahip ülkelerinden biridir (21, 240). Ülkemizde yetişen bitkilerin birçoğunun terapötik özellikler taşıdığı bilinmektedir (22). Bu bitkilerin büyük çoğunluğu, henüz tıbbi önemleri bilimsel olarak ispatlanmamış olmasına rağmen halk arasında çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (22). Bu bitkilerin, hastalık gelişimi üzerine olan etki mekanizmalarının ve uygun kullanım biçimlerinin modern tekniklerle araştırılması gerekmektedir. Ülkemiz

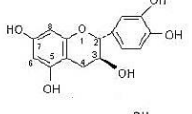
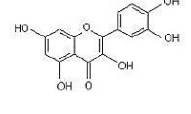
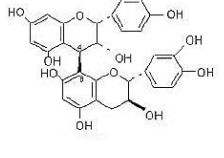
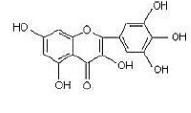
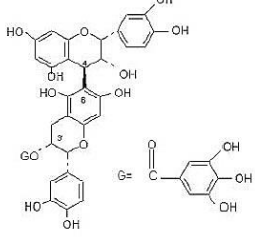
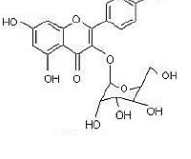
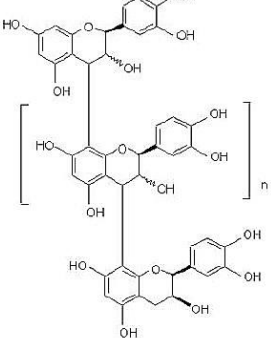
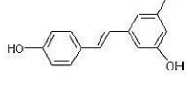
doğal florasında bulunan bitkilerin bazılarının, kanser tedavisinde kullanılabilecek kemoterapötik molekül özelliğindeki etken maddeleri içerdikleri bilinmektedir (241).

2.4.1. *Viscum album* (Ökse otu)

Viscum album L. (Ökse otu), *Loranthaceae* (ökseotugiller) familyasına dahil olup Avrupa, Akdeniz ülkeleri ve Türkiye’de genellikle köknar, çam gibi iğne yapraklı ağaçlar; ahlat, alıç, armut, ayva, elma, kayısı gibi meyva ağaçları; çitlembik, gürgen, ıhlamur, kavak gibi kışın yapraklarını döken ağaçların veya çalılarının üzerinde yetişen yan-parazit bir çalıdır (242). *Viscum album* (VA)’un yapısında lektinler, viskotoksinler, aminoasitler, flavonoidler, fenilpropanoidler, triptenler, fitosteroller, alkaloidler, polialkoller ve polisakkaritler bulunmaktadır (243). Lektinler, protein ya da glikoprotein yapısında olup, hücre yüzeyinde bulunan şekerler kalıntılarına spesifik olarak bağlanabilirler (244). Bu nedenle VA’nın etken maddesinin lektin olduğu düşünülmektedir. VA’dan elde edilen lektinlere, “Ökse otu Aglütini” (VAA) adı verilmektedir (244). Çeşitli çalışmalarda, VAA’nın tümör hücreleri üzerindeki etkisi tanımlanmıştır (245). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda VAA’nın meme, kolon, karaciğer kanserlerinde ve jinekolojik tümörlerde apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir (246 – 248). Ayrıca, günümüze kadar, Iscador, Helikxor, Plenosal, Vysorel gibi VAA içeren birçok ticari preparat kanser tedavisi amacıyla birçok ülkede kullanılmıştır (249 – 251). Literatürde bu bitkinin beyin tümörleri üzerinde etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Zuzak ve arkadaşlarının (252) pediatrik beyin tümörlerinin %20’sini oluşturan medulloblastoma hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, *Viscum album* L.’nin lektin içeriğinin tümör hücrelerinde gözlenen mitokondriye bağımlı apoptoz ile korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, Podlech ve arkadaşları (253) 2012 yılında, ISCADOR adı verilen, VA’nın yaşadığı konakçı bitkiden elde edilen fermente özütlerin LNT-229 ve LN-308 GBM hücre hatları üzerinde anti-tümöral etki gösterdiğini ifade etmişlerdir. Ancak, VA özütünün ya da VAA’nın tek başına, GBM tümörleri üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

2.4.2. *Vitis vinifera* (üzüm)

Vitis vinifera (üzüm), ülkemizin doğal florasında bulunan (254, 255) ve anti-tümöral özelliği birçok kanserde gösterilmiş bir bitki türüdür (256). *Vitis vinifera* çekirdeği özütü (Grape seed extract, GSE), vücudu erken yaşlanma ve hastalıklardan koruyan güçlü bir anti-oksidadır. GSE'nin yapısında, %4-5 oranında flavonoidler (kaempferol-3-O-glucosides, quercetin-3-O-glucosides, quercetin ve myricetin) ve %70 oranında polyphenoller ((+)-catechinler, (-)-epicatechinler, (-)-epicatechin-3-O-gallate, procyanidins dimerleri (B1-B5), procyanidin C1, ve procyanidin B5-3'-gallate) (257, 258) bulunmaktadır. Ayrıca, 3-glucosides, 3-acetylglucosides, 3-coumaroylglucosides, 3-caffeoylglucosides, 3,5-diglucosides, 3-acetyl-5-diglucosides, 3-coumaroyl-5-diglucosides, cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin ve malvidin'in 3-caffeoyl-5-diglucosides türevleri gibi anthocyanidinlerin (259) ve trans-Resveratrol (trans-3,5,40-trihydroxystilbene) gibi stilben türevlerinin de GSE yapısında bulunduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (260, 261) (Şekil-10).

Aktif bileşen	Kimyasal Formülü	Aktif bileşen	Kimyasal Formülü
Polyphenoller		Flavanoidler	
Catechin		Quercetin	
Procyanidin B1		Myricetin	
Procyanidin B3-3'-gallate		Kaempferol-3-O-glucoside	
Proanthocyanidin		Stilben türevleri	
		Trans-resveratrol	

Şekil-10 GSE'nin yapısında bulunan aktif bileşenler (261)

Üzüm çekirdeğinin içerdiği fenollerden en önemlisi proanthocyanidin'dir. Bilimsel çalışmalar proanthocyanidin'in anti-oksidan özelliğinin vitamin E'den 20 kat, vitamin C'den 50 kat fazla olduğunu göstermiştir (256). Zhao ve arkadaşları (258), fareler ile yaptıkları çalışmada GSE'den elde ettikleri procyanidin'in cilt kanseri üzerindeki anti-tümöral etkisini gözlemlemişlerdir. GSE'nin cilt kanserlerinde in vivo olarak gösterilen anti-tümöral etkisi başka tümör tiplerinde de gerek in vitro gerek in vivo koşullarda araştırılmış ve benzer bulgular elde edilmiştir. Kaur ve arkadaşlarının (262) kolon kanseri hücre hattında ve farelerde gerçekleştirdikleri çalışmalarında GSE'nin hücre çoğalmasını durdurduğu ve cip/P21 seviyesini düşürerek hücrelerin apoptozise gitmesine yol açtığı saptanmıştır. Agarwall ve arkadaşları (263) da içeriğinde çok yoğun miktarda procyanidin bulunduran GSE'nin prostat kanseri hücre hattında kaspaz aktivasyonunu ve mitokondri zarından sitokrom-c salınımını tetikleyerek apoptotik mekanizmayı aktive ettiğini

açıklamışlardır. Tüm bu bulguların yanı sıra literatürde GSE'nin başka kematerapötik ajanlar ile birlikte kullanımından daha efektif sonuçlar elde edildiğini belirten makaleler de mevcuttur. Meme kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmanın bulguları bu özütün doza bağlı olarak doxorubicin ile birlikte kullanımının hücre büyümesini % 16-72 oranında baskıladığı, %9-33 oranında ise hücre ölümünün gerçekleştiğini ortaya koymuştur (264). Ancak, GSE'nin tek başına, GSC üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

2.4.3. *Olea europaea* (Zeytin)

Olea europaea (Zeytin), ağacının yaprakları (*Olea europaea* leaf extract, OLE), sahip olduğu anti-oksidan özelliği nedeniyle, Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde birçok hastalığın tedavisinde geleneksel bir ilaç olarak kullanılmaktadır. OLE, sahip olduğu fenolik bileşenler nedeniyle, zeytin ağacının diğer bölgelerine göre daha yüksek anti-oksidan aktiviteye sahiptir. OLE'nin yapısında beş farklı grup fenolik bileşen bulunmaktadır (265, 266). Bunlar oleuropeosidler (oleuropein ve verbascoside), flavonlar (luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside, diosmetin-7-glucoside, luteolin, and diosmetin), flavonlar (rutin), flavan-3-ols (catechin) ve fenoller (tyrosol, hydroxytyrosol, vanillin, vanillic acid, and caffeic acid)'tir. OLE'nin yapısında en bol miktarda bulunan bileşen Oleuropein'dir (267). Zeytinyağındaki oleuropein miktarı yaklaşık %0.005 ile %0.12 arasında iken, bu oran OLE'de %1 ile %4 arasındadır. Bunu hydroxytyrosol, luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside ve verbascoside takip etmektedir. Hydroxytyrosol, oleuropeinin prokürsörüdür. Verbascoside ise hydroxytyrosol and caffeic acid'in glukozidlerine konjuge olmaktadır. Bu bileşenlerin kimyasal yapıları Şekil-11'de gösterilmektedir (268).

Fenolik bileşer	Kimyasal formül
Oleuropein	
Hydroxytyrosol	
Verbascoside	
Apigenin-7-glucoside	
Luteolin-7-glucoside	

Şekil-11 OLE'nin yapısında bulunan fenolik bileşenlerin kimyasal yapıları (268, 269)

OLE ile yapılan araştırmalar, birçok kanserde oleuropeinin anti-proliferatif ve apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bartoli ve arkadaşları (270) sıçanlarda yaptıkları çalışmalarında oleuropeinin kolon tümörlerini, Stark ve arkadaşları (271) ise meme kanseri gelişimini baskıladığını gözlemişlerdir. Son çalışmalar, oleuropeinin MCF-7 insan meme tümör hücre hatlarındaki çoğalmayı aktin filamentlerini etkilemeleri sebebiyle önlediklerini göstermiştir (272, 273). Oleuropein'in yanı sıra, zeytin yaprağında bulunan maslinik asit, oleanolik asit gibi pentasiklik triptertenlerin de güçlü anti-tümöral özelliklere sahip olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Reyes ve arkadaşları (274) OLE'de bulunan maslinik asitin kolon kanseri hücre hatları olan HT29 ve Caco-2 hücrelerinde anti-proliferatif ve proapoptotik etkisi olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışmalar, Maslinik asitin kaspaz-3 aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu yoluyla apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini ortaya koymaktadır (275). Ayrıca, Tunca ve arkadaşlarının (276) gerçekleştirdiği çalışmada OLE'nin GBM hücre hattı T98G üzerindeki anti-kanserojen etkisi belirlenmiştir. Ancak, bu etkinin moleküler mekanizması

ve OLE'nin kök hücre özellikli glioblastom tümörleri üzerindeki etkinliği henüz bilinmemektedir.

2.4.4. *Ficus carica* (incir)

Ficus carica L. (incir), *Moraceae* (dutgiller) ailesine ait bir bitkidir (277). Ülkemiz dünya incir üretiminin yaklaşık % 25'ini karşılamakta ve bu konuda ilk sırada yer almaktadır (278). İlk olarak 1952 yılında, meme ve deri tümörleri üzerinde gerçekleştirilen iki ayrı çalışma ile *Ficus carica* lateksinin (FCL) anti-tümöral aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur (279, 280). 49 yıl aradan sonra, 2001 yılında Rubnow ve arkadaşları (281) FCL'nin, Burkitt B hücre lenfoması, T-hücre lösemisi, prostat kanseri ve meme kanseri gibi hücre hatlarında doza bağlı olarak hücre çoğalmasını % 46 ile 66 arasında değişen oranlarda baskıladığını açıklamışlardır. 2003 yılında papillomatöz tipte cilt tümörü bulunan sığırlarda gerçekleştirilen bir çalışmada, tümöre her 5 günde bir FCL uygulanması sonucu 30 gün içerisinde tümörün tamamen kaybolduğu belirlenmiştir (282). 2011 yılında Hashemi ve arkadaşları (283), FCL'nin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda mide kanseri hücre hattında anti-proliferatif etki gösterdiğini açıklamışlardır. FCL'den farklı yöntemler ile hazırlanan ekstraktlarda gerçekleştirilen HPLC analizleri, FCL'nin yapısında Caffeic asit, 3,4-Dihydroxybenzoic acid, p-OH-Phenylacetic acid, p-Coumaric acid, Luteolin, N-argenine ve yüksek oranda Ferulic acid olduğunu göstermiştir (284). Bunun yanı sıra, FCL'nin anti-tümöral etkisinin, yapısında bulunan 6-O-acyl- β -D-glucosyl- β -sitositerol etken maddesinden kaynaklandığı düşünülmekle (281) beraber bu konuda yapılan çalışmalar çok yetersizdir. Bu etkinin moleküler mekanizması da henüz bilinmemektedir. Halk arasında siğil gibi cilt problemlerinin tedavisinde de yaygın olarak kullanılan (285) bu lateksin glioblastom tümörleri üzerindeki etkisini araştıran herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır.

2.4.5. Bitki Özütlерinin Etken Maddelerinin Belirlenmesine Yönelik Yöntemler

2.4.5.1. Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle spektrometreleri (MS), yüklü partikülleri manyetik ya da elektriksel bir alandan geçerken kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırarak analiz eden bir cihazdır (286). Normal koşullarda moleküller nötr halde bulunmaktadırlar ve stabildirler. Ancak MS analizinde iyonizasyon işlemi gerçekleştirilerek bu molekülleri yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil olmadığından, diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettiklerinde fragmentlerine parçalanırlar ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir fragment spesifik bir moleküler kütle ve yüke sahiptir. Bu nedenle, MS analizi sonucunda m/z değerine bağlı olarak oluşan bir spektrum elde edilir. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır. MS analizinde her bileşimin oluşturduğu spektrum kendine özeldir. Bu nedenle, içeriği yeterince araştırılmamış bitkisel özütlerin yapısında bulunan moleküller, MS analizinden elde edilen spektrumun referans spektrumları ile karşılaştırılması sonucunda tanımlanabilmektedirler (286 – 288).

2.4.5.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC/DAD)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), en yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir. Kromatografik yöntemler, durgun ve hareketli fazlar arasında kütle transferini kapsayan ayırma teknikleri olarak tanımlanırlar. HPLC; bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı hareketli fazı kullanmaktadır. Bu bileşenler ilk olarak çözücüde çözünürleştirilmekte ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanmaktadırlar (289). Durgun faz ve ayırma prosesine göre, iyon değişim kromatografisi, dağılma kromatografisi, affinite kromatografisi ve adsorbsiyon kromatografisi olmak üzere dört farklı tipte HPLC yöntemi bulunmaktadır. Bu kromatografi tiplerinden en yaygın kullanılanı dağılma kromatografisidir. Dağılma

kromatografisi, sıvı-sıvı ve bağlı-faz kromatografisi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. Bu teknikler arasındaki tek fark, destek katısına durgun fazın tutunmasına dayanmaktadır. Sıvı-sıvı kromatografide, sıvı bir durgun faz dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tutunmuştur. Ancak, bu kromatografide zamanla durgun faz hareketli fazda çözünerek kaybolduğundan destek katısının periyodik olarak kaplanması gerekmektedir. Bu nedenle bağlı-faz kromatografisi son dönemde daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır. HPLC'nin kantitatif analizi, analit pikinin yüksekliğinin ya da alanının bir ya da daha fazla standardı ile kıyaslanmasına dayanmaktadır. Düzlemsel kromatografide ayrılmış maddelerin kapladığı alan analitik parametre olarak işlev görür. Koşullar düzgün bir şekilde kontrol edilebilirse, bu parametreler derişimle doğrusal olarak değişmektedir (289).

2.4.6. Bitki Özütlerinin, Tümör Hücrelerinin Canlılığı Ve Çoğalabilme Yetenekleri Üzerindeki Etkisini Ölçmeye Yönelik Testler

Erişkin bir insan vücudunda beş trilyondan fazla hücre bulunmaktadır. Çeşitli doku ve organları oluşturan bu hücreler, normalde kararlı bir denge içerisindeyler. Ancak kanser vakalarında bu denge bozularak hücre çoğalmasında artış ve hücre ölümünde azalma gözlenmektedir (290). Apoptosis, otofaji, nekrozis ve mitotik katastrof bu güne kadar tanımlanmış, morfolojik olarak farklı özellikler gösteren dört ana hücre ölüm tipidir (Tablo-9). Ayrıca, hücre büyümesinin kalıcı olarak durdurulması "senescence" olarak adlandırılan hücre yaşlanması da kanser tedavisinde bir hücre ölüm yolağı olarak değerlendirilmektedir (291). Bu hücre ölüm yolaklarından iki tanesi, apoptoz ve otofaji, genetik mekanizma ile kontrol edilen programlı hücre ölüm tipleridir (292, 293). Programlanmış hücre ölümleri hücre bileşenlerinin parçalanması ve çevredeki diğer hücreler tarafından yutulması ile sonuçlanmaktadır. Çok hücreli ökaryotik organizmalarda normal gelişim sürecindeki doku farklılaşması, normal hücre dokularının tamiri ve bakımı bu hücre ölüm tipleri ile gerçekleşmektedir. Nekrozis ve mitotik katastrof ise hücre intiharında pasif role sahiptirler. Ancak, son dönemde edinilen bulgular bu ölüm tiplerinin de genetik olarak kontrol edilebileceğini düşündürmektedir (294 – 296). Senescence hücre yaşlanmasındaki en etkin mekanizma olup, telomeraz boyunun kısalması ve tümör baskılayıcı sinyal yolaklarının aktifleşmesine sebep olan bir genetik kontrol mekanizması ile gerçekleşmektedir (297). Son dönemde, apoptozis, otofaji, nekrozis, mitotik katastrof ve

senescence'e ek olarak başka ölüm modelleri de tanımlanmıştır. Bunlar kaspazdan bağımsız apoptozis, nekroptozis, parapitozis ve yavaş hücre ölümüdür. Bu hücre ölüm yollarının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ana hücre ölüm yollarından farklılık göstermektedir (298).

Tablo-9 Hücre ölüm yollarının morfolojik özellikleri (292, 293)

Morfolojik değişimler	Apoptozis	Otofaji	Nekrozis	Senescence	Mitotik katastrof
Hücre zarı	Şişme, Hücre zarı bütünlüğü korunur	Şişme	Hücre zarının bütünlüğü bozulur	Hücre zarının düzleşmesi, Hücre boyutunda büyüme	?
Nukleus	Kromatin kondensasyonu DNA fragmentasyonu Nuklear fragmentasyon	Kısmi kromatin kondensasyonu DNA fragmentasyonu görülmez	Rastgele DNA parçalanması	Heterokromatin bölgelerde artış	Sitokinez sırasında kromozomların hatalı ayrımı
Sitoplazma	Zarla kaplı hücresel fragmentler Hücre iskeletinin depolimerasyonu	Otofajik veziküllerde artış Golgi, poliribozom ve ER'nin degradasyonu	Hücresel organellerde şişme	Granülleşme	?

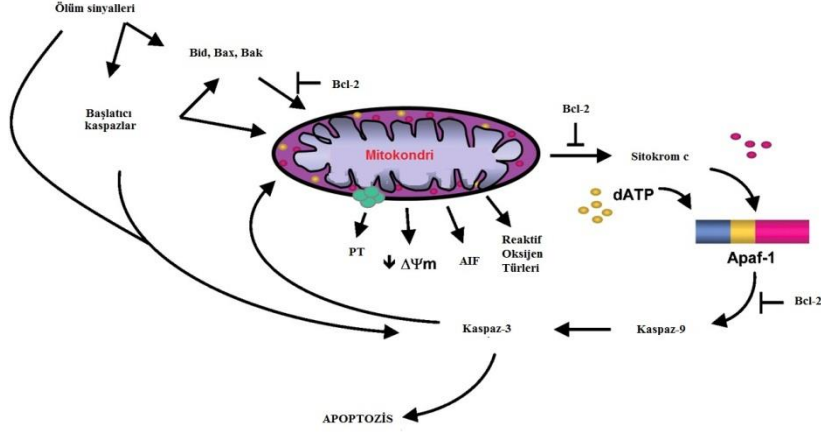
Apoptozis, hücre zarının kabarması (blebbing), hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu ve nukleosomal fragmentasyon ile karakterize olan bir programlı hücre ölüm tipidir. Normal koşullarda apoptozis geçiren hücreler, makrofajların varlığı ile veya fraksiyonlara ayrılmış kısımları ile tanınmaktadır. Kanser hücrelerinin kemoterapi ile tedavisinde hedef alınan ana mekanizma apoptozis mekanizması ve apoptozisi düzenlenemede rol oynayan sinyal yollarıdır (299).

Apoptotik hücre ölümüne yol açan birbirinden bağımsız iki sinyal yolağı bulunmaktadır. Bunlar, hücre içi sinyal yolağı, diğer adıyla mitokondri bağımlı sinyal yolağı ve hücre dışı sinyal yolağıdır (292, 300, 301). DNA hasarı, yüksek oranda reaktif oksijen türlerinin varlığı, viral enfeksiyonlar ve onkogen aktivasyonu gibi hücre içi stres sinyalleri genellikle hücre içi sinyal yolağı ile hücre ölümüne yol açarken, ekstrasellüler ligandın plazma zarındaki reseptörüne bağlanması, hücre dışı sinyal yolağını başlatmaktadır. Hem hücre içi hem de hücre dışı sinyal yolları, hücre organellerin ve iskeletin parçalanmasına yol açacak olan kaspaz adı verilen proteolitik enzimlerin aktifleşmesinde rol oynarlar. Kaspazlar, aspartik asit içeren motifleri parçalamakta rol

oyunayan nükleik sistein rezidüleri içeren bir protein ailesidir (302). Bu proteinler aktif prokürsörler olarak eksprese olurlar ve başlatıcı kesim işleminden sonra aktif oligomerler haline dönüşürler. Başlatıcı (kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz 10) ve efektör (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) olmak üzere 2 grup kaspaz bulunmaktadır. Başlatıcı kaspazlar otokatalitik aktivasyon yeteneğine sahip iken, efektör kaspazlar bir başlatıcı kaspas tarafından aktifleştirilmeye ihtiyaç duymaktadırlar.

Hücre içi ölüm sinyalizasyonunda Bcl-2 gen ailesi düzenleyici rol oynamaktadır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşmaktadır. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozisi indükleyici etkiye sahipken diğeri anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı etkiye sahiptir. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan hidrofobik cep ve amfipatik a-heliks yapısına bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturmaktadır. Amfipatik a-heliks ise BH3 bölgesinde yer almaktadır. Bcl-2 ailesi üyeleri, hidrofobik cep sayesinde bir diğeri bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanmaktadır. Pro-apoptotik üyeler, her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (ör: Bax, Bak) veya sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (ör: Bid, Bad, Bim) oluşurken, anti-apoptotik üyelerde (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, Bcl-w ve Bfl-1/A1) ayrıca BH4 bölgesi bulunmaktadır (303, 304).

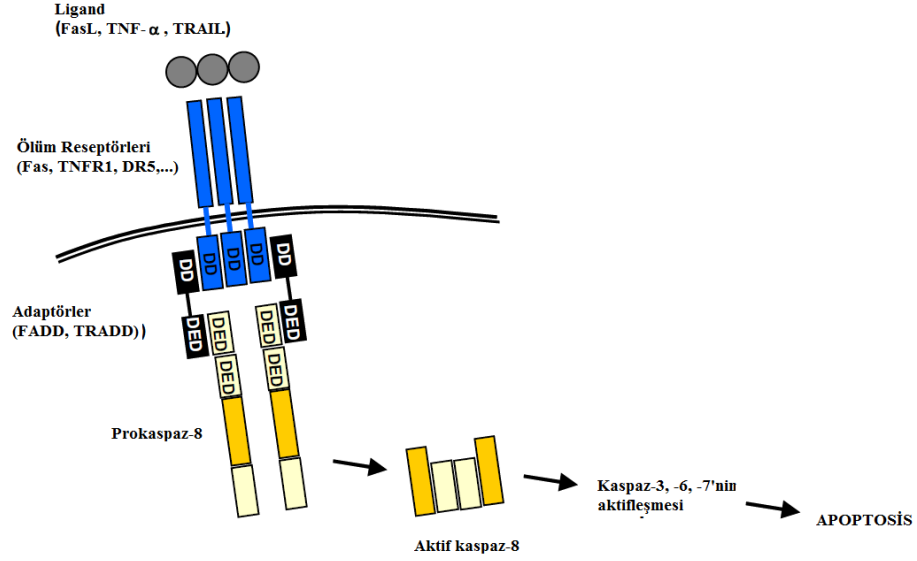
Hücre içi sinyal yolağında, Bcl-2 ailesi üyelerinden Bax ve Bak mitokondrinin dış zarında oligomerize olarak mitokondri dış zarının permeabilizasyonunun (MOMP)'u değiştirmekte ve mitokondriden, sitokrom c, Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 salınımına yol açmaktadır. Sitokrom c mitokondriden salındığında apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanmaktadır. Apaf-1 de, prokaspaz-9'un aktifleşerek kaspaz-9'a dönüşmesini sağlamaktadır. Aktifleşmiş kaspaz-9 ise sırasıyla kaspaz-3 -kaspaz 7 kaskadını aktifleştirmekte ve hücre içi substratların yıkımı gerçekleşmektedir (Şekil-12). IAP ailesi proteinleri olan X-bağımlı IAP (XIAP), c-IAP1 ve c-IAP2, kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'un aktivitesini baskılamakta iş görürler. Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 ise IAPların kaspaz aktivasyonunu baskılamalarını önlemektedirler (305 – 307).



Şekil-12 Hücre içi sinyal yolağı (308)

Antiapoptotik Bcl-2 proteinleri, Bax ve Bak oligomerizasyonunu ve BH3 içeren proteinlerle bağlantısını bloke ederek MOMP'u önlerler (301). BH3 içeren proteinlerin ölüm sinyalini ortaya çıkarabilmeleri için aktifleşmeleri gerekmektedir. Bu durum ya p53'ün transkripsiyonel kontrolü ile ya da post transkripsiyonel olaylarla gerçekleşmektedir (309, 310).

Hücre dışı sinyal yolağı ise tümör nekroz faktör (TNF) ve TNF reseptör (TNFR) ailelerinin üyeleri tarafından aktiflenmektedir (311). Birçok TNF ailesi üyesi, reseptörlerine bağlanarak proinflamator cevapla ilişkili sinyallerin oluşmasına yol açarlar. TNF ailesinin apoptozisi indükleyen ligandları FasL (CD95) ve TNF receptor apoptosis-inducing ligand (TRAIL veya Apo2L)'dir (312, 313). Hücre dışı ligandı, TNFR'nin sitoplazmik ucuna bağlandığında, başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8 ve kaspaz 10, Fas-associated death domain-containing protein (FADD) adaptör proteini ile bir araya gelerek ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC)'ni oluşturmaktadır (314, 315). Kaspaz 8 ve kaspaz 10'un DISC'te yer alması otoproteolitik kesimin başlamasına yol açmaktadır (316, 317) (Şekil-13). Kaspaz 8/10 aktivitesi yüksek homoloji gösterdikleri FADD-like interleukin-1-converting enzyme inhibitory protein (FLIP) ile durdurulabilmektedir.



Şekil-13 Reseptör bağımlı kaspaz aktifleşmesi (318)

Başlatıcı kaspazların hücrede apoptozisi başlatma şekline göre hücreler tip I ve tip II olarak sınıflandırılmaktadır. Tip I hücrelerde kaspaz 8/10 tarafından efektör kaspazların aktivasyonu apoptozisin indüklenmesi için yeterli iken, tip II hücrelerde kaspaz 8/10 aktivasyonu mitokondriyal faktörlerinin salınımını etkinleştirmektedir. Bu hücrelerde dış sinyal yolağı ile iç sinyal yolağı arasında bağlantı BH3 içeren protein Bid tarafından sağlanmaktadır. Bid'in kaspaz-8 tarafından kesime uğraması ve yapısına yeni bir glisin eklenmesi sonucu tBid oluşmakta ve mitokondri zarında Bax ve Bak oligomerizasyonunu tetiklemektedir (319, 320).

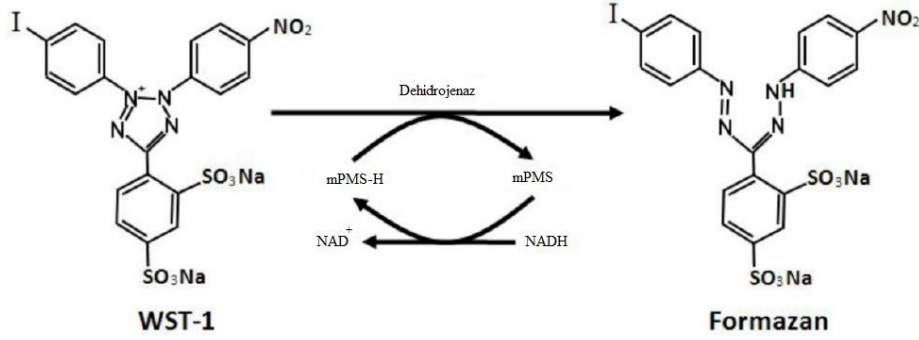
2.4.6.1. İn-vitro Yöntemler

Hücre canlılığının ölçümü, hücre kültüründe sağlıklı hücrelerin analizinde kullanılan en temel yöntemdir. Hücre canlılığını ölçmeye yönelik tripan mavisi analizi, resazurin temelli teknikler, DNA'da radyoaktif işaretli ^3H -timidin ölçümü ve çeşitli tetrazolium tuzlarının indirgenmesi gibi 10'dan fazla teknik bulunmaktadır (321, 322). Tripan mavisi ve resazurin temelli metotlar hücre canlılığının ölçümünde kullanılan en eski tekniklerdir (323). ^3H -timidin yöntemi ise, radyoaktif madde kullanımına rağmen kullanılmaya devam edilen diğer bir klasik tekniktir. Son dönemde, hücre canlılık durumu,

hücrelere tetrazolium tuzları eklenerek, hücrelerin mitokondrilerine bağımlı metabolik aktivitelerinin kolorimetrik olarak ölçülmesi ile analiz edilmeye başlanmıştır (324). Bu yöntemler, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5 diphenyltetrazolium bromide), XTT (2,3-bis(2- methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-carboxanilide- 2H-tetrazolium), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy- methoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) ve WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4- disulphophenyl)-2H-tetrazolium)'dir. MTT analizi, hücre metabolizmasının ölçülmesinde en yaygın kullanılan tekniklerden birisidir. Bu teknikte, MTT muamelesinden sonra, hücrede suda çözünemeyen yoğun renkli formazan kristalleri oluşur (325). Ancak, MTT tekniği hücrelerin parçalanmasını ve oluşan formazanın açığa çıkarılmasını gerektirmektedir. Bu analiz 570nm'de yaklaşık 44-52 saat boyunca ölçülmesini gerektirmektedir (326, 327). MTT'den sonra geliştirilen ikinci yöntem olan XTT analizinde mitokondri aktivitesine bağılı olarak, tetrazolium tuzları suda çözünebilir formazan türevlerine dönüşür ve 430-490nm aralığında absorbe edilir (328). MTS, tetrazolium tuzunun absorbans aralığı 515–580 nm'dir ve bu tekniğin renk ölçüm hızı XTT'ye göre hızlıdır (329). En son geliştirilen teknik olan WST-1 yönteminde ise, mPMS (1-methoxy-5-methyl-phenazinium methyl sulfate) gibi elektron akseptörlerinin varlığında, hücresel dehidrojenazlar aracılığı ile tetrazolium tuzları, suda yüksek oranda çözülebilen formazan kristalleri oluşturmaktadırlar (330). WST-1 tarafından oluşturulan formazan ürünleri XTT ve MTS'ye göre suda daha fazla çözünürler bu da daha geniş bir linear aralıkta doğruluk oranı daha yüksek olan veriler elde edilmesini sağlamaktadır (331).

2.4.6.1.1. WST-1 Analizi

WST-1, yapısında açık kırmızı renkli tetrazolium tuzları bulunduran bir bileşiktir. Canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimi tetrazolyum tuzlarını koyu kırmızı renkteki formazan kristallerine dönüştürmektedir. Hücreler WST-1 ile muamele edildiğinde, canlı hücre sayısındaki artışa bağılı olarak hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesinde de artış olur ve daha fazla formazan kristali oluşur. Koyu kırmızı renkteki formazan kristallerindeki artış, metabolik olarak aktif hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Şekil-14).



Şekil-14 WST-1 reaksiyonunun mekanizması (331)

WST-1 analizi 96 kuyulu hücre kültür kaplarında gerçekleştirilir. Hücre kültür kabının her bir kuyusuna 2×10^5 hücre ekilir ve 24 saat sonunda hücreler, etkisi araştırılan bitki özütünün çeşitli dozları ile muamele edilir. Uygun inkübasyon süreleri sonunda, kültüre edilen hücelere WST-1 solüsyonu eklenir. Hücreler, WST-1 ile muamele edildikten sonra Eliza cihazında 420-680nm dalga boylarında okuma gerçekleştirilir. Analiz sonucunda hücreler üzerinde etkin olan bitkisel özüt dozunun belirlenebilmesi için hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği bilinen H_2O_2 vb. madde pozitif kontrol olarak, hücrelerin büyütüldüğü kültür medyumunu da negatif kontrol olarak kullanılır. Analiz sonucunda örneklerden ve kontrollerden elde edilen absorbans değerleri ile aşağıdaki formülden yararlanılarak bitkisel özütlerin hücreler üzerinde yol açtığı % inhibisyon oranı hesaplanır (276).

$$\text{inhibisyon (\%)} = \left(1 - \frac{\text{örnek absorbansı}}{\text{pozitif kontrol absorbansı}}\right) \times 100$$

2.4.6.1.2. Anneksin V Analizi

Apoptozisin en erken belirtilerinden birisi plazma zarında asitmerinin kaybıdır. Normal hücrelerde hücre zarının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS), apoptozisin erken evrelerinde hücre zarının dış yüzeyine transloke olmaktadır. Bu nedenle apoptotik hücrelerde PS, hücre zarının dış yüzeyinde yer almaktadır.

Anneksin V, 35-36kDa büyüklüğünde Ca^{2+} bağımlı ve fosfolipid bağlama yeteneğine sahip bir protein olup, PS'ye yüksek affinite göstermektedir (332 – 334). Apoptotik hücrelerde Anneksin V, PS'yi tanıyıp bağlanırken aynı zamanda florasan

özelliikli bir antikora da bağlanabilmekte, böylece, akım sitometrik yöntem ile apoptoz geçirmekte olan hücrelerin belirlenmesine olanak sağlamaktadır.

Hücrelerde erken ya da geç apoptotik ölümün tanımlanabilmesi için Anneksin V, çoğunlukla propidium Iyodur (PI) gibi vital bir boya ile birlikte kullanılmaktadır. PI, nüklear materyali boyama yeteneğine sahip bir boyadır. Normal ya da erken apoptozisteki hücreler, hücre zarı bütünlükleri korunduğundan PI'yi içlerine almazlar ve boyanma gerçekleşmez. Ancak hücreler geç apoptoziste ise ya da zar bütünlüğü bozulacak şekilde hasar görerek nekroz gibi bir yolla ölüm gerçekleştiyse hücreler PI ile boyanırlar. Bu nedenle, canlı hücreler Anneksin V ve PI'nin her ikisi ile de boyanmazken, erken apoptozisteki hücreler yalnızca Anneksin V ile, geç apoptozisteki hücreler ve nekrotik hücreler ise hem Anneksin V hem de PI ile boyanmaktadır (332 – 334).

2.4.6.1.3. TUNEL Analizi

Apoptotik hücrelerin morfolojik olarak ayırdedilebilen diğer bir özelliği DNA fragmentasyonudur (335, 336). Erken apoptozis sırasında endonükleotik degradasyon nedeniyle jel elektroforezinde de gözlenebilen, 300kb ve 50 kb'lık geniş fragmentler oluşmaktadır (337 – 339). Daha sonra DNA, nukleosomlar arasındaki bağlayıcı bölgelerden degradasyona uğrayarak 180bp'lik daha küçük fragmentleri oluşturmakta ve jel elektroforezinde DNA markır görüntüsüne yol açmaktadır (340).

Apoptoziste gerçekleşen DNA fragmentasyonunu analiz etmenin diğer bir yolu da “terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling” (TUNEL) yöntemidir (302). Bu yöntemde, endonükleotik degradasyon sonucu oluşan DNA kırıkları, digoksinin adı verilen modifiye nükleotidlerle terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) tarafından enzimatik olarak işaretlenmektedir. Daha sonra, DNA kırıklarına eklenen digoksinin nükleotidi, florasana boya ile işaretlenmiş anti-digoksinin antikoru ile konjuge edilerek, kırık DNA uçları florasana mikroskopta görülebilir hale getirilmektedir (341). Apoptotik hücrelerin nukleus ve apoptotik cisimlerinde çok sayıda DNA 3'-OH kırık ucu bulunduğundan florasana mikroskobunda inceleme yapıldığında, bu hücreler florasana işaretli olarak gözlenmektedir, ancak, normal veya proliferen olan hücrelerin nukleusunda yeterli sayıda 3'-OH ucu bulunmayacağından TUNEL boyama da

gerçekleşmemektedir. Bu sayede, apoptotik hücrelerin toplam hücre popülasyonuna oranı hakkında bilgi edinilebilmektedir (341).

2.4.6.2.Ex-vivo Yöntemler

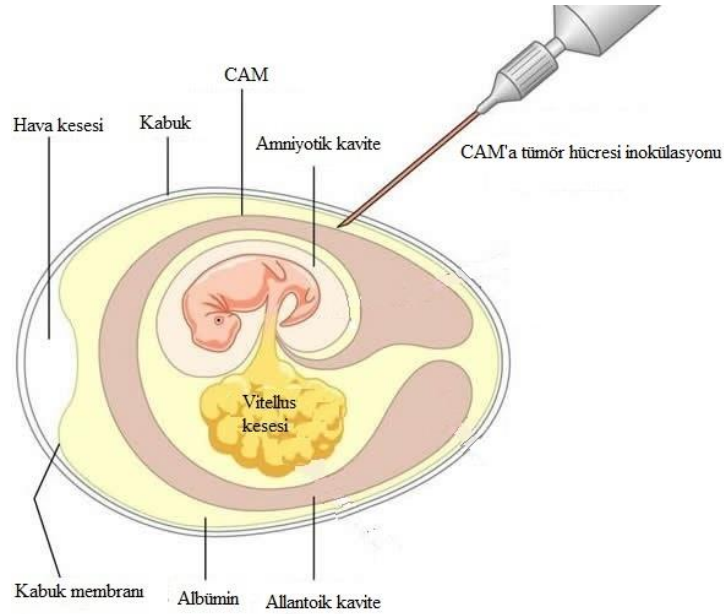
Potansiyel terapötik ilaç olma potansiyeline sahip olan maddelerin in-vivo deneylerle araştırılabilmesi amacıyla çoğunlukla tümör fare modelleri kullanılmaktadır. Ancak hayvan modelleri ile yapılan deneyler oldukça yüksek maliyetli olup veri elde etmesi uzun zaman alan araştırmalardır. İn-vivo hayvan modellerine alternatif olan, ex-vivo bir model olarak embriyolu tavuk yumurtası korioallantoik zar (CAM) analizi, son dönemde kolon, prostat kanserleri ve beyin tümörleri gibi birçok kanser türünde daha kısa sürede ve daha az maliyetli olarak potansiyel ilaç adaylarının tümör anjiogenezi ve invazyonu üzerine etkisinin araştırılmasına olanak sağlamaktadır (342).

2.4.6.2.1. Tavuk Korioallantoik Zar (CAM) Analizi

Erken evredeki tavuk yumurtaları, anjiogenez ve tümör çalışmaları için in vitro ve in vivo arasında bir çalışma ortamı sağlamaktadır. Tavuk embriolarının lenf sistemi 10. güne kadar yeterince gelişmediği için, immundefisit bir ortama sahiptirler ve insan da dahil olmak üzere bir çok türe ait kültüre hücrelerin gelişebilmeleri için iyi bir ortam oluşturmaktadırlar (342).

CAM, gelişmekte olan tavuk embriosunun gaz alışverişini gerçekleştirmesini sağlayan ekstraembriyonik bir zarıdır. Allantoik keseye ait duvarın bir parçası olan CAM, allantoik keseden sodyum ve klor'un ve yumurta kabuğundan kalsiyumun embriyonik damarlara aktif olarak taşınmasında iş gören ekstraembriyonik kılcal damarları desteklemektedir (343). CAM, tavuk embriosu gelişiminin 11–12. günlerine kadar yoğun bir kılcal damar ağına sahiptir ve anjiogenez uyarılara hızlı cevap vermektedir. Bu nedenle birçok analizden yalnızca 3 ile 5 gün içerisinde sonuç alınabilmektedir. Bu nedenle CAM analizi, ex-vivo ortamda anjiogenez, madde transportu, gaz değişimi, tümör gelişimi ve toksisite araştırmalarının gerçekleştirilmesi için kullanışlı ve hızlı bir tekniktir (344).

Terapötik bitki özütlerinin CAM analizi ile araştırılabilmesi için, civciv embriyo gelişiminin 7. gününde aseptik koşullarda yumurta kabuğu üzerinde küçük bir pencere açılır ve korioallantoik zara ulaşılır (345). Zar üzerinde orta büyüklükteki damar dallanma noktası üzerine, tümör hücre süspansiyonları inoküle edilir. Yumurtalarda açılan pencere selo bant ile kapatıldıktan sonra yine aynı kuluçka koşullarında inkübasyona bırakılır. Tümör inakülasyonundan sonra tümör gelişimine bağlı olarak, tümör dokusu 10 gün boyunca terapötik bitki özütü ile muamele edilir. Deney sonunda tümör dokusu zarla beraber uzaklaştırılır ve petri kabına yerleştirilir. Daha sonra tümör dokusu zardan disekte edilip tartılarak bitki özütünün tümör gelişimi üzerine etkisi değerlendirilir (345, 346). Embriyolu tavuk yumurtasının kısımları ve CAM inokulasyonu Şekil-15'te gösterilmektedir.



Şekil-15 Tavuk yumurtasının kısımları ve CAM inokulasyonu (347)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Aletler

- -86°C derin dondurucu (NUVE)
- -20°C derin dondurucu (BOSCH)
- +4 °C buzdolabı (ALASKA)
- Sıvı nitrojen tankı (THERMO SCIENTIFIC)
- Laminer kabin (SCANLAF)
- Santrijüf (NUVE)
- CO₂'li inkübatör (HERAEUS)
- İnvirt mikroskop (LABOMED)
- Işık mikroskobu (OLYMPUS)
- Floresan mikroskobu (NIKON)
- Tissue lyser (QIAGEN)
- Nano Drop (THERMO)
- Soğutmalı santrifüj (HERMLE)
- UV kabin (BIOSAN)
- LC480II-RT-PCR (ROCHE)
- Termal Cycluser PCR (TECHNE)
- Yatık jel elektroforezi (BIORAD)
- UV Jel Görüntüleme Sistemi (VILBER LOURMAT)
- Vorteks (VELP SCIENTIFICA)
- Flow Cytometry (BECTON, DICKINSON and COMPANY)

- ELISA okuyucu (SUNRISE)
- 1200 HPLC (AGILENT)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- DMEM with 4.5 g/L Glucose, with L-glutamine, without sodium pyruvate (500 mL) (LONZA)
- Research grade fetal bovine serum, South American Origin (500mL) (HYCLONE)
- Antibiyotik-antimitotik solution (100mL) (PAA)
- Trypsin- EDTA Solution (%0,25, sterile filtered, bioreagent, suitable for cell culture, 2,5gr porcine trypsin and 0,2g EDTA4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red (100mL) (LONZA)
- L-Glutamin (200mM) (100mL) (HYCLONE)
- Sodium pyruvate solution (100mM) (100ml) (LONZA)
- PBS (500mL) (HYCLONE)
- Heparin (10mg) (FISHER SCIENTIFIC)
- Recombinant human fibroblast growth factor (50µg) (BIOLOGICAL INDUSTRIES)
- B27 serum free supplement liquid (50X) (INVITROGEN)
- Human Epidermal Growth Factor (50ng/mL) (BIOLOGICAL INDUSTRIES)
- Leukemia Inhibitor Factor (mouse) 1.000.000 U (MILLIPORE)
- WST_1 (25ml) (ROCHE)
- CD133/2 (293C3)-PE, human (1mL) (MILTENYI)
- Mouse IgG2b-PE (1mL) (MILTENYI)
- Mouse (MOPC-21) mAb IgG1 Isotypecontrol (Alexa Fluor® 647Conjugate) (BECTON, DICKINSON and COMPANY)
- Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Nestin, (50 test) (BECTON, DICKINSON and COMPANY)
- Human PE, 10e9 cells (EASYSEP)
- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (100 test) (BECTON, DICKINSON and COMPANY)

- Apoptag Plus Fluorescein Kit (MILLIPORE)
- RNA izolasyon kiti (Taze doku ve hücre hattından izolasyona uygun) (200 reaksiyon) (ROCHE)
- Real time ready catalog assay (100 reaksiyon) (QIAGEN)
- PCR Master Mix, 5x1mL (QIAGEN)
- MicroRNA Single Assay (200 reaksiyon) (QIAGEN)
- Syber Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (1000 reaksiyon) (QIAGEN)
- PathScan Multiplex Western Coctail II: Phospho-p90RSK, Phospho-p53, Phospho p38-MAPK and Phospho-S6 Ribosomal Protein Detection Kit (7110S) (CELL SIGNALING)
- Protease Inhibitor Coctail Kit (20 tablet) (ROCHE)
- 4-20% Precise Protein Gels, 12-Well, 10gels (BIORAD)
- Nitrocellulose Membrane-0,45um, (7x 8,5cm) 20/pack cat: 162-0214 (BIORAD)
- CL-Xposure Film 8x10 (20x25 cm) 100 sheets (ROCHE)
- M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (25 mL) (PI-78503) (THERMO SCIENTIFIC)
- Metanol %99.9 HPLC grade (2.5L) (MERCK)
- Etanol %99.9 HPLC grade (2.5L) (MERCK)
- Etil asetat %99.9 HPLC grade (4L) (MERCK)
- Kloroform %99.9 HPLC grade (2.5L) (MERCK)
- n-hekzan %99.9 HPLC grade (2.5L) (MERCK)
- Propan 2-ol %99.9 HPLC grade (2.5L) (MERCK)
- 101769 Petroleum ether (5L) (MERCK)
- Sephadex® LH-20 LH20100 (100gr) (SIGMA)
- Silica gel 60 (230-400µm) (1kg) (MERCK)
- 102450 Chloroform-D1 (25mL) (MERCK)
- 103424 Dimethyle sulfoxide-D6 (25ml) (MERCK)
- Catechin Derivatives Kit (EXTSYNTHESE)
- Oleuropein (SIGMA)
- Temozolomid (SIGMA)

3.2.Yöntem

3.2.1. Tez Projesinde Değerlendirilecek Bitki Özütlerinin Hazırlanması

3.2.1.1. *Viscum album* (ökse otu) Özütünün (VA) Hazırlanması

Viscum Album (VA), stabilitesi ve mikrobiyolojik saflığı kontrol edilmiş olarak Kale Naturel (Edremit, Balıkesir)'den ücretsiz olarak temin edildi. İlgili firma tarafından, Balıkesir, Edremit bölgesinde Meşe ağacı üzerinde büyüyen VA yaprak, kök ve meyveleri şubat ayında toplandı ve kurutuldu. Kuruyan yaprak, kök ve meyveler ezilerek distile suda yıkandı. Yıkama işleminden sonra 16 saat boyunca +4°C'de mikserde karıştırılarak homojen hale getirildi. Daha sonra, elde edilen VA çözeltisi 7500 xg'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen supernatan 0.9 - 0.45 µm genişliğinde porlara sahip filtrelerden geçirildi ve metanol içerisinde çözüldü. Tez projesi kapsamında gerçekleştirilen tüm analizlerde VA özütü metanol içerisinde çözünerek dilue edildi.

3.2.1.2. *Vitis vinifera* (üzüm) Çekirdeği Özütünün (GSE) Hazırlanması

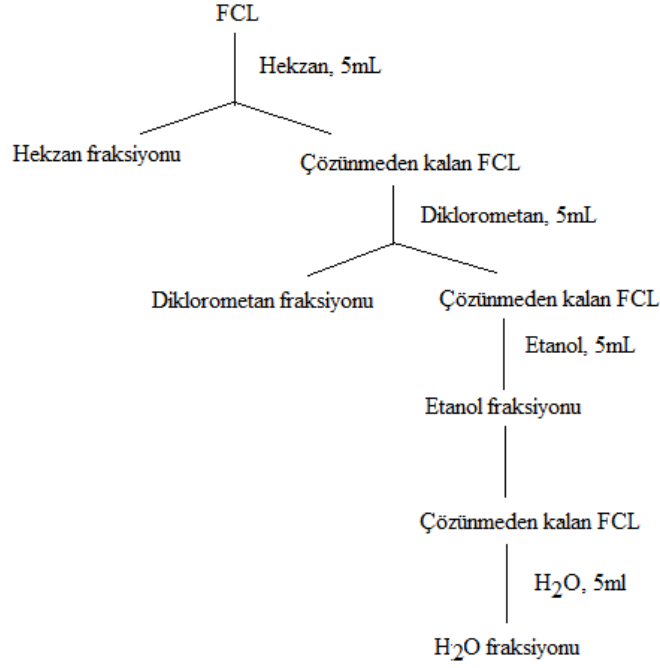
GSE (10-00014-00014-3), 66.7 mg/g proanthocyanidin içeriği, stabilitesi ve mikrobiyolojik saflığı kontrol edilerek standart olarak hazırlandı ve Kale Naturel (Edremit, Balıkesir)'den ücretsiz olarak temin edildi. İlgili firma tarafından, *Vitis vinifera* cv, türünün çekirdekleri Balıkesir, Edremit bölgesinden toplanarak 1 hafta açık havada kurutuldu ve lipidlerin uzaklaştırılabilmesi için partikül büyüklüğü <0.4 mm olacak şekilde değirmende parçalandı. Öğütülmüş üzüm çekirdekleri dört defa 70°C'de 200mL etil asetat içerisinde çözüldü. *Vitis vinifera*'nın etken maddesi olan proanthocyanidin'in bozulmasını önlemek için etanol ekstresinin etanolü Spray Dryer sisteminde alçak basınçta ve düşük ısıda uçurularak, özüt toz haline getirildi. Tez projesi kapsamında gerçekleştirilen tüm analizlerde liyofilize olarak temin edilen GSE dH₂O içerisinde çözünerek taze olarak hazırlandı.

3.2.1.3. *Olea europaea* (zeytin) Yaprağı Özütünün (OLE) Hazırlanması

OLE (05.06.2007,10-00014-00015-0), %15 oleuropein içeriği, stabilitesi ve mikrobiyolojik saflığı kontrol edilerek standart olarak hazırlandı ve Kale Naturel (Edremit, Balıkesir)'den ücretsiz olarak temin edildi. İlgili firma tarafından *Olea europaea* cv türünün yaprakları, Balıkesir, Edremit bölgesinden budama mevsimi olan Şubat ayında budanan dallardan toplanıp yıkanarak, gölgede kurutuldu. Böylece, *Olea europaea* ilk filizlerini Şubat ayında verdiği için budanan dalların pestisit ve herbisit gibi araştırmamızın sonuçlarını olumsuz etkileyecek kimyasal maddeler içermeye ihtimali ortadan kaldırıldı. Bir ay boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında kurutulan yapraklar daha sonra bitki değirmeninde toz edilerek %80 etanolde oda sıcaklığında bekletildi. *Olea europaea*'nın etken maddesi olan oleuropeinin bozulmasını önlemek için, etanol ekstresinin etanolü Spray Dryer sisteminde alçak basınçta ve 55°C'yi geçmeyen düşük ısıda uçurularak, özüt toz haline getirildi. Tez projesi kapsamında gerçekleştirilen tüm analizlerde liyofilize olarak temin edilen OLE, dH₂O içerisinde çözünerek taze olarak hazırlandı.

3.2.1.4. *Ficus carica* (incir) Sütünün (FCL) Hazırlanması

Kale Naturel' den hazır olarak temin edilen FCL'den 60mL alınarak, içeriğinde bulunan organik çözücü 70°C'deki su banyosunda uçuruldu. Kalan madde 3 mL hekzan içerisinde ultrasonik banyoda çözüldü. Üst kısım alındı ve dipte kalan kısımda bulunan hekzan 70°C'deki su banyosunda uçuruldu. Üzerine 3mL diklorometan eklenerek ultrasonik banyoda çözüldü. Diklorometanda çözünen üst kısım alınarak dipte kalan kısımda kalan çözücü 70°C'deki su banyosunda uçuruldu. Kalan pelletin üzerine 3 mL metanol eklenerek ultrasonik banyoda çözüldü. Metanolde çözüne kısım alınarak dipte kalan kısımda kalan çözücü 70°C'deki su banyosunda uçuruldu. Kalan pelletin üzerine 3 mL etil alkol eklenerek ultrasonik banyoda çözüldü. Böylece FCL'nin içeriğinde bulunan tüm fenolik maddelerin polar yapılarına göre uygun organik çözücü içerisinde çözünmesi sağlandı (Şekil-16).



Şekil-16 FCL'nin sulu fraksiyonunun hazırlanışı

3.2.2. Tez Projesinde Değerlendirilecek Bitki Özütlelerinin İçeriklerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. LC/MS

Bitkisel özütlelerin içeriğindeki maddelerin tayini TÜBİTAK-BUTAL'den hizmet alımı yapılarak, LC-MS analizi ile gerçekleştirildi.

3.2.2.2. HPLC/DAD

Bitkisel özütlelerin içeriğindeki fenolik bileşenlerin miktar tayini Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya AD öğretim üyeleri Prof.Dr. Cevdet DEMİR ve Doç.Dr. Saliha ŞAHİN tarafından, Analitik Kimya Labotaruvarında, HPLC-DAD (Agilent 1200 HPLC, Waldbronn, Almanya) ile yapıldı. HPLC ile analizinde her bir bileşiğin ayrılması, 0-10 dk % 13B, 10-20 dk % 41.5B, 20-25 dk % 70B, ve 25-35 dk %10B olmak üzere toplam 35

dk'lık analiz süresinde, XBridge C18 (4.6×250 mm, 3.5 µm; Elstree, İngiltere) kolonu ve %1 suda çözünmüş formik asit (çözücü A) ve asetonitril (çözücü B) (Merck, Darmstadt, Almanya)'den oluşan bir hareketli faz kullanılarak gerçekleştirildi. Kolonlar her bir analizden 10 dk önce 25°C'de kalibre edildi. Analizler, 0.5mL/dk'lık kolondan akış hızı ve 10 µL'lik enjeksiyon hacminde gerçekleştirildi. Veri toplanması için Chemstation for LC (Agilent) kullanıldı. Oleuropein (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), ve protococatechuic acid (Merck, Darmstadt, Germany) 280 nm, caffeic acid, ferulic acid ve p-coumaric acid (Merck, Darmstadt, Germany) 320 nm ve quercetin (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 360nm dalga boyunda görüntülendi. Fenolik bileşiklerden elde edilen pikler, standartların alıkonma süreleri ve UV spektraları ile karşılaştırılarak tanımlandı.

3.2.3. İn-vitro Analizler

3.2.3.1. Tez Projesinde Değerlendirilecek Bitki Özütlerinin ve TMZ'nin Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Hatlarında Denenmesi

Bitki özütlerinin ve TMZ'nin anti-proliferatif etkileri, MGMT geni unmetile olan ve TMZ'ye direnç gösteren U-138MG, MGMT geni heterozigot metile olan ve TMZ'ye direnç gösteren T98G ve MGMT geni metile olan ve TMZ'ye hassasiyet gösteren U-87MG hücre hatlarında araştırıldı.

3.2.3.1.1. Hücre Kültür Koşulları

T98G, U-138MG ve U-87MG hücreleri, % 10 oranında fetal bovine serum (FBS), % 1 Antibiotic/Antimycotic solution, 2 mM L-glutamin ve 1 mM sodium pyruvate içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 (DMEM-F12)'dan oluşan besiyeri ortamında, 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ oranı sağlayan inkübatörde 2X10⁶ hücre sayısına ulaşıncaya dek üretildi.

3.2.3.1.2.Uygulanan Dozlar

3.2.3.1.2.1.WST-1

Hücre hatları 96 kuyulu kültür kaplarına, her bir kuyuda 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek, Tablo-10 – 14’te belirtildiği şekilde hazırlanan özütler ve TMZ dozları ile 24 ve 48 saat süresince muamele edildi. Hücrelerin özüt ve TMZ muamelesi sonundaki hücre çoğalması oranları WST-1 analizi ile araştırıldı.

Tablo-10 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerine uygulanan VA konsantrasyonları

	konsantrasyon	Besiyeri (μ l)	Özüt(μ l)
1	15 ng/ml	992,5	7,5
2	30 ng/ml	985	15
3	50 ng/ml	975	25
4	60 ng/ml	970	30
5	70 ng/ml	965	35
6	80 ng/ml	960	40
7	90 ng/ml	955	45
8	100 ng/ml	950	50
9	250 ng/ml	875	125
10	500 ng/ml	750	250
11	30 mM H ₂ O ₂	999	1
12	Besiyeri	1000	-

Tablo-11 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerine uygulanan GSE konsantrasyonları

ANA STOK (AS): 0.5 mg/µl

1. Çalışma solüsyonu : 200 µl AS + 800 µl dH₂O ⇒ 0.1 mg / 1µl ⇒ 100 µg / 1µl

2. Çalışma solüsyonu : 20 µl AS + 980 µl dH₂O ⇒ 10 µg / 1µl

3. Çalışma solüsyonu : 2 µl AS + 998 µl dH₂O ⇒ 1 µg / 1µl

	Konsantrasyon	Besiyeri (µl) (10 kuyu için)	Eklenecek özüt solüsyonu	Eklenecek özüt miktarı (µl)
1	2 mg/ ml	996	AS (1 mg/µl)	4
2	1 mg/ ml	998	AS (1 mg/µl)	2
3	500 µg/ml	995	1. Çal. Sol. (100 µg / 1µl)	5
4	250 µg/ml	997,5	1. Çal. Sol. (100 µg / 1µl)	2.5
5	100 µg/ml	999	1. Çal. Sol. (100 µg / 1µl)	1
6	50 µg/ml	995	2. Çal. Sol. (10 µg / 1µl)	5
7	5 µg / ml	995	3. Çal. Sol. (1 µg / 1µl)	5
8	30 mM H ₂ O ₂	999	H ₂ O ₂	0.33
9	Besiyeri	1000	-	-

Tablo-12 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerine uygulanan OLE konsantrasyonları

ANA STOK (AS) konsantrasyonu: 1 gr/ml = 1 mg/μl

1. Çalışma solüsyonu : 100 μl AS + 900 μl dH₂O ⇒ 0.1 mg/μl ⇒ 100 μg/μl

2. Çalışma solüsyonu : 10 μl AS + 990 μl dH₂O ⇒ 10 μg/μl

3. Çalışma solüsyonu : 1 μl AS + 999 μl dH₂O ⇒ 1 μg/μl

	Konsantrasyon	Besiyeri (μl) (10 kuyu için)	Eklenecek özüt solüsyonu	Eklenecek özüt miktarı (μl)
1	3 mg/ ml	997	AS (1 mg/μl)	3
2	2 mg/ ml	998	AS (1 mg/μl)	2
3	1 mg/ ml	999	AS (1 mg/μl)	1
4	500 μg/ml	995	1. Çal. Sol. (100 μg / 1μl)	5
5	250 μg/ml	997,5	1. Çal. Sol. (100 μg / 1μl)	2.5
6	100 μg/ml	999	1. Çal. Sol. (100 μg / 1μl)	1
7	50 μg/ml	995	2. Çal. Sol. (10 μg / 1μl)	5
8	30 μg / ml	997	2. Çal. Sol. (10 μg / 1μl)	3
9	10 μg / ml	999	2. Çal. Sol. (10 μg / 1μl)	1
10	5 μg / ml	995	3. Çal. Sol. (1 μg / 1μl)	5
11	30mM H ₂ O ₂	999	H ₂ O ₂	0.33
12	Su	1000	-	-

Tablo-13 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerine uygulanan FCL konsantrasyonları

Konsantrasyon	Besiyeri (μl)	Özüt (μl)
0,125mg/ml	855	45
0,25mg/ml	910	90
0,5mg/ml	720	180
1mg/ml	540	360
1,5mg/ml	360	540
2mg/ml	180	720

Tablo-14 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerine uygulanan TMZ konsantrasyonları

	Uygulanan dozlar	TMZ (μ l)	Besiyeri (μ l)
1	300mM	1,5	1000
2	325mM	1,625	1000
3	350mM	1,75	1000
4	400mM	2	1000
5	450mM	2,25	1000
6	500mM	2,5	1000
7	30mM H ₂ O ₂	1	1000
8	Besiyeri	-	1000

WST-1 analizinin gerçekleştirilebilmesi için, 96 kuyulu kaplarda kültüre edilen hücrelerin 24 ve 48 saat süresince farklı dozlardaki bitki özütleri ile muamelesini takiben, her bir kuyuya 10 μ l WST-1 solüsyonu eklendi. Hücreler 30 dakika süre ile 37°C'de % 5 CO₂'lik etüvde inkübe edildi ve inkübasyon süresi sonunda, kültür kabındaki canlı ve ölü hücre sayıları eliza yöntemi ile 420-680 nm dalga boylarında okutularak belirlendi. Deneyle, uygulanan her bir doz için en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.3.1.2.2. Lenfosit Hücrelerinde Hücre Canlılığı Analizi

3.2.3.1.2.2.1. Lenfosit İzolasyonu

15 ml'lik falkona 3 mL Ficoll konularak kan üzerine yavaşça yayıldı. Oda ısısında 1200 xg'de 20 dk santrifüj yapıldı. Lenfositler bir pipet yardımıyla başka bir falkona alındı ve üzerlerine 5 mL kadar PBS eklendi. Oda sıcaklığında 300 xg'de 10 dk santrifüj edilerek hücreler yıkandı ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Son yıkama işleminden sonra hücreler % 10 FBS içeren DMEM F-12 besiyerine ekildi.

3.2.3.1.2.2.2. Tripan Mavisi Testi

1 mL'de bulunan canlı lenfosit sayısını tayin etmek için, lenfosit süspansiyonlarından alınan 5 µL örnek 5 µL Tripan mavisi ile karıştırıldı. Boyayı içine almamış ve şişmemiş lenfositler canlı olarak nitelendirilerek Thoma lamında 16 büyük kare 40x'lik büyütme altında sayıldı.

3.2.3.2.Bitki Özütlерinin Hangi Yolla Anti-Proliferatif Etki Gösterdiğinin Araştırılması

3.2.3.2.1.Annexin V Analizi

Bu analiz için 25cm²'lik hücre kültür flasklarına 1X10⁶ T98G, U-138MG ve U-87MG hücreleri ekildi ve etkin olduğu belirlenen OLE, GSE ve FCL dozları ile 24 ve 48 saat süreyle muamele edildi. İnkübasyon süreleri sonunda, besiyerindeki ölü hücreler toplandı. Zeminde yapışık olan hücreler ise % 0.05 Tripsin ile kaldırıldı. Flaskın zemininden kaldırılan ve besiyerinden toplanan hücreler bir araya getirildi. Daha sonra, hücreler soğuk PBS ile yıkandı ve 1X Binding buffer ile konsantrasyonları 1X10⁵ hücre/100 µl'ye ayarlandı. Elde edilen hücre solüsyonundan 12x75 mm'lik polystrene bir tüpe alındı ve 5'er µl Annexin V ve PI eklendi. Hücreler 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1X Binding buffer eklendi ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarında Doç.Dr. Ferah BUDAK rehberliğinde FACSCanto akım sitometri (BD Sciences) cihazında ölçüm yapıldı.

Yapılan akım sitometrik ölçüm sonucunda PI pozitif, Annexin V negatif olan hücreler nekrotik, PI negatif, Annexin V negatif olan hücreler canlı, PI pozitif, Annexin V pozitif olan hücreler geç apoptotik ve PI negatif, Annexin V pozitif olan hücreler erken apoptotik hücreler olarak değerlendirildi.

3.2.3.2.2.TUNEL Analizi

5cm'lik, 4 kuyulu hücre kültür lamlarına, 1×10^5 T98G, U-138MG ve U-87MG hücreleri ekildi ve etkin olduğu belirlenen OLE, GSE ve FCL dozları ile 24 ve 48 saat süreyle muamele edildi. İnkübasyon süreleri sonunda, besiyerindeki ölü hücreler toplandı ve pH 7,4 olan % 1 paraformaldehit (PFD) içeren PBS solüsyonu ile karıştırıldı. Lam üzerinde yapışık halde bulunan hücreler, oluşturulan ölü hücre ve % 1 PFD karışımı ile 10 dk süre ile oda sıcaklığında muamele edildi ve 5dk süresince PBS ile yıkandı. Böylece canlı ve ölü hücrelerin lam üzerinde birlikte fikse olmaları sağlandı. Daha sonra hücreler, 5 dk süreyle -20°C 'de soğutulmuş 2:1 oranında Etanol: Asetik asit ile muamele edilerek ikinci bir fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. 5dk'lık ikinci bir PBS ile yıkama işleminin ardından lamdaki her bir kuyuda fikse olan hücreler 13 μl dengeleme solüsyonu ile muamele edildi ve hemen ardından 3:7 oranında TdT ve reaksiyon çözeltisi içeren TdT enzim solüsyonu ile muamele edilerek 37°C 'de 1 saat CO_2 'li inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 15 saniye boyunca 1: 34 oranında dH_2O ile dilüe edilmiş durdurma/yıkama çözeltisi ile yıkandı ve yeniden 10dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından hücreler 3 defa PBS ile yıkanarak 13 μl oda sıcaklığındaki Anti-Digoksinin konjugat ile muamele edildi ve 30 dk CO_2 'li inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda lamlar 4 defa PBS ile yıkandı ve Propidium İyodür ile boyanarak üzerlerine lamel kapatıldı. Hazırlanan preparatlar -20°C 'de saklanarak 1 gün içerisinde florasan mikroskopunda değerlendirildi. Yapılan inceleme sonucunda kırmızı renk gözlenen hücreler canlı, yeşil renkli gözlenenler ise apoptotik olarak değerlendirildi.

3.2.3.3.Hücre Hatlarında Etkili Olduğu Belirlenen Bitki Özütlerinin Primer Tümörlerde Etkilerinin İncelenmesi

3.2.3.3.1.Hasta Grubu ve Klinik Özellikler

Tez çalışmasına yeni tanı konmuş, radyoterapi ve kemoterapi almamış, cerrahi müdahalenin uygulandığı ve genetik çalışmalar ile ilgili açıklamaları içeren gönüllü olur formu ile bilgilendirilerek onayları alınmış 20 primer glioblastoma hastası dahil edildi. (Hastaların projeye dahil edilebilmesi için gerekli olan etik kurul onayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 06.09.2011 tarihli ve 2011-17/07 nolu kararı ile alındı). Tezin gerçekleştirileceği glioblastoma hastalarının tümör dokularına ait örnekler Nöroşirürji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet Bekar, Doç. Dr. Hasan Kocaeli ve Yrd. Doç. Dr. Mevlüt Özgür Taşkapılıoğlu'nun sorumluluğunda gerçekleştirilen beyin tümörü operasyonlarından elde edildi. Çalışma grubuna dahil edilen hastaların klinik özellikleri Tablo-15'te belirtildi.

Tablo-15 Çalışmaya dahil edilen tümörlerinin klinik ve histopatolojik özellikleri.

Vaka no	Tümör tipi	Lokalizasyon	WHO grade	GFAP	Ki67	p53 (%)	IDH1(R132H) mutasyonu	Tanı yaşı	Sağkalım (ay)
1	GBM	sol paryetal	4	+	60/1000	0	-	48	1
2	GBM	sol frontal	4	+	300/1000	0	-	59	7
3	GBM	sol talamik	4	+	300/1000	50	-	58	5
4	GBM	sol frontal	4	+	350/1000	50	-	73	14
5	GBM	sol oksipital	4	+	bilinmiyor	1	-	70	23*
6	GBM	sağ talamik	4	+	700/1000	0	-	64	17
7	GBM	sağ frontal	4	+	200/1000	20	-	71	3
8	GBM	sol frontal	4	+	270/1000	60	-	64	6
9	GBM	sol paryetal bölge	4	+	200/1000	60	-	50	14
10	GBM	sol paryetooksipital	4	+	350/1000	80	-	55	4
11	GBM	sol frontoparyetal	4	+	120/1000	80	-	59	8*
12	GBM	sağ parietal	4	+	600/1000	40	-	48	2
13	GBM	frontotemporal	4	+	300/1000	10	-	61	9*
14	GBM	sağ frontal	4	+	250/1000	60	-	63	9*
15	GBM	sol temporal	4	+	200/1000	20	-	62	10*
16	GBM	sağ frontal	4	+	250/1000	50	-	50	12
17	GBM	sol temporal	4	+	bilinmiyor	0	-	63	13
18	GBM	sağ frontoparyetal	4	+	300/1000	30	-	71	14
19	GBM	paryetal	4	+	200/1000	30	-	69	15*
20	GBM	sağ frontal	4	+	200/1000	10	-	67	16

* Takip süresi sonunda hayatta olan hastalar

3.2.3.3.2. Primer Hücre Kültürü

Cerrahi müdahale sırasında hastalardan çıkartılan glioblastoma tümörlerinin bir kısmı % 5 antibiyotik içeren PBS içerisinde Tıbbi Biyoloji AD Hücre Kültürü Laboratuvarına ulaştırıldı. Burada doku örnekleri % 2 antibiyotik içeren PBS içerisine aktararak birkaç defa yıkandıktan sonra bistüri ve pensler yardımı ile iğne başı kadar küçük parçalara ayrılarak 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına aktarıldı. Üzerlerine besiyeri ilave edilen hücreler 7 gün boyunca yerleri değiştirilmeden kültüre edildi. 7. günde kültür kapları inverted mikroskop altında kontrol edilerek primer kültür kaplarının besiyeri

değiştirildi. Hücreler, 175 cm²'lik flaskaları dolduracak kadar çoğaltıldı ve dondurularak -80°C'de saklandı.

3.2.3.3.3. Primer Tümörlerin Kök Hücre İçerip İçermediğinin Belirlenmesi

Dondurup kaldırılan hücreler çözündürüldü ve 7 gün boyunca yerleri değiştirilmeden 25cm²'lik flaskalarda kültüre edildi. 7. günde kültür kapları inverted mikroskop altında kontrol edilerek primer kültür kaplarının besiyeri serumdan yoksun, 5 µg/ml Heparin, 50 ng/ml Epidermal growth factor, 20ng/ml Fibroblast growth factor, % 2 B27, 10 ng/ml Leukemia inhibitör factor ve %1 Antibiotic/Antimycotic solution içeren DMEM F12 besiyeri ile değiştirildi. Hücreler kültür kabını kaplayacak kadar çoğaldığında, tripsin uygulanarak kaldırılan hücreler daha büyük flaska pasajlanarak 1X10⁷ hücreye ulaşana dek çoğaltıldı. Serumsuz medyum içerisinde 1X10⁷ hücreye ulaşabilen flaskalardan glioblastom kök hücrelerine özgü yüzey antijeni olan CD133'ün varlığı ile kanser kök hücrelerin ayrımı sağlandı.

3.2.3.3.3.1. Manyetik Ayrım

Primer kültürde çoğaltılan hücreler tripsin uygulanarak kültür kaplarından kaldırıldı ve 12x75mm'lik polystrene bir tüpe kondu. Tüpe alınan hücre süspansiyonu üzerine CD133+ hücrelere özgü pozitif seleksiyon kokteyli ilave edildi. 15 dk'lık inkübasyon süresi sonunda, hücre-monoklonal antikor karışımı üzerine magnetik nanopartiküller ilave edildi. Tüp içeriği nazıkçe karıştırıldıktan sonra tüp mıknatıs içerisine alındı. Süpernatant atıldığında, tüpte kalan kısımdan CD133+ olan hücreler elde edildi. İşlem 3 kez tekrarlandı. Elde edilen CD133+ hücreler kültür kabına ekilerek çoğaltıldı.

3.2.3.3.3.2.Akım Sitometrik Analizler

3.2.3.3.3.2.1.CD133 Pozitifliğinin Kontrolü

Magnetik ayırım ile elde edilen GBM kök hücreleri kök hücre besiyerinde 1×10^6 hücreye ulaşana dek çoğaltıldı. Daha sonra hücreler % 0.025 tripsin uygulanarak hücre kültür kabının zemininden toplandı ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'dan yoksun PBS ile dilue edildi. Hücreler anti-10 μ L CD133 antikoru (CD133/2 (293C3)-PE Human monoclonal IgG1; 1:10; Miltenyi Biotec) veya Mouse IgG2b-PE isotype control antibody (Miltenyi Biotec) ile 30 dk süresince boyandı. İnkübasyon süresi sonunda hücreler Cell WASH (BD, Erembedegem, Belgium) ile yıkandı ve CD133+ olan hücreler Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarında, Doç.Dr. Ferah BUDAK rehberliğinde FACSCanto akım sitometri cihazında (Becton Dickinson, San Jose, CA) değerlendirildi.

3.2.3.3.3.2.2.Nestin Pozitifliğinin Kontrolü

Kanser kök hücrelerdeki Nestin ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi için hücreler Permeabilizing Solution 2 (BD, USA) ile 10 dk oda sıcaklığında fikse edildi. Daha sonra % 4 PFD içeren PBS ile 4°C'de 20 dk süreyle muamele edilerek yıkama solüsyonu Cell WASH (BD) ile 2 defa yıkandı. Daha sonra, hücreler Nestin antikoru (Alexa flour 647 mouse anti-Nestin; BD) veya IgG1 isotype control (Alexa (R) 488) Mouse mAb (BD) ile muamele edildi. 30 dk'lık inkübasyon süresi sonunda hücreler Cell WASH (BD) ile yıkandı ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarında, Doç.Dr. Ferah BUDAK rehberliğinde FACSCanto akım sitometri cihazında (Becton Dickinson, San Jose, CA) değerlendirildi.

3.2.3.3.3.3.Gen Ekspresyon Analizleri

3.2.3.3.3.3.1.RNA İzolasyonu

Hücre kültür flaskında çoğaltılan hücrelerden tripsinizasyon işlemi ile zeminden toplanarak High Pure RNA Isolation Kit (Roche) prosedürüne uygun şekilde Total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Buna göre, 200 µL PBS içerisinde bulunan hücrelere 400 µL parçalama ve bağlanma solüsyonu eklendi ve karışım filtreli tüplere aktarıldı. 15 sn 9000 xg'de santrifüj gerçekleştirilerek altta kalan kısım atıldı. Daha sonra filtreli tüplerin üzerine 90 µl DNase inkübasyon çözeltisi ve 10 µL DNase 1 eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda filtreler birer defa 500'er µL 1. ve 2. yıkama solüsyonları ile yıkandı. Her bir yıkama işleminin sonunda filtreli tüpler en yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi. Daha sonra yıkama işlemi 200 µL 2. yıkama solüsyonu ile tekrarlanarak 2 dk en yüksek hızda santrifüj edildi. Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra filtreli tüpler temiz birer 1,5 ml'lik reaksiyon tüpünün içerisine alınarak üzerlerine 50 µL sulandırma solüsyonu eklendi ve 9000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. Böylece santrifüj işlemi sonucunda filtereden süzülen kısımdan RNA eldesi gerçekleştirildi.

Gen ekspresyon düzeylerindeki pozitiflik oranının belirlenebilmesi için 5 adet epilepsi hastasından alınan sağlıklı dokudan da aynı kit yöntemi kullanılarak Total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen tüm RNA'ların kalite kontrolleri ve 260/280 nm dalga boyundaki optik dansiteleri Nanodrop 2000 spectrophotometer'da kontrol edildi.

3.2.3.3.3.3.2.cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezlemek amacıyla Protoscript® First Strand cDNA Synthesis Kit (Biolabs) kullanıldı. Uygulanan kit prosedürüne göre cDNA sentezi için iki farklı karışım hazırlandı (Tablo-16). cDNA çevrimi için 1. basamakta hazırlanan PCR karışımı 70°C'de 5 dk inkübe edilerek buza alındı ve üzerine 2. basamakta hazırlanan karışım eklendi. Oluşan karışım 42°C'de 1 saat ve 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen 20 µl hacimdeki cDNA, 50 µl nukleaz-free su ile dilue edildi.

Tablo-16 RNA'dan cDNA sentezlemek amacıyla kullanılan PCR karışımı

PCR karışımı	Hacim/reaksiyon
1. basamak	
Total RNA	(1 ng–2 µg)
Primer dT23VN	2 µL
dNTP	4 µL
Nükleaz free su	16 µL
2. basamak	
1. basamakta hazırlanan karışım	16 µL
10X RT Buffer	2 µL
RNase Inhibitor	1 µL
M-MuLV Reverse Transcriptase	1 µL
Toplam hacim	20 µL

3.2.3.3.3.3.Ekspresyon Analizi

mRNA ekspresyon analizi için total RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı. Deneyin gerçekleştirilmesi için syber green ile işaretleme yöntemine dayalı QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) kullanıldı. RT- PCR reaksiyonu LC480-II (Roche)'da gerçekleştirildi. Uygulanan RT-PCR karışımı ve PCR koşulları Tablo-17 ve Tablo-18'de verildi.

Tablo-17 mRNA ekspresyon analizi için uygulanan RT-PCR karışımı

PCR karışımı	Hacim/reaksiyon	Son konsantrasyon
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	25 µL	1X
Primer	1 µL	1µM
QuantiTect RT Mix	0.5 µL	
cDNA	12 µL	500ng/ reaksiyon
Rnase-free su	11.5 µL	
Toplam hacim	50µL	

Tablo-18 mRNA ekspresyon analizi için uygulanan RT-PCR koşulları

Basamak	Döngü sayısı	Süre	Isı
Başlangıç inaktivasyon			
basamağı	1	15 dk	95°C
Amplifikasyon basamağı			
-Denatürasyon	45	15 sn	94°C
-Bağlanma		30 sn	55°C
-Uzama		30 sn	72°C

RT-PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen veriler “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) web tabanlı programı kullanılarak $\Delta\Delta C_T$ metodu ile değerlendirildi.

3.2.3.3.4. Primer Tümörlerin *MGMT* Metilasyonu Açısından Değerlendirilmesi

3.2.3.3.4.1. DNA İzolasyonu

Operasyon sırasında alınan GBM tümör dokularından QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) prosedürüne uygun şekilde DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Buna göre, 25mg doku parçası mekanik olarak parçalanarak küçük parçalara ayrıldı. 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpüne konan doku parçalarının üzerine 180 µL ATL solüsyonu ve 20 µL Proteinaz K kondu ve 56°C’de 3 saat bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda mikrosantrifüj

tüpüne 4 µL RNase A (100mg/mL) eklendi ve oda sıcaklığında 2 dk bekletildi. Daha sonra 200 µL AL solüsyonu eklendi ve dokular 10 dk 70°C’de bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir mikrosantrifüj tüpüne 200 µl % 96 etanol eklendi ve elde edilen karışım kit içeriğinde bulunan filtreli tüpe aktarıldı. 6000 xg’de 1 dk santrifüj gerçekleştirilerek altta kalan kısım atıldı. Filtreler 500 µl AW1 yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 6000 xg’de 1dk santrifüj edildi. Daha sonra yıkama işlemi 500 µl AW2 yıkama solüsyonu ile tekrarlanarak 3 dk en yüksek hızda santrifüj edildi. Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra filtreli tüpler temiz birer 1,5 ml’lik reaksiyon tüpünün içerisine alınarak üzerlerine 200 µl sulandırma solüsyonu eklendi ve 6000 xg’de 1 dk santrifüj edildi. Böylece santrifüj işlemi sonucunda filtereden süzülen kısımdan DNA eldesi gerçekleştirildi. Elde edilen tüm DNA’ların kalite kontrolleri ve 260/280 nm dalga boyundaki optik dansiteleri Nanodrop 2000 spectrophotometer’da kontrol edildi.

3.2.3.3.4.2. *MGMT* Metilasyon Analizi

Çalışmaya dahil edilen hastaların *MGMT* geni promotor bölge metilasyon oranlarının değerlendirilebilmesi için EpiTech Methyl II PCR Assay (Qiagen) kiti kullanılarak metilasyon spesifik yüksek çözünürlüklü erime (MS-HRM) analizi gerçekleştirildi. Uygulanan kit prosedürüne göre DNA’nın metilasyona özgü restriksiyon enzimleri ile kesimi için Tablo-19’da belirtildiği şekilde reaksiyon karışımı 1 ve her bir MO, MS, MD ve MSD enzim kesimleri için reaksiyon karışımı 2 hazırlandı (Tablo-20).

Tablo-19 *MGMT* metilasyon analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı-1

X1	
5X Digestion buffer:	13 µL
Rnase/Dnase free H ₂ O:	Toplam hacimi 60 µL’ye tamamlayacak kadar
DNA:	125 ng

Tablo-20 *MGMT* metilasyon analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı-2

	MO	MS	MD	MSD
MS (A):	-	3.5	-	3.5
MD(B):	-	-	3.5	3.5
H ₂ O :	7	3.5	3.5	-
Toplam:	7 µL	7 µL	7 µL	7 µL

Her bir örneğin MO, MS, MD ve MSD kesimleri için 4.67 µL reaksiyon karışımı 1 ve 0.33 µL reaksiyon karışımı 2 olacak şekilde toplam 5 µL karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım 37°C’de 6 saat ve 65°C’de 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir örneğin MO, MS, MD ve MSD kesimlerinin *MGMT* metilasyonu analizi için uygulanan RT-PCR karışımı ve PCR koşulları Tablo-21 ve Tablo-22’de verildi.

Tablo-21 *MGMT* metilasyon analizinde kullanılan RT-PCR karışımı

	Mo	Ms	Md	Msd
master mix	12.5 µL	12.5 µL	12.5 µL	12.5 µL
primer mix	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Mo ürünü	5 µL	-	-	-
Ms ürünü	-	5 µL	-	-
Md ürünü	-	-	5 µL	-
Msd ürünü	-	-	-	5 µL
H ₂ O	6.5 µL	6.5 µL	6.5 µL	6.5 µL
Toplam	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Tablo-22 *MGMT* metilasyon analizinde kullanılan PCR koşulları

sıcaklık	süre	döngü
95°C	10 dk	1
99°C	3 sn	
72°C	1 dk	3
97°C	15 sn	
72°C	1 dk	45

3.2.3.3.5.Kanser Kök Hücrelerde Uygun Bitki Özütü Dozlarının Denenmesi

GSC (+) tümörler 96 kuyulu kültür kaplarına, her bir kuyuda 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek, daha önce sitotoksik etkiye sahip olduğunu belirlediğimiz bitkisel özüt ve TMZ dozları ile 24 ve 48 saat süresince muamele edildi. Hücrelerin özüt ve TMZ muamelesi sonundaki çoğalma oranları WST-1 analizi ile araştırıldı.

WST-1 analizinin gerçekleştirilebilmesi için, 96 kuyulu kaplarda kültüre edilen hücrelerin 24 ve 48 saat süresince farklı dozlardaki bitki özütleri ile muamelesini takiben, her bir kuyuya 10 µl WST-1 solüsyonu eklendi. Hücreler 30 dakika süre ile 37°C'de % 5 CO₂'lik etüvde inkübe edildi ve inkübasyon süresi sonunda, kültür kabındaki canlı ve ölü hücre sayıları eliza yöntemi ile 420-680 nm dalga boylarında okutularak belirlendi. Deneyle, uygulanan her bir doz için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.3.3.6.Bitki Özütlerinin miRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkilerinin Araştırılması

GSC (+) tümörler 6 kuyulu kültür kaplarına, her bir kuyuda $1,2 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekilerek, daha önce T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu belirlediğimiz konsantrasyonlarda OLE, GSE ve FCL ile 24 ve 48 saat süresince muamele edildi. İnkübasyon süreleri sonunda, besiyerindeki ölü hücreler toplandı. Zeminde yapışık olan hücreler ise % 0.05 Tripsin ile kaldırıldı. Flaskın zemininden kaldırılan ve besiyerinden toplanan hücreler bir araya getirildi. Böylece hücre kültür kabından toplanan hücreler, 200 µL PBS içerisinde resüspanse edilerek RNA izolasyonu yapılarına kadar -80°C' de saklandı.

3.2.3.3.6.1.RNA İzolasyonu

Bitkisel özütler ile muamele edildikten sonra -80°C'de muhafaza edilerek saklanan hücrelerden RNA izolasyonu 3.2.3.3.4.3.1'de belirtildiği şekilde High Pure RNA Isolation Kit (Roche)'un prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2.3.3.6.2.cDNA Sentezi

miRNA'dan cDNA çevrimi işlemi, miScript Reverse Transcriptase kit'in prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. Buna göre, her bir RNA örneğinden 125-250 ng'ı buz içerisine alındı ve Tablo-23'te belirtildiği şekilde PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Tablo-23 miRNA'dan cDNA sentezi için uygulanan PCR karışımı

PCR karışımı	Hacim/reaksiyon
5x miRNA Revers Transkriptaz Solüsyonu	4 µL
10x nükleik asit karışımı	2 µL
RNase-free su	6 µL
miRNA Revers Transkriptaz Enzimi	2 µL
Total RNA	6 µL
Toplam hacim	20 µL

Oluşturulan PCR karışımı önce 37°C'de 60 dk ve ardından 95°C'de 5 dk inkübe edilerek buza alındı. 20 µl hacimdeki cDNA karışımı 200 µl RNase-free su ile sulandırılarak -20°C'de saklandı.

3.2.3.3.6.3.Ekspresyon Analizi

3.2.3.3.6.3.1. Superarray Yöntemi

Elde edilen cDNA'lardan literatür araştırması ve web tabanlı programlar kullanılarak, GBM tümörlerinin oluşumunda ve gelişiminde, hücre döngüsü ve apoptosis ile ilgili sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynadığı belirlenen 40 miRNA'nın ekspresyon seviyeleri superarray yöntemi ile belirlendi. Değerlendirilen miRNA'lar ve erişim numaraları Tablo-24'te verildi. Deneyin gerçekleştirilmesi için syber green ile işaretleme yöntemine dayalı SABiosciences PCR Array (Qiagen) kullanıldı. RT- PCR

reaksiyonu LC480-II (Roche)'da gerçekleştirildi. Uygulanan RT-PCR karışımı ve PCR koşulları Tablo-25 ve Tablo-26'da verildi.

Tablo-24 Değerlendirilen miRNA'lar ve erişim numaraları

No	miRNA Sanger ID	miRNA Erişim numarası	No	miRNA Sanger ID	miRNA Erişim numarası
1	hsa-miR-7	MIMAT0000252	21	hsa-miR-155	MIMAT0000646
2	hsa-miR-9	MIMAT0000441	22	hsa-miR-181a	MIMAT0000256
3	hsa-miR-10a	MIMAT0000253	23	hsa-miR-181b	MIMAT0000257
4	hsa-miR-10b	MIMAT0000254	24	hsa-miR-181c	MIMAT0000258
5	hsa-miR-15b	MIMAT0000417	25	hsa-miR-193b*	MIMAT0004767
6	hsa-miR-21	MIMAT0000076	26	hsa-miR-195	MIMAT0000461
7	hsa-miR-24	MIMAT0000080	27	hsa-miR-210	MIMAT0000267
8	hsa-miR-24-2*	MIMAT0004497	28	hsa-miR-219-1-3p	MIMAT0004567
9	hsa-miR-26a	MIMAT0000082	29	hsa-miR-221	MIMAT0000278
10	hsa-miR-101	MIMAT0000099	30	hsa-miR-222	MIMAT0000279
11	hsa-miR-124	MIMAT0000422	31	hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690
12	hsa-miR-125b	MIMAT0000423	32	hsa-miR-320	MIMAT0000510
13	hsa-miR-128	MIMAT0000424	33	hsa-miR-330-3p	MIMAT0000751
14	hsa-miR-133a	MIMAT0000427	34	hsa-miR-451	MIMAT0001631
15	hsa-miR-133b	MIMAT0000770	35	hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784
16	hsa-miR-135a	MIMAT0000428	36	hsa-miR-502-3p	MIMAT0004775
17	hsa-miR-137	MIMAT0000429	37	hsa-miR-584	MIMAT0003249
18	hsa-miR-145	MIMAT0000437	38	hsa-let-7a	MIMAT0000062
19	hsa-miR-146a	MIMAT0000449	39	hsa-let-7b	MIMAT0000063
20	hsa-miR-153	MIMAT0000439	40	hsa-let-7d	MIMAT0000065

Tablo-25 miRNA superarray analizi için uygulanan RT-PCR karışımı

RT-PCR karışımı	Hacim/Reaksiyon
2x SYBR Green PCR Enzimi	1275 µL
RNase-free su	1173 µL
cDNA	102 µL
Toplam hacim	2550 µL

Tablo-26 miRNA superarray analizi için uygulanan RT-PCR koşulları

Basamak	döngü sayısı	Süre	Isı	
Başlangıç inaktivasyon basamağı	1	10 dk	95°C	
Amplifikasyon basamağı	40			
-denatürasyon		15 sn	95°C	
-bağlanma		1 dk	60°C	Her 72°C de floresan okuma yapıldı
- uzama		30 sn	70°C	
Erime eğrisi analizi basamağı	1			
		1dk	95°C	65°C den 95°C ye devamlı floresan okuma yaptırıldı
		2dk	65°C	
		30sn	95°C	
			2°C'ye	
			bağlandı.	

3.2.3.3.6.3.2. Single Assay Yöntemi

miRNA ekspresyon analizi için RNA'lardan sentezlenen miRNA cDNA'ları kalıp DNA olarak kullanıldı. Deneyin gerçekleştirilmesi için syber green ile işaretleme yöntemine dayalı miScript miRNA PCR array kit (Qiagen) kullanıldı. RT-PCR reaksiyonu LC480-II (Roche)'da gerçekleştirildi. Uygulanan RT-PCR karışımı ve PCR koşulları Tablo-27 ve Tablo-28'de verildi.

Tablo-27 miRNA ekspresyon analizi için uygulanan RT-PCR karışımı

RT-PCR karışımı	Hacim/Reaksiyon
2x SYBR Green PCR Enzimi	12,5 µL
10x Üiversal Primer	1 µL
RNase-free su	10,5 µL
cDNA	1 µL
Toplam hacim	25 µL

Tablo-28 miRNA ekspresyon analizi için uygulanan RT-PCR koşulları

Basamak	döngü sayısı	Süre	Isı
Başlangıç inaktivasyon			
basamağı	1	15 dk	95°C
Amplifikasyon basamağı	40		
-denatürasyon		15 sn	94°C
-bağlanma		30 sn	55°C
- uzama		30 sn	70°C

RT-PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen veriler “miScript miRNA PCR Arrays” (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>) web tabanlı programı kullanılarak $\Delta\Delta C_T$ metodu ile değerlendirildi.

3.2.3.3.7.miRNA’ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi

miRNA’ların hedef genleri, KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) ve BioCarta (<http://www.biocarta.com/>)’da yayınlanan, hücre sinyal yollarını hedefleyen miRNA’lar ile ilgili bilgi sunan miRWalk veritabanından (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>) yararlanılarak belirlendi. Ayrıca miRNA’lar ile hedef genleri arasındaki ilişki KEGG and NCBI-Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)’den yararlanılarak araştırıldı ve literatür bilgisi ile desteklendi.

3.2.3.3.7.1. RT-PCR Reaksiyonu İle Hedef Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Bitkisel özütler ile muamele edildikten sonra, hücrelerden High Pure RNA Isolation Kit (Roche)'un prosedürüne uygun olarak izole edilen RNA'lardan, 3.2.3.3.4.3.2'de belirtildiği şekilde Protoscript® First Strand cDNA Synthesis Kit (Biolabs) prosedürüne uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Özüt muamelesi sonucu ekspresyon seviyesinde anlamlı şekilde değişiklik olduğu belirlenen miRNA'ların hedef genlerinin ekspresyonları, 3.2.3.3.4.3.3'te belirtildiği şekilde RT-PCR reaksiyonu ile belirlendi ve elde edilen veriler "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis programında değerlendirildi.

3.2.3.3.7.2. Western-Blot Analizi

Kullanılan solüsyonların hazırlanışı:

- IP Buffer

50 mM Tris pH:7.5

150 mM NaCl

% 10 gliserol

0.5 NP40 protein inhibitör ref: 1187350001

*15 ml IP buffer içerisine 1 protein inhibitör tablet atıldı ve çözününce buffer buz içerisine alındı.

- Yürütme tamponu:

10 X TGC buffer'dan seyreltilerek 1 X TGS hazırlandı (BIORAD # 161-0772)

25 mM Tris

192 mM Glisin

% 0.1 SDS, (pH = 8.3)

- Transfer tamponu:

100 mL 10X Tris/Glycine Buffer (5 L) (BIORAD # 161-0771)

200 mL Metanol

700 mL dH₂O

(+ 4°C'de soğutularak kullanıldı.)

- TTBS:

100 mL (% 10) Tween 20 (BIORAD # 161-0781)

200 mL TBS (10X Tris BIORAD # 170-6435)

2 L'ye dH₂O ile tamamlanarak kullanıldı.

- MILK:

2.5 gr MILK (Non-fat Dry milk 500g cat: M0841)

0.5 gr Albumine bovine serum (Sigma A9647)

50 mL Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma D 8537)

- %2 Bovine Serum Albumin (BSA):

0.1 gr Sodyum azide (S-8032)

10 gr BSA (A 9647)

500 mL PBS (Sigma D 8537) manyetik karıştırıcıda çözüldü ve; vakum kullanılarak 0.22 µm por büyüklüğündeki hidrofilik membrandan geçirildi.

Western Blot analizi laboratuvar koşullarımıza uygun olarak aşağıdaki şekilde optimize edildi:

- Protein ekstraksiyonu:

- -80°C'den alınan örnekler eppendorf tüplere aktarılarak buza gömüldü.
- Pelletin büyüklüğüne göre ~120 µL IP buffer ilave edilerek pellet ile karıştırılıp örnekler eppendorfa aktarıldı.
- 5 dk buzda bekletildi.
- 18000 xg'de +4°C'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni eppendorf tüplere aktarıldı ve buza alındı.
- Qubit cihazı kullanarak her bir örneğin protein konsantrasyonları belirlendi.
- Poliakrilamid jele yükleme için tüm örneklerin konsantrasyonları 80 µg olacak şekilde seyreltmeleri yapıldı.

- Proteinlerin jele yüklenmesi ve jelden membrana transfer edilmesi:

- 15 µl hacimde 80 µg protein içeren örneklere 5 µL içerisinde β merkaptetanol içeren 5X loading buffer eklendi.
- Örnekler ısıtıcı blokta 100°C'de 5 dk bekletildi ve 1 dk buza alındı.

- Santrifüjde spin down yapıldı.
- Örnekler %4-%20 konsantrasyondaki Mini-PROTEAN® TGX™ (BORAD # 456-1095) jele yüklendi ve elektroforez tankına yürütme tamponu olarak 1X TGS (Glycine/SDS Buffer (5 L) (BIORAD # 161-0772) kondu.
- 1. kuyucuğa 5 µL protein marker (BIORAD # 161-0374 dual colour) yüklendi.
- 2. Kuyucuktan itibaren 80 µg protein içeren örnekler kuyucuklara yüklendi.
- 80V'ta yaklaşık 85 dk oda sıcaklığında yürütüldü.
- Jel elektroforezinde yürütme tamamlandıktan sonra patch (bez)'ler ve kartonlar transfer tampon ile ıslatıldı.
- patch (bez)- alt karton – jel – membran – üst karton – patch olacak şekilde sandviç hazırlandı ve transfer aparatına yerleştirilerek önceden hazırlanan transfer buffer ve buz içeren elektroforez tankı içerisinde 250 mA'de +4°C'de gece boyunca yürütülerek ıslak transfer gerçekleştirildi.
- Proteinlerin membranda görüntülenmesi:
 - Transfer sonucunda membran üzerine Ponceau S solüsyonu (Sigma P7170) konarak jelden membrana geçen proteinlerin varlığı kontrol edildi.
 - Membran TTBS ile yıkanarak Ponceau S solüsyonu membrandan uzaklaştırıldı.
 - Membran 1 dk TTBS içerisinde çalkalayıcıda çalkalandı.
- Western blotlama:
 - Membran kapaklı bir kaba kondu ve önceden hazırlanan MILK içerisinde edilerek 25xg'de oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 1 saat boyunca çalkalandı.
 - 1 saatlik MILK ile çalkalama işleminden sonra, membran üzerine TTBS konup 10 dk 38 xg'de orbital çalkalayıcıda çalkalandı.
 - Membran TTBS ile yıkandıktan sonra, membran 1:300 oranında BSA ile dilue edilmiş olan primer antikor (PathScan® Multiplex Western Coctail II #5302) ile bir gece boyunca +4°C'de 25 xg'de orbital çalkalayıcıda çalkalanarak muamele edildi.

- Primer antikorun uzaklaştırılabilmesi için membran TTBS ile 30 dk boyunca 38 xg'de çalkalanarak yıkandı. (Her 10dk'da bir TTBS değiştirildi).
- Sekonder antikor olarak Goat Anti-Rabbit IgG HRP (Cat no: ab97069) 1:10000 oranında TTBS ile dilue edilerek hazırlandı.
- Primer antikor uzaklaştırıldıktan sonra membran sekonder antikor ile muamele edilerek 3 saat süresince çalkalayıcıda oda sıcaklığında çalkalandı.
- Sekonder antikorun uzaklaştırılabilmesi için membran TTBS ile 30 dk boyunca çalkalanarak yıkandı. (Her 10 dk'da bir TTBS değiştirildi).
- TTBS'ten alınan membran dikkatlice kurulandı.
- Antikorla işaretlenen proteinlerin görüntülenmesi:
 - Oluşan protein bantlarının görüntülenebilmesi için membran, 1:1 olarak buz üzerinde hazırlanan PIERCE ECL Western Blotting Substrat (Thermoscientific # 32106) (5 mL: 5 mL) ile 1 dk süresince karanlık ortamda muamele edildi.
 - Membran üzerine otoradyografi filmi konularak proteinler görüntülendi (Cat no: E3018).

3.2.4.Ex-Vivo Analizler

3.2.4.1. CAM Analizi

Fertilize olmuş tavuk yumurtaları 37°C'de % 60 nemlilik oranında kuluçka makinesinde inkübe edildi. Cıvciv embriyosu gelişiminin 7. gününde aseptik koşullarda yumurta kabuğu üzerinde küçük bir pencere açıldı ve korioallantoik zara ulaşıldı. Zar üzerinde orta büyüklükteki damar dallanma noktası üzerine, T98G veya GSC hücreleri 1 x10⁶/20 µL olacak şekilde inoküle edildi. Hücreler üzerine 1 mg/mL OLE, 2 mg/mL OLE veya 0.25 mg/mL FCL ilave edildi. Negatif kontrol olarak yalnızca hücrelerin inoküle edildiği yumurtalar kullanıldı. Yumurtalarda açılan pencere selo bant ile kapatıldıktan sonra yine aynı kuluçka koşullarında 10 gün boyunca inkübasyona bırakıldı (Şekil-17).

Deney sonunda tümör dokusu zarla beraber uzaklaştırıldı ve hassas terazide tartıldı. *VEGFA* ekspresyonu analizi için tümör dokuları -80°C’de saklandı.



Şekil-17 Yumurtalara açılan pencerelere kanser hücresi ve özüt inokülasyonu yapıp selo bant ile kapatılması

3.2.4.1.1. *VEGFA* Ekspresyon Analizi

CAM assay’de oluşturulan ve bitkisel özütler ile muamele edildikten sonra yumurta zarından uzaklaştırılan tümör dokularından 3.2.3.3.4.3.1’de belirtildiği şekilde High Pure RNA Isolation Kit (Roche)’un prosedürüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA’lardan, 3.2.3.3.4.3.2’de belirtildiği şekilde Protoscript® First Strand cDNA Synthesis Kit (Biolabs) prosedürüne uygun olarak cDNA sentezlendi ve 3.2.3.3.4.3.3’te belirtildiği şekilde RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek CAM assay’den elde edilen tümörlerdeki *VEGFA* geni ekspresyon seviyesi belirlendi. Elde edilen veriler “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis programında değerlendirildi.

3.2.5. İstatistiksel Yöntem

WST-1 analizinde bitkisel özütlerin etkin dozlarının araştırıldığı grup sayıları ikiden fazla olduğundan, her bir gruptan elde edilen veriler arasında anlamlı bir fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile araştırıldı. Gruplar arasında fark bulunduğu,

farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı Tukey testi ile incelendi. GSC varlığının hastaların sağkalım süreleri üzerindeki etkisinin araştırılabilmesi için kaplan-meier analizinden yararlanıldı. GSC (+) ve GSC (-) tümörlerin *MGMT* metilasyon seviyeleri arasındaki fark, grup sayısı iki olduğundan ve parametrik test varsayımları yerine geldiğinden, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (bağımsız T testi) ile araştırıldı. Örneklem gruplarının mRNA ve miRNA ekspresyon seviyeleri ve örneklem grupları arasındaki kat değişimleri web tabanlı “RT² profiler PCR Array Data Analysis” programından yararlanarak bağımsız T testi ile hesaplandı (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>).

4. BULGULAR

4.1. Bitkisel Özümlerin T98G, U-138MG ve U87MG GBM Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkileri

4.1.1. VA

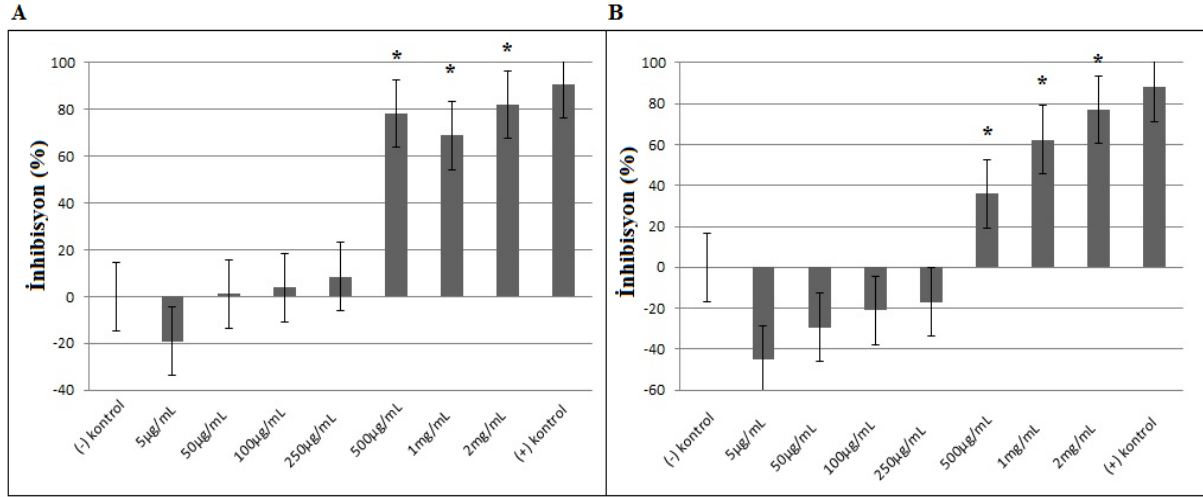
4.1.1.1. VA'nın GBM Hücre Hatlarında Sitotoksik Aktivitesi

WST-1 analizine göre T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinin 24 ve 48 saat VA ile muamelesinden sonra luminometrik olarak elde edilen değerler Tablo-29 – 31'de ve bu değerler kullanılarak belirlenen ortalama canlılık oranları Şekil-18 – 20'de gösterilmiştir.

Tablo-29 24 ve 48 saatlik VA muamelesi sonunda T98G hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat												
	(-) Kontrol	15 ng/mL	30 ng/mL	50 ng/mL	60 ng/mL	70 ng/mL	80 ng/mL	90 ng/mL	100 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	(+) Kontrol
1.deneme	2.669	1.201	0.309	2.071	1.477	1.423	1.229	0.495	0.911	0.709	1.131	0.074
2.deneme	0.243	1.565	0.337	2.258	1.262	0.999	1.188	0.883	0.868	0.705	1.129	0.334
3.deneme	2.966	2.175	2.624	2.339	2.531	2.811	1.778	1.659	1.081	0.732	1.103	0.285
4.deneme	0.411	1.985	2.028	1.768	3.147	2.192	2.157	1.767	2.123	0.704	1.155	0.288
5.deneme	3.707	2.302	2.269	3.198	3.191	2.232	2.237	2.054	1.513	0.738	1.057	0.336
6.deneme	3.506	2.508	2.342	0.438	3.729	1.940	2.112	1.888	2.113	0.708	1.102	0.293
7.deneme	*	2.250	3.190	3.430	*	2.045	2.137	1.908	1.819	0.684	1.076	0.356
8.deneme	3.756	2.613	2.762	3.581	*	1.742	1.160	2.330	1.404	0.71	1.084	0.357
Ortalama	3.321	2.075	2.536	2.664	2.556	2.074	1.750	1.934	1.676	0.711	1.105	0.290
48 saat												
	(-) Kontrol	15 ng/mL	30 ng/mL	50 ng/mL	60 ng/mL	70 ng/mL	80 ng/mL	90 ng/mL	100 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	(+) Kontrol
1.deneme	1.478	1.537	1.105	1.895	1.948	1.726	1.842	1.678	1.353	0.707	1.180	0.206
2.deneme	1.621	1.504	1.293	1.312	2.165	1.864	2.182	1.270	1.339	0.693	1.157	0.205
3.deneme	1.448	1.535	1.414	1.190	1.415	1.735	2.047	1.092	1.196	0.755	1.181	0.214
4.deneme	1.616	1.953	2.112	1.806	1.310	1.916	1.789	1.703	1.393	0.743	1.155	0.203
5.deneme	1.379	1.776	2.042	1.817	1.377	1.340	1.045	1.466	0.758	0.675	1.097	0.196
6.deneme	*	1.578	1.823	1.640	1.632	1.605	1.695	1.625	1.501	0.728	1.186	0.255
7.deneme	*	1.798	1.820	1.606	1.515	1.538	1.637	1.212	1.131	0.695	1.189	0.229
8.deneme	*	1.166	1.484	1.474	2.174	1.548	1.598	0.817	1.077	0.793	1.149	0.310
Ortalama	1.508	1.606	1.637	1.593	1.692	1.659	1.729	1.435	1.284	0.723	1.162	0.227

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂, *: Analiz edilemedi.

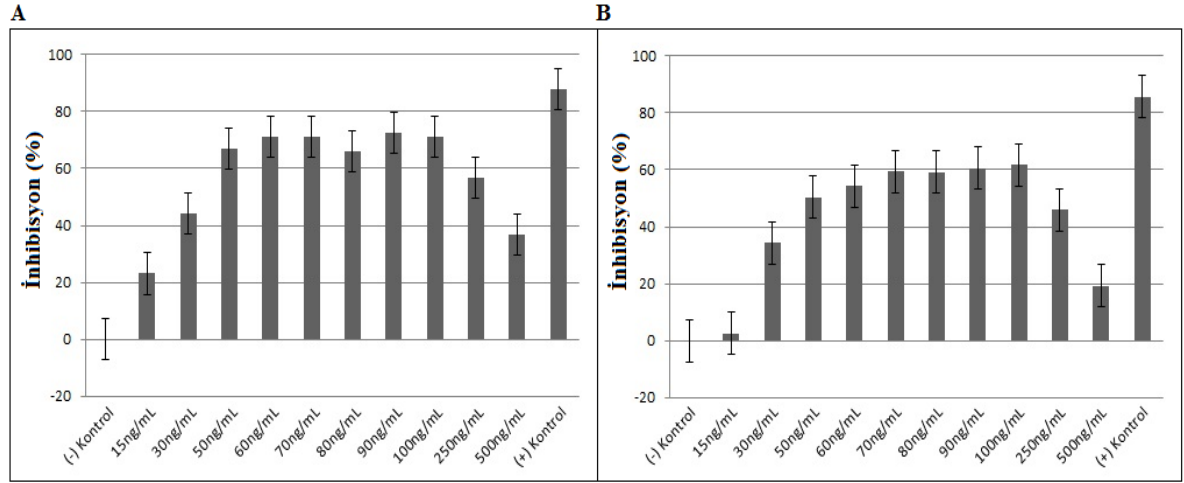


Şekil-18 24 (A) ve 48 (B) saatlik VA muamelesi sonunda T98G hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. *: $p < 0.05$, (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H_2O_2

Tablo-30 24 ve 48 saatlik VA muamelesi sonunda U138MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat												
	(-) Kontrol	15 ng/mL	30 ng/mL	50 ng/mL	60 ng/mL	70 ng/mL	80 ng/mL	90 ng/mL	100 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.523	0.338	0.469	0.447	0.472	0.394	0.659	0.475	0.412	0.637	0.913	0.182
2. deneme	1.653	1.132	0.911	0.453	0.391	0.382	0.566	0.375	0.404	0.595	0.878	0.177
3. deneme	1.37	1.155	0.773	0.464	0.403	0.41	0.381	0.409	0.388	0.634	0.878	0.17
4. deneme	1.329	1.057	0.837	0.537	0.382	0.395	0.455	0.356	0.461	0.613	0.87	0.178
5. deneme	1.538	1.293	0.704	0.419	0.364	0.376	0.412	0.376	0.426	0.602	0.847	0.174
6. deneme	1.49	1.292	0.715	0.462	0.428	0.391	0.408	0.371	0.375	0.598	0.863	0.171
7. deneme	1.426	1.471	0.84	0.488	0.427	0.485	0.477	0.375	0.449	0.602	0.997	0.157
8. deneme	1.065	1.027	1.089	0.506	0.443	0.462	0.511	0.418	0.394	0.663	0.951	0.174
Ortalama	1.424	1.095	0.792	0.472	0.413	0.411	0.483	0.394	0.413	0.618	0.899	0.172
48 saat												
	(-) Kontrol	15 ng/mL	30 ng/mL	50 ng/mL	60 ng/mL	70 ng/mL	80 ng/mL	90 ng/mL	100 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.251	1.147	0.803	0.712	0.696	0.617	0.56	0.625	0.542	0.655	1.042	0.18
2. deneme	1.449	1.468	0.879	0.581	0.611	0.53	0.53	0.47	0.424	0.639	0.937	0.17
3. deneme	1.14	1.321	0.8	0.742	0.575	0.539	0.57	0.472	0.484	0.643	0.928	0.193
4. deneme	0.917	1.294	0.911	0.582	0.488	0.455	0.455	0.439	0.449	0.652	1.091	0.164
5. deneme	0.91	0.826	0.581	0.633	0.565	0.492	0.471	0.462	0.45	0.651	0.91	0.154
6. deneme	0.963	1.199	0.917	0.527	0.464	0.437	0.473	0.426	0.439	0.648	0.925	0.172
7. deneme	1.472	1.057	0.799	0.585	0.595	0.428	0.436	0.453	0.444	0.628	0.955	0.166
8. deneme	1.471	1.026	0.6	0.382	0.393	0.386	0.406	0.422	0.428	0.661	0.95	0.174
Ortalama	1.196	1.167	0.786	0.593	0.548	0.485	0.487	0.471	0.457	0.647	0.967	0.171

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H_2O_2

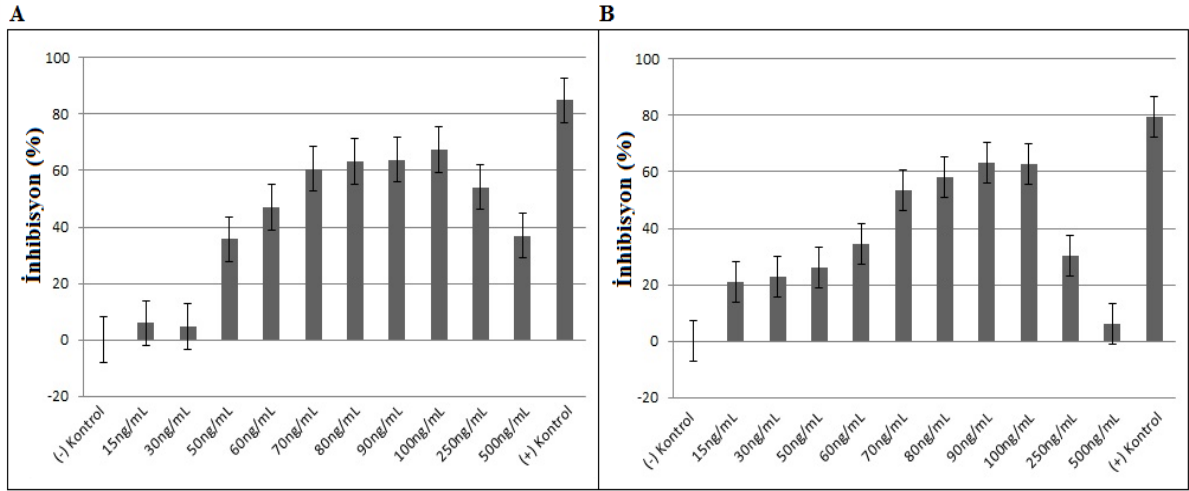


Şekil-19 24 (A) ve 48 (B) saatlik VA muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Tablo-31 24 ve 48 saatlik VA muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat												
	(-) Kontrol	15ng/mL	30ng/mL	50ng/mL	60ng/mL	70ng/mL	80ng/mL	90ng/mL	100ng/mL	250ng/mL	500ng/mL	(+) Kontrol
1. deneme	0.519	0.762	0.789	0.48	0.457	0.348	0.364	0.378	0.305	0.586	0.779	0.135
2. deneme	1.551	1.404	1.638	1.088	0.648	0.58	0.519	0.507	0.438	0.624	0.82	0.214
3. deneme	1.321	1.417	1.541	0.798	0.826	0.594	0.526	0.507	0.508	0.594	0.815	0.228
4. deneme	1.518	1.811	1.536	0.964	0.856	0.601	0.524	0.542	0.537	0.604	0.836	0.224
5. deneme	1.388	1.321	1.52	1.072	0.818	0.643	0.544	0.561	0.447	0.601	0.886	0.219
6. deneme	1.45	1.213	1.24	0.947	0.713	0.524	0.466	0.446	0.448	0.677	0.835	0.218
7. deneme	1.416	0.883	0.983	0.925	0.768	0.46	0.5	0.482	0.415	0.62	0.853	0.209
8. deneme	1.68	1.391	1.079	0.698	0.672	0.521	0.536	0.49	0.427	0.67	1.016	0.187
Ortalama	1.355	1.275	1.290	0.871	0.719	0.533	0.497	0.4895	0.440	0.622	0.855	0.204
48 saat												
	(-) Kontrol	15ng/mL	30ng/mL	50ng/mL	60ng/mL	70ng/mL	80ng/mL	90ng/mL	100ng/mL	250ng/mL	500ng/mL	(+) Kontrol
1. deneme	0.913	0.843	0.651	0.456	0.408	0.425	0.391	0.356	0.364	0.652	0.91	0.211
2. deneme	0.968	0.806	0.676	0.69	0.589	0.33	0.394	0.329	0.351	0.674	0.869	0.195
3. deneme	1.04	0.678	0.819	0.741	0.599	0.384	0.467	0.373	0.338	0.653	0.863	0.197
4. deneme	0.933	0.736	0.878	0.753	0.632	0.389	0.425	0.375	0.346	0.662	0.971	0.183
5. deneme	0.836	0.604	1.134	0.743	0.723	0.47	0.365	0.363	0.358	0.664	0.883	0.193
6. deneme	1.038	0.603	0.811	0.758	0.69	0.527	0.352	0.323	0.354	0.676	0.895	0.192
7. deneme	0.861	0.895	0.751	0.861	0.681	0.562	0.342	0.296	0.356	0.698	0.903	0.18
8. deneme	1.117	0.936	0.226	0.702	0.72	0.509	0.498	0.409	0.387	0.686	0.952	0.229
Ortalama	0.963	0.762	0.743	0.713	0.630	0.449	0.404	0.353	0.356	0.670	0.905	0.197

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂



Şekil-20 24 (A) ve 48 (B) saatlik VA muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, VA'nın T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde 24 ve 48 saat'lik inkübasyon sürelerinde hücre canlılığında yol açtığı değişimin doza bağlı olarak artan ya da azalan bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle tez projesi kapsamında gerçekleştirilen ileri analizlere bu özüt dahil edilmemiştir.

4.1.2. GSE

4.1.2.1. GSE'nin Yapısında Bulunan Etken Maddeler

HPLC/ DAD analizi ile standardize edilmiş GSE'nin içeriğinde 24.542 ±0.010 mg/gr gallik asit, 6.139 ± 0.002 mg/gr epigallokateşin galat, 3.807 ± 0.012 mg/gr kateşin, 2.180 ± 0.001 mg/gr epikateşin galat ve 0.162 ± 0.001 mg/gr gallik asit olmak üzere 36.8 mg/gr total prosiyanidin (n = 2) olduğu belirlendi.

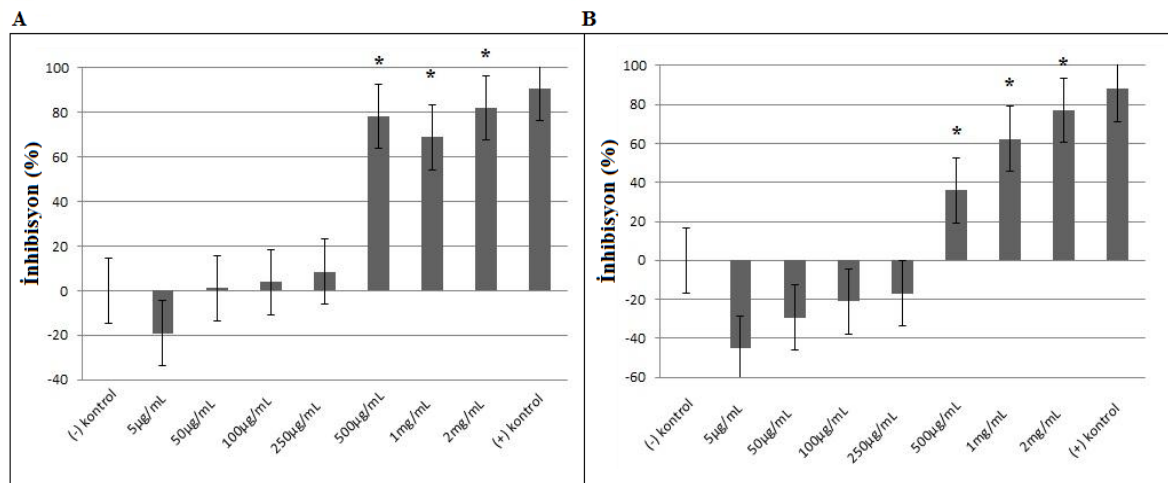
4.1.2.2. GSE'nin GBM Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Aktivitesi

WST-1 analizine göre T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinin 24 ve 48 saat GSE ile muamelesinden sonra luminometrik olarak elde edilen değerler Tablo-32 – 34'te ve bu değerler kullanılarak belirlenen ortalama canlılık oranları Şekil-21 – 23'te gösterilmiştir.

Tablo-32 24 ve 48 saatlik GSE muamelesi sonunda T98G hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat									
	(-) kontrol	5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	(+) kontrol
1.deneme	2.056	1.773	2.032	2.647	1.682	0.400	0.601	0.315	0.181
2.deneme	1.853	2.206	1.743	1.422	1.237	0.389	0.665	0.347	0.162
3.deneme	1.821	2.171	1.800	1.751	1.665	0.397	0.567	0.328	0.168
4. deneme	1.555	2.533	1.624	1.183	2.075	0.402	0.434	0.323	0.162
Ortalama	1.821	2.170	1.799	1.750	1.664	0.397	0.566	0.328	0.168
48 saat									
	(-) kontrol	5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	(+) kontrol
1.deneme	1.555	2.533	1.183	1.624	2.075	1.081	0.409	0.323	0.166
2.deneme	2.056	1.773	2.647	1.383	1.682	1.160	0.434	0.315	0.174
3.deneme	1.853	1.628	1.422	2.032	1.237	0.818	0.601	0.347	0.170
4.deneme	0.140	2.206	2.000	1.743	1.559	0.535	0.665	0.307	0.170
Ortalama	1.401	2.035	1.813	1.696	1.638	0.899	0.527	0.323	0.170

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

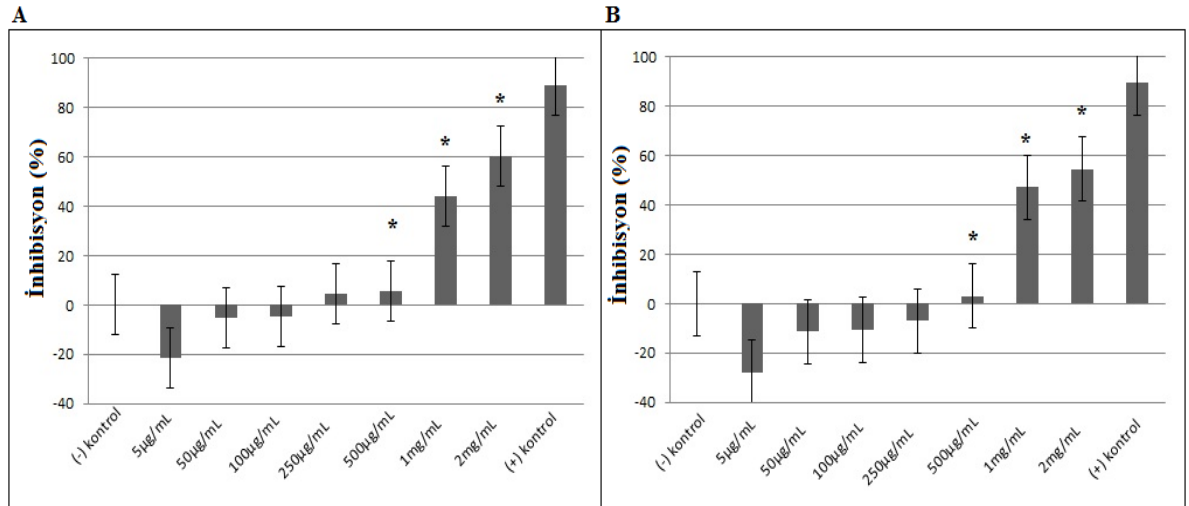


Şekil-21 24 (A) ve 48 (B) saatlik GSE muamelesi sonunda T98G hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O

Tablo-33 24 ve 48 saatlik GSE muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat									
	(-) kontrol	5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	(+) kontrol
1. deneme	1.695	2.598	1.822	2.414	2.179	1.853	0.877	0.662	0.197
2. deneme	1.750	2.527	2.248	1.776	1.270	1.840	1.083	0.597	0.196
3. deneme	1.643	1.555	1.867	1.482	1.780	1.583	0.865	0.718	0.200
4. deneme	1.818	1.705	1.335	1.553	1.357	1.229	1.037	0.766	0.178
Ortalama	1.726	2.096	1.818	1.806	1.646	1.6265	0.965	0.6855	0.192
48 saat									
	(-) kontrol	5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	(+) kontrol
1. deneme	1.157	1.737	1.409	1.523	1.406	1.019	0.908	0.416	0.135
2. deneme	1.074	1.239	1.888	1.194	1.198	1.465	0.635	0.550	0.140
3. deneme	1.344	1.718	1.077	1.425	1.293	1.173	0.580	0.854	0.128
4. deneme	1.465	1.754	1.231	1.434	1.499	1.234	0.538	0.47	0.128
Ortalama	1.260	1.612	1.401	1.394	1.349	1.222	0.665	0.572	0.132

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

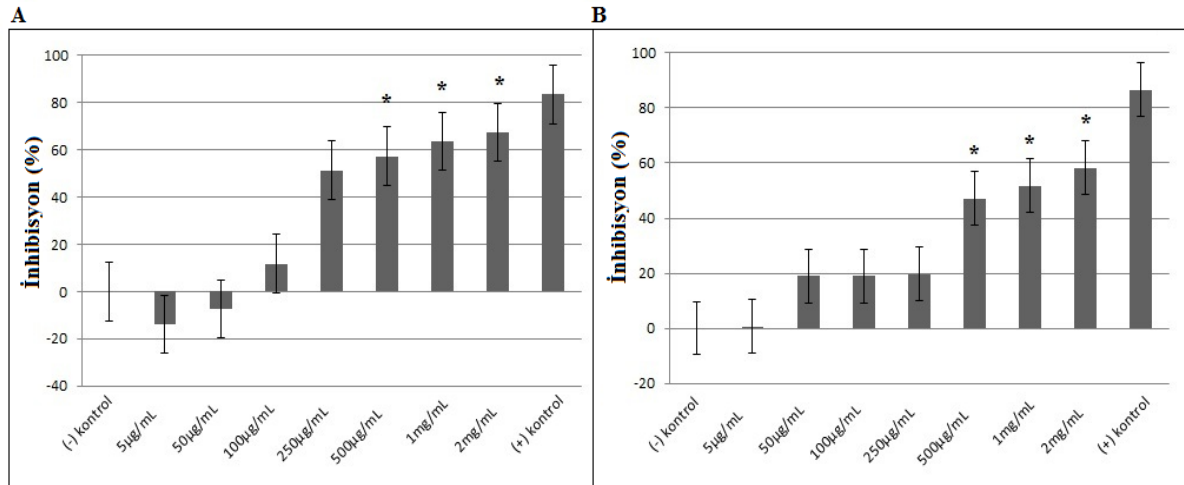


Şekil-22 24 (A) ve 48 (B) saatlik GSE muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Tablo-34 24 ve 48 saatlik GSE muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat									
	(-) kontrol	5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	(+) kontrol
1. deneme	1.978	1.61	1.712	1.395	0.633	1.044	0.484	0.52	0.322
2. deneme	1.851	2.23	2.173	1.519	0.786	0.867	0.581	0.576	0.214
3. deneme	1.353	1.832	1.892	1.722	0.854	0.18	0.615	0.498	0.281
4. deneme	1.287	1.701	1.173	1.073	0.876	0.673	0.68	0.51	0.255
Ortalama	1.617	1.843	1.737	1.427	0.787	0.691	0.590	0.526	0.268
48 saat									
	(-) kontrol	5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	(+) kontrol
1. deneme	1.137	0.926	1.432	1.249	1.138	0.612	0.816	0.6	0.169
2. deneme	1.871	1.049	0.998	1.419	1.385	0.85	0.832	0.496	0.181
3. deneme	1.798	1.831	1.327	0.982	0.925	0.7	0.538	0.703	0.232
4. deneme	0.879	1.842	0.853	0.958	1.112	0.846	0.556	0.571	0.185
Ortalama	1.421	1.412	1.152	1.152	1.140	0.752	0.685	0.592	0.191

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂



Şekil-23 24 (A) ve 48 (B) saatlik GSE muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

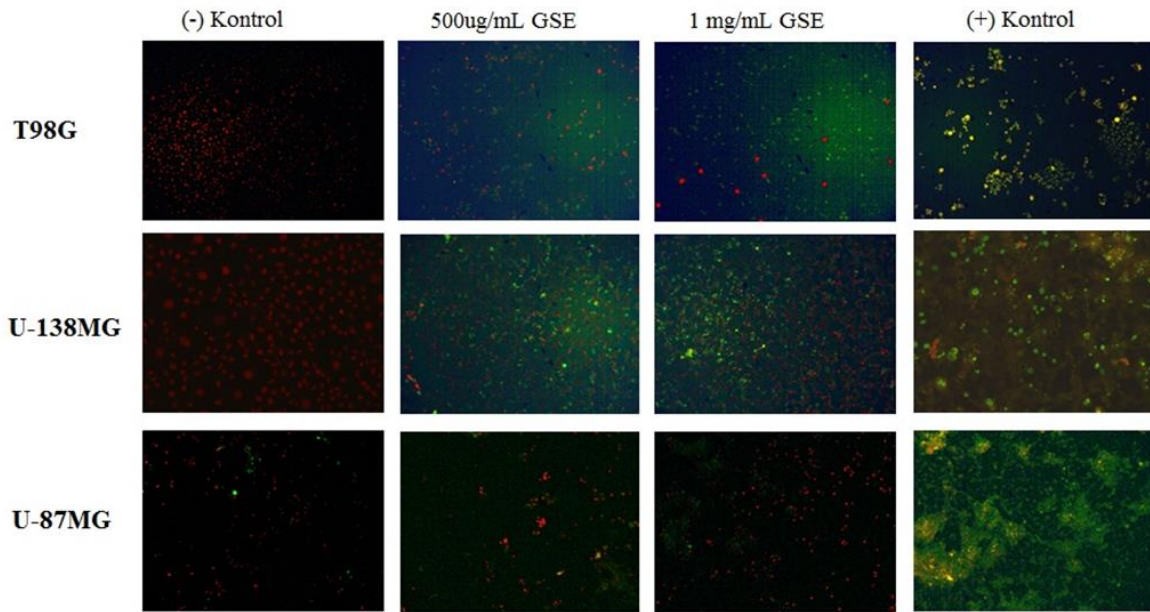
GSE'nin optimal etkisi 24 saatte gözlemlendi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1 mg/ml GSE, T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 69, % 44 ve % 63 oranında hücre ölümüne yol açarken, 500 µg/mL GSE, sırasıyla % 60, % 58 ve % 57 oranında hücre canlılığında azalmaya yol açtı. Aynı koşullar altında, (+) kontrol olarak kullanılan 30 mM H₂O₂, T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 90, % 88 ve % 83 oranında hücre ölümüne yol açtı. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi'ne

göre, GSE'nin 1 mg/mL ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlarının T98G, U-138MG ve U-87MG hücre hatlarında letal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

Thoma lamında gerçekleştirilen Triphan mavisi ile hücre canlılık tayinine göre, 1 mg/mL ve 500 µg/mL GSE'nin lenfosit hücreleri üzerinde % 10.5 ve % 8 oranında sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi.

4.1.2.3. GSE'nin GBM Hücre Hatlarında Hücre Ölüm Yolakları Üzerindeki Etkisi

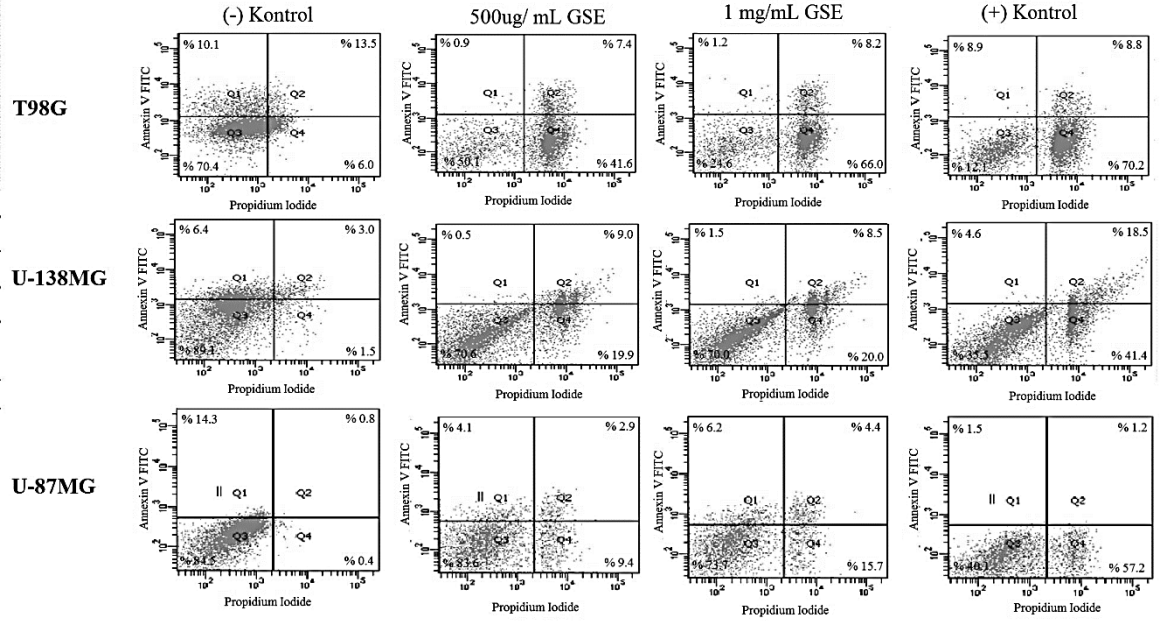
TUNEL analizine göre, 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda 1 mg/mL GSE'nin T98G hücrelerinde % 76, U-138 hücrelerinde % 55, U-87MG hücrelerinde % 32 oranında, 500 µg/mL GSE'nin ise T98G hücrelerinde % 55, U-138 hücrelerinde % 36, U-87MG hücrelerinde % 22 oranında ölüme yol açtığı belirlendi (Şekil-24).



Şekil-24 GSE'nin GBM hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisinin TUNEL yöntemi ile gösterilmesi. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Annexin V analizine göre, 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda 1mg/mL GSE'nin T98G hücrelerinde % 9.4 apoptotik, % 66.0 nekrotik ölüme, U-138 hücrelerinde % 10 apoptotik, % 20.0 nekrotik ölüme, U-87MG hücrelerinde % 10.6 apoptotik ve % 15.7 nekrotik ölüme yol açtığı, 500 µg/mL GSE'nin ise T98G hücrelerinde % 8.3 apoptotik, %

41.6 nekrotik ölüme, U-138 hücrelerinde % 9.5 apoptotik, % 19.9 nekrotik ölüme, U-87MG hücrelerinde % 7.0 apoptotik ve % 9.4 nekrotik ölüme yol açtığı belirlendi (Şekil-25).



Şekil-25 GSE'nin GBM hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin V yöntemi ile gösterilmesi. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30mM H₂O₂

4.1.2.4. GSE'nin T98G Hücrelerinde İnvazyon Üzerindeki Etkisi

Her biri 24 tekrarlı olmak üzere, embriyolu tavuk yumurtalarının koryo-allantoik zarı üzerine 2×10^6 T98G hücresi, 1 mg/mL veya 500 µg/mL GSE ekilerek neovaskülerizasyon indüklendi. 10 günlük büyüme süresi sonunda ölü olduğu belirlenen yumurtalar değerlendirme dışı bırakıldı. GSE muamelesine bağlı olarak tümör gelişen ve gelişmeyen yumurta sayıları Tablo-35'te belirtilmektedir.

Tablo-35 GSE muamelesine bağlı olarak embriyolu yumurtalarda tümör gelişim oranı

	2x10 ⁶ T98G	2x10 ⁶ T98G + 500 µg/ml GSE	2x10 ⁶ T98G + 1 mg/ml GSE
Toplam yumurta sayısı	24	24	24
Tümör gelişen yumurta sayısı	13	13	11
Tümör gelişmeyen yumurta sayısı	7	8	4
l yumurta sayısı	4	3	9

GSE muamelesinin embriyolu yumurtada tümör oluşumu ve damarlanma üzerine etkisi Şekil-26'da belirtilmektedir.



Şekil-26 GSE muamelesi sonrası invazyon görüntüsü

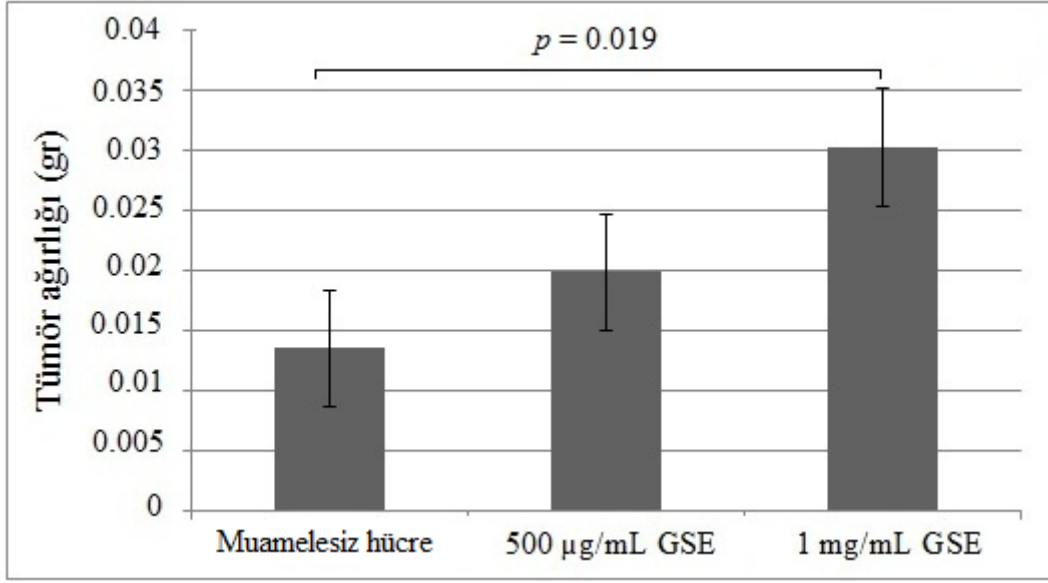
Yumurtadan uzaklaştırılan tümörler hassas terazide tartıldığında 1 mg/mL GSE muamelesinin tümör ağırlığını anlamlı Şekilde arttırdığı belirlendi. GSE muamelesinin tümörlerin ağırlığı üzerindeki etkisi Tablo-36 – 37'de ve Şekil-27'de belirtilmektedir.

Tablo-36 CAM assay'de GSE muamelesi sonucu oluşan tümörlerin ağırlıkları

	T98G (gr)	500 µg/mL GSE (gr)	1 mg/mL GSE (gr)
	0.0036	0.0265	0.0255
	0.0042	0.004	0.0344
	0.0098	0.0058	0.0069
	0.0194	0.0199	0.0532
	0.0066	0.0175	0.0288
	0.0054	0.0209	0.0142
	0.0133	0.0268	0.0425
	0.0127	0.0138	0.0125
	0.0135	0.0067	0.0266
	0.0271	0.0092	0.0468
	0.0261	0.013	0.0416
	0.0155	0.0748	
	0.0189	0.0199	
En küçük – En büyük tümör ağırlığı (gr)	0.0036 – 0.0271	0.004 – 0.0748	0.0069 – 0.0532
Ortalama tümör ağırlığı (gr)	0.0135	0.0199	0.0302
Standart Sapma	0.0077	0.0181	0.0150
Standart hata	0.0021	0.0050	0.0045
95% CI	0.0088 – 0.018	0.0089 – 0.030	0.020 – 0.015

Tablo-37 Post Hoc ve Tukey testlerine göre CAM analizinde GSE muamelesinin tümör büyüklüğü üzerine etkisi

Grup	Ortalama fark	Standart hata	<i>p</i> değeri	% 95CI
T98G – 500µg/mL GSE	-0.0063	0.0055	0.498	-0.0200 – 0.0073
T98G – 1mg/mL GSE	-0.0167	0.0058	0.019	-0.0310 – -0.0024
500 µg/mL GSE – 1mg/mL GSE	-0.0103	0.0058	0.193	-0.0039 – 0.0246



Şekil-27 CAM analizinde T98G hücrelerinde GSE muamelesinin tümör büyüklüğü üzerine etkisi (p değeri Post Hoc ve Tukey testleri ile hesaplandı)

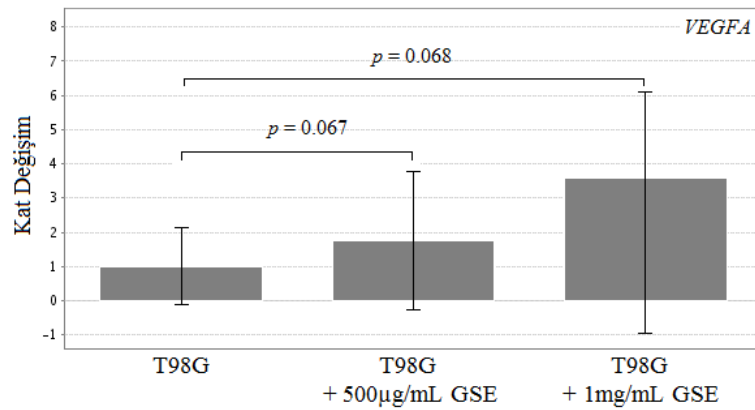
CAM analizinde GSE muamelesinin tümörler invazyonu üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için yumurtalardan uzaklaştırılan tümörlerde *VEGFA* ekspresyon analizi gerçekleştirildi. *VEGFA* ekspresyon analizi için CAM'da gelişen tümörlerden elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} dalga boyundaki optik dansiteleri Tablo-38'de belirtilmektedir. Gen ekspresyon analizi sonunda gerçekleştirilen bağımsız T testi verilerine göre, 500 µg/mL GSE tümör hücrelerinde *VEGFA* ekspresyonunda 1.7 kat, 1 mg/mL GSE ise 3.5 kat artışa yol açtı (Tablo-39, Şekil-28).

Tablo-38 CAM analizinde T98G hücrelerinde GSE muamelesinden sonra *VEGFA* ekspresyonu analizi için tümörlerden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve optik dansiteleri

T98G			T98G + 500 µg/mL GSE			T98G + 1 mg/mL GSE		
No	RNA (ng/µl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	No	RNA (ng/µl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	No	RNA (ng/µl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	15,00	1,82	1	1247,00	1,71	1	817,30	2,01
2	352,10	2,00	2	566,50	1,82	2	1224,00	1,90
3	1257,00	1,82	3	691,00	1,91	3	870,90	2,03
4	766,90	2,01	4	1732,00	1,86	4	1076,00	1,97
5	84,98	1,74	5	1195,00	1,94	5	1064,00	2,06
6	833,20	1,96	6	277,35	1,81	6	2593,00	1,58
7	506,30	1,97	7	2423,00	1,85	7	3027,00	1,76
8	521,40	1,73	8	1710,00	1,96	8	2906,00	1,99
9	1106,60	1,75	9	578,40	1,94	9	2337,00	2,02
10	1230,00	1,85	10	215,50	1,92	10	1130,00	2,00
11	1332,00	1,95	11	3110,67	1,82	11	947,60	1,77
12	961,10	1,76	12	2129,40	2,08			
13	1744,00	1,83	13	1518,00	1,97			

Tablo-39 CAM analizinde T98G hücrelerinde GSE muamelesinin *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

Gen	T98G		T98G + 500 µg/mL GSE			T98G + 1 mg/mL GSE			
	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat değişim	95% CI	p değeri	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat değişim	95% CI	p değeri
VEGFA	0.7610	1.3209	1.7355	(0.64, 2.83)	0.0671	2.7166	3.5694	(0.97– 6.17)	0.0681



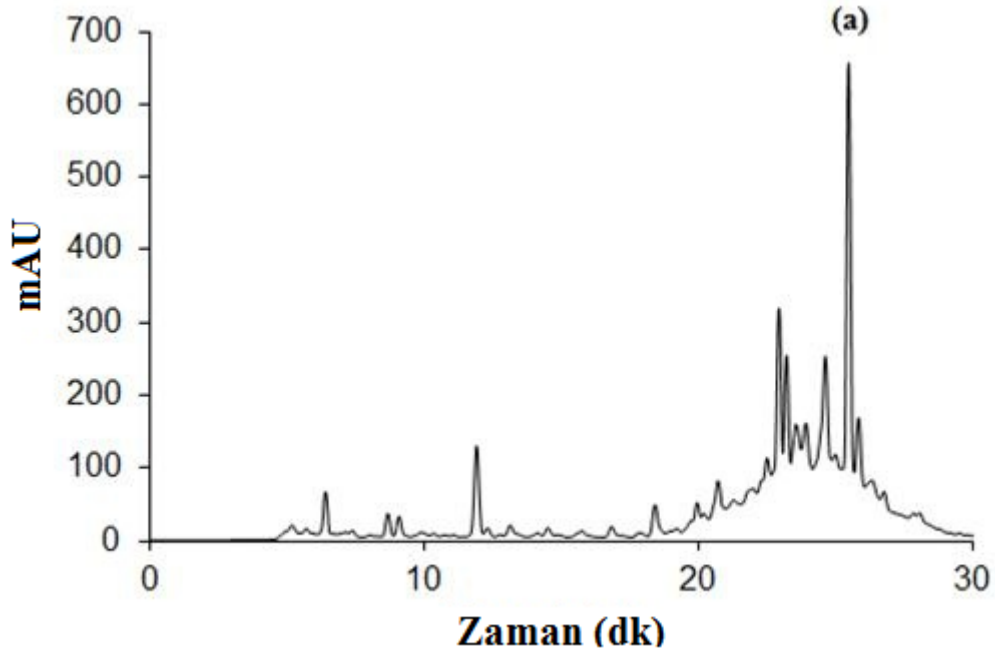
Şekil-28 CAM analizinde GSE muamelesinin *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, 500 µg/mL ve 1 mg/mL GSE'nin in-vitro koşullarda T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde hücre canlılığında azalmaya yol açtığı belirlenmiş olsa da, ex-vivo koşullarda gerçekleştirilen analizler GSE'nin tümör invazyonunu arttırıcı yönde etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bulgularımız, GSE'nin GBM tümörlerinin tedavisine yönelik araştırmalar için aday bir terapötik ajan olamayacağını gösterdiğinden dolayı tez projesi kapsamında bu aşamadan sonra gerçekleştirilmesi planlanan ileri analizlere dahil edilmemiştir.

4.1.3. OLE

4.1.3.1. OLE'nin Yapısında Bulunan Etken Maddeler

HPLC/ DAD analizi ile standardize edilmiş OLE'nin içeriğinde 9.36 ± 0.22 mg/ml (n = 2) Oleuropein olduğu belirlendi. Standardize OLE'nin kromatogram görüntüsü Şekil-29'da gösterilmiştir.



Şekil-29 Standardize OLE'nin HPLC analizindeki kromatogram görüntüsü. Oleuropein 25.503. dakikada görüntülendi. a: Oleuropein

4.1.3.2. OLE'nin GBM Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Aktivitesi

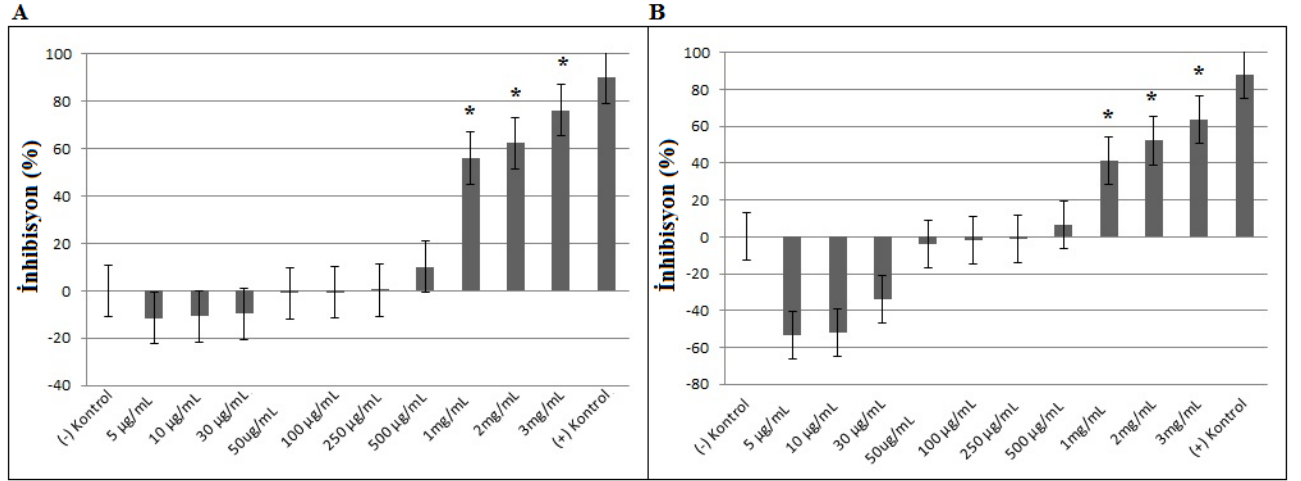
OLE'nin T98G hücrelerindeki lethal dozları, daha önce 2010/07 nolu BAP projesi kapsamında gerçekleştirilen ve 2012 yılında Journal of Cancer Research and Clinical Oncology dergisinde yayınlanan çalışmamızda 1mg/mL ve 2mg/mL olarak belirlendi (276).

WST-1 analizine göre U-138MG ve U-87MG hücrelerinin 24 ve 48 saat OLE ile muamelesinden sonra luminometrik olarak elde edilen değerler Tablo-40 ve Tablo-41'de ve bu değerler kullanılarak belirlenen ortalama canlılık oranları Şekil-30 ve Şekil-31'de gösterilmiştir.

Tablo-40 24 ve 48 saatlik OLE muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat												
	(-) Kontrol	5 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	50µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.616	1.465	1.723	1.638	1.474	1.168	1.335	1.042	0.561	0.523	0.29	0.122
2. deneme	1.182	1.104	1.267	1.248	1.222	1.386	1.226	1.404	0.557	0.424	0.294	0.125
3. deneme	1.237	1.627	1.898	1.26	1.572	1.884	1.391	1.443	0.558	0.526	0.31	0.127
4. deneme	1.002	1.421	0.691	1.381	0.823	0.639	1.075	0.638	0.543	0.422	0.304	0.132
Ortalama	1.259	1.404	1.394	1.381	1.272	1.269	1.256	1.131	0.554	0.473	0.299	0.126
48 saat												
	(-) Kontrol	5 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	50µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.505	2.768	2.972	2.286	1.564	1.421	1.911	1.668	0.905	0.917	0.642	0.199
2. deneme	1.922	2.607	2.673	2.901	2.673	2.632	1.667	1.434	0.9	0.772	0.653	0.189
3. deneme	1.939	2.785	1.712	2.431	2.509	2.139	2.017	1.812	1.309	0.893	0.691	0.238
4. deneme	1.855	2.914	3.604	2.070	0.767	1.165	1.706	1.827	1.117	0.873	0.654	0.224
Ortalama	1.805	2.768	2.740	2.422	1.878	1.839	1.825	1.685	1.057	0.863	0.660	0.212

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

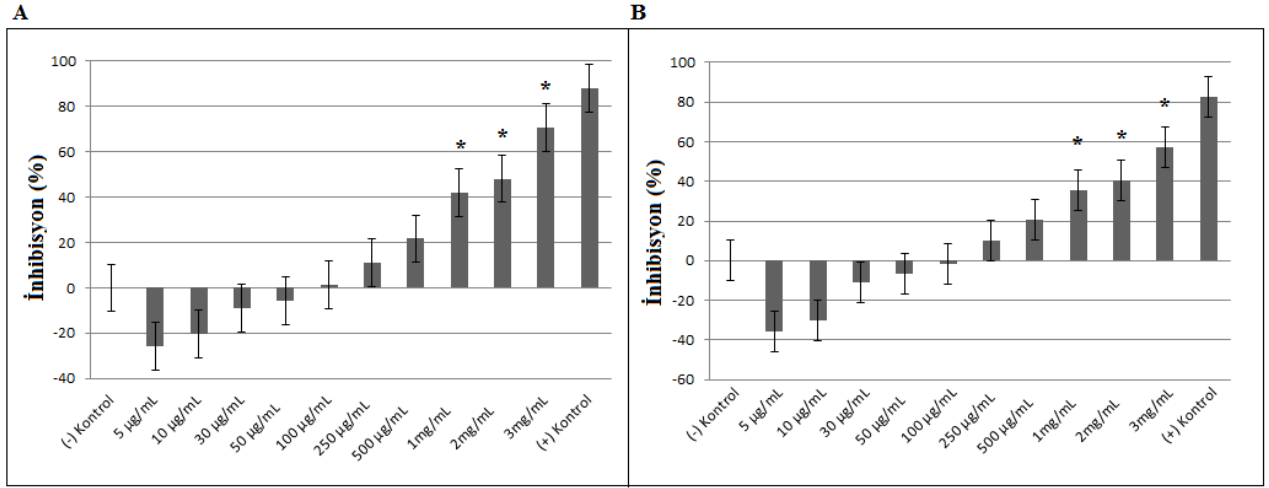


Şekil-30 24 (A) ve 48 (B) saatlik OLE muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H_2O_2

Tablo-41 24 ve 48 saatlik OLE muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat												
	(-) Kontrol	5 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	2.203	2.611	2.367	2.229	1.637	1.719	1.479	1.732	1.026	0.929	0.53	0.21
2. deneme	1.76	2.38	1.716	1.641	2.046	1.6	1.264	1.154	1.023	0.908	0.483	0.206
3. deneme	1.656	2.389	2.177	2.144	2.157	1.916	2.16	1.412	1.024	0.901	0.521	0.203
4. deneme	1.414	1.457	2.199	1.659	1.610	1.718	1.358	1.213	1.016	0.914	0.518	0.225
Ortalama	1.758	2.209	2.114	1.918	1.862	1.738	1.565	1.377	1.022	0.913	0.513	0.211
48 saat												
	(-) Kontrol	5 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.764	1.637	1.086	1.396	0.591	1.027	0.911	0.86	0.588	0.555	0.427	0.179
2. deneme	0.741	1.154	1.417	1.025	0.987	0.906	1.003	0.969	0.69	0.608	0.412	0.169
3. deneme	0.758	1.309	1.726	0.734	1.523	1.414	1.048	0.634	0.617	0.623	0.465	0.174
4. deneme	0.887	1.543	1.177	1.438	1.328	0.863	0.768	0.838	0.790	0.695	0.469	0.193
Ortalama	1.037	1.410	1.351	1.148	1.107	1.052	0.932	0.825	0.671	0.620	0.443	0.178

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H_2O_2



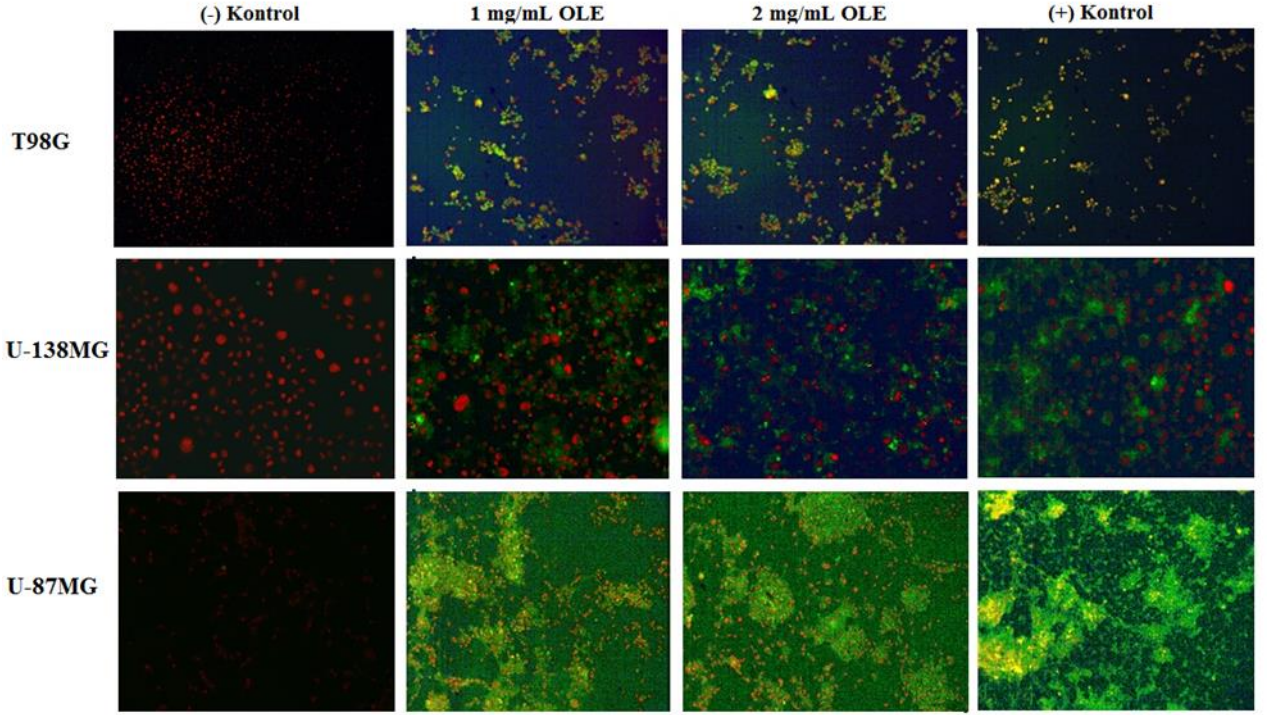
Şekil-31 24 (A) ve 48 (B) saatlik OLE muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

OLE'nin optimal etkisi 24 saatte gözlemlendi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1 mg/ml OLE, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 55 ve % 43 oranında hücre ölümüne yol açarken, 2 mg/mL OLE, sırasıyla % 62 ve % 48 oranında hücre canlılığında azalmaya yol açtı. Aynı koşullar altında, (+) kontrol olarak kullanılan 30mM H₂O₂, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 89.9 ve % 87 oranında hücre ölümüne yol açtı. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey testine göre, OLE'nin 1mg/mL ve 2 mg/mL'lik konsantrasyonlarının U-138MG ve U-87MG hücre hatlarında lethal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

Daha önce gerçekleştirilen çalışmamızda, thoma lamında gerçekleştirilen Triphan mavisi ile hücre canlılık tayinine göre, 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE'nin lenfosit hücreleri üzerinde % 16 ve % 22 oranında sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmişti (276).

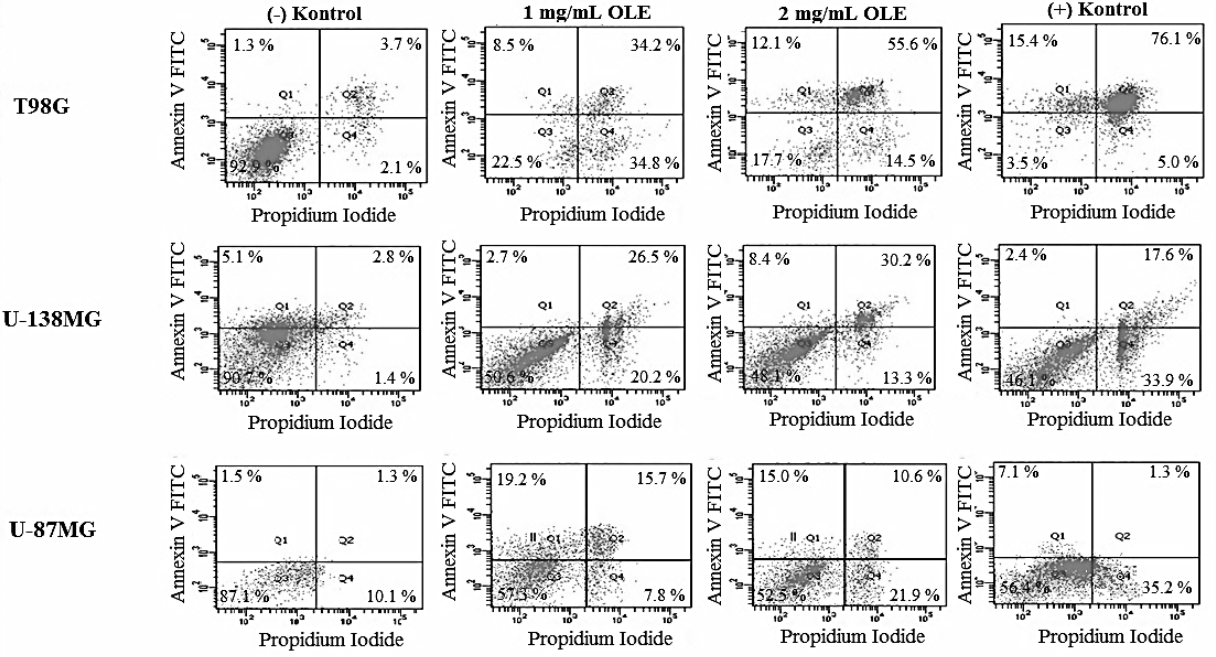
4.1.3.3. OLE'nin GBM Hücre Hatlarında Hücre Ölüm Yolakları Üzerindeki Etkisi

TUNEL analizine göre, 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda 1 mg/mL OLE'nin T98G hücrelerinde % 42.7, U-138 hücrelerinde % 29.2, U-87MG hücrelerinde % 34.9 oranında, 2 mg/mL OLE'nin ise T98G hücrelerinde % 67, U-138 hücrelerinde % 39.5, U-87MG hücrelerinde % 24.5 oranında ölüme yol açtığı belirlendi (Şekil-32).



Şekil-32 OLE'nin GBM hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisinin TUNEL yöntemi ile gösterilmesi. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30mM H₂O₂

Annexin V analizine göre, 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda 1 mg/mL OLE'nin T98G hücrelerinde % 42.7 apoptotik, % 34.8 nekrotik ölüme, U-138 hücrelerinde % 29.2 apoptotik, % 20.2 nekrotik ölüme, U-87MG hücrelerinde % 34.9 apoptotik ve % 7.8 nekrotik ölüme yol açtığı, 2 mg /mL OLE'nin ise T98G hücrelerinde % 67.7 apoptotik, % 14.5 nekrotik ölüme, U-138 hücrelerinde % 38.6 apoptotik, % 13.3 nekrotik ölüme, U-87MG hücrelerinde % 25.6 apoptotik ve % 21.9 nekrotik ölüme yol açtığı belirlendi (Şekil-33).



Şekil-33 OLE'nin GBM hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin V yöntemi ile gösterilmesi. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

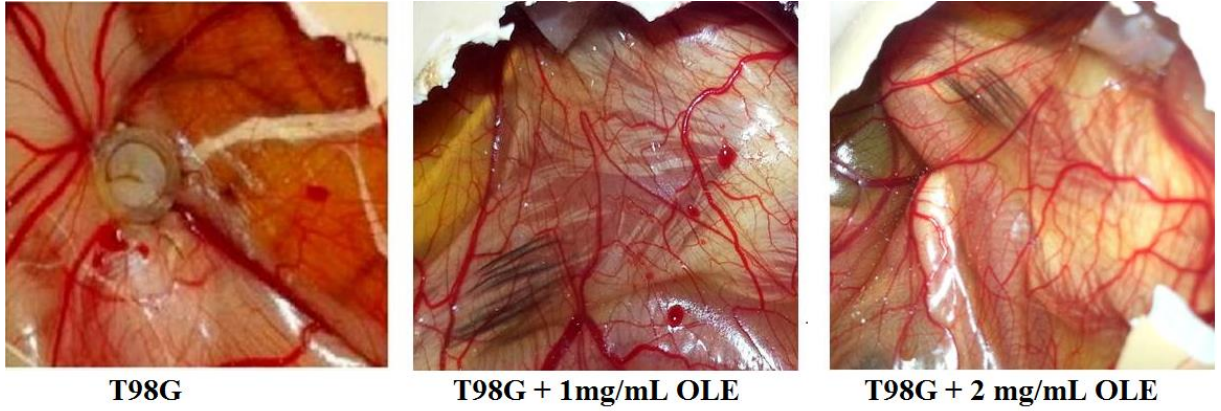
4.1.3.4. OLE'nin T98G Hücrelerinde İnvazyon Üzerindeki Etkisi

Her biri 24 tekrarlı olmak üzere, embriyolu tavuk yumurtalarının koryo-allantoik zarı üzerine 2×10^6 T98G hücresi, 1 mg/mL veya 2 mg/mL OLE ekilerek neovaskülerizasyon indüklendi. 10 günlük büyüme süresi sonunda ölü olduğu belirlenen yumurtalar değerlendirme dışı bırakıldı. OLE muamelesine bağlı olarak tümör gelişen ve gelişmeyen yumurta sayıları Tablo-42'de belirtilmektedir.

Tablo-42 OLE muamelesine bağlı olarak embriyolu yumurtalarda tümör gelişim oranı

	2×10^6 T98G	2×10^6 T98G + 1 mg/ml OLE	2×10^6 T98G + 2 mg/ml OLE
Toplam yumurta sayısı	24	24	24
Tümör gelişen yumurta sayısı	13	7	5
Tümör gelişmeyen yumurta sayısı	7	12	13
Ölü yumurta sayısı	4	5	6

OLE muamelesinin embriyolu yumurtada tümör oluşumu ve damarlanma üzerine etkisi Şekil-34'te belirtilmektedir.



Şekil-34 OLE muamelesi sonrası invazyon görüntüsü

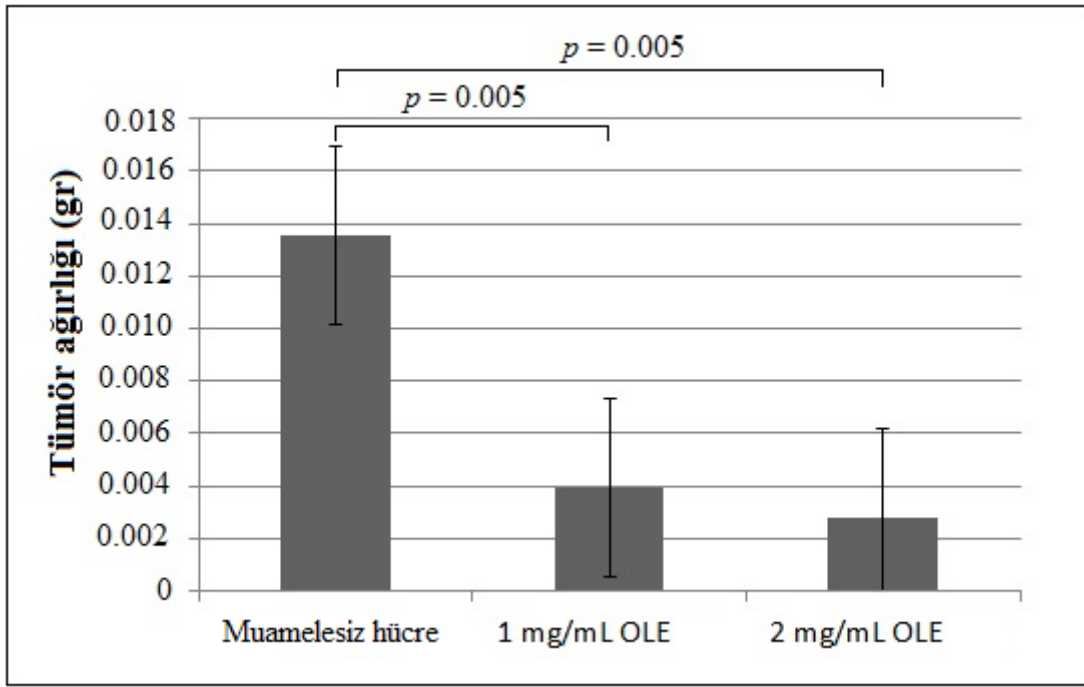
Yumurtadan uzaklaştırılan tümörler hassas terazide tartıldığında OLE muamelesinin tümör ağırlığını anlamlı şekilde azalttığı belirlendi. OLE muamelesinin tümörlerin ağırlığı üzerindeki etkisi Tablo-43 – 44'te ve Şekil-35'te belirtilmektedir.

Tablo-43 CAM analizinde OLE muamelesi sonucu oluşan tümörlerin ağırlıkları

	T98G (gr)	1 mg/mL OLE (gr)	2 mg/mL OLE (gr)
	0.0036	0.0043	0.0039
	0.0042	0.0052	0.0024
	0.0098	0.0024	0.002
	0.0194	0.0014	0.003
	0.0066	0.0044	0.0026
	0.0054	0.0059	
	0.0133	0.004	
	0.0127		
	0.0135		
	0.0271		
	0.0261		
	0.0155		
	0.0189		
En küçük – En büyük tümör ağırlığı (gr)	0.0036 – 0.0271	0.0014–0.0059	0.002 –0.0039
Ortalama tümör ağırlığı (gr)	0.013546154	0.003943	0.00278
Standart Sapma	0.007766125	0.0015598	0.0007225
Standart hata	0.002153935	0.0075812	0.0015162
95% CI	0.0088 – 0.018	0.0025 – 0.0053	0.0018 – 0.0036

Tablo-44 Post Hoc ve Tukey testlerine göre CAM analizinde OLE muamelesinin tümör büyüklüğü üzerine etkisi

Grup	ortalama fark	standart hata	<i>p</i> değeri	% 95CI
T98G – 1 mg/mL OLE	-0.0096	0.0027	0.005	0.0027 – 0.0164
T98G – 2 mg/mL OLE	-0.0107	0.0030	0.005	0.0309 – 0.0184
1 mg/mL OLE – 2 mg/mL OLE	-0.0011	0.0033	0.938	-0.0073 – 0.0096



Şekil-35 CAM analizinde T98G hücrelerinde OLE muamelesinin tümör büyüklüğü üzerine etkisi (*p* değeri Post Hoc ve Tukey analizi ile hesaplandı)

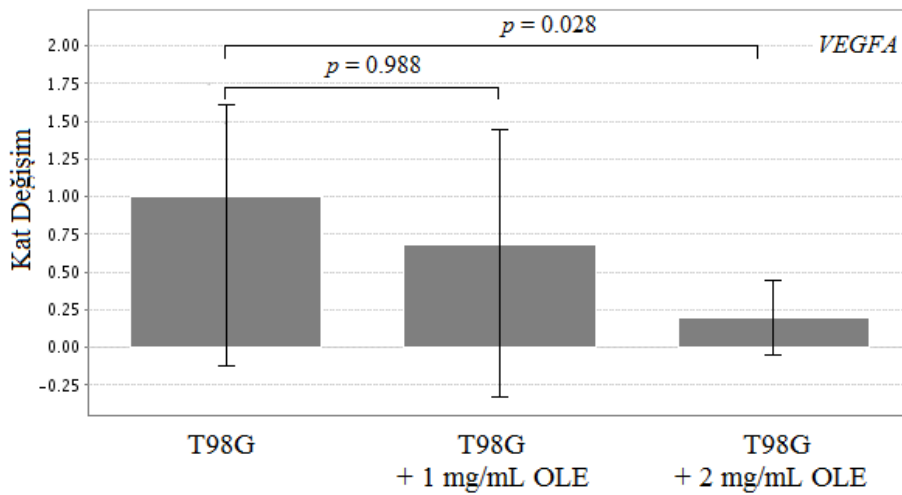
CAM assay'de OLE muamelesinin tümörler invazyonu üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için yumurtalardan uzaklaştırılan tümörlerde *VEGFA* ekspresyon analizi gerçekleştirildi. *VEGFA* ekspresyon analizi için CAM assay'de gelişen tümörlerden elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} dalga boyundaki optik dansiteleri Tablo-45'te belirtilmektedir. Gen ekspresyon analizi sonunda gerçekleştirilen bağımsız T testi verilerine göre, 1 mg/mL OLE tümör hücrelerinde *VEGFA* ekspresyonunda 1.47 kat, 2 mg/mL OLE ise 5.01 kat azalışa yol açtı (Tablo-46, Şekil-36).

Tablo-45 CAM analizinde T98G hücrelerinde OLE muamelesinden sonra *VEGFA* ekspresyonu analizi için tümörlerden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve optik dansiteleri

T98G			T98G + 1 mg/mL OLE			T98G + 2 mg/mL OLE		
No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	15.00	1.82	1	891.60	1.86	1	863.80	1.84
2	352.10	2	2	256.00	1.93	2	278.90	1.79
3	1257.00	1.82	3	1542.50	1.72	3	1941.00	1.84
4	766.90	2.01	4	1675.00	1.92	4	1393.50	1.98
5	84.98	1.74	5	49.65	1.95	5	1932.00	1.95
6	833.20	1.96	6	1565.30	1.84			
7	506.30	1.97	7	755.50	1.71			
8	521.40	1.73						
9	1106.60	1.75						
10	1230.00	1.85						
11	1332.00	1.95						
12	961.10	1.76						
13	1744.00	1.83						

Tablo-46 CAM analizinde OLE muamelesinin *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

Gen	T98G		T98G + 1 mg/mL OLE			T98G + 2 mg/mL OLE			
	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat değişim	95% CI	p değeri	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat değişim	95% CI	p değeri
VEGFA	0.7610	0.5176	0.6801	(0.00001. 1.38)	0.9885	0.1517	0.1994	(0.01. 0.39)	0.0284



Şekil-36 CAM assayde OLE muamelesinin *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

4.1.3.5. OLE'nin GBM Hücre Hatlarında TMZ İle Kombine Etkisi

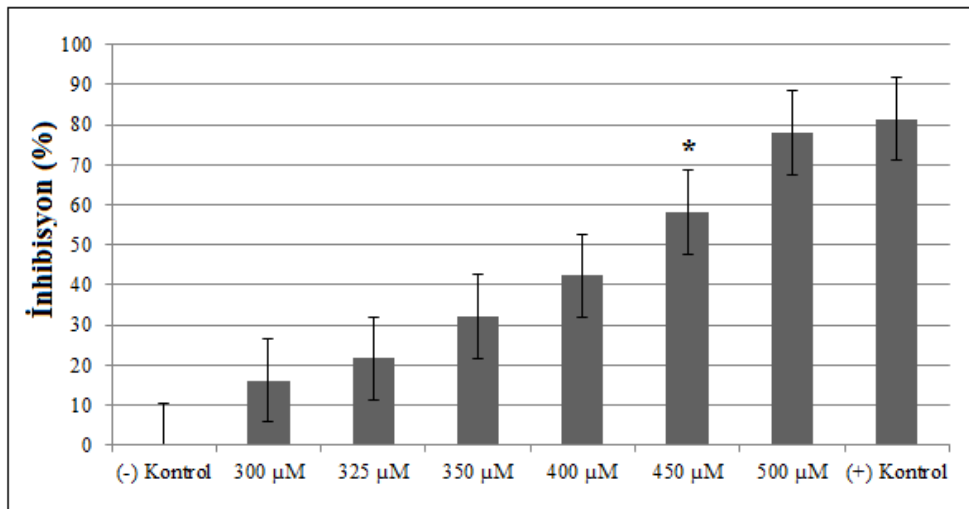
4.1.3.5.1. TMZ'nin GBM Hücre Hatlarında Sitotoksik Olarak Etkin Dozunun Belirlenmesi

TMZ'nin T98G, U-138MG ve U87MG hücre hatlarındaki etkin dozlarını belirlemek amacıyla, TMZ'nin 6 farklı dozu 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca hücrelere verildi. Hücre hatlarına uygulanan TMZ dozları ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda gerçekleştirilen WST-1 analizinden elde edilen veriler Tablo-47 – 49'da ve hücrelerde gözlenen canlılık oranları Şekil-37 – 39'da gösterilmektedir.

Tablo-47 24 saatlik TMZ muamelesi sonunda T98G hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(-) Kontrol	300 µM	325 µM	350 µM	400 µM	450 µM	500 µM	(+) Kontrol
1. deneme	1.105	0.972	0.722	0.708	0.588	0.506	0.263	0.207
2. deneme	1.149	0.950	0.846	0.669	0.622	0.448	0.252	0.203
3. deneme	1.064	0.836	0.886	0.747	0.613	0.439	0.242	0.200
4. deneme	1.066	0.917	0.981	0.854	0.706	0.445	0.207	0.204
Ortalama	1.096	0.918	0.858	0.744	0.632	0.459	0.241	0.203

(-) Kontrol: DMSO, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

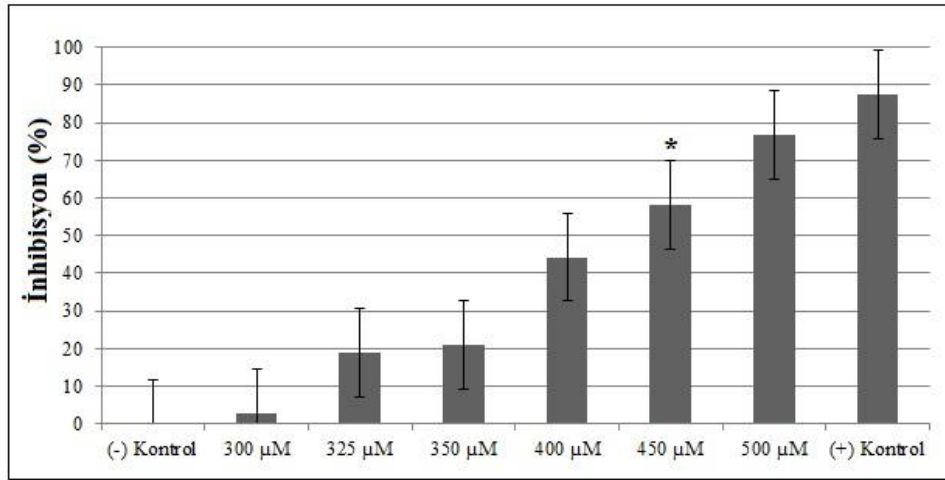


Şekil-37 24 saatlik TMZ muamelesi sonunda T98G hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: DMSO, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Tablo-48 24 saatlik TMZ muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(-) Kontrol	300 µM	325 µM	350 µM	400 µM	450 µM	500 µM	(+) Kontrol
1. deneme	1.431	1.475	1.153	1.566	0.748	0.591	0.331	0.172
2. deneme	1.399	1.377	1.367	1.137	0.88	0.6	0.271	0.173
3. deneme	1.405	1.393	0.917	0.901	0.733	0.591	0.327	0.178
4. deneme	1.424	1.254	1.152	0.864	0.793	0.595	0.381	0.182
Ortalama	1.414	1.374	1.147	1.117	0.788	0.594	0.327	0.176

(-) Kontrol: DMSO, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

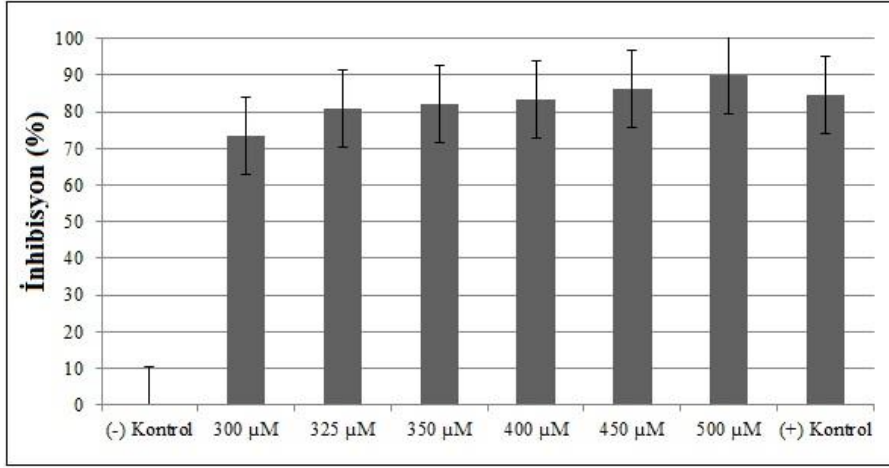


Şekil-38 24 saatlik TMZ muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: DMSO, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Tablo-49 24 saatlik TMZ muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(-) Kontrol	300 µM	325 µM	350 µM	400 µM	450 µM	500 µM	(+) Kontrol
1. deneme	1.006	0.592	0.176	0.107	0.219	0.178	0.092	0.178
2. deneme	1.22	0.182	0.281	0.102	0.156	0.167	0.167	0.187
3. deneme	1.261	0.326	0.209	0.375	0.155	0.186	0.119	0.174
4. deneme	1.179	0.137	0.226	0.248	0.244	0.106	0.088	0.185
Ortalama	1.165	0.309	0.223	0.208	0.193	0.159	0.116	0.181

(-) Kontrol: DMSO, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂



Şekil-39 24 saatlik TMZ muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: DMSO, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Tek yönlü varyans analizi ve Tukey testine göre, 450 µM TMZ'nin T98G ve U-138MG hücre hatlarında sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Yapılan hücre inhibisyon analizi sonuçlarına göre 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 450µM TMZ, T98G ve U-138MG hücrelerinde sırasıyla % 58.07 ve % 57.99 oranında hücre ölümüne yol açtı. Ancak, uygulanan tüm TMZ konsantrasyonlarının U-87MG hücreleri için lethal olduğu belirlendi. Bu nedenle yapılan literatür araştırmasına göre U-87MG hücreleri için 25 µM TMZ, %50 canlılık inhibisyonuna yol açan sitotoksik olarak etkin doz olarak belirlendi (348).

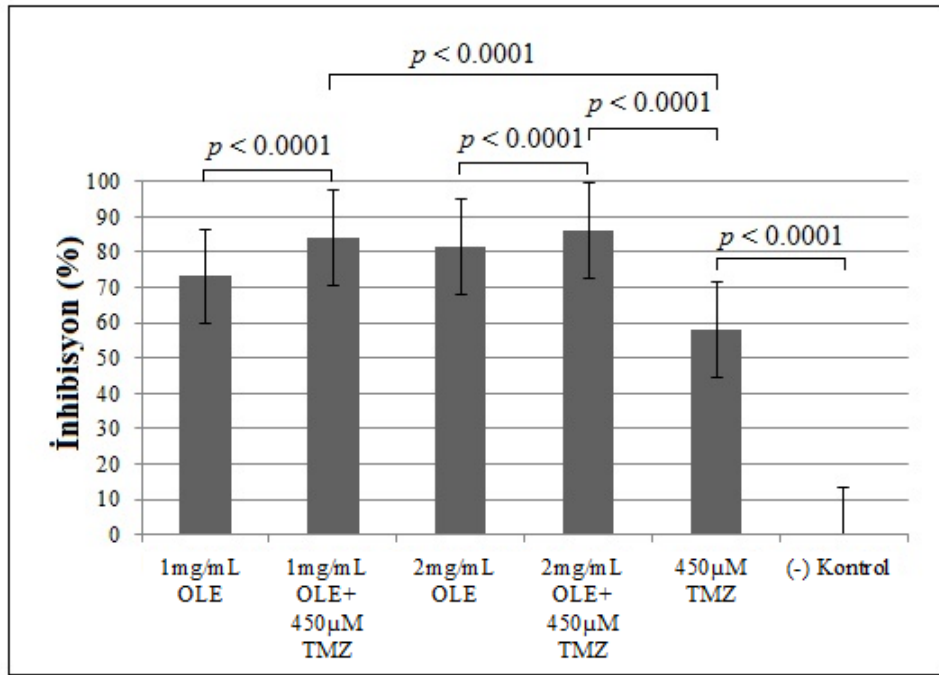
4.1.3.5.2. OLE'nin TMZ İle Kombine Etkisi

24 saatlik inkübasyon süresi sonunda WST-1 analizine göre T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde OLE ve TMZ muamelesinden sonra luminometrik olarak elde edilen değerler Tablo-50 – 52'de ve bu değerler kullanılarak belirlenen hücre canlılığı inhibisyon oranları Şekil-40 – 42'de gösterilmiştir.

Tablo-50 24 saatlik OLE ve TMZ muamelesi sonunda T98G hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(+) Kontrol	DMSO	(-) Kontrol	1 mg OLE	1 mg OLE+ 450µM TMZ	2 mg OLE	2 mg OLE+ 450µM TMZ	450 µM TMZ
1.deneme	0.126	2.524	2.445	0.644	0.360	0.468	0.308	1.014
2.deneme	0.544	2.530	2.630	0.720	0.380	0.489	0.328	1.097
3.deneme	0.249	2.586	2.686	0.725	0.375	0.474	0.325	1.022
Ortalama	0.306	2.546	2.587	0.696	0.371	0.477	0.320	1.044

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30mM H₂O₂

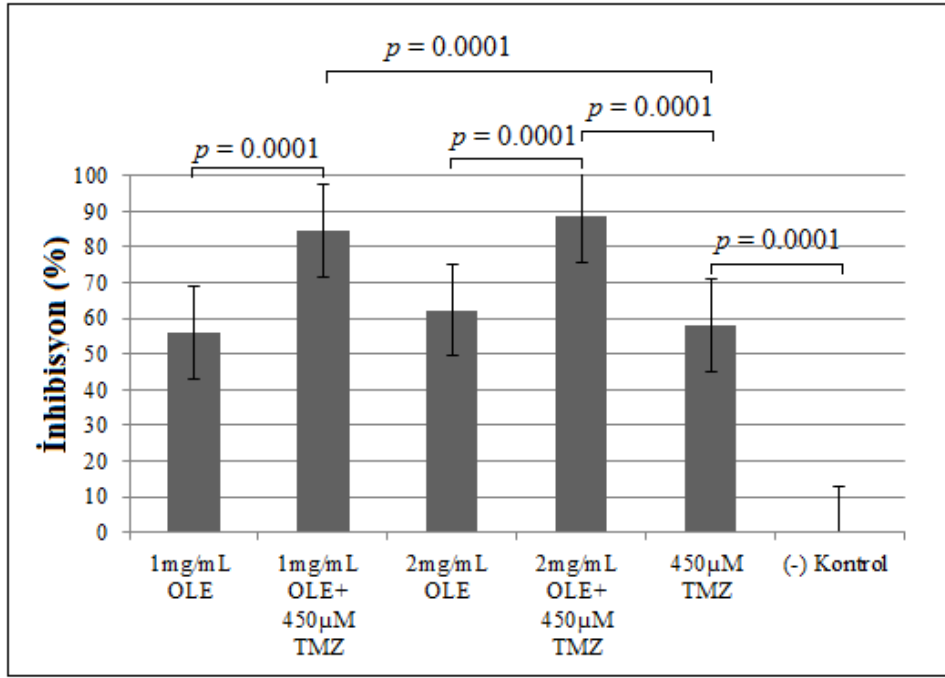


Şekil-40 24 saatlik OLE ve TMZ muamelesi sonunda T98G hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre

Tablo-51 24 saatlik OLE ve TMZ muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(+) Kontrol	DMSO	(-) Kontrol	1 mg/mL OLE	1 mg/mL OLE+ 450µM TMZ	2 mg/mL OLE	2 mg/mL OLE+ 450µM TMZ	450 µM TMZ
1.deneme	0.228	2.643	2.644	1.135	0.646	0.951	0.278	1.499
2.deneme	0.228	2.892	2.890	1.117	0.332	0.974	0.463	1.487
3.deneme	0.231	2.439	2.439	1.114	0.542	0.955	0.456	0.558
Ortalama	0.229	2.658	2.657	1.122	0.506	0.960	0.399	1.181

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

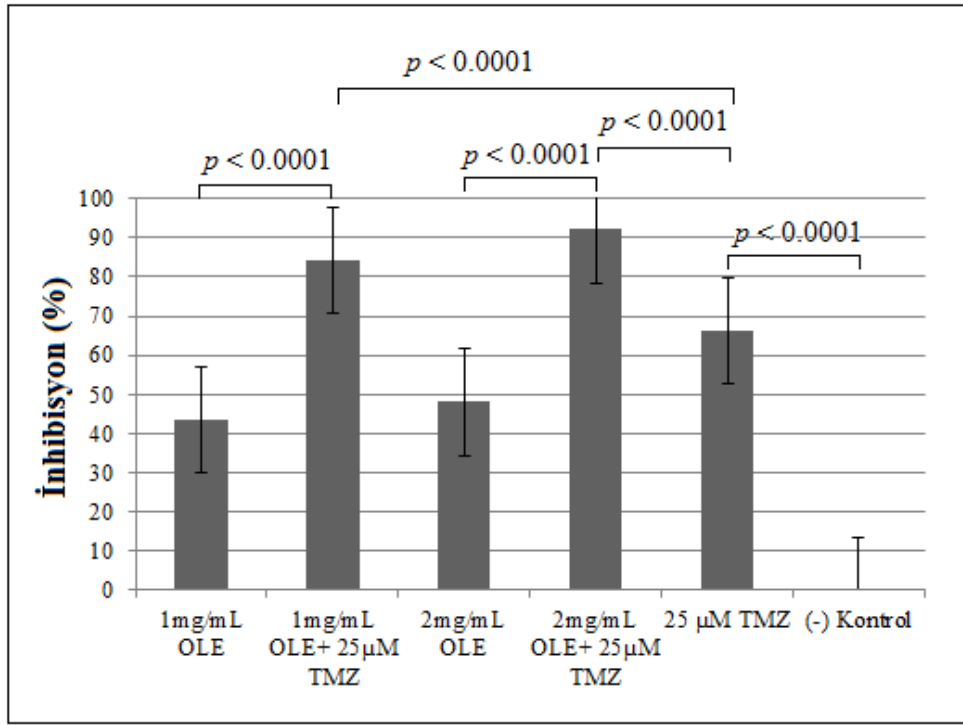


Şekil-41 24 saatlik OLE ve TMZ muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre

Tablo-52 24 saatlik OLE ve TMZ muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(+) Kontrol	DMSO	(-) Kontrol	1 mg/mL OLE	1 mg/mL OLE+ 25µM TMZ	2 mg/mL OLE	2 mg/mL OLE+ 25µM TMZ	25 µM TMZ
1.deneme	0.267	2.537	2.537	0.902	0.346	1.552	0.148	0.964
2.deneme	0.235	1.755	1.755	1.502	0.314	1.069	0.103	0.829
3.deneme	0.257	2.547	2.637	1.509	0.346	0.978	0.205	0.455
Ortalama	0.253	2.279	2.309	1.304	0.335	1.199	0.152	0.749

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30mM H₂O₂



Şekil-42 24 saatlik OLE ve TMZ muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre

T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde 1mg/mL OLE-TMZ kombinasyonu, muamelesiz hücelere göre hücre canlılığında sırasıyla % 84.07, % 84.47 ve % 84.18 oranında inhibisyona yol açtı. 2 mg/mL OLE-TMZ kombinasyonu ise sırasıyla % 86.05, % 88.70 ve % 92.12 oranında hücre canlılığını azalttı.

4.1.3.6. OLE'nin T98G Hücrelerinde miRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Daha önce 2010/07 nolu BAP projesi kapsamında gerçekleştirilen ve 2012 yılında Journal of Cancer Research and Clinical Oncology dergisinde yayınlanan çalışmamızda OLE'nin etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için miRNA PCR array tekniğinden yararlanılarak GBM oluşumu ve ilaç dirençliliği ile ilişkili yollarda görevli 40 farklı miRNA'nın ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Web tabanlı RT² Profiler PCR Array Data Analiz programından yararlanılarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda, 1 mg/mL OLE'nin Hsa-miR-137, Hsa-miR-145, Hsa-miR-153, Hsa-miR-181b ve Hsa-let-7d ekspresyonlarını sırasıyla 1.41, 1.19, 0.9, 1.84 ve 1.42 kat arttırdığı ($p < 0.05$), 2 mg/mL OLE'nin ise bu miRNA'ların ekspresyonlarını sırasıyla 1.8, 1.62, 1.32, 2.03 ve 1.07 kat

arttırdığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca hücelere, 1 mg/mL OLE 450 μ M TMZ ile birlikte verildiğinde yalnızca 450 μ M TMZ verilen hücelere göre Hsa-miR-137, Hsa-miR-145, Hsa-miR-153, Hsa-miR-181b ve Hsa-let-7d'nin sırasıyla 4.6, 2.38, 4.7, 6.1 ve 2.25 kat daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) (276). Bu nedenle, tez projesi kapsamında, primer GBM tümörlerinden elde edilen kanser kök hücrelerde gerçekleştirilen ileri analizlerde OLE'nin Hsa-miR-181b, Hsa-miR-145, Hsa-miR-153, Hsa-miR-137 ve Hsa-Let-7d ekspresyonları üzerindeki etkisi değerlendirildi.

4.1.3.7. miR-181b, miR-145, miR-153, miR-137 ve Let-7d'nin Hedef Genleri

miRWalk veri tabanı ve literatür araştırmasına göre miR-181b, miR-145, miR-153, miR-137 ve Let-7d'nin regüle ettiği genler Tablo-53'te belirtilmektedir.

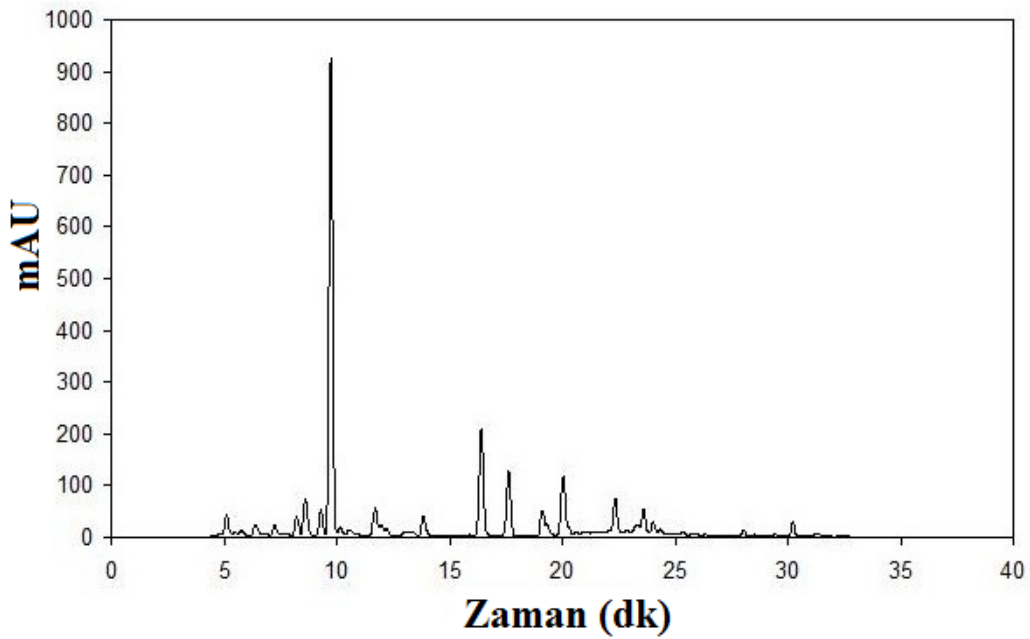
Tablo-53 miR-181b, miR-145, miR-153, miR-137 ve Let-7d'nin hedef genleri

miRNA	Hedef genleri	Referans makale	miRNA	Hedef genleri	Referans makale
miR-181b	<i>ATM</i>	349	miR-145	<i>TP53</i>	354
	<i>BCL2</i>	350		<i>c-MYC</i>	355
	<i>TGFB</i>	351		<i>SOX9</i>	356
	<i>TIMP3</i>	351, 352		<i>BCL2</i>	357
	<i>MCL1</i>	353		<i>CTGF</i>	358
miR-153	<i>BCL2</i>	359, 360	miR-137	<i>RTVP-1</i>	361
	<i>Irs2</i>	359		<i>c-MET</i>	362
	<i>Mcl1</i>	359		<i>BCL2</i>	362
	<i>Akt1</i>	359		<i>SOX2</i>	363
Let7d	<i>BCL2</i>	364, 365			
	<i>NF-kappaB</i>	365			
	<i>Bcl-xL</i>	366			
	<i>HMGA2</i>	367			
	<i>KRAS</i>	364, 368			

4.1.4. FCL

4.1.4.1. FCL'nin Yapısında Bulunan Etken Maddeler

FCL'nin aktif bileşenlerinin araştırılabilmesi için işlenmemiş FCL'nin sırasıyla hekzan, diklorometan, etanol ve suda çözünen fraksiyonları hazırlandı. Hekzan, diklorometan ve etanol'de çözünen FCL fraksiyonlarında herhangi bir sitotoksik aktivite belirlenmediği için yalnızca FCL'nin sulu çözeltisinin HPLC analizi gerçekleştirildi. HPLC/ DAD analizine göre FCL'nin suda çözünen fraksiyonunun içeriğinde 28.784 ± 0.080 mg/L protocatechuic asit, 3.06 ± 0.027 mg/L kafeik asit, 2.536 ± 0.005 mg/L ferulik asit, 2.746 ± 0.007 mg/L p-coumaric asit ve 0.562 ± 0.004 mg/L quercetin (n = 2) olduğu belirlendi. FCL'nin kromatogram görüntüsü Şekil-43'te gösterilmiştir.



Şekil-43 FCL'nin HPLC analizindeki kromatogram görüntüsü. 280 nm'de elde edilen 1, 2, 3, 4 ve 5. Pikler sırasıyla protocatechuic acid, kafeik asit, p-coumaric asit, ferulik asid ve quercetin

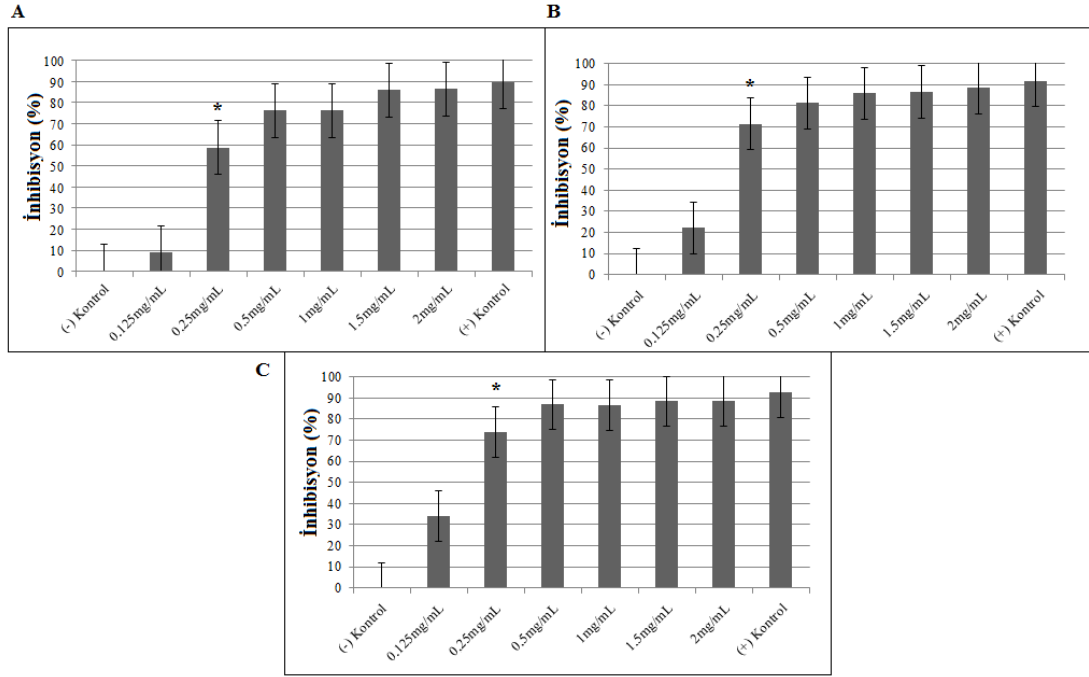
4.1.4.2. FCL'nin GBM Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Aktivitesi

WST-1 analizine göre T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat FCL ile muamelesinden sonra luminometrik olarak elde edilen değerler Tablo-54 – 56'da ve bu değerler kullanılarak belirlenen ortalama canlılık oranları Şekil-44 – 46'da gösterilmiştir.

Tablo-54 24, 48 ve 72 saatlik FCL muamelesi sonunda T98G hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.499	1.437	0.647	0.490	0.369	0.256	0.244	0.105
2. deneme	1.591	1.342	0.649	0.570	0.352	0.235	0.223	0.169
3. deneme	1.524	1.343	0.680	0.195	0.357	0.210	0.224	0.179
4. deneme	1.421	1.380	0.516	0.176	0.349	0.142	0.125	0.170
Ortalama	1.508	1.375	0.623	0.357	0.356	0.210	0.204	0.156
48 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	2.535	1.309	0.56	0.487	0.294	0.272	0.289	0.196
2. deneme	2.293	1.412	0.744	0.397	0.327	0.274	0.290	0.211
3. deneme	2.222	2.049	0.470	0.478	0.302	0.280	0.276	0.189
4. deneme	1.884	2.183	0.765	0.307	0.331	0.364	0.16	0.122
Ortalama	2.233	1.738	0.634	0.417	0.313	0.297	0.253	0.179
72 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.901	1.597	0.438	0.460	0.292	0.274	0.261	0.192
2. deneme	2.133	1.313	0.690	0.207	0.294	0.273	0.207	0.203
3. deneme	2.277	1.424	0.610	0.228	0.279	0.274	0.279	0.208
4. deneme	2.302	1.350	0.500	0.230	0.282	0.172	0.221	0.023
Ortalama	2.153	1.421	0.559	0.281	0.286	0.248	0.242	0.156

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

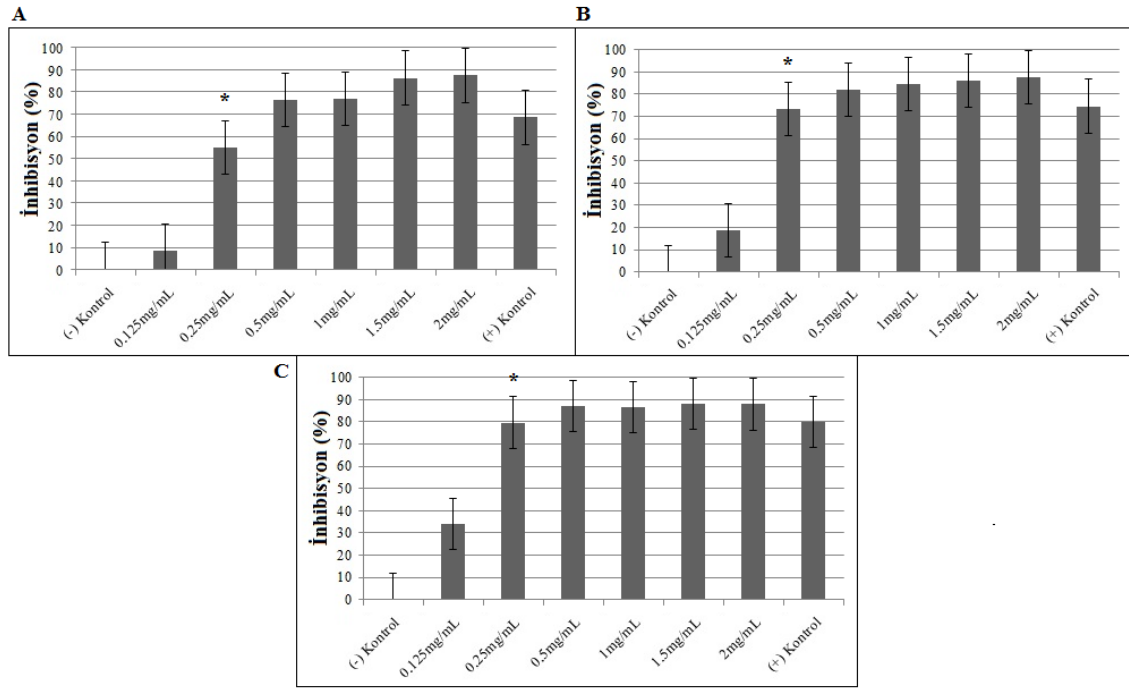


Şekil-44 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik FCL muamelesi sonunda T98G hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Tablo-55 24, 48 ve 72 saatlik FCL muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.602	1.522	0.823	0.357	0.366	0.232	0.102	0.499
2. deneme	1.355	1.479	0.541	0.413	0.353	0.245	0.254	0.482
3. deneme	1.490	1.250	0.426	0.320	0.355	0.156	0.221	0.457
4. deneme	1.579	1.263	0.925	0.330	0.319	0.198	0.172	0.448
Ortalama	1.506	1.378	0.678	0.355	0.348	0.207	0.187	0.472
48 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.622	1.043	0.464	0.284	0.25	0.165	0.204	0.38
2. deneme	1.663	1.277	0.44	0.302	0.26	0.18	0.124	0.33
3. deneme	1.68	1.373	0.43	0.297	0.21	0.26	0.211	0.326
4. deneme	1.182	1.29	0.305	0.231	0.221	0.24	0.211	0.526
Ortalama	1.536	1.245	0.409	0.278	0.235	0.211	0.187	0.390
72 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.800	0.989	0.311	0.180	0.212	0.172	0.168	0.305
2. deneme	1.200	0.936	0.305	0.171	0.204	0.150	0.165	0.295
3. deneme	1.110	0.762	0.255	0.200	0.164	0.164	0.163	0.205
4. deneme	1.400	0.950	0.250	0.160	0.159	0.165	0.164	0.301
Ortalama	1.377	0.909	0.280	0.177	0.184	0.162	0.165	0.276

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

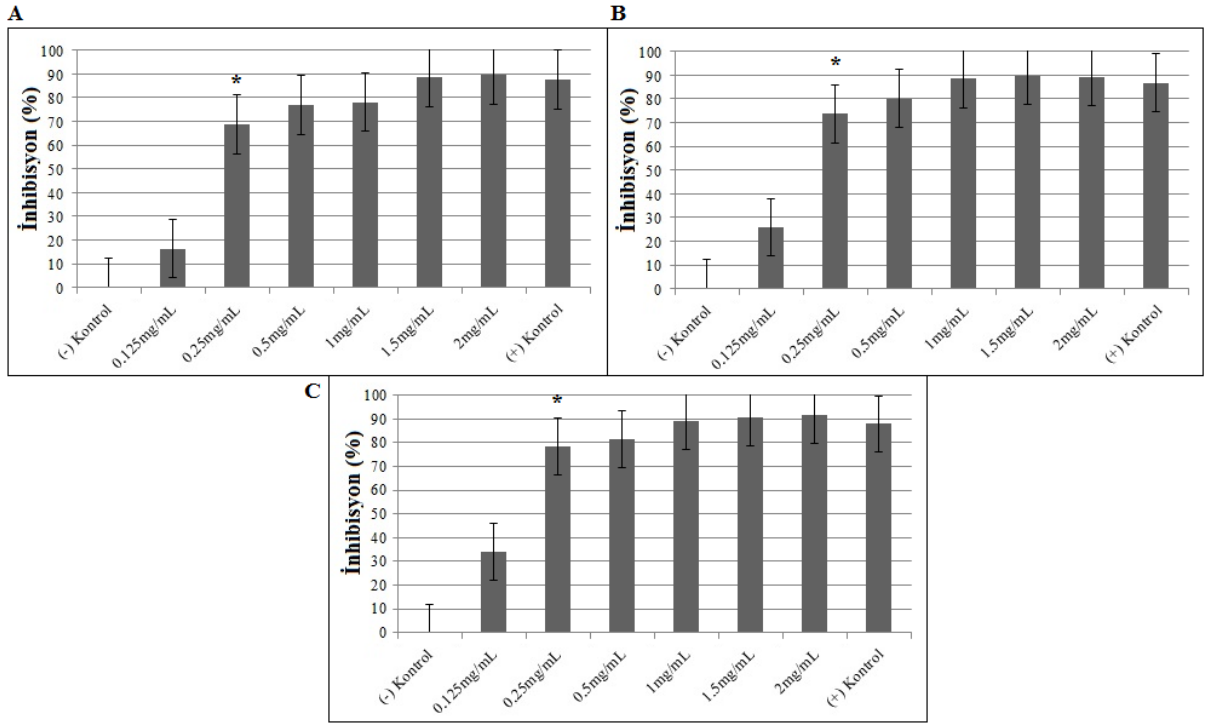


Şekil-45 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik FCL muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Tablo-56 24, 48 ve 72 saatlik FCL muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.245	0.879	0.483	0.437	0.392	0.139	0.134	0.150
2. deneme	1.339	0.997	0.416	0.272	0.273	0.139	0.139	0.150
3. deneme	1.269	1.230	0.418	0.196	0.258	0.165	0.132	0.158
4. deneme	1.384	1.270	0.316	0.296	0.218	0.149	0.131	0.191
Ortalama	1.309	1.094	0.408	0.300	0.285	0.148	0.134	0.162
48 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	0.911	1.130	0.386	0.334	0.211	0.19	0.164	0.273
2. deneme	1.839	0.870	0.501	0.380	0.216	0.162	0.192	0.246
3. deneme	1.665	1.343	0.393	0.185	0.152	0.142	0.158	0.262
4. deneme	1.899	1.340	0.385	0.350	0.151	0.150	0.158	0.048
Ortalama	1.578	1.170	0.416	0.312	0.182	0.161	0.168	0.207
72 saat								
	(-) Kontrol	0.125 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	2 mg/mL	(+) Kontrol
1. deneme	1.287	1.299	0.31	0.348	0.212	0.105	0.191	0.208
2. deneme	1.304	0.864	0.368	0.261	0.145	0.107	0.103	0.231
3. deneme	1.299	0.889	0.300	0.240	0.139	0.102	0.102	0.227
4. deneme	2.038	0.850	0.300	0.240	0.143	0.240	0.104	0.050
Ortalama	1.482	0.975	0.319	0.272	0.159	0.138	0.125	0.179

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂



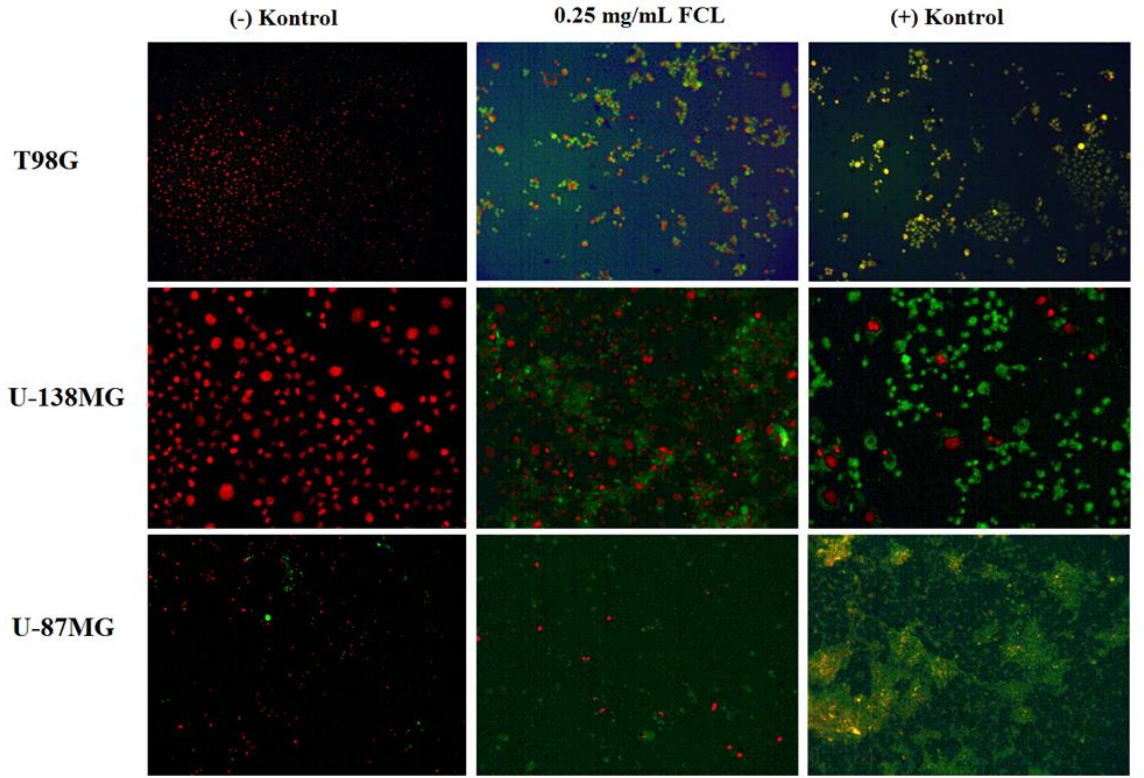
Şekil-46 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik FCL muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. * $p < 0.05$. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H_2O_2

FCL'nin optimal etkisi 24 saatte gözlemlendi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0.25 mg/mL FCL, T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 58.7, % 54.94 ve % 68.81 oranında hücre canlılığında azalmaya yol açtı. Aynı koşullar altında, (+) kontrol olarak kullanılan 30mM H_2O_2 , T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 89.67, % 68.7 ve % 87.6 oranında hücre ölümüne yol açtı. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey testine göre, FCL'nin 0.25 mg/mL'lik konsantrasyonunun T98G, U-138MG ve U-87MG hücre hatlarında lethal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

Thoma lamında gerçekleştirilen Triphan mavisi ile hücre canlılık tayinine göre, 0.25 mg/mL FCL'nin lenfosit hücreleri üzerinde % 14.83 ± 0.33 oranında sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi. Aynı koşullar altında, (+) kontrol olarak kullanılan 30mM H_2O_2 , lenfosit hücrelerinde % 75.5 ± 0.5 oranında ölüme yol açtı.

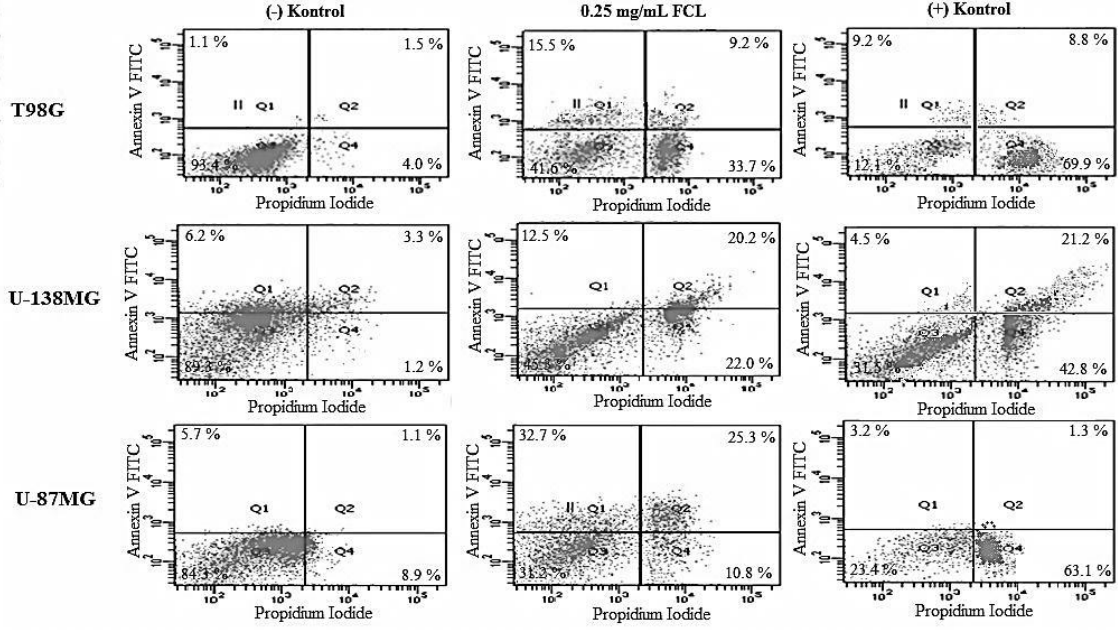
4.1.4.3. FCL'nin GBM Hücre Hatlarında Hücre Ölüm Yolakları Üzerindeki Etkisi

TUNEL analizine göre, 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda 0.25 mg/mL FCL'nin T98G hücrelerinde % 24.5, U-138 hücrelerinde % 32.5, U-87MG hücrelerinde % 57.8 oranında ölüme yol açtığı belirlendi (Şekil-47).



Şekil-47 FCL'nin GBM hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisinin TUNEL yöntemi ile gösterilmesi. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

Annexin V analizine göre, 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda 0.25 mg/mL FCL'nin T98G hücrelerinde % 24.7 apoptotik, % 33.7 nekrotik ölüme, U-138 hücrelerinde % 32.7 apoptotik, % 22.0 nekrotik ölüme, U-87MG hücrelerinde % 58.0 apoptotik ve % 10.8 nekrotik ölüme yol açtığı belirlendi (Şekil-48).



Şekil-48 FCL'nin GBM hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin V yöntemi ile gösterilmesi. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

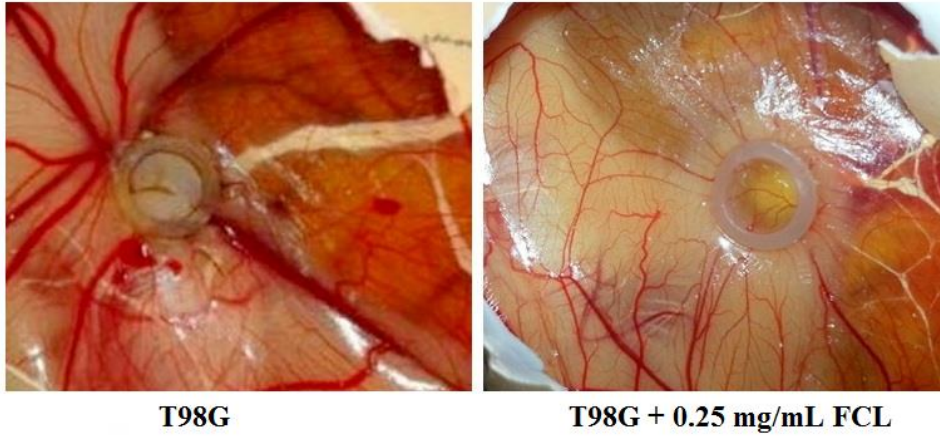
4.1.3.4. FCL'nin T98G Hücrelerinde İnvazyon Üzerindeki Etkisi

En az 23 tekrarlı olmak üzere, embriyolu tavuk yumurtalarının koryo-allantoik zarı üzerine 2×10^6 T98G hücresi ve 0.25 mg/mL FCL ekilerek neovaskülerizasyon indüklendi. 10 günlük büyüme süresi sonunda ölü olduğu belirlenen yumurtalar değerlendirme dışı bırakıldı. FCL muamelesine bağlı olarak tümör gelişen ve gelişmeyen yumurta sayıları Tablo-57'de belirtilmektedir.

Tablo-57 FCL muamelesine bağı olarak embriyolu yumurtalarda tümör gelişim oranı

	2x10 ⁶ T98G	2x10 ⁶ T98G + 0.25 mg/ml FCL
Toplam yumurta sayısı	24	23
Tümör gelişen yumurta sayısı	13	9
Tümör gelişmeyen yumurta sayısı	7	12
Ölü yumurta sayısı	4	2

FCL muamelesinin embriyolu yumurtada tümör oluşumu ve damarlanma üzerine etkisi Şekil-49'da belirtilmektedir.



Şekil-49 FCL muamelesi sonrası T98G hücrelerinde invazyon görüntüsü

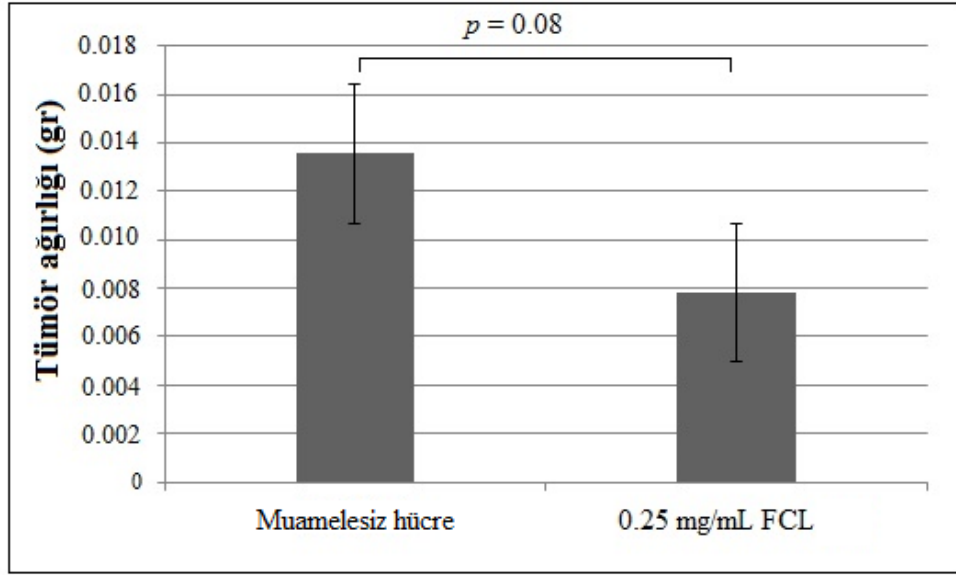
Yumurtadan uzaklaştırılan tümörler hassas terazide tartıldığında FCL muamelesinin tümör ağırlığını anlamlı şekilde azalttığı belirlendi. FCL muamelesinin tümörlerin ağırlığı üzerindeki etkisi Tablo-58 – 59 ve Şekil-50'de belirtilmektedir.

Tablo-58 CAM analizinde T98G hücrelerinde FCL muamelesi sonucu oluşan tümörlerin ağırlıkları

	T98G (gr)	0.25 mg/mL FCL (gr)
	0.0036	0.0170
	0.0042	0.0037
	0.0098	0.0135
	0.0194	0.0058
	0.0066	0.0029
	0.0054	0.0048
	0.0133	0.0071
	0.0127	0.0033
	0.0135	0.0122
	0.0271	
	0.0261	
	0.0155	
	0.0189	
En küçük – En büyük tümör ağırlığı (gr)	0.0036 – 0.0271	0.0029 – 0.0170
Ortalama tümör ağırlığı (gr)	0.013546154	0.007811
Standart Sapma	0.007766125	0.0051363
Standart hata	0.002153935	0.0017121

Tablo-59 Bağımsız T testine göre CAM analizinde FCL muamelesinin tümör büyüklüğü üzerine etkisi

Grup	t	df	ortalama fark	standart hata	p değeri	% 95CI
T98G – 0.25 mg/mL FCL	1.935	20	0.0057	0.002	0.08	-0.0004 – 0.0119



Şekil-50 CAM analizinde T98G hücrelerinde FCL muamelesinin tümör büyüklüğü üzerine etkisi (p değeri Bağımsız T testi ile hesaplandı)

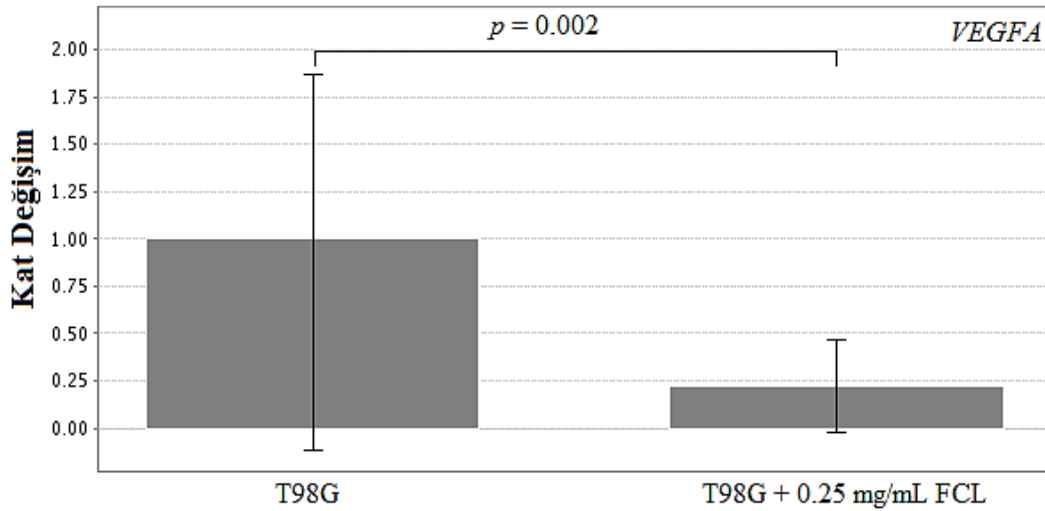
CAM analizinde FCL muamelesinin tümörler invazyonu üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için yumurtalardan uzaklaştırılan tümörlerde *VEGFA* ekspresyon analizi gerçekleştirildi. *VEGFA* ekspresyon analizi için CAM’da gelişen tümörlerden elde edilen RNA’ların konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} dalga boyundaki optik dansiteleri Tablo-60’ta belirtilmektedir. Gen ekspresyon analizi sonunda gerçekleştirilen bağımsız T testi verilerine göre, 0.25 mg/mL FCL tümör hücrelerinde *VEGFA* ekspresyonunda 4.51 kat azalışa yol açtı (Tablo-61, Şekil-51).

Tablo-60 CAM analizinde FCL muamelesinden sonra *VEGFA* ekspresyonu analizi için tümörlerden izole edilen RNA’ların konsantrasyonları ve optik dansiteleri

T98G			T98G + 0.25 mg/mL FCL		
No	RNA (ng/ μ l)	A_{260}/A_{280}	No	RNA (ng/ μ l)	A_{260}/A_{280}
1	15.00	1.82	1	760.60	1.76
2	352.10	2	2	325.00	1.85
3	1257.00	1.82	3	1425.65	1.92
4	766.90	2.01	4	1362.03	1.82
5	84.98	1.74	5	1145.15	1.95
6	833.20	1.96	6	1321.42	1.89
7	506.30	1.97	7	1665.75	1.81
8	521.40	1.73	8	564.72	2.01
9	1106.60	1.75	9	896.35	2.08
10	1230.00	1.85			
11	1332.00	1.95			
12	961.10	1.76			
13	1744.00	1.83			

Tablo-61 CAM analizinde FCL muamelesinin *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

Gen	T98G		T98G + 0.25 mg/mL FCL		
	$2^{(-\text{Avg.}(\Delta\text{Ct}))}$	$2^{(-\text{Avg.}(\Delta\text{Ct}))}$	Kat değişim	95% CI	p değeri
<i>VEGFA</i>	0.7610	0.1684	0.2213	(0.08, 0.37)	0.002



Şekil-51 CAM analizinde FCL muamelesinin T98G hücrelerinde *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

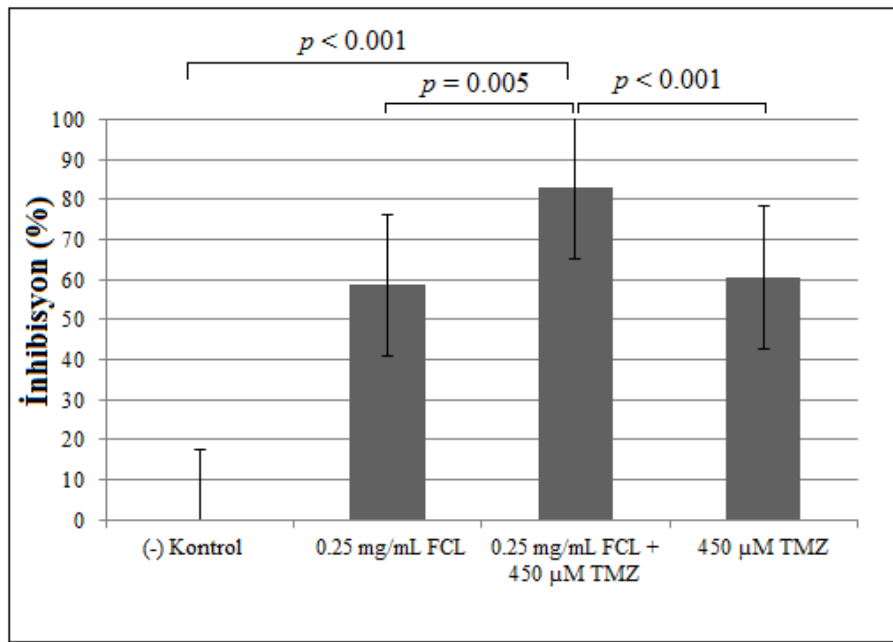
4.1.4.5. FCL'nin GBM Hücre Hatlarında TMZ ile Kombine Etkisi

24 saatlik inkübasyon süresi sonunda WST-1 analizine göre T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde FCL ve TMZ muamelesinden sonra luminometrik olarak elde edilen değerler Tablo-62 – 64'te ve bu değerler kullanılarak belirlenen hücre canlılığı inhibisyon oranları Şekil-52 – 54'te gösterilmiştir.

Tablo-62 24 saatlik FCL ve TMZ muamelesi sonunda T98G hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(+) Kontrol	DMSO	(-) Kontrol	0.25 mg/mL FCL	0.25 mg/mL FCL + 450 µM TMZ	450 µM TMZ
1. deneme	0.105	2.624	1.499	0.647	0.429	1.014
2. deneme	0.169	2.63	1.591	0.649	0.415	1.097
3. deneme	0.179	2.686	1.524	0.680	0.493	1.022
4. deneme	0.170	2.647	1.421	0.516	0.446	1.044
Ortalama	0.155	2.646	1.508	0.623	0.445	1.044

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

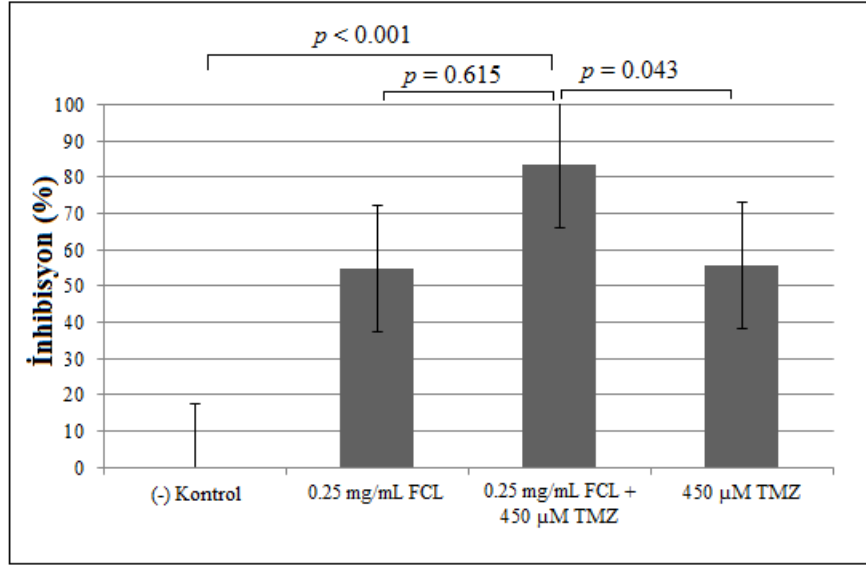


Şekil-52 24 saatlik FCL ve TMZ muamelesi sonunda T98G hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre

Tablo-63 24 saatlik FCL ve TMZ muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(+) Kontrol	DMSO	(-) Kontrol	0.25 mg/mL FCL	0.25 mg/mL FCL + 450 µM TMZ	450 µM TMZ
1. deneme	0.499	2.643	1.602	0.823	0.400	1.499
2. deneme	0.482	2.892	1.355	0.541	0.441	1.487
3. deneme	0.457	2.439	1.490	0.426	0.428	1.181
4. deneme	0.448	2.658	1.579	0.925	0.495	0.558
Ortalama	0.471	2.658	1.506	0.678	0.441	1.181

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂

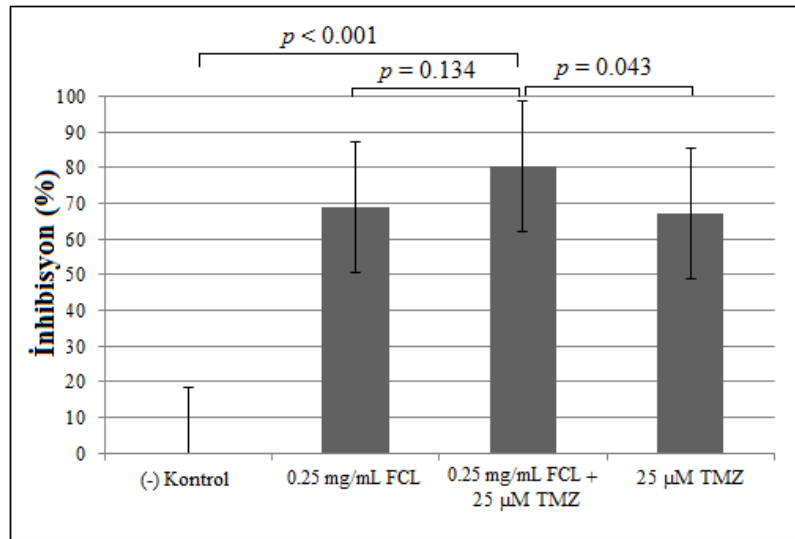


Şekil-53 24 saatlik FCL ve TMZ muamelesi sonunda U-138MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre

Tablo-64 24 saatlik FCL ve TMZ muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

	(+) Kontrol	DMSO	(-) Kontrol	0.25 mg/mL FCL	0.25 mg/mL FCL + 25 µM TMZ	25 µM TMZ
1. deneme	0.150	2.537	1.245	0.483	0.293	0.749
2. deneme	0.150	1.755	1.339	0.416	0.540	0.829
3. deneme	0.158	2.547	1.269	0.418	0.493	0.455
4. deneme	0.191	2.279	1.384	0.316	0.442	0.964
Ortalama	0.162	2.280	1.309	0.408	0.442	0.749

(-) Kontrol: Muamelesiz hücre, (+) Kontrol: 30 mM H₂O₂



Şekil-54 24 saatlik FCL ve TMZ muamelesi sonunda U-87MG hücrelerinde belirlenen hücre inhibisyon oranları. (-) Kontrol: Muamelesiz hücre

T98G ve U-138MG hücreleri 450 μ M TMZ ile muamele edildiğinde, muamelesiz hücrelere göre hücre canlılığında sırasıyla % 60.5 ve % 55.5 oranında inhibisyon gerçekleşti. U-87MG hücreleri 25 μ M TMZ ile muamele edildiğinde ise muamelesiz hücrelere göre hücre canlılığı % 67.1 oranında azaldı. T98G, U-138MG ve U-87MG hücreleri belirtilen TMZ konsantrasyonları ve 0.25 mg/mL FCL ile birlikte muamele edildiğinde hücre canlılığında sırasıyla % 83.1, % 83.4 ve % 80.6 oranında azalma gözlemlendi.

4.1.4.6. FCL'nin T98G Hücrelerinde miRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

FCL'nin etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için miRNA PCR array tekniğinden yararlanılarak GBM oluşumu ve ilaç dirençliliği ile ilişkili yollarda görevli 40 farklı miRNA'nın ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Bu amaçla FCL, FCL-TMZ kombinasyonu veya TMZ ile 24 saat süresinde muamele edilmiş T98G hücrelerinden elde edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları Tablo-65'te belirtilmektedir.

Tablo-65 FCL, FCL-TMZ kombinasyonu veya TMZ muamelesinden sonra miRNA ekspresyonu analizi için T98G hücrelerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve optik dansiteleri

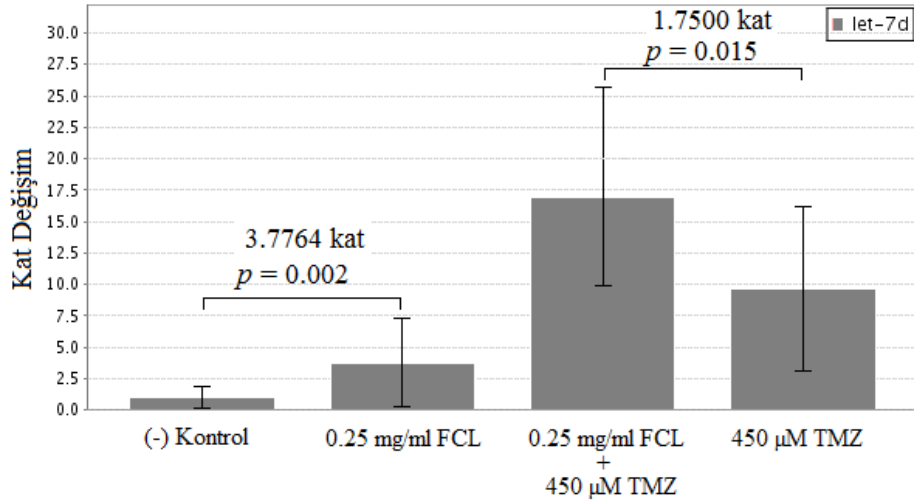
T98G		
No	RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	115.00	1.82
2	135.20	2.15
T98G + 0.25 mg/mL FCL		
1	579.75	1.78
2	878.52	1.92
T98G + 0.25 mg/mL FCL + 450 μ M TMZ		
1	185.65	1.81
2	562.84	1.96
T98G + 450 μ M TMZ		
1	308.54	2.01
2	523.74	2.08

Web tabanlı RT² Profiller PCR Array Data Analiz programından yararlanılarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda, 0.25 mg/mL FCL'nin muamele edilmemiş hücrelere göre Hsa-let-7d'nin ekspresyon seviyesini 3.77 kat arttırdığı belirlendi ($p < 0.05$). Ayrıca hücrelere, 0,25 mg/mL FCL 450 µM TMZ ile birlikte verildiğinde yalnızca 450 µM TMZ verilen hücrelere göre Hsa-let-7d'nin 1.75 kat daha fazla eksprese olduğu saptandı ($p < 0.05$; Tablo-66). Deney 10 kez tekrarlanarak, superarray tekniği ile let-7d ekspresyonunda belirlenen değişim single assay tekniği ile doğrulandı (Şekil-55).

Tablo-66 Superarray tekniğine göre 0.25 mg/mL FCL ve 450 µM TMZ'nin T98G hücrelerinde let-7d ekspresyonu üzerindeki etkisi

	let-7d
(-) Kontrol	
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	0.1611
0.25 mg/ml FCL	
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	0.1108
Kat değişim	0.6878
95% CI	(0.00001, 4.76)
<i>p</i> değeri*	0.1396
0.25 mg/FCL + 450µM TMZ	
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	0.507566
Kat değişim	3.1492
95% CI	(1.54, 4.76)
<i>p</i> değeri*	0.0002
450µM TMZ	
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	0.2485
Kat değişim	1.5422
95% CI	(0.36, 2.72)
<i>p</i> değeri*	0.2810

* RT² Profiler PCR Array Data Analysis'de Bağımsız T-testi kullanılarak değerlendirildi.



Şekil-55 Single assay tekniğine göre 0.25 mg/mL FCL ve 450 µM TMZ'nin T98G hücrelerinde let-7d ekspresyonu üzerindeki etkisi. (P değeri RT2 Profiler PCR Array Data Analysis'de Bağımsız T-testi kullanılarak değerlendirildi)

4.1.4.7. Let-7d'nin Hedef Genleri

miRWalk veri tabanı ve literatür araştırmasına göre Let-7d'nin regüle ettiği genler Tablo-67'de belirtilmektedir.

Tablo-67 Let-7d'nin hedef genleri

miRNA	Hedef genleri	Referans makale
Let7d	<i>BCL2</i>	364, 365
	<i>NF-kappaB</i>	365
	<i>Bcl-xL</i>	366
	<i>HMGA2</i>	367
	<i>KRAS</i>	364, 368

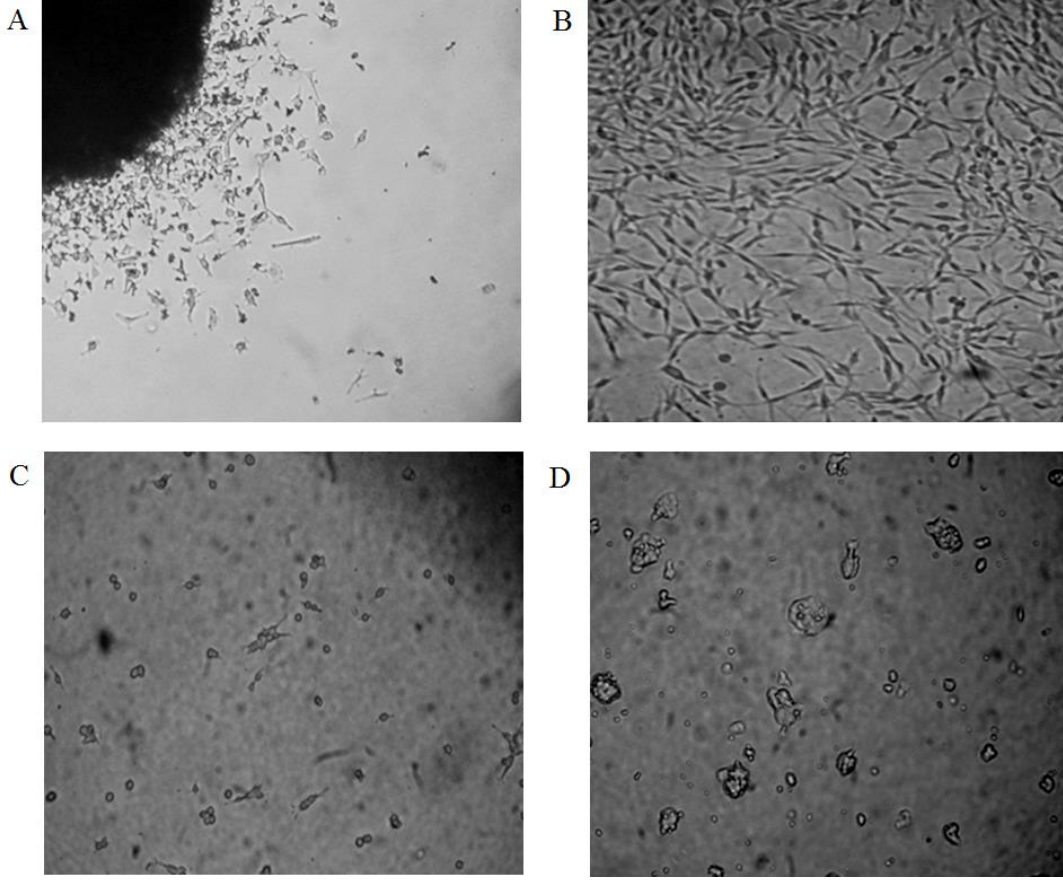
4.2. Bitkisel Özümlerin Glioblastoma Kanseri Kök Hücreleri (GSC) Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

4.2.1. Hasta Grubu

Çalışmaya yaş ortalaması 62.5 ± 1.76 (48–73) olan 11'i erkek, 9'u kadın olmak üzere 20 GBM hastası dahil edildi. Primer tümör hastaların 4'ünde parietal, 9'unda frontal, 3'ünde temporal, 2'sinde talamik ve 1'inde oksipital bölgede yer almakta idi. Hastaların 7 (% 33.3)'sinde ağır baş ağrısı, 5 (% 23.8)'inde başdönmesi, 4 (% 19)'ünde konuşma güçlüğü ve 2 (% 9.5)'sinde kişilik ve karakter değişimi görüldü. Ayrıca, 16 (% 76.1) hastada nöroşirüjik hasarlar görüldü. Hiçbir hastada parezi gözlenmedi.

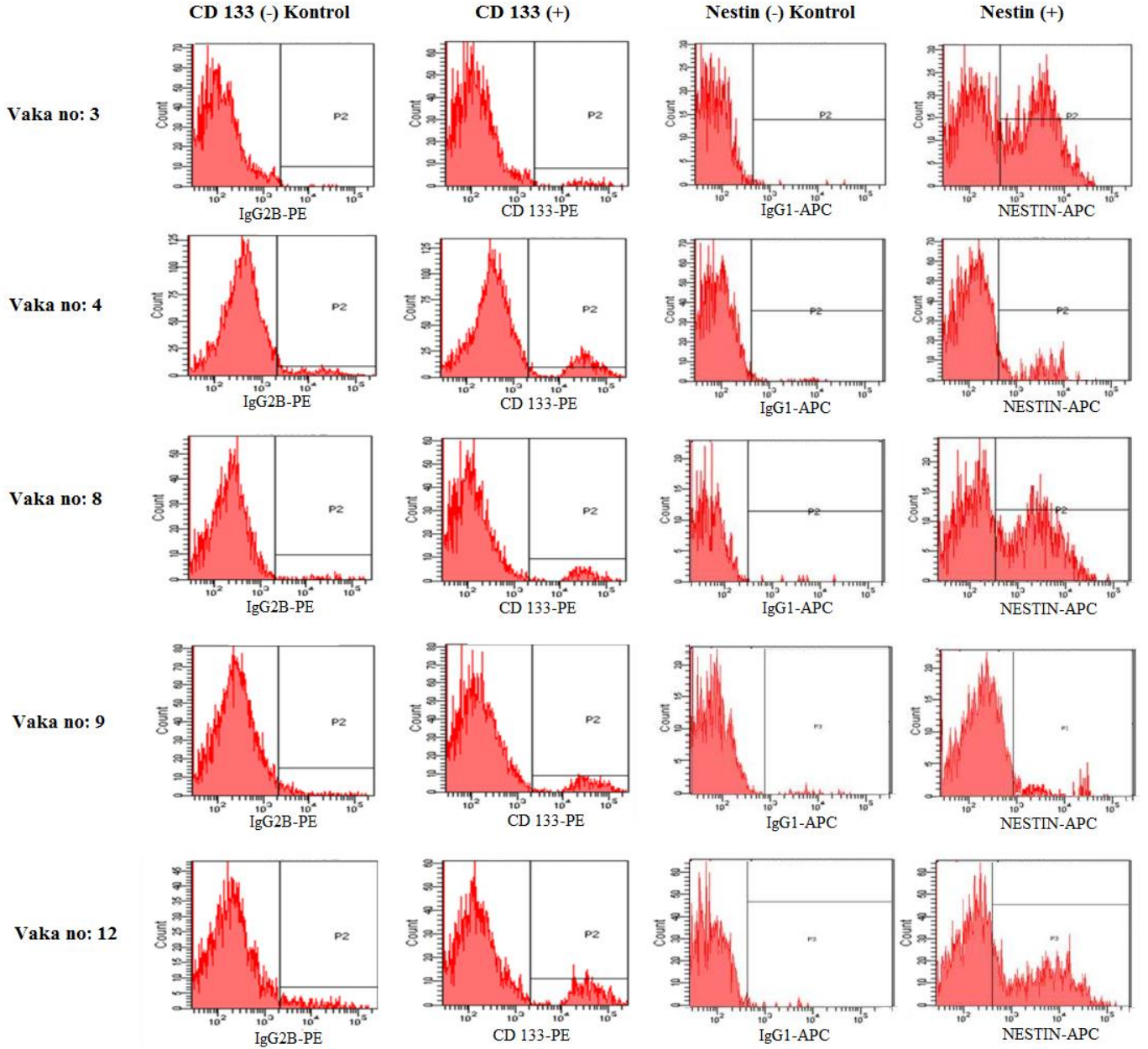
4.2.2. GSC İzolasyonu ve Validasyonu

20 primer GBM tümörü hücre kültür ortamında 3 – 6 pasaj çoğaltıldı ve CD133 (+) olan hücreler magnetik ayırım yöntemiyle ayrılarak yeni bir hücre kültür kabına aktarıldı ve serumdan yoksun kök hücre besiyerinde hücre sayısı 1×10^6 'ya ulaşana dek çoğaltıldı. 3, 4, 8, 9 ve 12 numaralı primer GBM tümörlerinden çoğaltılan hücreler, kök hücre besiyerinde nörosfer oluşturdu (Şekil-56).



Şekil-56 Hücre kültürü koşullarında GSC (+) GBM tümörlerinin büyümesi (a) 2. gün (b) 7. Gün (c) CD133 (+) hücrelerin magnetik ayırımından sonraki 1. gün (d) GSC'lerin erken faz nörosfer oluşturması (40x)

GSC'lerin farklılaşma potansiyelleri göz önüne alınarak 3, 4, 8, 9 ve 12 numaralı hücreler 2 pasaj çoğaltıldı ve akım sitometrik yöntemle CD133 ve Nestin pozitifliği değerlendirildi. Elde edilen verilere göre bu hücrelerde sırasıyla % 1.5, 12.9, 4.5, 6 ve 4.4 oranında CD 133 pozitifliği ve % 36.5, 3.1, 32.4, 2.3 ve 25.7 oranında Nestin pozitifliği belirlendi (Şekil-57).



Şekil-57 GSC'lerde CD133 ve Nestin pozitifliğinin akım sitometrik analiz ile validasyonu

CD133 ve nestin pozitifliği akım sitometrik olarak belirlenen hücrelerde diğer GSC belirteçleri olan *ITGA*, *VIM*, *CD44* ve *OCT4* ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla CD133 (+) hücrelerden ve epileptik dokulardan elde edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları Tablo-68'de belirtilmektedir.

Tablo-68 GSC ve epileptik dokulardan izole edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları

Hasta No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	Kontrol No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio
3	992.80	1.95	1	357.70	1.94
4	862.74	1.76	2	795.50	1.99
8	1387.00	1.91	3	853.80	1.94
9	1574.00	1.92	4	177.90	1.89
12	1649.95	1.75	5	1751.00	1.94

Elde edilen gen ekspresyon oranları epilepsi hastalarından cerrahi operasyon sırasında alınan tümör olmayan dokular ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilere göre GSC (+) olan tümörlerde *ITGA*, *VIM*, *CD44* ve *OCT4* ekspresyonlarının en az 2 kat yüksek olduğu görüldü (Tablo-69).

Tablo-69 CD133 (+) hücrelerde GSC belirteçlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri

	Hücre no: 3		Hücre no: 4		Hücre no: 8		Hücre no: 9		Hücre no: 12		*Kontrol
	2 ⁻ ΔC _t	Fold change	2 ⁻ ΔC _t	Fold change	2 ⁻ ΔC _t	Fold change	2 ⁻ ΔC _t	Fold change	2 ⁻ ΔC _t	Fold change	Average (2 ⁻ ΔC _t)
ITGA	1.9453	8894.3081	0.0021	9.8401	0.0020	58.8376	0.162668	743.7462	0.2058	941.4017	0.0002
VIM	6.2333	9598.9885	0.5586	860.2825	0.5580	81.4965	2.411616	3713.7646	0.0421	64.8335	0.0006
CD44	0.7845	1434.8326	0.2517	460.3753	0.2510	43.9158	0.283221	517.9492	0.1158	211.8158	0.0005
OCT4	3.7580	660.1576	0.0028	0.4900	0.0020	2.0000	0.325335	57.1494	0.4673	83.6716	0.0056

* Kontrol : Epileptik hastalardan elde edilen non-tümöral dokular

Çalışmaya dahil edilen hastaların tanı yaşı, cinsiyeti gibi klinik özellikleri ve tümörlerin GFAP, p53, Ki-67 indeksi gibi patolojik özellikleri, χ^2 ve Fisher exact test kullanılarak tümörlerin GSC varlığına göre değerlendirildi. Buna göre GSC (+) hastaların GSC (-) hastalara göre daha genç yaşta oldukları ($p = 0.001$) ve GSC (+) tümörlerde GFAP ve Ki-67 boyamalarının GSC (-) tümörlere göre daha güçlü olduğu belirlendi (sırasıyla $p = 0.001$ ve 0.007). Hastaların biyopatolojik özellikleri ve GSC varlığı arasındaki ilişki Tablo-70'te belirtilmektedir.

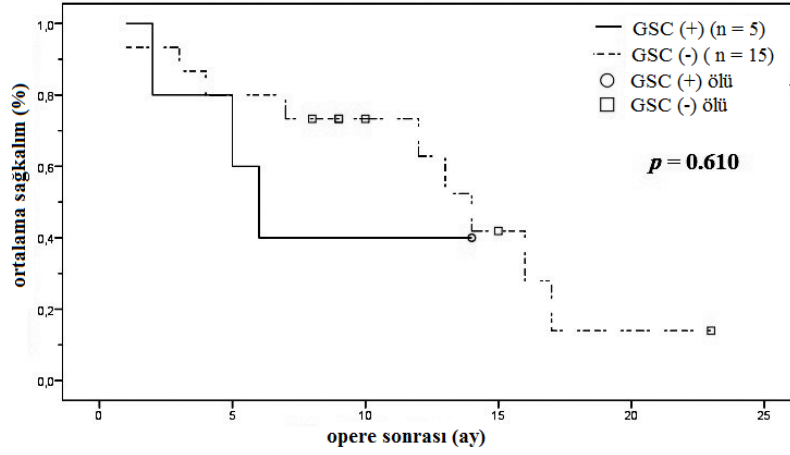
Tablo-70 GSC pozitifliği ve GBM hastaların biyopatolojik özellikleri arasındaki ilişki

Biyopatolojik özellikler	GSC (+) (%)	GSC (-) (%)	p değeri
Yaş			< 0.001**
< 50	2 (10)	0 (0)	
> 50	3 (15)	15 (75)	
Cinsiyet			0.655**
Erkek	1 (5)	10 (50)	
Kadın	4 (20)	5 (25)	
Tümör lokalizasyonu			0.075*
Paryetal	2 (10)	2 (10)	
Frontal	2 (10)	7 (35)	
Temporal	0 (0)	3 (15)	
Talamik	1 (5)	1 (5)	
Oksipital	0 (0)	2 (10)	
GFAP			< 0.001**
+	5 (25)	14 (70)	
-	0 (0)	1 (5)	
p53			0.371**
> 50 %	4 (20)	8 (40)	
< 50 %	1 (5)	7 (35)	
Ki-67 (%)			0.007**
≤ 499	1 (5)	3 (35)	
≥ 500	4 (20)	12 (60)	

* χ^2 ve ** Fisher exact test kullanılarak analiz edildi.

4.2.2.1. GCS (+)'liğinin Sağkalım Üzerine Etkisi

GSC varlığının sağkalım üzerine etkisinin belirlenebilmesi için hastalar tanı konduktan sonra ortalama 10 ± 1.28 ay boyunca takip edildi (1 – 23 ay). Kaplan-Meier analizine göre GSC (+) tümörlerin ortalama sağkalım süresi GSC (-) tümörlere göre daha kısa olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (log-rank $p = 0.610$; Şekil-58).



Şekil-58 GSC varlığının ortalama sağ kalım üzerine etkisi

4.2.3. MGMT Metilasyonu

Çalışmaya dahil edilen GBM hastalarının TMZ tedavisine verecekleri yanıtın belirlenebilmesi için hastaların *MGMT* geni promotör bölge metilasyon oranları belirlendi. Bu amaçla hastaların tümör dokularından elde edilen DNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları Tablo-71'de belirtilmektedir.

Tablo-71 Çalışmaya dahil edilen GBM tümörlerinden elde edilen DNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları

Hasta No	DNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	Hasta No	DNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio
1	22.78	1.80	11	11.66	1.93
2	19.16	1.95	12	20	2.13
3	17.51	1.91	13	23.99	2.05
4	17.18	2.24	14	19.16	1.79
5	22.45	2.03	15	11.09	1.16
6	83.66	2.04	16	6.5	1.85
7	37.38	2.05	17	98.94	1.82
8	17.67	1.86	18	36.8	1.76
9	45.46	1.87	19	11.42	1.88
10	19.4	2.04	20	14.16	1.81

MS-HRM analizi'ne göre çalışmaya dahil edilen GBM tümörlerinin *MGMT* geni promotör bölge metilasyon oranları Tablo-72'de belirtilmektedir.

Tablo-72 MS-HRM analizine göre GBM tümörlerinin *MGMT* promotör bölge metilasyonu oranları

MGMT metilasyon oranı		MGMT metilasyon oranı	
Hasta no	(%)	Hasta no	(%)
1	50.00	11	53.69
2	50.00	12	50.00
3	50.00	13	13.44
4	50.00	14	3.06
5	0.33	15	8.90
6	9.93	16	84.07
7	4.00	17	4.29
8	50.00	18	50.00
9	50.00	19	48.08
10	9.88	20	50.00

GSC (+) GBM tümörlerinde ortalama % 50.0 ± 0.00 , GSC (-) GBM tümörlerinde ise ortalama % 26.5 ± 6.85 *MGMT* promotör bölge metilasyonu görüldü. Bağımsız T testine göre, GSC (+) GBM tümörlerinde *MGMT* geni promotör bölge mutasyonunun GSC (-) GBM tümörlerine göre anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlendi ($p = 0.009$, % 95 CI: 5.9 – 35.3).

4.2.4. OLE'nin GSC (+) Tümörler Üzerindeki Etkisi

4.2.4.1. OLE'nin GSC (+) Tümörlerde miRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

T98G GBM hücre hattında gerçekleştirilen çalışmalarda 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE'nin Hsa-miR-137, Hsa-miR-145, Hsa-miR-153, Hsa-miR-181b ve Hsa-let-7d ekspresyonlarını anlamlı şekilde arttırdığı belirlenmişti. Bu nedenle GSC (+) primer GBM tümörlerde OLE'nin bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi araştırıldı. GSC (+) hücreler 24 saat süresince 1 mg/mL OLE, 450 µM TMZ veya 1 mg/mL OLE – 450 µM TMZ kombinasyonu veya 2 mg/mL OLE, 450 µM TMZ veya 2 mg/mL OLE –

450 μ M TMZ ile muamele edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerden elde edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları Tablo-73'te belirtilmektedir.

Tablo-73 OLE ve TMZ muamelesi sonunda GSC (+) tümörlerden izole edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları

Muamelesiz			450 μ M TMZ		
Hasta No	RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	Hasta No	RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio
3	69.38	2.03	3	30.61	1.77
4	64.13	1.97	4	39.49	1.73
8	110.7	1.96	8	60.57	2.03
9	116.8	2.1	9	64.21	1.82
12	32.98	1.79	12	84.48	1.77
1 mg/mL OLE			2 mg/mL OLE		
Hasta No	RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	Hasta No	RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio
3	101.2	1.92	3	51.26	1.99
4	90.75	1.96	4	121	1.79
8	14.99	1.78	8	159.1	1.95
9	35.58	1.94	9	170.5	1.93
12	114.3	1.92	12	129.2	1.79
1mg/mL OLE + 450 μ M TMZ			2 mg/mL OLE + 450 μ M TMZ		
Hasta No	RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	Hasta No	RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio
3	51.87	1.88	3	84.26	2.04
4	156.2	2.01	4	29.8	1.85
8	67.88	1.91	8	34.89	2.07
9	37.63	1.69	9	34.02	1.81
12	140.06	1.99	12	130.3	2.03

Bağımsız T testi kullanılarak, 1 mg/mL OLE, 2 mg/ml OLE, 1 mg/mL OLE – 450 μ M TMZ, 2 mg/mL OLE – 450 μ M TMZ muamelesinin GSC (+) hücrelerde yol açtığı miRNA ekspresyonlarındaki değişimler muamele edilmemiş GSC (+) hücrelerin miRNA ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilere göre 1 mg/mL OLE –450 μ M TMZ muamelesi sonucunda miR-137 ekspresyonu muamelesiz hücrelere göre 35.06 kat artış gösterdi ($p = 0.03$). Ayrıca, 2 mg/mL OLE –450 μ M TMZ muamelesi miR-153,

miR-145 ve miR-137 ekspresyonlarında muamelesiz hücelere göre sırasıyla 81.9, 73.72 ve 32.89 kat artışa yol açtı ($p < 0.05$). OLE ve TMZ muamelesinin GSC (+) GBM tümörlerinde, muamelesiz hücelere göre miRNA ekspresyonlarında yol açtığı değişim Tablo-74'te belirtilmektedir.

Tablo-74 1 mg/mL, 2 mg/mL OLE, 450 μ M TMZ veya OLE – TMZ kombinasyonları ile muamele edilen GSC (+) tümörlerinde muamelesiz hücelere göre miRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri

	mir-181b	miR-153	miR-145	miR-137	let-7d
Muamelesiz					
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	0.412367	0.000379	0.007922	0.000518	0.026388
1 mg/ml OLE					
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	0.544876	0.004796	0.080772	0.004796	0.17776
Kat Değişim	1.3213	12.6582	1.1965	9.2663	6.7365
95 % CI	(0.13, 2.51)	(0.00001, 42.64)	(0.00001, 37.00)	(0.00001, 31.01)	(0.00001, 32.83)
*P değeri	0.6212	0.1375	0.1876	0.1754	0.6828
2 mg/ml OLE					
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	0.713013	0.011296	0.034722	0.011296	0.136408
Kat Değişim	1.7291	29.8157	4.3832	21.8264	5.1694
95 % CI	(0.05, 3.41)	(0.00001, 90.40)	(0.00001, 17.36)	(0.00001, 65.61)	(0.00001, 27.89)
*P değeri	0.3557	0.0088	0.4323	0.0155	0.3847
450 μM TMZ					
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	0.088388	0.016289	0.080214	0.016289	0.046974
Kat Değişim	0.2143	42.9921	10.1261	31.4721	1.7802
95 % CI	(0.00001, 0.43)	(0.00001, 132.10)	(0.00001, 37.69)	(0.00001, 95.91)	(0.00001, 8.58)
*P değeri	0.4428	0.0118	0.2239	0.0155	0.2864
1 mg/ml OLE + 450 μM TMZ					
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	9.958994	0.028676	0.056563	0.018149	0.004588
Kat Değişim	24.1508	75.6884	7.1404	35.0660	0.1739
95 % CI	(0.00001, 105.23)	(0.00001, 258.73)	(0.00001, 26.75)	(0.00001, 113.99)	(0.00001, 0.82)
*P değeri	0.0842	0.1774	0.3209	0.0323	0.1360
2 mg/ml OLE + 450 μM TMZ					
2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	1.503161	0.031034	0.583984	0.017027	0.143786
Kat Değişim	3.6452	81.9118	73.7208	32.8996	5.4490
95 % CI	(0.72, 6.57)	(0.00001, 257.85)	(0.00001, 259.87)	(0.00001, 111.76)	(0.00001, 25.00)
*P değeri	0.0227	0.0438	0.0005	0.0146	0.3762

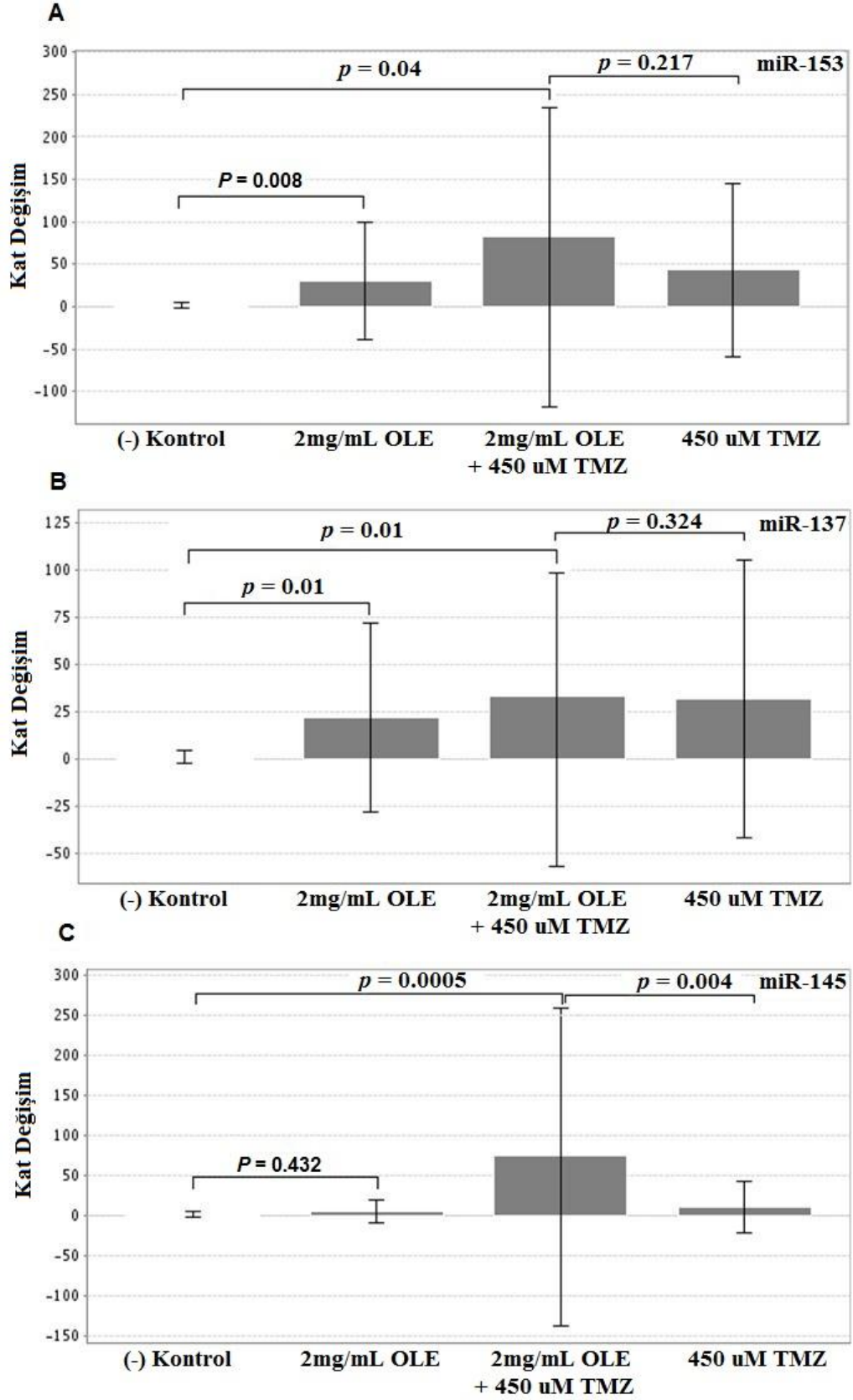
* p değerleri RT² Profiler PCR Array Data Analysis kullanılarak bağımsız T testi ile hesaplandı.

Bağımsız T testinden yararlanarak, OLE – TMZ kombinasyonlarının miRNA ekspresyonlarında yol açtığı değişimler TMZ'nin tek başına yol açtığı değişim ile karşılaştırıldığında, OLE ve TMZ'nin birlikte kullanımının tek başına TMZ kullanımına göre miR-145 ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığı görüldü ($p < 0.05$, Tablo-75). Elde edilen veriler GSC (+) GBM tümörlerinin tedavisinde OLE'nin TMZ ile birlikte kullanımının miRNA ekspresyonlarının düzenlenmesinde sinerjik bir etki gösterdiğini ortaya koydu (Şekil-59).

Tablo-75 OLE – TMZ kombinasyonları ile muamele edilen GSC (+) tümörlerinde TMZ ile muamele edilen hücrelere göre miRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri

	mir-181b	miR-153	miR-145	miR-137	let-7d
450 µM TMZ					
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.088388	0.016289	0.080214	0.016289	0.046974
1mg/ml OLE + 450 µM TMZ					
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	9.958994	0.028676	0.056563	0.018149	0.004588
Kat Değişim	112.6732	1.7605	0.7051	1.1142	0.0977
95 % CI	(0.00001, 492.25)	(0.00001, 4.51)	(0.00001, 1.79)	(0.00001, 2.59)	(0.00001, 0.26)
*P değeri	0.0829	0.3133	0.7102	0.4842	0.1542
2 mg/ml OLE + 450 µM TMZ					
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	1.503161	0.031034	0.583984	0.017027	0.143786
Kat Değişim	17.0063	1.9053	7.2803	1.0454	3.061
95 % CI	(2.54, 31.47)	(0.00001, 3.99)	(0.00001, 15.22)	(0.00001, 2.68)	(0.00001, 7.35)
*P değeri	0.0030	0.2173	0.0040	0.3944	0.4846

* p değerleri RT2 Profiler PCR Array Data Analysis kullanılarak bağımsız T testi ile hesaplandı.



Şekil-59 OLE ve TMZ muamelesinin GSC (+) GBM tümörlerinde yol açtığı miRNA ekspresyon değişimleri. P değerleri RT² Profiler PCR Array Data analysis kullanılarak bağımsız T testi ile hesaplandı

4.2.4.1.1.miRNA'ların Hedef Genlerinin Ekspresyonlarının Belirlenmesi

OLE ve TMZ muamelesine bağılı olarak miR-153, miR-137 ve miR-145'in hedef genlerinden olan *TP53*, *OCT-4*, *SOX2*, *BCL2*, *c-myc* ve *c-met*'in ekspresyon seviyeleri belirlendi (Tablo-76).

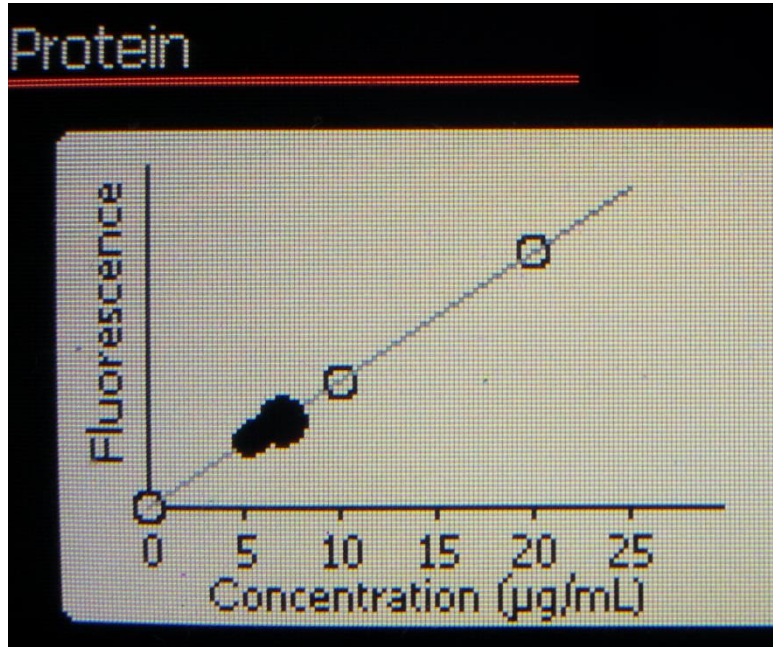
Tablo-76 GSC (+) primer GBM tümörlerinde OLE-TMZ muamelesine bağılı olarak miRNA hedef genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim

	<i>TP53</i>	<i>OCT-4</i>	<i>SOX2</i>	<i>BCL2</i>	<i>c-myc</i>	<i>c-met</i>
Muamelesiz						
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.014418	0.02039	0.184795	0.042926	0.014458	0.011454
2 mg/ml OLE						
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.002418	0.002828	0.013831	0.010352	0.002418	0.002418
Kat değişim	0.1677	0.1387	0.0748	0.2411	0.1672	0.2111
95 % CI	(0.00001, 0.58)	(0.00001, 0.46)	(0.00001, 0.29)	(0.00001, 0.98)	(0.00001, 1.01)	(0.00001, 1.09)
*P değeri	0.314169	0.227929	0.175984	0.351612	0.341963	0.302438
2 mg/ml OLE + 450 µM TMZ						
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.004743	0.002418	0.011502	0.007557	0.000975	0.000975
Kat değişim	0.329	0.1186	0.0622	0.176	0.0675	0.0851
95 % CI	(0.00001, 1.10)	(0.00001, 0.42)	(0.00001, 0.26)	(0.00001, 0.70)	(0.00001, 0.39)	(0.00001, 0.41)
*P değeri	0.329112	0.220026	0.187845	0.353684	0.341256	0.29579
450 µM TMZ						
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.121751	0.121751	0.133046	0.155609	0.121751	0.121751
Kat değişim	8.4444	5.9711	0.72	3.625	8.421	10.6295
95 % CI	(0.00001, 28.07)	(0.00001, 20.13)	(0.00001, 2.91)	(0.00001, 14.44)	(0.00001, 50.50)	(0.00001, 53.82)
*P değeri	0.209763	0.224161	0.23702	0.484775	0.371175	0.681602

* *p* değerleri RT2 Profiler PCR Array Data Analysis kullanılarak bağımsız T testi ile hesaplandı.

4.2.4.2. OLE'nin GSC (+) Tümörlerde p53 Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

GSC (+) GBM tümörlerinin patalog tarafından immünohistokimyasal olarak belirlenen p53 protein ekspresyon oranları sırası ile % 50, 50, 60, 60 ve 40 idi. OLE'nin bu tümörlerde p53 ekspresyonu üzerindeki etkisi Western Blot yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla GSC (+) GBM tümörleri 24 saat boyunca 2 mg/mL OLE ile muamele edildi ve inkübasyon süresi sonunda protein izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen proteinlerin Qubit cihazından elde edilen konsantrasyon eğrisi Şekil-60'ta ve her bir hücre kültüründen elde edilen protein konsantrasyonları Tablo-77'de belirtilmektedir.

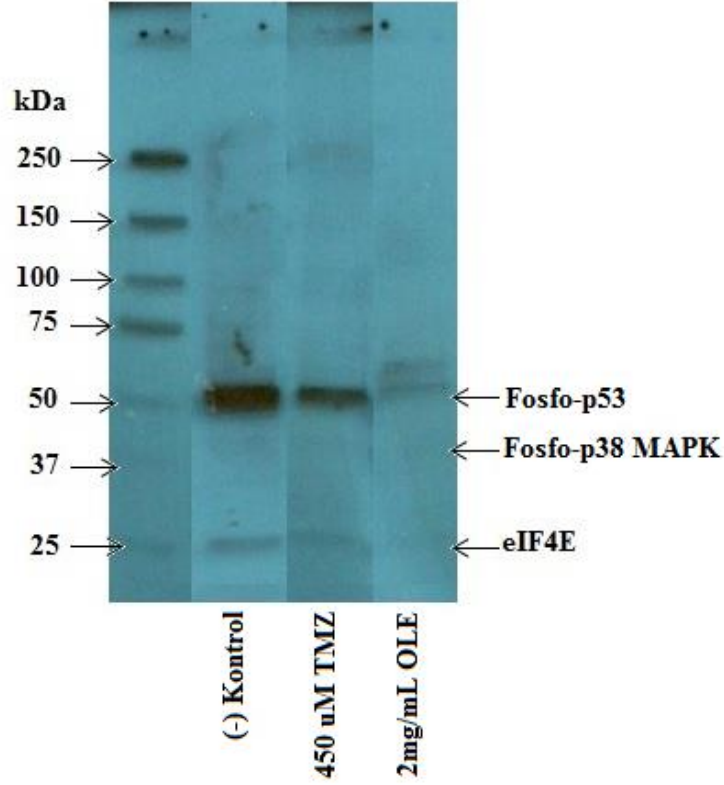


Şekil-60 2 mg/mL OLE ile muamele edilen ve edilmeyen GSC (+) primer GBM hücrelerinin Qubit cihazında gerçekleştirilen protein ölçümü sonucu elde edilen konsantrasyon eğrisi

Tablo-77 2 mg/mL OLE ile muamele edilen ve edilmeyen GSC (+) primer GBM hücrelerinin Qubit cihazında gerçekleştirilen protein ölçümleri

Vaka no	Konsanstrasyon (ng/mL)	80µg protein için		
		protein µL	dH ₂ O µL	
3	450 µM TMZ	6.48	12.3	2.7
3	muamelesiz	7.15	11.18	3.82
3	2 mg/mL OLE	6.19	12.92	2.08
4	muamelesiz	8.57	9.3	5.7
4	2 mg/mL OLE	5.74	13.9	1.1
8	muamelesiz	6.49	12.32	2.68
8	2 mg/mL OLE	6.37	12.5	2.5
9	muamelesiz	12.5	6.4	8.6
9	2 mg/mL OLE	5.95	13.44	1.56
12	muamelesiz	7.94	10.06	4.94
12	2 mg/mL OLE	6.42	12.45	2.55

Western Blot analizi'ne göre GSC (+) GBM tümörlerinde 2 mg/mL OLE'nin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda p53 ekspresyonunda azalmaya yol açtığı görüldü (Şekil-61).



Şekil-61 2 mg/mL OLE muamelesi sonunda Western Blot analizinin' de elde edilen p53 ve p38MAPK proteinlerine ait bant görüntüleri. * eIF4E: Kontrol

4.2.4.3. OLE'nin GSC (+) Tümörlerde İnvazyon Üzerindeki Etkisi

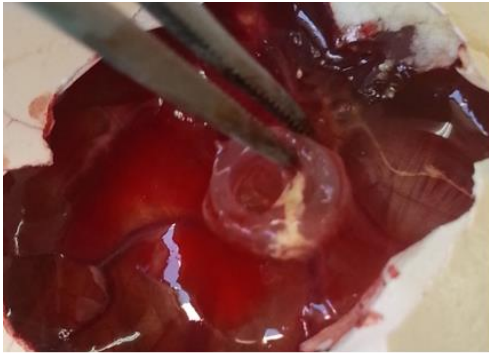
5 GSC (+) GBM tümör hücrelerinden ikisi, en az 12 tekrarlı olarak embriyolu tavuk yumurtalarının koryo-allantoik zarı üzerine, her bir yumurtaya 2×10^6 hücre ve 2 mg/mL OLE ekilerek neovaskülerizasyon indüklendi. 10 günlük büyüme süresi sonunda ölü olduğu belirlenen yumurtalar değerlendirme dışı bırakıldı. OLE muamelesine bağlı olarak tümör gelişen ve gelişmeyen yumurta sayıları Tablo-78'de belirtilmektedir.

Tablo-78 OLE muamelesine bağı olarak embriyolu yumurtalarda GSC (+) tümör gelişim oranı

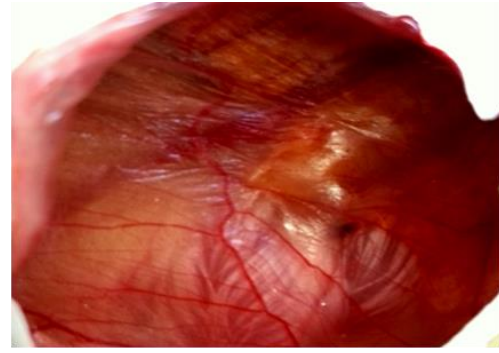
GSC (+) tümör no:1		
	2x10 ⁶ GSC	2x10 ⁶ GSC + 2 mg/mL OLE
Toplam yumurta sayısı	12	12
Tümör gelişen yumurta sayısı	6	5
Tümör gelişmeyen yumurta sayısı	2	1
Ölü yumurta sayısı	4	6

GSC (+) tümör no:2		
	2x10 ⁶ GSC	2x10 ⁶ GSC + 2 mg/mL OLE
Toplam yumurta sayısı	12	14
Tümör gelişen yumurta sayısı	6	6
Tümör gelişmeyen yumurta sayısı	2	4
Ölü yumurta sayısı	4	4

OLE muamelesinin embriyolu yumurtada GSC (+) tümör oluşumu ve damarlanma üzerine etkisi Şekil-62’de belirtilmektedir.



GSC (+) tümör



GSC (+) tümör + 2 mg/mL OLE

Şekil-62 OLE muamelesi sonrası GSC (+) tümörlerde invazyon görüntüsü

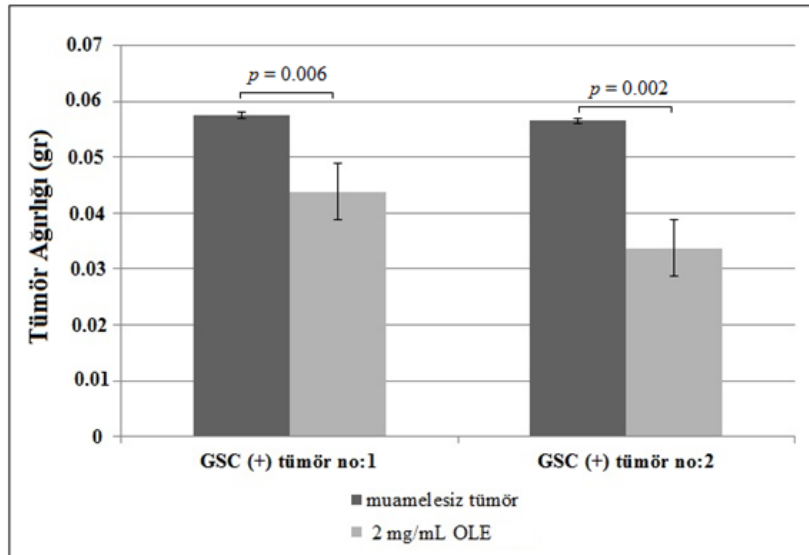
Yumurtadan uzaklaştırılan GSC (+) tümörler hassas terazide tartıldığında OLE muamelesinin tümör ağırlığını anlamlı şekilde azalttığı belirlendi. OLE muamelesinin tümörlerin ağırlığı üzerindeki etkisi Tablo-79 – 80’de ve Şekil-63’te belirtilmektedir.

Tablo-79 CAM analizinde OLE muamelesi sonucu oluşan GSC (+) tümörlerin ağırlıkları

	GSC (+) tümör no: 1		GSC (+) tümör no: 2	
	muamelesiz tümör (gr)	2 mg/mL OLE (gr)	muamelesiz tümör (gr)	2 mg/mL OLE (gr)
	0.054	0.041	0.059	0.053
	0.056	0.042	0.061	0.036
	0.051	0.039	0.051	0.037
	0.068	0.045	0.052	0.017
	0.051	0.052	0.061	0.024
	0.065		0.055	0.035
En küçük – En büyük tümör ağırlığı (gr)	0.051-0.068	0.039-0.052	0.051-0.061	0.017-0.053
Ortalama tümör ağırlığı (gr)	0.0575	0.0438	0.0565	0.0336
Standart Sapma	0.007287	0.005070	0.004461	0.012356
Standart hata	0.002975	0.002267	0.001821	0.005044

Tablo-80 Bağımsız T testine göre CAM analizinde OLE muamelesinin GSC (+) tümör büyüklüğü üzerine etkisi

Grup	t	df	ortalama fark	standart hata	p değeri	% 95CI
GSE (+) tümör no: 1 – 2 mg/mL OLE	3.537	9	0.013700	0.003874	0.006	0.004937 – 0.022463
GSE (+) tümör no: 2 – 2 mg/mL OLE	4.258	10	0.022833	0.005363	0.002	0.010884 – 0.034783



Şekil-63 CAM assay'de OLE muamelesinin GSC (+) tümör büyüklüğü üzerine etkisi (p değeri Bağımsız T testi ile hesaplandı)

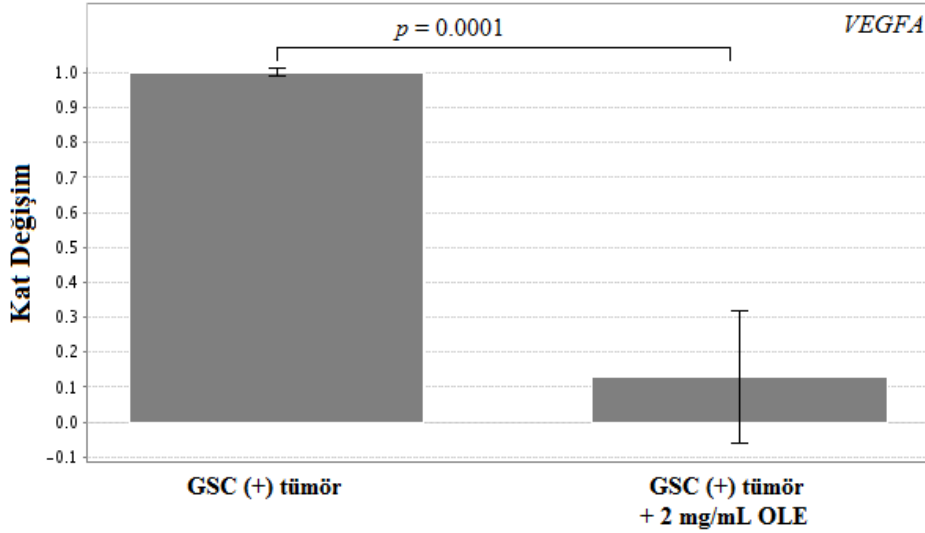
CAM analizinde OLE muamelesinin GSC (+) tümörlerde invazyon üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için yumurtalardan uzaklaştırılan tümörlerde *VEGFA* ekspresyon analizi gerçekleştirildi. *VEGFA* ekspresyon analizi için CAM'da gelişen tümörlerden elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} dalga boyundaki optik dansiteleri Tablo-81'de belirtilmektedir. Gen ekspresyon analizi sonunda gerçekleştirilen bağımsız T testi verilerine göre, 2 mg/mL OLE GSC (+) tümör hücrelerinde *VEGFA* ekspresyonunda 7.78 kat azalışa yol açtı (Tablo-82, Şekil-64).

Tablo-81 CAM analizinde OLE muamelesinden sonra GSC (+) tümörlerde *VEGFA* ekspresyonu analizi için tümörlerden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve optik dansiteleri

GSC (+) tümör no: 1					
Muamelesiz			2 mg/mL OLE		
No	RNA (ng/μl)	A_{260}/A_{280} ratio	No	RNA (ng/μl)	A_{260}/A_{280} ratio
1	45.58	1.85	1	66.41	1.79
2	55.41	1.88	2	47.26	1.83
3	68.75	1.82	3	75.24	1.87
4	41.89	1.74	4	65.47	1.75
5	51.45	1.79	5	52.16	1.79
6	67.24	1.72			
GSC (+) tümör no: 2					
Muamelesiz			2 mg/mL OLE		
No	RNA (ng/μl)	A_{260}/A_{280} ratio	No	RNA (ng/μl)	A_{260}/A_{280} ratio
1	56.71	1.79	1	51.42	1.74
2	47.84	1.75	2	79.56	1.86
3	55.47	1.78	3	72.64	1.96
4	51.55	1.86	4	59.55	1.81
5	35.62	1.84	5	62.24	1.77
6	42.74	1.91	6	65.34	1.79

Tablo-82 CAM analizinde OLE muamelesinin GSC (+) tümörlerde *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

Gen	GSC (+) tümör		GSC (+) tümör + 2 mg/mL OLE		
	2 ^{-Avg.(Delta(Ct))}	2 ^{-Avg.(Delta(Ct))}	Kat değişim	95% CI	p değeri
VEGFA	0.4322	0.0555	0.1285	(0.00001, 0.30)	0.0001



Şekil-64 CAM analizinde GSC (+) tümörlere OLE muamelesinin *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

4.2.5. FCL'nin GSC (+) Tümörler Üzerindeki Etkisi

4.2.5.1. FCL'nin GSC (+) Tümörlerde miRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

T98G GBM hücre hattında gerçekleştirilen çalışmalarda 0.25 mg/mL FCL'nin Hsa-Hsa-Let-7d ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığı belirlenmişti. Bu nedenle GSC (+) primer GBM tümörlerde 0.25 mg/mL FCL'nin bu Hsa-Let-7d ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. GSC (+) hücreler 24 saat süresince 0.25 mg/mL FCL, 450 µM TMZ veya 0.25 mg/mL FCL – 450 µM TMZ kombinasyonu ile muamele edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerden elde edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları Tablo-83'te belirtilmektedir.

Tablo-83 FCL ve TMZ muamelesi sonunda GSC (+) tümörlerden izole edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları

Muamelesiz			450 µM TMZ			0.25 mg/mL FCL		
Hasta No	RNA (ng/µl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	Hasta No	RNA (ng/µl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	Hasta No	RNA (ng/µl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio
3	69.38	2.03	3	30.61	1.77	3	91.38	2.04
4	64.13	1.97	4	39.49	1.73	4	95.81	2.05
8	110.7	1.96	8	60.57	2.03	8	75.74	1.47
9	116.8	2.1	9	64.21	1.82	9	98.39	2.09
12	32.98	1.79	12	84.48	1.77	12	22.54	1.56

Bağımsız T testi kullanılarak, 0.25 mg/mL FCL, 0.25 mg/mL FCL –450 µM TMZ, muamelesinin GSC (+) hücrelerde yol açtığı miRNA ekspresyonlarındaki değişimler muamele edilmemiş GSC (+) hücrelerin miRNA ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilere göre 0.25 mg/ml FCL –450 µM TMZ muamelesi sonucunda Let-7d ekspresyonu muamelesiz hücelere göre anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p = 0.127$). FCL ve TMZ muamelesinin GSC (+) GBM tümörlerinde, muamelesiz hücelere göre miRNA ekspresyonlarında yol açtığı değişim Tablo-84'te belirtilmektedir

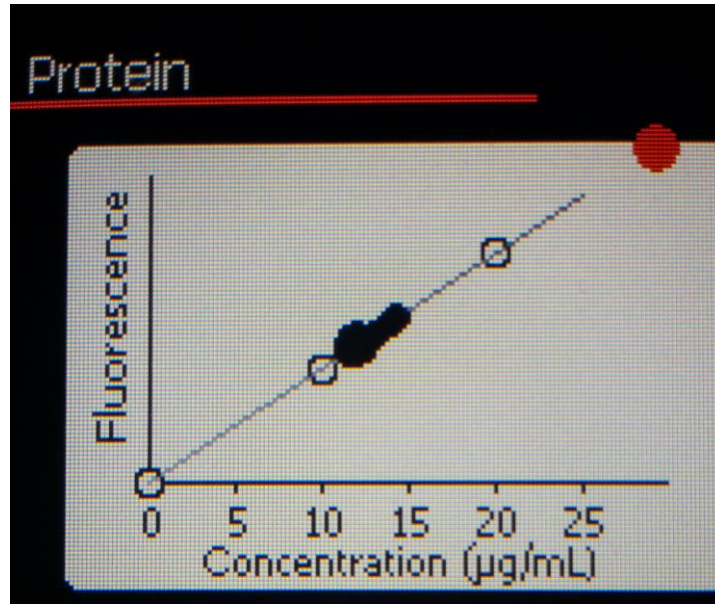
Tablo-84 0.25 mg/mL FCL ve 450 µM TMZ'nin GSC (+) GBM kök hücrelerinde let-7d ekspresyonu üzerindeki etkisi

let-7d	
(-) Kontrol	
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.2903
0.25 mg/ml FCL	
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.0569
Kat değişim	0.1961
95% CI	(0.00001, 0.43)
<i>p</i> değeri*	0.0625
0.25 mg/FCL + 450 µM TMZ	
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.0967
Kat değişim	0.3331
95% CI	(0.00001, 0.74)
<i>p</i> değeri*	0.1272
450 µM TMZ	
2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	0.0731
Kat değişim	0.2519
95% CI	(0.00001, 0.56)
<i>p</i> değeri*	0.1480

* RT² Profiler PCR Array Data Analysis'de Bağımsız T-testi kullanılarak değerlendirildi.

4.2.5.2. FCL'nin GSC (+) Tümörlerde p53 ve p38MAPK Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi

FCL'nin GSC (+) tümörlerde p53 ekspresyonu üzerindeki etkisi Western Blot yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla hücreler 24 saat boyunca 0.25 mg/mL FCL ile muamele edildi ve inkübasyon süresi sonunda protein izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen proteinlerin Qubit cihazından elde edilen konsantrasyon eğrisi Şekil-65'te ve her bir hücre kültüründen elde edilen protein konsantrasyonları Tablo-85'te belirtilmektedir.

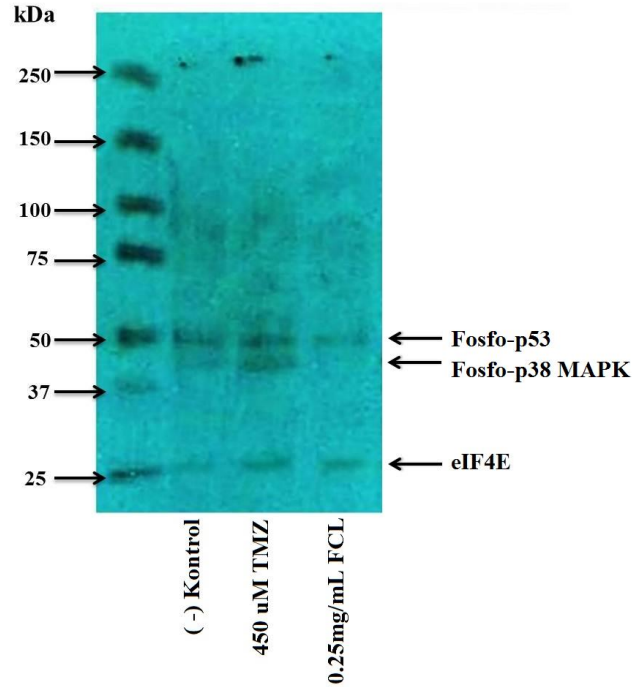


Şekil-65 0.25 mg/mL FCL ile muamele edilen ve edilmeyen GSC (+) primer GBM hücrelerinin Qubit cihazında gerçekleştirilen protein ölçümü sonucu elde edilen konsantrasyon eğrisi

Tablo-85 0.25 mg/mL FCL ile muamele edilen ve edilmeyen GSC (+) primer GBM hücrelerinin Qubit cihazında gerçekleştirilen protein ölçümleri

Vaka no	Konsanstrasyon (ng/mL)	80µg protein için	
		protein µL	dH ₂ O µL
3	450 µM TMZ	12.3	6.48
3	muamelesiz	11.5	6.93
3	0.25 mg/mL FCL	11.7	6.81
4	muamelesiz	26	2.65
4	0.25 mg/mL FCL	13.2	6.03
8	muamelesiz	14.0	5.69
8	0.25 mg/mL FCL	12.7	6.27
9	muamelesiz	14.3	5.57
9	0.25 mg/mL FCL	12.6	6.32
12	muamelesiz	14.4	5.53
12	0.25 mg/mL FCL	12.1	6.58

Western Blot analizi'ne göre GSC (+) GBM tümörlerinde 0.25 mg/mL FCL'nin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda p38 MAPK ekspresyonunda azalmaya yol açtığı görüldü (Şekil-66).



Şekil-66 0.25 mg/mL FCL muamelesi sonunda Western Blot analizinde elde edilen p53 ve p38 MAPK proteinlerine ait bant görüntüleri. * eIF4E: Kontrol

4.2.5.3. FCL'nin GSC (+) Tümörlerde İnvazyon Üzerindeki Etkisi

5 GSC (+) GBM tümör hücrelerinden ikisi, en az 12 tekrarlı olarak embriyolu tavuk yumurtalarının koryo-allantoik zarı üzerine, her bir yumurtaya 2×10^6 hücre ve 0.25 mg/mL FCL ekilerek neovaskülerizasyon indüklendi. 10 günlük büyüme süresi sonunda ölü olduğu belirlenen yumurtalar değerlendirme dışı bırakıldı. FCL muamelesine bağlı olarak tümör gelişen ve gelişmeyen yumurta sayıları Tablo-86'da belirtilmektedir.

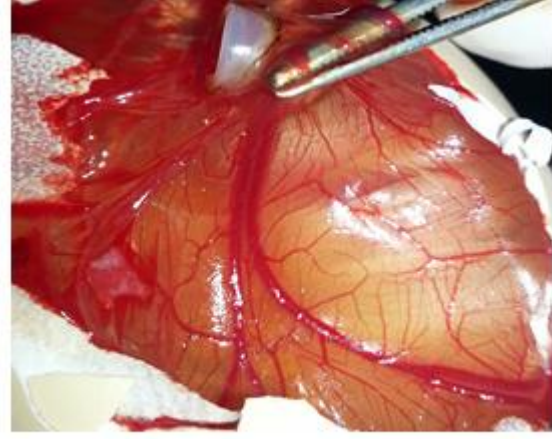
Tablo-86 FCL muamelesine bağlı olarak embriyolu yumurtalarda GSC (+) tümör gelişim oranı

	GSC (+) tümör no:1	
	2×10^6 GSC	2×10^6 GSC + 0.25 mg/mL FCL
Toplam yumurta sayısı	12	13
Tümör gelişen yumurta sayısı	6	9
Tümör gelişmeyen yumurta sayısı	3	2
Ölü yumurta sayısı	3	2
	GSC (+) tümör no:2	
	2×10^6 GSC	2×10^6 GSC + 0.25 mg/mL FCL
Toplam yumurta sayısı	13	14
Tümör gelişen yumurta sayısı	7	8
Tümör gelişmeyen yumurta sayısı	2	3
Ölü yumurta sayısı	4	3

FCL muamelesinin embriyolu yumurtada GSC (+) tümör oluşumu ve damarlanma üzerine etkisi Şekil-67'de belirtilmektedir.



GSC (+) tümör



GSC (+) tümör + 0.25 mg/mL FCL

Şekil-67 FCL muamelesi sonrası GSC (+) tümörlerde invazyon görüntüsü

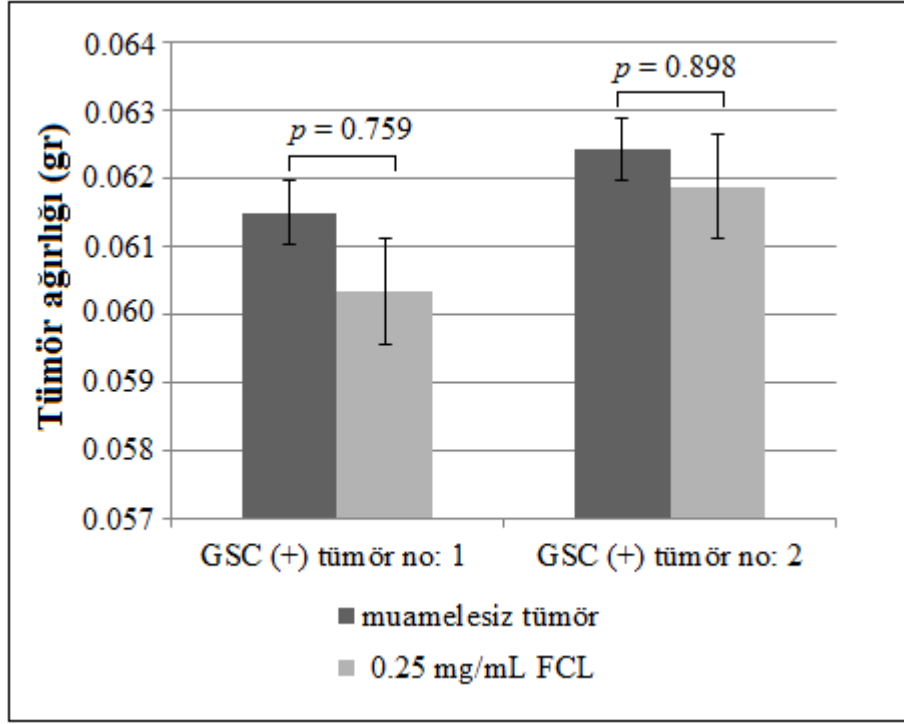
Yumurtadan uzaklaştırılan tümörler hassas terazide tartıldığında FCL muamelesi sonucu tümör ağırlığında gözardı edilebilir bir düşüş saptandı ($p > 0.05$). FCL muamelesinin tümörlerin ağırlığı üzerindeki etkisi Tablo-87 – 88’de ve Şekil-68’de belirtilmektedir.

Tablo-87 CAM assay’de büyüyen GSC (+) tümörlerin FCL muamelesine bağlı olarak ağırlıkları

	GSC (+) tümör no: 1		GSC (+) tümör no: 2	
	muamelesiz tümör (gr)	0.25 mg/mL FCL (gr)	muamelesiz tümör (gr)	0.25 mg/mL FCL (gr)
	0.055	0.06	0.052	0.073
	0.058	0.062	0.056	0.051
	0.071	0.058	0.065	0.068
	0.062	0.056	0.068	0.066
	0.053	0.072	0.051	0.061
	0.07	0.065	0.072	0.059
		0.051	0.073	0.056
		0.053		0.061
		0.066		
En küçük – En büyük tümör ağırlığı (gr)	0.053-0.071	0.051-0.072	0.051-0.073	0.051-0.073
Ortalama tümör ağırlığı (gr)	0.0615	0.060333333	0.062428571	0.061875
Standart Sapma	0.007609205	0.006689544	0.009324826	0.006978283
Standart hata	0.003106445	0.002229848	0.003524453	0.002467195

Tablo-88 Bağımsız T testine göre CAM assay’de FCL muamelesinin GSC (+) GBM tümörlerinin büyüklüğü üzerine etkisi

Grup	t	df	ortalama fark	standart hata	p değeri	% 95CI
GSE (+) tümör no: 1 – 0.25 mg/mL FCL	0.314	13	0.0011667	0.0037196	0.759	-0.0068691 – 0.0092024
GSE (+) tümör no: 2 – 0.25 mg/mL FCL	0.131	13	0.0005536	0.0042158	0.898	-0.0085542 – 0.0096613



Şekil-68 CAM assay’de FCL muamelesinin GSC (+) tümör büyüklüğü üzerine etkisi (p değeri Bağımsız T testi ile hesaplandı)

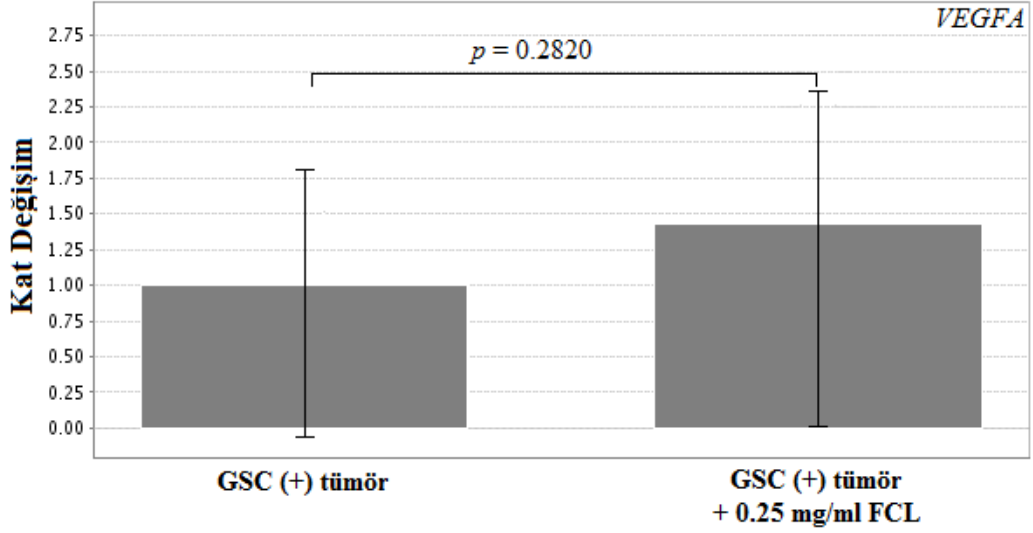
CAM analizinde FCL muamelesinin GSC (+) tümörler invazyonu üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için yumurtalardan uzaklaştırılan tümörlerde *VEGFA* ekspresyon analizi gerçekleştirildi. *VEGFA* ekspresyon analizi için CAM’da gelişen tümörlerden elde edilen RNA’ların konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} dalga boyundaki optik dansiteleri Tablo-89’da belirtilmektedir. Gen ekspresyon analizi sonunda gerçekleştirilen bağımsız T testi verilerine göre, 0.25 mg/mL FCL tümör hücrelerinde *VEGFA* ekspresyonunda anlamlı bir değişime yol açmadı (Tablo-90, Şekil-69).

Tablo-89 CAM assay'de FCL muamelesinden sonra *VEGFA* ekspresyonu analizi için GSC (+) tümörlerden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve optik dansiteleri

GSC (+) tümör no: 1					
Muamelesiz			0.25 mg/mL FCL		
No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio
1	50.68	1.95	1	36.51	1.77
2	65.21	1.98	2	59.61	1.8
3	58.35	1.72	3	54.42	1.81
4	49.72	1.69	4	51.12	1.71
5	69.65	1.71	5	58.86	1.74
6	56.54	1.75	6	54.45	1.76
			7	61.25	1.82
			8	63.59	1.75
			9	65.56	1.79
GSC (+) tümör no: 2					
Muamelesiz			0.25 mg/mL FCL		
No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio	No	RNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio
1	68.81	1.84	1	41.12	1.91
2	65.56	1.76	2	63.35	1.87
3	25.15	1.68	3	82.54	1.92
4	81.45	1.77	4	65.55	1.87
5	66.59	1.79	5	26.12	1.79
6	35.51	1.86	6	54.44	1.74
7	97.02	1.84	7	96.51	1.75
			8	46.35	1.86

Tablo-90 CAM assayde FCL muamelesinin GSC (+) tümörlerde *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

Gen	GSC (+) tümör		GSC (+) tümör + 0.25 mg/mL FCL		
	$2^{(-Avg.(Delta(Ct))}$	$2^{(-Avg.(Delta(Ct))}$	Kat değişim	95% CI	p değeri
VEGFA	0.6113	0.8712	1.4251	(0.58, 2.27)	0.2820



Şekil-69 CAM analizinde GSC (+) tümörlere FCL muamelesinin *VEGFA* ekspresyonu üzerine etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Beyin tümörleri, Türkiye’de en sık gözlenen 10 kanser türü içerisinde yer almaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nun sınıflandırmasına göre beyin tümörleri astrositoma, oligodendrioglioma, ependimoma ve miks oligoastrositoma olmak üzere 4 farklı histolojik gruba ayrılmaktadır. Glioblastoma evre IV astrositoma olarak tanımlanan, nekroz ve vasküler çoğalma ile karakterize olan ve yetişkinlerde en yaygın görülen agresif özellikte bir primer beyin tümörüdür (2). Son zamanlarda GBM hastalarının tedavisinde yeni teknolojiler dahilinde elde edilen tüm gelişmelere rağmen istenen başarı elde edilebilmiş değildir (3). Bu nedenle, bu hastalığın tedavisinde, günümüz tedavi yöntemlerinden henüz yeterli derecede yarar sağlanamamaktadır. Bu hastalığın etkin tedavisinin gerçekleştirilebilmesi için kanser kök hücrelerini tamamen yok edebilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda çeşitli kanser türlerinde yeni tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında sıklıkla bitkilerden yararlanılarak, tedavi protokollerinin iyileştirilmesine ve mevcut tedavilerin muhtemel sitotoksik yan etkilerinin azaltılmasına çalışılmaktadır (19). Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda vinblastin, vincristine, camptothecin türevleri, topotecan, irinotecan, etoposide ve paclitaxel gibi pek çok bitki türevi bileşen anti-kanser ajanı olarak klinik amaçla kullanıma sunulmuştur (19). Ayrıca, bazı terapötik özelliği belirlenen bitkilerin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımının, kemoterapötik ajanın etkin dozunu düşürürerek, yol açabileceği yan etkilerin azalmasını sağladığını ifade eden çalışmalar mevcuttur (20). Türkiye 9000’den fazla bitki türü ile dünyanın en zengin florasına sahip ülkelerinden biridir (21, 240). Ülkemizde yetişen bitkilerin birçoğunun terapötik özellikler taşıdığı bilinmektedir (22). Bu bitkilerin büyük çoğunluğu, henüz tıbbi önemleri bilimsel olarak ispatlanmamış olmasına rağmen halk arasında çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (22). Bu bitkilerin, hastalık gelişimi üzerine olan etki mekanizmalarının ve uygun kullanım biçimlerinin modern tekniklerle araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, gerçekleştirilen çalışmada, Türkiye florasında yetişen ve çeşitli kanser türlerinde terapötik etki gösterdiği belirlenmiş dört bitkisel özütün, ilaç dirençliliği açısından farklılık gösteren GBM hücre hatlarında ve bu tümörlerin oluşumunda, nüksetmesinde ve tedaviye direnç göstermesinde en önemli rolü oynayan hücreler olan GSC’ler üzerinde, tek başlarına veya TMZ ile eş zamanlı olarak gösterdikleri etki araştırılmıştır.

Mevcut çalışmaya GBM hastalarından cerrahi operasyon sırasında alınan 20 tümör dokusu dahil edilmiştir. IDH1-R132H mutasyonu negatif olan primer GBM tümörleri olduğu bir patalog tarafından onaylanan tümörler GSC varlığı açısından değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen akım sitometrik analiz sonuçlarına göre CD133 ve Nestin pozitifliği gösteren ve RT-PCR analizinde *ITGA*, *VIM*, *CD44* ve *OCT4* ekspresyonları, negatif kontrol olarak kullanılan epileptik dokulardan en az iki kat fazla olan 5 GBM tümörü GSC varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. GSC (+) 5 hastanın χ^2 ve Fisher exact test'e göre GSC (-) hastalara göre daha genç yaşta oldukları ($p = 0.001$) ve GFAP ve Ki-67 boyamalarının GSC (-) hastaların tümörlerine göre daha güçlü olduğu görülmüştür (sırasıyla $p = 0.001$ ve 0.007).

GBM hastalarının tedavisinde yaygın olarak TMZ kullanılmaktadır. Ancak, TMZ'nin etkinliği hastanın *MGMT* gen ifadesine göre farklılık göstermektedir. TMZ, guaninin O6 pozisyonundan metilasyonu sonucu DNA'da hasarlanmalara yol açarak sitotoksik etki gösteren bir alkali ajandır. DNA tamir mekanizmasında görevli olan *MGMT*, guaninin O6 pozisyonundan metil gruplarını uzaklaştırarak hastanın TMZ gibi alkali ajanlara karşı direnç göstermesine yol açmaktadır. Bu nedenle, *MGMT*'nin metilasyon yoluyla transkripsiyonel olarak sessizleşmesi hastanın TMZ tedavisine iyi cevap vermesinde belirleyici rol oynamaktadır (81, 369). Mevcut çalışmada GSC (+) ve GSC (-) hastalar *MGMT* promotör bölge metilasyonu açısından değerlendirilmiş ve GSC (+) tümörlerin *MGMT* promotör bölge metilasyonu oranının GSC (-) tümörlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p = 0.009$). Henüz TMZ direncine yol açan alternatif bir mekanizma bilinmemekle birlikte, *MGMT* geni unmetile olan hastaların bazı hastaların TMZ tedavisine beklenildiği şekilde yanıt vermediğini bildiren çalışmalar mevcuttur (370, 371). Bu nedenle *MGMT* metilasyonunun GBM hastalarında TMZ direncine yol açan tek mekanizma olmadığı düşünülmektedir (372). GSC (+) tümörlerin en önemli özelliklerinden biri kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç göstermeleridir (10). Çalışmamızda GSC (+) tümörlerin *MGMT* gen metilasyon oranı GSC (-) tümörlerden yüksek olmasına rağmen (ortalama $\% 50 \pm 00$) bu hastaların ortalama yaşam sürelerinin GSC (-) tümöre sahip olanlardan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle elde ettiğimiz veriler GSC (+) olan tümörlerde TMZ direncine yol açan *MGMT* metilasyonuna alternatif farklı bir mekanizmanın varlığına işaret etmektedir.

VA, Avrupa, Akdeniz ülkeleri ve Türkiye'de genellikle köknar, çam gibi iğne yapraklı ağaçlar; ahlat, alıç, armut, ayva, elma, kayısı gibi meyva ağaçları; çitlembik, gürgen, ıhlamur, kavak gibi kışın yapraklarını döken ağaçların veya çalılıkların üzerinde

yetişen yan-parazit bir çalıdır (242). VA'nın yapısında lektinler, viskotoksinler, aminoasitler, flavonoidler, fenilpropanoidler, tripertenler, fitosteroller, alkaloidler, polialkoller ve polisakkaritler bulunmaktadır (243). Bu bileşenlerden özellikle lektinlerin anti-tümöral etkileri meme, kolon, karaciğer kanserlerinde ve jinekolojik tümörlerde gösterilmiştir olup VA'nın anti-tümöral etkinliğinin içeriğindeki lektin oranı ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (245 – 248). Özellikle Almanca konuşulan Orta Avrupa ülkelerinde sıklıkla kullanılan ve anti kanserojen etkisi en iyi araştırılmış bir VA türü olan Iscador, elma, kauçuk ve çam ağaçları üzerinde yetişmektedir. Her üç bitki türünde yetişen VA aynı tür olmasına rağmen, çam ağacı üzerinde yetişen Iscador'un lektin oranının elma ve kauçuk üzerinde yetişen Iscador'a oranla daha düşük olduğu bilinmektedir (253). Zuzak ve arkadaşları (252) Köknar, Çam, Kavak, Elma, Söğüt, Alıç, Kauçuk ve Ihlamur ağaçlarında büyüyen VA özütlerinin, içerdikleri lektin oranına bağlı olarak pediatrik medullablastoma tümörlerindeki etkisinin farklılık gösterdiğini ve lektin içeriğinin tümör hücrelerinde gözlenen mitokondriye bağımlı apoptoz ile korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle, VA'nın yapısında bulunan lektin içeriğinin, VA'nın konakçı olarak kullandığı bitkinin türü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Podlech ve arkadaşları (253), migrasyon özelliği açısından birbirinden farklı özellik gösteren iki GBM hücre hattı olan LNT-229 ve LN-308 hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında, dut ağacı üzerinde yetişen VA özütünün sitokin TGF- β ve matriks metalloproteinazlar gibi hücre migrasyonunda ve invazyonunda rol oynayan genlerin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığını ortaya koymuşlardır.

Mevcut çalışmada ise meşe ağacı üzerinde büyüyen VA'nın yaprak, kök ve meyvelerinden hazırlanmış VA özütünün birbirinden farklı ilaç direnci özelliği gösteren GBM hücre hatlarındaki anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Kültür ortamına eklenen VA özütünün 24 ve 48 saatlik muamele süresi sonunda sitotoksite testi ile luminometrik olarak elde edilen değerler VA özütünün 250 mg/ ml'lik dozunun pozitif kontrol olarak kültür ortamına ilave edilen H₂O₂ kadar hücre çoğalmasını ve canlılığı azalttığını göstermiştir. Ancak, elde edilen etkinin doza bağımlı olarak değişim göstermediği görülmüştür. Mevcut çalışmada kullanılan meşe ağacı üzerinde yetişmiş olan VA özütünün lektin içeriği ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca özüt hazır olarak temin edildiğinden, farklı koşullarda hazırlanmış bir özüte ulaşamamış olmamız ve mevcut özütün içeriğinin incelenebilmesi konusunda yeterli analizlerin gerçekleştirilememiş olmasından dolayı

özütün lektin içeriği ve homojenliği hakkındaki bilginizin yetersiz olması nedeniyle VA özütü tez projesi kapsamında gerçekleştirilen ileri analizlere dahil edilmemiştir.

GSE, prosiyanidin içeriği zengin bir özüt olup, lösemi, akciğer, nazofarinks, prostat, meme ve kolon hücre hatlarında anti-kanser etki gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (262, 373 –383). Ayrıca, TMZ direnci düşük olan bir GBM hücre hattı olan U-87MG hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiş bir çalışmada GSE yapısında bulunan bir prosiyanidinin hücre döngüsü ve mitokondriyal zar potansiyeli üzerinde etki gösterdiği ortaya konmuştur (384). Mevcut çalışmamızda GSE'nin anti-kanser etkisi TMZ dirençliliği açısından farklılık gösteren üç GBM primer hücre hattı olan T98G, U-138MG ve U-87MG hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalara göre, GSE'nin kanser hücrelerinin % 50'sinin ölümüne yol açan dozları tümör tipine göre çeşitlilik göstermekte olup, Caco-2, HCT-8 ve LoVo kolon kanseri hücrelerinde GSE'nin etkin dozlarının 50 – 100 µg/mL aralığında olduğu bildirilirken (262, 381), 3PC mürin keratinosit non-tümörajenik, MT1/2 papilloma ve Ca3/7 skuamöz hücre karsinoması hücre hatlarında GSE'nin etkin dozlarının 20 – 35 µM konsantrasyon aralığında olduğu belirtilmiştir (385). Zhang ve arkadaşları (384) GSE'nin 24 saatlik inkübasyon süresinde ve 75 µg/mL konsantrasyonda U-87MG hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu ifade etmiş olmalarına rağmen, mevcut çalışmada gerçekleştirilen WST-1 analizi sonucunda 24 saat'lik inkübasyon süresinde 500 µg/mL GSE'nin T98G hücrelerinde % 60, U-138MG hücrelerinde % 58 ve U-87MG hücrelerinde % 57 oranında hücre ölümü görülmüştür. 1 mg/mL GSE muamelesi sonucunda ise T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 69, % 44 ve % 63 oranında hücre ölümü gözlenmiştir. Aynı koşullar altında, (+) kontrol olarak kullanılan 30mM H₂O₂, T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 90, % 88 ve % 83 oranında hücre ölümüne yol açmıştır. Gerçekleştirilen Tek Yönlü Varyans analizi ve Tukey testi'ne göre, GSE'nin 500 µg/mL ve 1 mg/mL'lik konsantrasyonlarının T98G, U-138MG ve U-87MG hücre hatlarında lethal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca, mevcut çalışmada 24 ve 48 saatlik GSE muamelesi sonucunda elde edilen hücre ölüm oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiş olup, GSE'nin yapısında bulunan flavonoidlerin vücutta yalnızca birkaç saat aktif olarak kalabilmeleri bu bulgularımızı desteklemektedir (386). GSE'nin GBM hücrelerindeki sitotoksik aktivitesini belirlediğimiz konsantrasyonu daha önce Zhang ve arkadaşlarının (384) U-87MG hücrelerinde gerçekleştirdiği çalışma ile karşılaştırıldığında mevcut çalışmada sitotoksik olarak etkin olduğu belirlenen

konsantrasyonların Zhang ve arkadaşlarının belirlediği konsantrasyondan yüksek olduğu görülmüştür. Bu farklılığın, Zhang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, mevcut çalışmadan farklı olarak total GSE özütü yerine yalnızca prosiyanidin içeriğinin değerlendirilmiş olmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz. Mevcut çalışmada gerçekleştirilen HPLC/DAD analizine göre kullandığımız GSE'nin 36.8 mg/gr total prosiyanidin içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca, 1 mg/mL ve 500 µg/mL GSE'nin lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin oldukça düşük olması (sırasıyla % 10.5 ve % 8), mevcut çalışmada kullanılan GSE'nin etkin olduğu konsantrasyonun kullanılabilir olduğunu göstermiştir. 500 µg/mL ve 1 mg/mL GSE'nin GBM hücre ölüm yolları üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen TUNEL analizine göre, 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda 1 mg/mL GSE'nin T98G hücrelerinde % 76, U-138 hücrelerinde % 55, U-87MG hücrelerinde % 32 oranında, 500 µg/mL GSE'nin ise T98G hücrelerinde % 55, U-138 hücrelerinde % 36, U-87MG hücrelerinde % 22 oranında ölüme yol açtığı belirlenmiş olup Annexin-V-FITC/PI analizi sonucunda, bu ölümün 1 mg/mL GSE için T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 9.4, % 10, %20 oranında apoptotik ve % 66, % 20 ve % 15.7 oranında nekrotik, 500 µg/mL GSE için ise sırasıyla % 8.3, % 41.6, % 9.5 oranında apoptotik ve % 41.6, % 19.9 ve % 9.4 oranında nekrotik yolla olduğunu görülmüştür.

GSE'nin veya içeriğindeki fenolik bileşenlerden proantosiyandin'in tümör invazyonunun baskılanmasına yol açtığını ortaya koyan görüşler bulunmasına rağmen bu etkinin moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (379 – 383, 387). Ancak, mevcut çalışmada GSE'nin tümör invazyonu üzerine etkisi ex-vivo koşullarda gerçekleştirilen CAM analizinde, beklenilenin aksine GSE'nin T98G hücrelerinden oluşturulan tümörlerde damarlanmayı arttırdığı görülmüştür. CAM'da büyüyen tümörlerin ağırlıkları tartıldığında negatif kontrol olarak değerlendirilen muamele görmemiş tümörlerin ortalama ağırlıklarının 0.0135 ± 0.0077 gr iken, 500 µg/mL ve 1 mg/mL GSE ile muamele edilen tümörlerin ortalama ağırlıklarının sırasıyla 0.0199 ± 0.0181 gr ve 0.0302 ± 0.0150 gr olduğu görülmüştür. Post Hoc ve Tukey testleri 1 mg/mL GSE'nin CAM analizinde tümör büyümesini anlamlı şekilde arttırdığını ortaya koymuştur ($p = 0.019$). Ayrıca, bağımsız T testi verilerine göre, 500 µg/mL GSE'nin tümör hücrelerinde *VEGFA* ekspresyonunda 1.7 kat ($p = 0.0067$), 1 mg/mL GSE'nin ise 3.5 kat ($p = 0.068$) artışa yol açtığı görülmüştür. İn-vitro koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda GSE'nin anti-invazif özellikte olduğu ifade edilmiş olsa da (379 – 383, 387), in-vivo koşullarda, damar trombozu olan rat modelinde gerçekleştirilen bir çalışma da GSE'den izole edilen

proantisiyanidinlerin damardaki trombozu azalttığı, damar bütünlüğünü koruduğu ve *VEGFR-2* ekspresyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir (388). Mevcut çalışmada da in-vitro koşullarda elde edilen bulgular, daha önce in-vitro koşullarda gerçekleştirilen çalışmaların bulgularını desteklemesine rağmen, embriyolu tavuk yumurtasının canlı organizma olarak kullanıldığı ex-vivo koşullarda gerçekleştirilen deneyler in-vitro koşullardaki bulgularımızı desteklememiştir. GSE'nin anti-kanser aktivitesinin daha iyi şekilde anlaşılabilmesi için embriyolu tavuk yumurtasına göre daha güvenilir veriler sunacak olan in-vivo sistemlerde araştırılması gerekmektedir. Mevcut tez projesi kapsamında bu analizlerin gerçekleştirilmesi mümkün olmadığından, GSE, mevcut proje kapsamında gerçekleştirilen ileri analizlere dahil edilmemiştir.

Son dönemde, içerdiği fenolik bileşenlerden dolayı *Olea europaea*'nin yağ, meyve ve yaprakları tıp alanında önem kazanmaya başlamıştır (389). *Olea europaea*'nin en önemli fenolik bileşeni oleuropein'dir. *Olea europaea* bitkisinin çeşitli bölgelerinde farklı oranlarda oleuropein bulunmaktadır (390). Mevcut çalışmada bu bitkinin yapraklarının anti-karsinogen etkisi araştırılmıştır. Gerçekleştirilen HPLC analizine göre çalışmamızda kullanılan OLE 9.36 ± 0.22 mg/mL oleuropein içermektedir.

OLE'nin T98G hücre hattında, anti-kanser aktivitesi ve TMZ yanıtı ile ilişkili olan miR-181b, miR-153 miR-145, miR-137 ve let-7d'nin ekspresyonlarını düzenlediği daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda ortaya konmuştur (276). Ayrıca OLE'nin T98G hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği ve OLE ve TMZ'nin birlikte kullanımının hücrelerde TMZ maruziyetine bağlı oluşan toksisitenin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (276). T98G hücreleri, 61 yaşında Kafkasya'lı bir erkek hastadan alınmış hücrelerdir. Bu hücreler fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip olup *MGMT* metilasyonu açısından heterozigottur. Daha önce bu hücrelerde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın bulguları OLE'nin GBM tümörleri üzerindeki potansiyel etkisini ortaya koymuş olsa da bu özütün TMZ dirençliliği, morfoloji ve agresiflik açısından farklılık gösteren GBM tümörlerindeki etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle, mevcut çalışmada öncelikle OLE'nin U-138MG ve U-87MG hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. U-138MG hücreleri 47 yaşında bir Kafkasya'lı erkek hastadan alınmış, TMZ'ye karşı direnç gösteren poligonal ve *MGMT* geni unmetile olan hücrelerdir (http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr, 348). U-87MG hücreleri ise 44 yaşında Kafkasya'lı bir erkek hastadan alınmış, TMZ'ye iyi cevap veren ve *MGMT* geni metile olan epitelyal morfolojideki GBM hücreleridir (http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr, 348). OLE'nin U-138MG ve U-87MG hücrelerindeki optimal aktivitesi 24 saatte görülmüştür.

Kurisawa ve arkadaşları (386) flavonoidlerin organizmada 24 saate kadar aktif kalabildiklerini ortaya koymuşlardır. OLE'nin aktif bileşeni olan oleuropein de bir flavonoid türüdür. Bu nedenle, mevcut projede OLE'nin etkinliğinin araştırıldığı ileri analizlerde 24 saatlik inkübasyon süresi kullanılmıştır. Ayrıca, daha önceki çalışmamızda T98G hücrelerinde elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde, OLE'nin U-138MG ve U-87MG hücrelerindeki IC50 değeri 1 mg/mL ve 2 mg/mL'lik konsantrasyonlarda görülmüştür (276). 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE U-138MG hücrelerinde sırasıyla % 55 ve % 62 oranında ve U-87MG hücrelerinde sırasıyla % 43 ve % 48 oranında hücre ölümüne yol açmıştır ($p < 0.05$). T98G, U-138MG ve U-87MG hücreleri *MGMT* metilasyon oranları açısından birbirinden farklı özellikler gösterebilir de OLE'nin her üç hücre hattındaki IC50 değerlerinin benzer olduğu görülmüştür. Bu nedenle bulgularımız OLE'nin *MGMT*'den bağımsız bir sinyal yolağı ile hücre ölümüne yol açıyor olabileceğine işaret etmektedir.

OLE'nin tümör hücre canlılığı üzerindeki etkisinin moleküler mekanizmasının değerlendirilebilmesi için Annexin-V-FITC/PI ve TUNEL analizleri gerçekleştirilmiş ve T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinde 1 mg/mL OLE'nin sırasıyla % 42.7, % 29.2, % 34.9 oranında apoptoz ve %34.8, % 20.2, % 7.8 oranında nekroz, 2 mg/mL OLE'nin ise sırasıyla % 67.7, % 38.6, % 25.6 oranında apoptoz ve % 14.5, % 13.3 % 21.9 oranında nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür. Mijatovic ve arkadaşları (391) B16 melanoma hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında OLE'nin Bim ve p53'ü sessizleştirerek ve Bcl-XL'nin amplifikasyonunu tetikleyerek, kaspas-3, -8, -9'un transkripsiyonunun baskılanmasına yol açtığını ve bu sayede apoptotik sürecin nekroze dönüşmesine sebep olduğunu ortaya koymuşlardır. Öte yandan, Reyes-Zurita ve arkadaşları (392), OLE'nin yapısında bulunan bir fenolik bileşen olan maslinik asit'in Caco-2 insan kolon kanseri hücre hattında yüksek oranda Bid kesimine ve kaspaz-8 ve -3'ün erken aktivasyonuna yol açtığını ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmada GSC (+) tümörlerde OLE maruziyeti sonunda gerçekleştirilen Western Blot analizinde OLE'nin p53 inaktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle, bulgularımız Mijatovic ve arkadaşlarının bulgularına benzer şekilde, OLE'nin yapısında bulunan fenolik bileşenlerin p53'ün sessizleştirilmesi yoluyla hücre ölümünü apoptozdan nekroza dönüştürüyor olabileceğini desteklemektedir. Her ne kadar nekroz, kanser tedavisinde öncelikli olarak tercih edilen bir ölüm yolağı olmasa da, 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE'nin lenfositler üzerindeki sitotoksik etkisinin çok az olduğu daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmada gösterilmiştir (sırasıyla % 16 ve % 22) (276). Bu bulgu OLE'nin tümör olmayan hücreler

üzerinde yol açacağı muhtemel yan etkilerin çok düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, mevcut verilerimiz OLE'nin apoptozun yanı sıra bir miktar nekrotik ölüme de yol açıyor olmasına rağmen GBM tedavisi için ileri ilaç araştırmalarında kullanılmaya aday bir ajan olabileceğini göstermektedir. OLE'nin apoptotik etkisinin yanı sıra, CAM analizinde TMZ'ye direnç gösteren hücreler olan T98G hücrelerinden oluşturulan tümörlerde elde edilen bulgular 2 mg/mL OLE'nin GBM tümör ağırlığında azalmaya ($p = 0.005$) ve *VEGFA* ekspresyonunda 5.26 kat düşüşe yol açtığını ortaya koymuştur ($p = 0.028$). Ayrıca, CAM analizi ile OLE'nin GSC (+) tümörlerdeki etkisi değerlendirildiğinde, T98G hücrelerinde elde edilen bulgulara benzer şekilde OLE'nin GSC (+) tümörlerde de tümör ağırlığını anlamlı şekilde azalttığı ($p < 0.05$) ve *VEGFA* ekspresyonunda 7.78 kat düşüşe yol açtığı belirlenmiştir ($p = 0.0001$). Bu nedenle, mevcut bulgularımız, OLE'nin ilaç direnci olan GBM tümörlerinde ve GSC (+) tümörlerde invazyonu azaltıcı yönde etki gösterebileceğine işaret etmektedir.

İkinci olarak, mevcut projede OLE'nin TMZ ile eş zamanlı etkisinin değerlendirebilmesi amacıyla WST-1 analizi ile TMZ'nin T98G, U-138MG ve U-87MG hücre hatlarında % 50 hücre ölümüne yol açan konsantrasyonları araştırılmış ve daha önce gerçekleştirilen çalışmalara benzer şekilde, TMZ'nin T98G ve U-138MG hücrelerindeki IC50 değerinin U-87MG hücrelerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (348). Bulgularımıza göre, 24 saatlik inkübasyon süresinde, 450 μ M TMZ'nin, T98G ve U-138MG hücrelerinde sırasıyla % 58.07 ve % 57.99 oranında hücre canlılığında inhibisyona yol açtığı görülürken, 25 μ M TMZ'nin U-87MG hücrelerinde % 66.25 oranında ölüme yol açtığı belirlenmiştir. OLE'nin TMZ ile eş zamanlı etkisi değerlendirildiğinde, T98G ve U-138MG hücrelerinde 1 mg/mL OLE'nin, 450 μ M TMZ ile birlikte sırasıyla % 84.07 ve % 84.47 oranında, U-87MG hücrelerinde ise 25 μ M TMZ ile birlikte % 84.18 oranında hücre ölümüne yol açtığı saptanmıştır. 2 mg/mL OLE'nin ise 450 μ M TMZ ile birlikte T98G ve U-138MG hücrelerinde sırasıyla % 86.05 ve % 88.70 oranında ve 25 μ M TMZ ile birlikte U-87MG hücrelerinde % 92.12 oranında hücre canlılığını inhibe ettiği gözlenmiştir. Mevcut çalışmada elde ettiğimiz bulgular, OLE'nin TMZ'nin aktivitesini arttırıcı yönde etki ettiğini göstermiş olmasına rağmen, Mijatovic ve arkadaşları (391), B16 melanoma hücrelerinde OLE'nin sispilin ve paklitaksel gibi ilaçların etkinliğini arttırırken TMZ'nin etkinliğini azalttığını ifade etmişlerdir. GBM tedavisinde TMZ'ye direnç mekanizmalarından biri, DNA tamirinde görevli, O6-alkilguanin DNA alkiltransferaz'ın yüksek oranda sentezlenerek *MGMT* geninin O6 pozisyonundaki guaninden metil gruplarını uzaklaştırmasıdır (393). Bu nedenle tümörde gözlenen *MGMT* ekspresyon

seviyesi TMZ tedavisinin başarısını etkilemektedir. Mijatovic ve arkadaşlarının OLE'nin etkinliğini değerlendirdikleri B16 melanoma hücrelerinde *MGMT* ekspresyonu görülmemektedir. Bu nedenle bu hücreler TMZ tedavisine iyi cevap vermektedirler. Benzer şekilde, mevcut çalışmada, 2 mg/mL OLE ve TMZ kombinasyonu, T98G ve U-138MG hücrelerinde TMZ'nin tek başına kullanımına göre, hücre çoğalmasını 1.48 ve 1.52 kat fazla baskılamakta, *MGMT* geni metile olan U-87MG hücrelerinde 1.39 kat fazla baskılamıştır. Bu nedenle, her ne kadar, bulgularımız OLE'nin etki mekanizmasının *MGMT* ekspresyonundan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleştiğine işaret ediyor olsa da, OLE ve TMZ'nin birlikte kullanımından elde ettiğimiz veriler OLE ve TMZ'nin gösterecekleri sinerjik etkinin *MGMT* seviyesi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bununla beraber, *MGMT* ekspresyonu TMZ tedavisine yanıtı etkilediği en iyi bilinen mekanizmalardan birisi olmasına rağmen, *MGMT* geni metile olan bazı hastaların TMZ tedavisinden yarar sağlayamadıkları bilinmektedir (394, 395). Ayrıca, GSC (+) tümöre sahip olan hastaların da büyük bir çoğunluğu TMZ tedavisine yanıt vermemesine rağmen GBM tümörlerinde GSC varlığı ile *MGMT* protein seviyesi arasında da bir korelasyon olmadığı bildirilmiştir (396). Daha önce araştırma ekibimiz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada GSC (+) tümörlerin *MGMT* metilasyon oranlarının GSC (-) tümörlere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmesine rağmen GSC (+) tümörü olan hastaların sağkalım sürelerinin daha kısa olduğu görülmüştür (397). Bu nedenle, *MGMT* metilasyonundan başka, TMZ yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan farklı moleküler mekanizmaların olabileceğini düşünmekteyiz. Daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, tümörigenezin her basamağında rol oynadığı bilinen miRNA'ların GSC varlığında TMZ cevabı ile ilişkisi araştırılmış ve miR-181b ve miR-455-3p'nin anormal ekspresyonunun GSC (+) tümörlerde TMZ direncine yol açtığı ortaya koyulmuştur (397). Mevcut çalışmada ise, OLE'nin tek başına ve TMZ ile birlikte kullanımının GSC (+) tümörlerde miRNA ekspresyonları üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Daha önce T98G hücrelerinde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda OLE'nin miR-181b, miR-153, miR-145, miR-137 ve let-7d'nin ekspresyon seviyelerini değiştirdiği gözlenirken (276), mevcut projede GSC (+) tümörlerde 2 mg/mL OLE maruziyeti sonrası miR-153, miR-137 ve miR-145'in ekspresyonlarının değiştiği gözlenmiştir (sırasıyla $p = 0.008$; 0.015 ve 0.432).

miR-153, meme, ovaryum, prostat, kolon, rektum ve GBM gibi kanser türlerinde tümör baskılayıcı fonksiyonu olan bir miRNA'dır (360, 399 – 402). Son dönemde yapılan araştırmalarda miR-153'ün ekspresyon seviyesinin GSC (+) tümörlerde GSC (-) tümörlere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (403). Mevcut çalışmada GSC (+) tümörlerin 450

μM TMZ ile muamele edilmesinin miR-153 ekspresyon seviyesinde 42.99 kat artışa yol açtığı gözlenmiştir. Bu hücreler 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE'ye maruz bırakıldığında bu miRNA'nın ekspresyon seviyesinin 12.6 ve 29.81 kat artarken ($p=0.1375$ ve 0.008) hücreler 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE'ye 450 μM TMZ ile birlikte maruz bırakıldığında miR-153'ün ekspresyon seviyesinin 75.68 ve 81.91 kat arttığı saptanmıştır ($p=0.177$ ve 0.04). Bulgularımız, OLE-TMZ kombinasyonunun miR-153 ekspresyonunda yol açtığı artışın 450 μM TMZ'nin tek başına yol açtığı artıştan 1.76 ve 1.90 kat yüksek olduğunu göstermiştir ($p=0.313$ ve 0.217). Xu ve arkadaşları (360), miR-153'ün GBM hücre hatlarında, apoptoz'un düzenlenmesinde önemli rol oynayan Bcl-2 ve Mcl-1 proteinlerinin baskılanmasına yol açtığını ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmada, GSE (+) hücrelerin 2 mg/mL OLE ile muamele edilmesi sonucunda *BCL2* gen ekspresyonunda 4.14 kat, 2 mg/mL OLE – 450 μM TMZ kombinasyonu ile muamele edilmesi sonucunda ise 5.68 kat azalma olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $p = 0.351$ ve 0.353). Bu nedenle mevcut bulgularımız OLE'nin miR-153 ekspresyonunda artışa yol açarak *BCL2*'nin regülasyonunu değiştirdiğine ve bu yolla apoptoz'u aktiflediğine işaret etmektedir. Ayrıca, Xu ve arkadaşları (359), miR-153'ün Irs-2 protein seviyesinde düşüşe yol açarak protein kinaz B (PKB/Akt) sinyal yolağını baskıladığını göstermişlerdir. Akt sinyal yolağının regülasyonu GBM'de sıklıkla bozulmaktadır. Bu yolağın aktiflenmesi hücre döngüsünde ve sağkalımda artışa sebep olarak metastaza ve kemoterapi ve radyasyon tedavisine dirence yol açmaktadır (404). Bu nedenle, miR-153'ün Akt sinyal yolağını düzenleyerek TMZ direncinin önlenmesinde rol oynayabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, mevcut çalışmada, GSC (+) tümörlerde miR-153 ekspresyonunu değerlendirdiğimizde, OLE ve TMZ'nin sinerjik etkisinin tümörden tümöre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu tümörlerin OLE ve TMZ'ye maruz bırakılması miR-153 ekspresyonunda artışa yol açsa da bu artışın hastanın TMZ cevabına bağımlı olduğu görülmüştür. TMZ tedavisine iyi yanıt veren U-87MG hücrelerinde elde edilen verilere benzer şekilde, sağkalım süresi kısa olan hastalarda, sağkalım süresi uzun olan hastalara göre OLE-TMZ kombinasyonunun etkisinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu hastalarda *MGMT* geni promotör metilasyonu oranları benzer olduğundan (50.00 ± 00), mevcut veri, GSC (+) tümörlerde TMZ yanıtının farklı moleküler mekanizmalar tarafından düzenleniyor olabileceğini desteklemektedir.

Çalışmamızda OLE muamelesi sonucu GSC (+) hücrelerde ekspresyonu anlamlı şekilde değişen ikinci miRNA miR-137'dir. GBM'de miR-137 ekspresyonunun düşük olduğu daha önce farklı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (124, 361). Bier ve

arkadaşları (361) GBM'de miR-137 ekspresyonunun düşük olmasının promotör bölge metilasyonundan kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE muamelesi sonucunda T98G hücrelerinde miR-137 ekspresyonunun 1.41 kat ve 1.86 kat arttığı belirlenmiştir (276). Mevcut çalışmada, 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE muamelesi sonucunda GSC (+) tümörlerde bu miRNA'nın ekspresyon seviyesinin 9.26 ve 21.82 kat arttığı görülmüştür. Son dönemde, Zerdeçal gibi bazı terapötik bitkilerin, yapısında bulunan curcumin'den dolayı epigenetik mekanizmalar üzerinde düzenleyici etkisi olduğunu ifade eden çalışmalar bulunmaktadır (405). İleri araştırmalar gerekmele birlikte, OLE'nin yapısında bulunan Oleuropein'in curcumin gibi doğal bir polifenol olması, bu özütün de metilasyonun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Mevcut çalışmada, GSC (+) tümör hücreleri 450 µM TMZ ile muamele edildiğinde miR-137 ekspresyonunun 31.47 kat arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle bulgularımız OLE'nin miR-137 ekspresyonu üzerindeki etkisinin TMZ'ye benzer olduğunu desteklemektedir. GSC (+) hücreler 1 mg/mL veya 2 mg/mL OLE ve 450 µM TMZ kombinasyonuna maruz bırakıldığında ise miR-137 ekspresyonu sırasıyla 35.06 ve 32.89 kat arttığı görülmüştür ($p = 0.03$ ve 0.01). Elde edilen veriler, 1 mg/mL veya 2 mg/mL OLE ve 450 µM TMZ kombinasyonlarının yol açtığı miR-137 ekspresyon seviyelerinin, hücrelerin yalnızca TMZ ile muamelesi sonucu gözlenen miR-137 ekspresyonundan 1.11 ve 1.04 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur ($p = 0.484$ ve 0.394).

miR-137, G0/G1 evresinde hücre döngüsünün inhibisyonunda ve hücre döngüsü proteinlerinden CDK6 ve fosforile Rb'nin baskılanmasında rol oynamaktadır (124). Çalışmalar, miR-137'nin, GSC belirteçleri olan Nanog, Shh, Oct4 ve Sox2 ekspresyonlarının düşmesine ve tümör hücrelerinin hızlı yayılımından sorumlu olan GSC hücrelerinin kendini yenileme yeteneğinin azalmasına yol açtığını göstermiştir (406). Mevcut çalışmada, GSC (+) hücreler yalnızca 450 µM TMZ ile muamele edildiğinde *OCT-4*'ün ekspresyonunun 5.9 kat arttığı ve *SOX2* ekspresyonunun 1.38 kat azaldığı görülmüştür. 2 mg/mL OLE veya 2 mg/mL OLE – 450 µM TMZ muamelesinden sonra ise bu hücrelerde *OCT-4* ekspresyonunda 7.21 ve 8.43 kat, *SOX2* ekspresyonunda ise 13.36 ve 16.06 kat azalma olduğu belirlenmiştir. Jun ve arkadaşlarının (407) 2014 yılında GBM'de gerçekleştirdikleri çalışmalarında MET sinyal yolağının aktivasyonunun Oct-4 proteininin ekspresyonunu arttırdığı, melanoma hücrelerinde gerçekleştirilmiş bir başka çalışmada da miR-137'nin c-met'i hedeflediği gösterilmiştir (362). Mevcut çalışmada, 2 mg/mL OLE veya 2 mg/mL OLE – 450 µM TMZ muamelesinin GSC (+) tümörlerde *c-MET* ekspresyon

seviyesinde 4.73 ve 17.21 kat düşüşe yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle, bulgularımız OLE'nin miR-137 ekspresyonunu artırarak GSC (+) tümörlerin kök hücre özelliklerinin baskılanmasına, böylelikle tümör agresifliğinin azalmasına yol açtığını ortaya koymaktadır. Buna ek olarak, miR-137'nin bir diğer hedef geni olan *RTVP-1*, GBM'de c-Jun-NH2-kinaz aktiflenmesine ve *BCL2* ekspresyonunda artışa sebep olarak tümör nekroz faktör'e bağımlı apoptoz'a direnç oluşmasına yol açmaktadır (361, 408). Mevcut çalışmada *OCT-4*'ün yanısıra OLE'nin *BCL2* ekspresyonunda 4.14 kat azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu veriler OLE'nin GSC (+) tümörlerde hücre çoğalmasını ve kök hücre özelliklerini azalttığı ile ilgili düşüncelerimizi güçlendirmektedir. Ayrıca, miR-137 ekspresyonu her bir GSC(+) tümörde ayrı ayrı değerlendirildiğinde, tüm hastalar TMZ tedavisi görmüş olmasına ve *MGMT* metilasyon oranları benzer olmasına rağmen, OLE-TMZ kombinasyonu sağkalım süresi en kısa olan hastada (5 ay) miR-137 ekspresyonunda 6.23 kat artışa yol açtığı halde, sağkalım süresi en uzun olan hastada (> 48 ay) 8.3 kat artışa yol açtığı gözlenmiştir. Bu bulgu, OLE ve TMZ'nin birlikte kullanımından sağlanacak yararın TMZ direnciyle ilişkili, *MGMT* ekspresyonundan bağımsız farklı bir mekanizma ile olabileceği yönündeki bulguları destekler niteliktedir.

Mevcut tez projesinde OLE muamelesi sonucu GSC (+) hücrelerde ekspresyonu anlamlı şekilde değişen üçüncü miRNA miR-145'tir. Lee ve arkadaşları (358) miR-145'in astrosit ve nöral progenitör hücrelere göre glioma hücre hatlarında ve GSC (+) tümörlerdeki ekspresyonunun daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde, daha önce tarafımızdan gerçekleştirilen bir çalışmada miR-145'in GSC (+) tümörlerde GSC (-) tümörlere kıyasla daha düşük seviyede eksprese olduğu belirlenmiştir (397). Mevcut çalışmada da, 1 mg/mL ve 2 mg/mL OLE muamelesi sonucu GSC (+) tümörlerde miR-145 ekspresyonunun 1.2 ve 4.38 kat arttığı gözlenmiştir (sırasıyla $p = 0.187$, 0.432). GSC (+) hücreler 2 mg/mL OLE ve 450 μ M TMZ ile birlikte muamele edildiğinde ise miR-145 ekspresyonunun 73.72 kat arttığı belirlenmiştir ($p = 0.0005$). Bulgularımız, 2 mg/mL OLE ve 450 μ M TMZ'nin GSC (+) hücrelerde yol açtığı miR-145 ekspresyonunun 450 μ M TMZ'nin tek başına yol açtığı ekspresyondan 7.28 kat fazla olduğunu göstermiştir ($p = 0.004$). GSC pozitifliğinin iki önemli belirteci olan *OCT-4* ve *SOX2*'nin 3'UTR bölgeleri miR-145 ile eşleniklik göstermektedir (409, 410). Bu nedenle miR-145'in GBM tümörlerinde Oct-4 ve Sox2 ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynayabileceğine yönelik görüşler bulunmaktadır (410). Mevcut çalışmada, GSC (+) tümörlerde 2 mg/mL OLE muamelesinden sonra *OCT-4* ve *SOX2*'nin ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 7.21 ve 13.36 kat azaldığı saptanmıştır. Bu tümörler 2 mg/mL OLE ve 450 μ M TMZ ile birlikte

muamele edildiğinde ise bu genlerin ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 8.48 ve 16.06 kat azaldığı belirlenmiştir. Rani ve arkadaşları (356), miR-145'in SOX gen ailesi üyelerinden *SOX9*'u hedef alarak tümör baskılayıcı rol oynadığını, bu miRNA'nın ekspresyon seviyesindeki düşüşün ise neoplastik transformasyona ve tümör agresifliğinin artmasına yol açtığını ortaya koymuşlardır. Son dönemde gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen veriler ve mevcut çalışmanın bulguları, OLE'nin miR-145 ekspresyonunda artışa yol açarak GSC (+) hücrelerde kök hücre özelliklerinin baskılanmasını sağlayabileceğini desteklemektedir. Bununla birlikte Rani ve arkadaşları (356) miR-145'in glial tümörlerdeki fonksiyonunu araştırdıkları çalışmalarında bu miRNA'nın sessizleştirilmesinin, hücre döngüsünün düzenlenmesinde iş gören proteinler olan Siklin D1, *c-myc* ve *N-myc*'nin ekspresyonlarında artışa yol açtığını göstermişlerdir. Mevcut çalışmada 2 mg/mL OLE muamelesinin GSC (+) hücrelerde miR-145 ekspresyonunda 4.38 kat artışa yol açarken, *c-myc* ekspresyonunda da 5.97 kat azalmaya yol açtığı belirlenmiştir ($p = 0.341$). Hücreler, 2 mg/mL OLE ve 450 μ M TMZ ile birlikte muamele edildiğinde ise *c-myc* ekspresyonunun 14.82 kat azaldığı görülmüştür ($p = 0.341$). Öte yandan, miR-145 ekspresyonu her bir GSC (+) tümörde ayrı ayrı değerlendirildiğinde, OLE-TMZ kombinasyonu sağkalım süresi en uzun olan hastada miR-145 ekspresyonunda en az (3.36 kat) artışa yol açtığı halde, bu miRNA'nın ekspresyonundaki en yüksek artış (6.45 kat) sağkalım süresi en kısa olan hastada gözlenmiştir. Diğer 3 vakada ise miR-145 ekspresyonu ile sağkalım süresi arasında bir ilişki gözlenmemiştir. Bu nedenle, verilerimiz OLE-TMZ kombinasyonunun GSC (+) tümörlerde miR-145 ekspresyon seviyesinin azalmasına katkı sağladığını ancak, ekspresyon seviyesindeki azalış oranının başka faktörlerden de etkilenebileceğini göstermektedir.

Özetle, mevcut projede OLE'nin hem *MGMT* geni unmetile olan U-138MG hem de *MGMT* geni metile olan U-87MG hücrelerinde sitotoksiteye yol açtığı görülmüştür. Ayrıca, OLE'nin sitotoksik olarak etkili olduğunu belirlediğimiz dozlarının *MGMT* geni heterozigot metile olan T98G hücrelerinde de etkili olduğu daha önceki çalışmamızda gösterilmiştir (276). Mevcut çalışmada OLE'nin tümör hücrelerini apoptoz ve nekroz yoluyla öldürdüğü belirlenmiş olsa da daha önceki çalışmamızda bu özütün lenfosit hücrelerindeki sitotoksik aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir (276). Bunlara ilaveten, GSC (+) tümörlerde OLE'nin miRNA ekspresyonları üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde 2 mg/mL OLE'nin 450 μ M TMZ'nin tek başına gösterdiği etkiye benzer bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Dahası, miRNA ekspresyonlarındaki değişim her ne kadar *MGMT* metilasyon durumu veya farklı mekanizmalara bağımlı olsa da OLE'nin TMZ ile birlikte

kullanımının GSC (+) tümörlerde, TMZ'nin tek başına kullanımına oranla miR-153, miR-137 ve miR-145 ekspresyonlarını anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, OLE'nin anti-kanser aktivitesinin daha iyi anlaşılabilmesi için içeriğindeki aktif bileşenlerin GBM tümörlerindeki etkisinin de araştırılması gerektiğine inanmakla birlikte, elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, OLE'nin sağlıklı hücrelerde gözardı edilebilir bir sitotoksik aktivite göstererek GSC (+) tümörlerde TMZ'nin aktivitesini sinerjik olarak arttırdığı ortaya konmuştur. Ayrıca, elde edilen mevcut verilere göre, farklı hastalardan alınan GSC (+) tümörlerde OLE ve TMZ'nin etkileşim mekanizması ve ilaç dirençliliği ile ilişkisinin anlaşılabilmesi ileri araştırmalara açık bir konu olmakla birlikte, GBM hücre hatlarında elde ettiğimiz bulgular, *MGMT* metilasyon durumunun OLE ve TMZ'nin birlikte kullanımının aktivitesini etkilediğini göstermiştir.

Ficus carica halk arasında metabolik, kardiovasküler ve inflamatör hastalıkların geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır (411). Ayrıca, T-hücre lösemisi, Burkitt B lenfoma, melanoma, prostat, meme ve mide kanseri hücre hatlarında FCL'nin hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi gösterilmiştir (283, 281, 412). Ancak bu özütün beyin tümörlerindeki etkisi bilinmemektedir. Mevcut çalışmada, FCL'nin GBM hücre hatlarındaki ve GSC (+) tümörlerdeki anti-kanser etkisi değerlendirilmiştir. T98G, U-138MG ve U-87MG hücrelerinin 6 farklı FCL dozu ile muamelesinden sonra gerçekleştirilen WST-1 analizine göre, FCL'nin optimal aktivitesi ilk 24 saatte gözlenmiştir. Bu nedenle FCL'nin etki mekanizmasının araştırılması amacıyla gerçekleştirilen analizler 24 saatlik inkübasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, her üç GBM hücre hattı için de FCL'nin IC50 değeri 0.25 mg/mL olarak belirlenmiştir. WST-1 analizine göre, 0.25 mg/mL FCL, 24 saatlik inkübasyon süresinde T98G hücrelerinde % 58.7, U-138MG hücrelerinde % 54.94 ve U-87MG hücrelerinde % 68.81 oranında hücre ölümüne yol açmıştır ($p < 0.05$). Bu nedenle, bulgularımız FCL'nin *MGMT*'den bağımsız bir sinyal yolağı ile hücre ölümüne yol açtığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, gerçekleştirilen çalışmada 0.25 mg/mL FCL'nin lenfositler üzerinde % 14.83 ± 0.33 oranında inhibisyona yol açtığı belirlenmiştir. Bu verilerimiz FCL'nin sağlıklı hücreler üzerindeki olası yan etkilerinin göz ardı edilebilir oranda olduğunu göstermektedir.

0.25 mg/mL FCL'nin tümör hücrelerinde yol açtığı ölüm TUNEL ve Annexin-V-FITC/ PI analizleriyle değerlendirildiğinde, hücre ölümünün apoptoz ve nekroz yoluyla gerçekleştiği görülmüştür. Gerçekleştirilen HPLC analizi sonucunda çalışmamızda kullanılan FCL'nin, 28.784 ± 0.080 mg/L protocatechuic acid içerdiği belirlenmiştir. Anter ve arkadaşları, *Matricaria chamomilla* ve *Uncaria tomentosa*'dan ekstrakte edilen

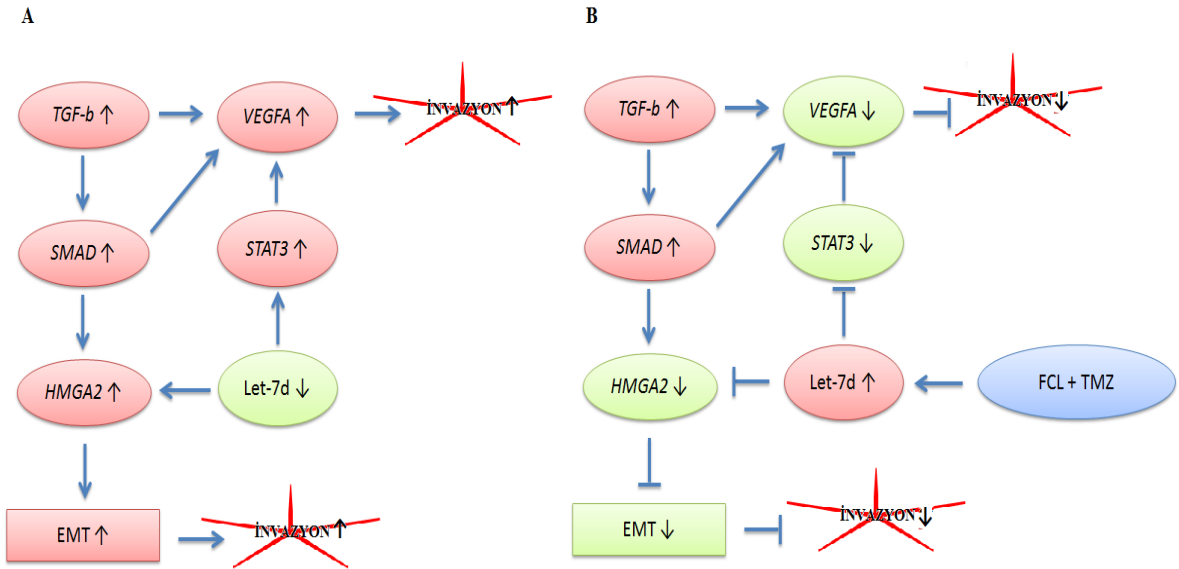
protocatechuic acid'in HL-60 lösemi hücrelerinde apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (413). Mevcut çalışmadan elde ettiğimiz bulgular FCL'nin moleküler etki mekanizmasını ilk kez ortaya koymuş olsa da bu özütün içeriğinde en fazla bulunan fenolik bileşik protocatechuic acid olduğundan, elde ettiğimiz veriler daha önceki çalışmaları destekler nitelikte olup, FCL'nin apoptozu indükleyici özelliğinin GBM hücrelerinde anti-kanser aktivitesine yol açabileceğini göstermektedir. FCL'nin apoptotik etkisinin yanı sıra, CAM analizinde T98G hücrelerinden oluşturulan tümörlerde elde edilen bulgular FCL'nin GBM tümör ağırlığında ($p = 0.08$) ve *VEGFA* ekspresyonunda ($p = 0.002$) azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur. T98G hücreleri TMZ'ye direnç gösteren hücreler olduğundan CAM analizinden elde edilen bulgularımızın FCL'nin ilaç direnci olan GBM tümörlerinde de anti-kanser etkisi gösterebileceğine işaret etmektedir. Daha önce, gerçekleştirilen çalışmalarda çeşitli bitkisel özütlerden elde edilen protocatechuic acid'in invazyonu baskılayıcı etkisinin olduğundan bahsedilmektedir (414 – 416). Spilioti ve arkadaşları (416) baldan ekstrakte edilen protocatechuic acid'in prostat kanseri hücre hattı PC-3 ve meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücrelerindeki anti-kanser aktivitesini ortaya koymuşlar ve balın protocatechuic acid içeriği ile vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) arasında ters korelasyon bulunduğunu belirtmişlerdir. VCAM-1'in GBM'de makrofaj hücre interaksyonunu ve tümör hücresi invazyonunu tetiklediği bilinmektedir (417). Bu nedenle, FCL'nin GBM hücrelerindeki potansiyel invazyonu baskılayıcı etkisinin, bu özütün protocatechuic acid içeriğinden kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, mevcut çalışmadan elde ettiğimiz bulguların aksine, Kang ve arkadaşları (418), protocatechuic acid'in *PI3 K/Akt/eNOS/VEGF* sinyal yolağını aktifleyerek anjiogenez'i indüklediğini ifade etmişlerdir. Ancak, mevcut çalışmada protocatechuic acid içerdiğini belirlediğimiz FCL'nin GBM hücre hattından türetilen tümörlerde anti-anjiogenik etki gösterdiği görülmüştür. Kang ve arkadaşları (418) protocatechuic acid'in etkisini aynı zamanda non-tümöral bir hücre tipi olan insan beyin mikrovasküler endotelial hücre hattında da incelemişler ve mevcut çalışmada lenfosit hücrelerinde elde edilen bulgulara benzer şekilde çok düşük oranda bir sitotoksik aktivite belirlemişlerdir. FCL'nin invazyon üzerindeki etki mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için ileri araştırmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Birlikte, elde edilen veriler protocatechuic acid'in hücre tipine bağlı olarak invazyon özelliğinin değişiklik gösterdiğine işaret etmektedir.

Mevcut çalışmada FCL'nin TMZ ile kombine etkisinin değerlendirilebilmesi için 0.25 mg/mL FCL ile birlikte T98G ve U-138MG hücrelerine 450 μ M TMZ, U-87MG

hücrelerine ise 25 µM TMZ verilmiştir. WST-1 analizinden elde edilen bulgular, TMZ'nin hücre canlılığında yol açtığı inhibisyon oranına kıyasla FCL-TMZ kombinasyonunun daha yüksek oranda hücre ölümüne yol açtığını ortaya koymuştur (sırasıyla $p < 0.01$, = 0.043 ve 0.043). Bu veriler, FCL'nin TMZ'nin terapötik etkinliğini arttırıcı yöndeki etkisine işaret etmektedir. FCL'nin moleküler etki mekanizmasını araştırmak amacıyla mevcut çalışmada T98G hücreleri 0.25 mg/mL FCL ve/ veya 450 µM TMZ ile muamele edilmiş ve bu hücrelerde GBM gelişimi ve ilaç dirençliliği ile ilişkili 40 miRNA'nın ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen Super Array ve RT-PCR analizleri FCL muamelesinin T98G hücrelerinde let-7 ekspresyonunu muamelesiz hücrelere göre 3.77 kat arttırdığını ortaya koymuştur ($p = 0.002$). FCL ve TMZ'nin birlikte muamelesinin ise TMZ'nin tek başına kullanımına göre let-7d ekspresyonunu 1.75 kat arttırdığı saptanmıştır ($p = 0.015$).

Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda, beslenme şeklinin, epigenetik modifikasyonlar yoluyla kanserden korunmaya katkı sağladığı ortaya konmuştur (419, 420). Bu etkinin alınan besinlerin içerdikleri fenolik bileşenlerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Paluszczak ve arkadaşları (421) protocatechuic acid'in *DNMT* aktivitesini baskılayıcı etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, Wang ve arkadaşları (422) fizyolojik konsantrasyonlardaki protocatechuic acid'in makrofajlarda miR-10b ekspresyonunu baskılayabildiğini göstermişlerdir. Biyokimyasal analizlerle desteklenmesi gerekmele birlikte, mevcut çalışmanın bulguları, FCL'nin içeriğinde bulunan protocatechuic acid'in GBM tümörlerinde let-7d ekspresyonunda artışa yol açtığına işaret etmektedir. Let-7 ailesi tümör baskılayıcı fonksiyonu olan bir miRNA ailesi olup bu ailenin üyeleri normal dokuya kıyasla birçok tümör dokusunda düşük ekspresyon göstermektedir (423 – 425). Let-7d'nin en iyi araştırılmış olan hedef genlerinden birisi *HMGA2*'dir (427). Xi ve arkadaşları (426), let-7 ekspresyonu yüksek olduğunda Hmga2 proteininin ekspresyonunun düştüğünü ifade etmişlerdir. Hmga2 epitelyal mezenkimal değişim (EMT)'nin düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (427). Transforming growth factor beta (TGF-b) EMT'yi uyararak Snail/Slug, ZEB1/2 ve Twist gibi proteinlerin ekspresyonunda artışa yol açmaktadır (428, 429). Bu proteinler E-kaderin ekspresyonunu baskılayarak mezenkimal genlerin ekspresyonunu uarmaktadır (429, 430). *HMGA2* EMT'nin TGF-b tarafından uyarılmasında önemli rol oynamaktadır. *HMGA2*, Smad proteinleri tarafından aktiflenerek Snail ve Twist proteinlerinin ekspresyonlarının artmasına yol açmaktadır (428, 429). *HMGA2* ekspresyonu ve invazyon arasındaki ilişki daha önce ovaryum kanserinde ve retinoblastoma'da gösterilmiştir (426,

431). Ayrıca, Chen ve arkadaşları da (432) *HMGA2*'nin yüksek evreli glial tümörlerde de invazyonu düzenlediğini belirlemişlerdir. *Let-7d*'nin iyi araştırılmış hedef genlerinden bir diğeri de, hücre çoğalmasında, sağkalımında ve invazyonunda rol oynayan Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (*STAT3*)'tür (433, 434). *Stat3* proteini *let-7* ailesi üyelerini baskılayarak siklin D1, Bcl2 protein ailesi ve Rho ailesi GTPaz'ları, hypoxiainducible factor-1a ve VEGF gibi proteinleri kodlayan genleri aktiflemektedir (435 – 439). Mevcut çalışmada FCL ve TMZ'nin birlikte kullanımının GBM hücrelerinde *let-7d* ekspresyonunda artışa yol açtığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen çalışma kapsamında CAM'da oluşturulan tümörlerde FCL muamelesi sonrasında *VEGFA* ekspresyonu ve FCL'nin tümör ağırlığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bulgularımız, FCL'nin GBM tümörlerinde *let-7d* ekspresyonunda artışa yol açarak *HMGA2* ve *VEGFA* ekspresyonlarının baskılanmasını sağladığına ve FCL varlığında tümörün TMZ'ye karşı daha iyi yanıt verdiğiine işaret etmektedir (Şekil-70).



Şekil-70 FCL-TMZ etkileşiminin *let-7d* yoluyla invazyon üzerindeki etkisi. A. *HMGA2* ve *VEGFA* ekspresyonu ile invazyonun tetiklenmesi. B. FCL-TMZ etkileşiminin *let-7-d*'yi tetiklemesi sonucu *HMGA2* ve *VEGFA*'nın baskılanarak invazyonun kontrolü

FCL ve TMZ'nin birlikte kullanımının, T98G hücrelerinde *let-7d* ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığı belirlendiğinden, GSC (+) tümörler de 24 saatlik inkübasyon süresinde ayrı ayrı ve eş zamanlı olarak 0.25 mg/mL FCL ve 450 µM TMZ ile maruz bırakılmış ve bu hücrelerde *let-7d* ekspresyonu değerlendirilmiştir. Ancak T98G hücrelerinden farklı olarak, GSC (+) tümörlerde FCL ve TMZ maruziyeti sonucunda *let-7d* ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p = 0.127$). Ayrıca, CAM

analizi'nde, T98G hücrelerinden türevlenen tümörlerde gözlenenin aksine, 0.25 mg/mL FCL maruziyetinin, GSC (+) tümörlerin ağırlığında ($p > 0.05$) ve *VEGFA* ekspresyon seviyelerinde ($p = 0.282$) anlamlı bir değişime yol açmadığı gözlenmiştir. FCL'nin T98G hücrelerinde anti-invazif özellik göstermesine rağmen GSC (+) hücrelerde aynı etkiyi göstermemiş olması, FCL'nin içeriğindeki protocatechuic acid'in hücre tipine bağlı olarak invazif etki gösterebileceği ile ilgili görüşlerimizi desteklemektedir. Bununla birlikte, gerçekleştirilen western blot analizi sonucunda, GSC (+) tümör hücrelerinde FCL maruziyeti sonrasında p53 proteininde herhangi bir değişim gözlenmezken, FCL'nin p38 MAPK proteininin baskılanmasına yol açtığı belirlenmiştir. Va ve arkadaşları (440), U-87MG hücrelerinde JNK ve Akt sinyal yollarını aktiflediklerinde p38 MAPK ekspresyonunun da arttığını ve hücrelerde TMZ direnci oluştuğunu ve p38 MAPK'nin baskılanmasının TMZ yanıtını arttırdığını ortaya koymuşlardır. Mevcut çalışmada, FCL, GSC (+) hücrelerde p38 MAPK protein ekspresyonunda azalmaya yol açtığından, tek başına anti-invazif özellik göstermemesine rağmen bu hücrelerin TMZ tedavisine verdiği yanıtı arttırabileceği düşünülmektedir.

Özet olarak, mevcut çalışmada, 0.25 mg/mL FCL'nin TMZ dirençliliği açısından farklı özelliklerde olan T98G, U-138 MG ve U-87 MG hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. FCL'nin bu hücrelerde apoptozun yanı sıra nekroz ile de ölüme yol açıyor olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, bu özütün lenfosit hücrelerinde belirlenen sitotoksik aktivitesinin düşük olması, FCL'nin muhtemel yan etkilerinin göz ardı edilebilir olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, FCL'nin TMZ ile birlikte kullanımının, TMZ'nin tek başına kullanımına göre let-7d ekspresyon seviyesini anlamlı şekilde arttırarak invazyonun kontrolüne katkı sağladığı ortaya konmuştur. GSC (+) tümörlerde ise, hücre hatlarında elde edilen bulgulardan farklı olarak FCL'nin tek başına anti-invazif bir etki göstermemesine rağmen, p38 MAPK proteininin baskılanması yoluyla TMZ direncinin azalmasına yol açtığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamız kapsamında değerlendirilen VA, GBM tümörleri üzerinde doza bağımlı olarak değişen bir hücre ölümüne yol açmamıştır. Bu nedenle, bu özütün GBM tümörlerinin tedavisinde bir ilaç adayı olma potansiyelinin anlaşılabilmesi için özütün lektin içeriğinin ve homojenliğinin ileri araştırmalarla araştırılması gerekmektedir. GSE, GBM hücre hatlarında, hücre çoğalmasında azalmaya yol açmış olmasına rağmen, ex-vivo koşullarda gerçekleştirilen analizlerin verileri in-vitro koşullardaki bulgularımızı desteklememiştir. Bu nedenle, GSE'nin anti-kanser aktivitesinin daha iyi şekilde anlaşılabilmesi için in-vivo sistemlerde araştırılması

gerekmektedir. OLE'nin TMZ'ye karşı birbirinden farklı direnç özellikleri gösteren GBM hücre hatlarında hücre ölümüne yol açtığı ve OLE'nin TMZ ile birlikte kullanımının bu etkiyi sinerjik olarak arttırdığı ilk kez mevcut çalışma ile ortaya konmuştur. Her ne kadar daha önceki çalışmamızda OLE'nin GBM hücrelerinde miRNA ekspresyon seviyelerini düzenlediği belirlenmiş olsa da, OLE'nin GSC (+) hücrelerde de benzer şekilde miRNA ekspresyonlarını düzenleyebildiği mevcut çalışma ile ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca bulgularımız ile FCL'nin farklı TMZ cevabı veren GBM tümörlerinde hücre ölümüne yol açtığı ve TMZ direnci gösteren GSC (+) tümörlerde ilaç direncini azalttığı ilk kez mevcut çalışma ile ortaya konmuştur. Bununla birlikte, FCL'nin let-7d ekspresyonunun düzenlenmesi aracılığıyla anti-invazif etki gösterdiği ilk kez mevcut çalışmada belirlenmiştir. OLE ve FCL'nin GBM tümörleri üzerindeki etkisinin in-vivo çalışmalarla desteklenmesi gerektiğine inanmakla birlikte, mevcut bulgularımız OLE ve FCL'nin GBM tedavisi için ilaç araştırmalarında kullanılabilecek potansiyel terapötik adaylar olabileceklerini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. TC. Sağlık Bakanlığı (<http://saglik.gov.tr>).
2. Central Brain Tumor Registry of the United States 2008. CBTRUS statistical report: primary brain tumors in the United States, 2000 – 2004. Chicago: CBTRUS, 2008.
3. SCOTT CB, SCARANTINO C, URTASUN R, MOVSAS B, JONES CU, SIMPSON JR, FISCHBACH AJ, CURRAN WJ JR. Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90–06. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 40: 51 – 55, 1998.
4. GILBERTSON RJ, RICH JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nature Reviews Cancer*, 7:733 – 736, 2007.
5. HERHOLZ K, COOPE D, JACKSON A. Metabolic and molecular imaging in neuro-oncology. *The Lancet Neurology*, 6:711 – 724, 2007.
6. COLLINS VP. Mechanisms of disease: genetic predictors of response to treatment in brain tumors. *Nature Clinical Practice Oncology*, 4: 362 – 374, 2007.
7. NAKANO I, KORNBLUM HI. Brain tumor stem cells. *Pediatric Research*, 59:54R–58R, 2006
8. NAKANO I, JOSHI K, VISNYEI K, HU B, WATANABE M, LAM D, WEXLER E, SAIGUSA K, NAKAMURA Y, LAKS DR, MISCHEL PS, VIAPIANO M, KORNBLUM HI. Siomycin A targets brain tumor stem cells partially through a MELK-mediated pathway. *Neuro-Oncology*, 13(6):622 – 34, 2011.
9. VESCOVI AL, GALLI R, REYNOLDS BA. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 6:425 – 436, 2006.
10. REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, WEISSMAN IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414:105 – 111, 2001.
11. SINGH SK, HAWKINS C, CLARKE ID, SQUIRE JA, BAYANI J, HIDE T, HENKELMAN RM, CUSIMANO MD, DIRKS PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432:396 – 401, 2004.
12. HEMMATI HD, NAKANO I, LAZAREFF JA, MASTERMAN-SMITH M, GESCHWIND DH, BRONNER-FRASER M, KORNBLUM HI. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:15178 – 15183, 2003.

13. GALLI R, BINDA E, ORFANELLI U, CIPELLETTI B, GRITTI A, DE VITIS S, FIOCCO R, FORONI C, DIMECO F, VESCOVI A. Isolation and characterization of tumorigenic, stemlike neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*, 64:7011 – 7021, 2004.
14. PICCIRILLO SG, REYNOLDS BA, ZANETTI N, LAMORTE G, BINDA E, BROGGI G, BREM H, OLIVI A, DIMECO F, VESCOVI AL. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*. 444:761 – 765, 2006.
15. BAR EE, CHAUDHRY A, LIN A, FAN X, SCHRECK K, MATSUI W, PICCIRILLO S, VESCOVI AL, DIMECO F, OLIVI A, EBERHART CG. Cyclopamine-Mediated Hedgehog Pathway Inhibition Depletes Stemlike Cancer Cells in Glioblastoma. *Stem Cells*. 25:2524 – 33, 2007.
16. BAO S, WU Q, MCLENDON RE, HAO Y, SHI Q, HJELMELAND AB, DEWHIRST MW, BIGNER DD, RICH JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444:756 – 760, 2006.
17. BAO S, WU Q, SATHORNSUMETEE S, HAO Y, LI Z, HJELMELAND AB, SHI Q, MCLENDON RE, BIGNER DD, RICH JN. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Research*, 66:7843 – 7848, 2006.
18. CLEMENT V, SANCHEZ P, DE TRIBOLET N, RADOVANOVIC I, RUIZ I ALTABA A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Current Biology*, 17:165 – 172, 2007.
19. CRAGG GM, NEWMAN DJ. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents, *Journal of Ethnopharmacology*, 22;100 (1 – 2):72 – 9, 2005.
20. LI J, LIU H, RAMACHANDRAN S, WAYPA GB, YIN JJ, LI CQ, HAN M, HUANG HH, SILLARD WW, VANDENHOEK TL, SHAO ZH. Grape seed proanthocyanidins ameliorate Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *The American Journal of Chinese Medicine*, 38(3):569 – 84, 2010.
21. ELOFF JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60: 1-8, 1998.
22. ŞENER B. Recent results in the search for bioactive compounds from Turkish medicinal plants. *Pure and Applied Chemistry*, 66: 10/11, 2295 – 2298, 1994.
23. PERCY C. Diagnostic techniques and tumor classification. *Human Pathology*, 15(6):598, 1984.

24. KLEIHUES P, BURGER PC, SCHEITHAUER BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathology*, 3(3):255 – 68, 1993.
25. LOUIS DN, OHGAKI H, WIESTLER OD, CAVENEE WK, BURGER PC, JOUVET A, SCHEITHAUER BW, KLEIHUES P. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114: 97-109, 2007.
26. TÜZÜN E, DEMİR GA, YAZICI, Nöro-Onkoloji, 2009 (<http://www.itfnoroloji.org/onkoloji/onkoloji.htm>)
27. WESTPHAL M, HILT DC, BORTEY E, DELAVAUPT P, OLIVARES R, WARNKE PC, WHITTLE IR, JÄÄSKELÄINEN J, RAM Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncology*, 5(2):79 – 88, 2003.
28. CLARKE J, BUTOWSKI N, CHANG SR. Recent advances in therapy for glioblastoma. *Archives of neurology*, 67: 279 – 283, 2010.
29. STUPP R, MASON WP, VAN DEN BENT MJ, WELLER M, FISHER B, TAPHOORN MJ, BELANGER K, BRANDES AA, MAROSI C, BOGDAHN U, CURSCHMANN J, JANZER RC, LUDWIN SK, GORLIA T, ALLGEIER A, LACOMBE D, CAIRNCROSS JG, EISENHAEUER E, MIRIMANOFF RO, EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER BRAIN TUMOR AND RADIOTHERAPY GROUPS, NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS GROUP. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 10;352 (10): 987 – 96, 2005.
30. SCHMIDINGER M, LINZMAYER L, BECHERER A, FAZENY-DOEMER B, FAKHRAI N, PRAYER D, KILLER M, UNGERSBOECK K, DIECKMANN K, MAROSI C. Psychometric-and quality-of-life assessment in long-term glioblastoma survivors. *Journal of Neuro-Oncology*, 63: 55 – 61, 2003.
31. The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455: 1061-1068, 2008.
32. LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J. *Molecular Cell Biology*. 4th edition, W. H. Freeman, New York, 2000.
33. VON DEIMLING A, LOUIS DN AND WIESTLER OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia*, 15: 328 – 338, 1995.

34. WATANABE K, TACHIBANA O, SATA K, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathology*, 6: 217 – 223, 1996.
35. OHGAKI H, KLEIHUES P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, 170:1445–1453, 2007.
36. OHGAKI H, KLEIHUES P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*, 100:2235 – 2241, 2009.
37. OHGAKI H, KLEIHUES P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64:479–489, 2005.
38. OHGAKI H, DESSEN P, JOURDE B, HORSTMANN S, NISHIKAWA T, DI PATRE PL, BURKHARD C, SCHÜLER D, PROBST-HENSCH NM, MAIÏORKA PC, BAEZA N, PISANI P, YONEKAWA Y, YASARGIL MG, LÜTOLF UM, KLEIHUES P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Research*, 64: 6892 – 9, 2004.
39. BIERNAT W, HUANG H, YOKOO H, KLEIHUES P, OHGAKI H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathology*, 14: 131–6, 2004.
40. KNOBBE CB, MERLO A, REIFENBERGER G. Pten signaling in gliomas. *Neuro-Oncology*, 4: 196–211, 2002.
41. KITA D, YONEKAWA Y, WELLER M, OHGAKI H. PI3KCA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathologica*, 113:295–302, 2007.
42. BOGLER O, HUANG HJ, KLEIHUES P, CAVENEE WK. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia*, 15: 308 – 27, 1995.
43. SHERR CJ, ROBERTS JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13: 1501 – 12, 1999.
44. STOTT FJ, BATES S, JAMES MC, MCCONNELL BB, STARBORG M, BROOKES S, PALMERO I, RYAN K, HARA E, VOUSDEN KH, PETERS G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO Journal*, 17: 5001 – 14, 1998.
45. MOMAND J, ZAMBETTI GP, OLSON DC, GEORGE D, LEVINE AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69: 1237 – 45, 1992.

46. OLINER JD, KINZLER KW, MELTZER PS, GEORGE DL, VOGELSTEIN B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358: 80–3, 1992.
47. POMERANTZ J, SCHREIBER-AGUS N, LIÉGEOIS NJ, SILVERMAN A, ALLAND L, CHIN L, POTES J, CHEN K, ORLOW I, LEE HW, CORDON-CARDO C, DEPINHO RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 92: 713 – 23, 1998.
48. TOLEDO F, WAHL GM. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 1476 – 82, 2007.
49. BIERNAT W, TOHMA Y, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathologica*, 94: 303 – 9, 1997.
50. DEVLIN TM. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, 2006.
51. GEISBRECHT BV, GOULD SJ. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 30527 – 33, 1999.
52. YAN H, PARSONS DW, JIN G, MCLENDON R, RASHEED BA, YUAN W, KOS I, BATINIC-HABERLE I, JONES S, RIGGINS GJ, FRIEDMAN H, FRIEDMAN A, REARDON D, HERNDON J, KINZLER KW, VELCULESCU VE, VOGELSTEIN B, BIGNER DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 360: 765 – 73, 2009.
53. ZHAO S, LIN Y, XU W, JIANG W, ZHA Z, WANG P, YU W, LI Z, GONG L, PENG Y, DING J, LEI Q, GUAN KL, XIONG Y. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*, 324: 261 – 5, 2009.
54. BEROUKHIM R, LIN M, PARK Y, HAO K, ZHAO X, GARRAWAY LA, FOX EA, HOCHBERG EP, MELLINGHOFF IK, HOFER MD, DESCAZEAUD A, RUBIN MA, MEYERSON M, WONG WH, SELLERS WR, LI C. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Computational Biology*, 2(5):e41, 2006.

55. RASHEED BK, MCLENDON RE, FRIEDMAN HS, FRIEDMAN AH, FUCHS HE, BIGNER DD, BIGNER SH. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene*, 10: 2243 – 6, 1995.
56. KARLBOM AE, JAMES CD, BOETHIUS J, CAVENEE WK, COLLINS VP, NORDENSKJÖLD M, LARSSON C. Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Human Genetics*, 92: 169–74, 1993.
57. ICHIMURA K, SCHMIDT EE, MIYAKAWA A, GOIKE HM, COLLINS VP. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 22: 9 – 15, 1998.
58. FUJISAWA H, REIS RM, NAKAMURA M, COLELLA S, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Laboratory Investigation*, 80: 65 – 72, 2000.
59. NAKAMURA M, YANG F, FUJISAWA H, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59: 539 – 43, 2000.
60. VEERIAH S, BRENNAN C, MENG S, SINGH B, FAGIN JA, SOLIT DB, PATY PB, ROHLE D, VIVANCO I, CHMIELECKI J, PAO W, LADANYI M, GERALD WL, LIAU L, CLOUGHESY TC, MISHEL PS, SANDER C, TAYLOR B, SCHULTZ N, MAJOR J, HEGUY A, FANG F, MELLINGHOFF IK, CHAN TA. The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 9435 – 40, 2009.
61. SOLOMON DA, KIM JS, CRONIN JC, SIBENALLER Z, RYKEN T, ROSENBERG SA, RESSOM H, JEAN W, BIGNER D, YAN H, SAMUELS Y, WALDMAN T. Mutational inactivation of PTPRD in glioblastoma multiforme and malignant melanoma. *Cancer Research*, 68: 10300 – 6, 2008.
62. NAKAMURA M, ISHIDA E, SHIMADA K, KISHI M, NAKASE H, SAKAKI T, KONISHI N. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Laboratory Investigation*, 85: 165 – 75, 2005.
63. MARTIN C, ZHANG Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(3):266 – 272, 2007.

64. HOLLIDAY R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, 1(2):76 – 80, 2006.
65. JIRTLE RL, SKINNER MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, 8:253 – 262, 2007.
66. FEINBERG AP. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA*, 299:1345 – 1350, 2008.
67. ESTELLER M. Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358:1148–1159, 2008.
68. SELARU FM, DAVID S, MELTZER SJ, HAMILTON JP. Epigenetic events in gastrointestinal cancer. *The American Journal of Gastroenterology*, 104:1910–1912, 2009.
69. GIBNEY ER, NOLAN CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105:4 – 13, 2010.
70. ESTELLER M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35): 5427–5440, 2002.
71. JONES PA, BAYLİN SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3(6): 415 – 428, 2002.
72. BACHMAN KE, HERMAN JG, CORN PG, MERLO A, COSTELLO JF, CAVENEE WK, BAYLIN SB, GRAFF JR. Methylation associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase- 3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Research*, 15;59(4):798-802, 1999.
73. HERMAN JG, LATIF F, WENG Y, LERMAN MI, ZBAR B, LIU S, SAMID D, DUAN DS, GNARRA JR, LINEHAN WM. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21): 9700–9704, 1994.
74. HERMAN JG, MERLO A, MAO L, LAPIDUS RG, ISSA JP, DAVIDSON NE, SIDRANSKY D, BAYLIN SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Research*, 15;55(20):4525-30, 1995.
75. MARTÍNEZ R. Beyond Genetics in Glioma Pathways: The Ever-Increasing Crosstalk between Epigenomic and Genomic Events. *Journal of Signal Transduction*. 2012:519807, 2012.
76. FEINBERG AP, VOGELSTEIN B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301:89 – 92, 1983.

77. ROBERTS LR, GORES GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Seminars in Liver Disease*, 25:212 – 225, 2005.
78. CALVISÌ DF, LADU S, GORDEN A, FARINA M, LEE JS, CONNER EA, SCHROEDER I, FACTOR VM, THORGEIRSSON SS. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 117:2713 – 2722, 2007.
79. HERMAN JG, BAYLIN SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, 349:2042 – 2054, 2003.
80. HAMILTON PJ. Epigenetics. *Design Principles & Practices* 29(2): 130 – 135, 2011.
81. HEGI ME, DISERENS AC, GORLIA T, HAMOU MF, DE TRIBOLET N, WELLER M, KROS JM, HAINFELLNER JA, MASON W, MARIANI L, BROMBERG JE, HAU P, MIRIMANOFF RO, CAIRNCROSS JG, JANZER RC, STUPP R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10):997 – 1003, 2005.
82. PEGG AE, DOLAN ME, MOSCHEL RC. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 51:167 – 223, 1995.
83. ESTELLER M, HERMAN JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O 6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene*, 8;23(1):1 – 8, 2004.
84. FRIEDMAN HS, MCLENDON RE, KERBY T, DUGAN M, BIGNER SH, HENRY AJ, ASHLEY DM, KRISCHER J, LOVELL S, RASHEED K, MARCHEV F, SEMAN AJ, COKGOR I, RICH J, STEWART E, COLVIN OM, PROVENZALE JM, BIGNER DD, HAGLUND MM, FRIEDMAN AH, MODRICH PL. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 16:3851 – 3857, 1998.
85. ESTELLER M, GARCIA-FONCILLAS J, ANDION E, GOODMAN SN, HIDALGO OF, VANACLOCHA V, BAYLIN SB, HERMAN JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England Journal of Medicine*, 343:1350 – 1355, 2000.
86. HERMAN JG, GRAFF JR, MYOHANEN S, NELKIN BD, BAYLIN SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:9821 – 9826, 1996.

87. LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843 – 854, 1993.
88. RUVKUN G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 294: 797 – 799, 2001.
89. BARTEL DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions, *Cell*, 136: 215–233, 2009.
90. miRBase: the microRNA database. release 21; June 2014. Available from: <http://www.mirbase.org>
91. SAYED D, ABDELLATIF M. MicroRNAs in development and disease, *Physiological Reviews*, 91:827 – 87, 2011.
92. KI VN, HAN J, SIOMI MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 126 – 19, 2009.
93. KIM YK, KIM VN. Processing of intronic microRNAs. *The EMBO Journal*, 26:775 – 83, 2007.
94. BRACHT J, HUNTER S, EACHUS R, WEEKS P, PASQUINELLI AE. Trans-splicing and polyadenylation of *let-7* microRNA primary transcripts. *RNA*, 10: 1586 – 94, 2004.
95. YI R, QIN Y, MACARA IG, CULLEN BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17: 3011 – 6, 2003.
96. BOHNSACK MT, CZAPLINSKI K, GORLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10: 185-91, 2004.
97. CHENDRIMADA TP, GREGORY RI, KUMARASWAMY E, NORMAN J, COOCH N. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436:740 – 4, 2005.
98. LEE Y, HUR I, PARK SY, KIM YK, SUH MR, KIM VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*, 25: 522 – 32, 2006.
99. WU L, FAN J, BELASCO JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:4034 – 9, 2006.
100. AHMAD J, HASNAIN SE, SIDDIQUI MA, AHAMED M, MUSARRAT J, AL-KHEDHAIRY AA. MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: a new paradigm. *Indian Council of Medical Research*, 137(4):680 – 94, 2013.
101. SHENOUDA SK, ALAHARI SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer and Metastasis Reviews*, 28:369 – 378, 2009.

102. SUN W, LI YSJ, HUANG HD, SHYY JYJ, CHIEN S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12:1 – 27, 2010.
103. DALMAY T, EDWARDS DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*, 9;25(46):6170 – 5, 2006.
104. IORIO MV, CROCE CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*. 4(3):143-59, 2012.
105. HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57 – 70, 2000.
106. CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, ALDLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 15524 – 15529, 2002.
107. CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD, HYSLOP T, NOCH E, YENDAMURI S, SHIMIZU M, RATTAN S, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 2999 – 3004, 2004.
108. ZHANG L, HUANG J, YANG N, GRESHOCK J, MEGRAW MS, GIANNAKAKIS A, LIANG S, NAYLOR TL, BARCHETTI A, WARD MR, YAO G, MEDINA A, O'BRIEN-JENKINS A, KATSAROS D, HATZIGEORGIOU A, GIMOTTY PA, WEBER BL, COUKOS G. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 9136 – 914, 2006.
109. MERRITT WM, LIN YG, HAN LY, KAMAT AA, SPANNUTH WA, SCHMANDT R, URBAUER D, PENNACCHIO LA, CHENG JF, NICK AM, DEAVERS MT, MOURAD-ZEIDAN A, WANG H, MUELLER P, LENBURG ME, GRAY JW, MOK S, BIRRER MJ, LOPEZ-BERESTEIN G, COLEMAN RL, BAR-ELI M, SOOD AK. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359: 2641 – 2650, 2008.
110. NAKAMURA T, CANAANI E, CROCE CM. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 10980 – 10985, 2007.

111. THOMSON JM, NEWMAN M, PARKER JS, MORIN-KENSICKI EM, WRIGHT T, HAMMOND SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & Development*, 20: 2202 – 2207, 2006.
112. WEBER B, STRESEMANN C, BRUECKNER B, LYKO F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 6: 1001 – 1005, 2007.
113. SAITO Y, LIANG G, EGGER G, FRIEDMAN JM, CHUANG JC, COETZEE GA, JONES PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the protooncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 9: 435 – 443, 2006.
114. LEHMANN U, HASEMEIER B, CHRISTGEN M, MULLER M, ROMERMANN D, LANGER F, KREIPE H. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *The Journal of Pathology*, 214: 17 – 24, 2008.
115. TOYOTA M, SUZUKI H, SASAKI Y, MARUYAMA R, IMAI K, SHINOMURA Y, TOKINO T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Research*, 68: 4123 – 4132, 2008.
116. SCOTT GK, MATTIE MD, BERGER CE, BENZ SC, BENZ CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Research*, 66: 1277 – 1281, 2006.
117. CIAFRÈ SA, GALARDI S, MANGIOLA A, FERRACIN M, LIU CG, SABATINO G, NEGRINI M, MAIRA G, CROCE CM, FARACE MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(4):1351 – 1358, 2005.
118. CHAN JA, KRICHEVSKY AM, KOSIK KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Research*, 65 (14):6029 – 6033, 2005.
119. MØLLER HG, RASMUSSEN AP, ANDERSEN HH, JOHNSEN KB, HENRIKSEN M, DUROUX M. A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Molecular Neurobiology*, 47(1):131 – 44, 2013.
120. HUSE JT, BRENNAN C, HAMBARDZUMYAN D, WEE B, PENA J, ROUHANIFARD SH, SOHN-LEE C, LE SAGE C, AGAMI R, TUSCHL T, HOLLAND EC. The PTEN-regulating microRNA miR- 26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes & Development*, 23(11):1327 – 1337, 2009.

121. RAO SAM, SANTOSH V, SOMASUNDARAM K. Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Modern Pathology*, 23(10):1404 – 1417, 2010.
122. WUCHTY S, ARJONA D, LI A, KOTLIAROV Y, WALLING J, AHN S, ZHANG A, MARIC D, ANOLIK R, ZENKLUSEN JC, FINE HA. Prediction of associations between microRNAs and gene expression in glioma biology. *PLoS One*, 6(2):e14681, 2011.
123. LAVON I, ZRIHAN D, GRANIT A, EINSTEIN O, FAINSTEIN N, COHEN MA, COHEN MA, ZELIKOVITCH B, SHOSHAN Y, SPEKTOR S, REUBINOFF BE, FELIG Y, GERLITZ O, BEN-HUR T, SMITH Y, SIEGAL T. Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro-Oncology*, 12(5):422 – 433, 2010.
124. SILBER J, LIM DA, PETRITSCH C, PERSSON AI, MAUNAKEA AK, YU M, VANDENBERG SR, GINZINGER DG, JAMES CD, COSTELLO JF, BERGERS G, WEISS WA, ALVAREZ-BUYLLA A, HODGSON JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Medicine*, 6:14, 2008.
125. SASAYAMA T, NISHIHARA M, KONDOH T, HOSODA K, KOHMURA E. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *International Journal of Cancer*, 125(6):1407–1413, 2009.
126. SUN L, YAN W, WANG Y, SUN G, LUO H, ZHANG J, WANG X, YOU Y, YANG Z, LIU N. MicroRNA-10b induces glioma cell invasion by modulating MMP-14 and uPAR expression via HOXD10. *Brain Research*, 1389:9 – 18, 2011.
127. MALZKORN B, WOLTER M, LIESENBERG F, GRZENDOWSKI M, STÜHLER K, MEYER HE, REIFENBERGER G. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathology*, 20(3):539 – 550, 2010.
128. LAGES E, GUTTIN A, ATIFI EL M, RAMUS C, IPAS H, DUPRÉ I, ROLLAND D, SALON C, GODFRAIND C, DEFRAIPONT F, DHOBB M, PELLETIER L, WION D, GAY E, BERGER F, ISSARTEL JP. MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS One*, 6(5):e20600, 2011.
129. SCHRAIVOGEL D, WEINMANN L, BEIER D, TABATABAI G, EICHNER A, ZHU JY, ANTON M, SIXT M, WELLER M, BEIER CP, MEISTER G. CAMTA1 is a novel

- tumour suppressor regulated by miR-9/9* in glioblastoma stem cells. *The EMBO Journal*, 30(20):4309 – 4322, 2011.
130. DEWS M, FOX JL, HULTINE S, SUNDARAM P, WANG W, LIU YY, FURTH E, ENDERS GH, EL-DEIRY W, SCHELTER JM, CLEARY MA, THOMAS-TIKHONENKO A. The myc-miR-17-92 axis blunts TGF β signaling and production of multiple TGF β -dependent antiangiogenic factors. *Cancer Research*, 70(20):8233 – 8246, 2010.
 131. ERNST A, CAMPOS B, MEIER J, DEVENS F, LIESENBERG F, WOLTER M, REIFENBERGER G, HEROLD-MENDE C, LICHTER P, RADLWIMMER B. De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures. *Oncogene*, 29(23):3411 – 3422, 2010.
 132. GABRIELY G, WÜRDINGER T, KESARI S, ESAU CC, BURCHARD J, LINSLEY PS, KRICHEVSKY AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Molecular and Cellular Biology*, 28(17):5369 – 5380, 2008.
 133. ZHOU X, ZHANG J, JIA Q, REN Y, WANG Y, SHI L, LIU N, WANG G, PU P, YOU Y, KANG C. Reduction of miR-21 induces glioma cell apoptosis via activating caspase 9 and 3. *Oncology Reports*, 24(1):195 – 201, 2010.
 134. ZHOU X, REN Y, MOORE L, MEI M, YOU Y, XU P, WANG B, WANG G, JIA Z, PU P, ZHANG W, KANG C. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Laboratory Investigation*, 90 (2):144 – 155, 2010.
 135. DONG H, LUO L, HONG S, SIU H, XIAO Y, JIN L, CHEN R, XIONG M. Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Systems Biology*, 4:163, 2010.
 136. LI D, CHEN P, LI XY, ZHANG LY, XIONG W, ZHOU M, XIAO L, ZENG F, LI XL, WU MH, LI GY. Grade-specific expression profiles of miRNAs/mRNAs and docking study in human grade I-III astrocytomas. *OMICS*, 15(10):673 – 682, 2011.
 137. Schramedei K, Mörbt N, Pfeifer G, Läuter J, Rosolowski M, Tomm JM, von Bergen M, Horn F, Brocke-Heidrich K (2011) MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene*, 30(26):2975–2985
 138. LI Y, ZHAO S, ZHEN Y, LI Q, TENG L, ASAI A, KAWAMOTO K. A miR-21 inhibitor enhances apoptosis and reduces G(2)-M accumulation induced by ionizing

- radiation in human glioblastoma U251 cells. *Brain Tumor Pathology*, 28(3):209 – 214, 2011.
139. PAPAGIANNAKOPOULOS T, SHAPIRO A, KOSIK KS. MicroRNA- 21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Research*, 68(19):8164 – 8172, 2008.
 140. CORSTEN MF, MIRANDA R, KASMIEH R, KRICHEVSKY AM, WEISSLEDER R, SHAH K. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Research*, 67(19):8994 – 9000, 2007.
 141. SHI L, CHEN J, YANG J, PAN T, ZHANG S, WANG Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/ Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Research*, 1352:255 – 264, 2010.
 142. ZHI F, CHEN X, WANG S, XIA X, SHI Y, GUAN W, SHAO N, QU H, YANG C, ZHANG Y, WANG Q, WANG R, ZEN K, ZHANG C-Y, ZHANG J, YANG Y. The use of hsa-miR-21, hsa-miR-181b and hsa-miR- 106a as prognostic indicators of astrocytoma. *European Journal of Cancer*, 46(9):1640 – 1649, 2010.
 143. KWAK HJ, KIM YJ, CHUN KR, WOO YM, PARK SJ, JEONG JA, JO SH, KIM TH, MIN HS, CHAE JS, CHOI EJ, KIM G, SHIN SH, GWAK HS, KIM SK, HONG EK, LEE GK, CHOI KH, KIM JH, YOO H, PARK JB, LEE SH. Downregulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas. *Oncogene*, 30 (21):2433 – 2442, 2011.
 144. REN Y, ZHOU X, MEI M, YUAN XB, HAN L, WANG GX, JIA ZF, XU P, PU PY, KANG CS. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. *BMC Cancer*, 10:27, 2010.
 145. REN Y, KANG C-S, YUAN X-B, ZHOU X, XU P, HAN L, WANG GX, JIA Z, ZHONG Y, YU S, SHENG J, PU PY. Co-delivery of as miR- 21 and 5-FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 21 (3):303 – 314, 2010.
 146. CHAUDHRY MA, SACHDEVA H, OMARUDDIN RA. Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways. *DNA and Cell Biology*, 29(9):553 – 561, 2010.

147. LI Y, LIW, YANG Y, LU Y, HE C, HU G, LIU H, CHEN J, HE J, YU H. MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Research*, 1286:13 – 18, 2009.
148. GAUR AB, HOLBECK SL, COLBURN NH, ISRAEL MA. Downregulation of Pcd4 by mir-21 facilitates glioblastoma proliferation in vivo. *Neuro-Oncology*, 13(6):580 – 590, 2011.
149. ZHANG C, HAN L, ZHANG A, YANG W, ZHOU X, PU P, DU Y, ZENG H, KANG C. Global changes of mRNA expression reveals an increased activity of the interferon-induced signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway by repression of miR-221/222 in glioblastoma U251 cells. *International Journal of Oncology*, 36(6):1503 – 1512, 2010.
150. CONTI A, AGUENNOUZ M, LA TORRE D, TOMASELLO C, CARDALI S, ANGILERI FF, MAIO F, CAMA A, GERMANÒ A, VITA G, TOMASELLO F. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 93 (3):325 – 332, 2009.
151. GUAN Y, MIZOGUCHI M, YOSHIMOTO K, HATA N, SHONO T, SUZUKI SO, ARAKI Y, KUGA D, NAKAMIZO A, AMANO T, MA X, HAYASHI K, SASAKI T. MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clinical Cancer Research*, 16(16):4289 – 4297, 2010.
152. LAKOMY R, SANA J, HANKEOVA S, FADRUS P, KREN L, LZICAROVA E, SVOBODA M, DOLEZELOVA H, SMRCKA M, VYZULA R, MICHALEK J, HAJDUCH M, SLABY O. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Science*, 102(12):2186 – 2190, 2011.
153. FANG L, DENG Z, SHATSEVA T, YANG J, PENG C, DU WW, YEE AJ, ANG LC, HE C, SHAN SW, YANG BB. MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8. *Oncogene*, 30(7):806 – 821, 2011.
154. KARSY M, ARSLAN E, MOY F. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. *Genes Cancer*, 3(1):3 – 15, 2012.
155. GODLEWSKI J, NEWTON HB, CHIOCCA EA, LAWLER SE. MicroRNAs and glioblastoma; the stem cell connection. *Cell Death & Differentiation*, 17(2):221 – 8, 2010.
156. UJIFUKU K, MITSUTAKE N, TAKAKURA S, MATSUSE M, SAENKO V, SUZUKI K, HAYASHI K, MATSUO T, KAMADA K, NAGATA I, YAMASHITA S.

- miR-195, miR-455-3p and miR-10a(*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells. *Cancer Letters*, 28;296(2):241 – 8, 2010.
157. LEBER MF, BOSSOW S, LEONARD VHJ, ZAOUI K, GROSSARDT C, FRENZKEM,MIEST T, SAWALL S, CATTANEO R, VON KALLE C, UNGERECHTS G. MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism. *Molecular Therapy*, 19(6):1097 – 1106, 2011.
 158. WU D-G, WANG Y-Y, FAN L-G, LUO H, HAN B, SUN L-H,WANG X-F, ZHANG J-X, CAO L,WANG X-R, YOU Y-P, LIU N. MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression. *Chinese Medical Journal*, 124(17):2616 – 2621, 2011.
 159. LU ZJ, LIU SY, YAO YQ, ZHOU YJ, ZHANG S, DAI L, TIAN HW, ZHOU Y, DENG HX, YANG JL, LUO F. The effect of miR-7 on behavior and global protein expression in glioma cell lines. *Electrophoresis*, 32(24):3612 – 3620, 2011.
 160. KEFAS B, GODLEWSKI J, COMEAU L, LI Y, ABOUNADER R, HAWKINSON M, LEE J, FINE H, CHIOCCA EA, LAWLER S, PUROW B. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Research*, 68 (10):3566 – 3572, 2008.
 161. LI Y, GUESSOUS F, ZHANG Y, DIPIERRO C, KEFAS B, JOHNSON E, MARCINKIEWICZ L, JIANG J, YANG Y, SCHMITTGEN TD, LOPES B, SCHIFF D, PUROW B, ABOUNADER R. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Research*, 69(19):7569 – 7576, 2009.
 162. GUESSOUS F, ZHANG Y, KOFMAN A, CATANIA A, LI Y, SCHIFF D, PUROW B, ABOUNADER R. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle*, 9(6):1031 – 1036, 2010.
 163. LUAN S, SUN L, HUANG F. MicroRNA-34a: a novel tumor suppressor in p53-mutant glioma cell line U251. *Archives of Medical Research*, 41(2):67 – 74, 2010.
 164. SILBER J, JACOBSEN A, OZAWA T, HARINATH G, PEDRAZA A, SANDER C, HOLLAND EC, HUSE JT. miR-34a repression in proneural malignant gliomas upregulates expression of its target PDGFRA and Promotes tumorigenesis. *PLoS One*, 7(3):e33844, 2012.
 165. VO DT, QIAO M, SMITH AD, BURNS SC, BRENNER AJ AND PENALVA LOF. The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by tumor suppressor miRNAs. *RNA Biology*, 8(5), 2011.

166. SHI ZM, WANG J, YAN Z, YOU YP, LI CY, QIAN X, YIN Y, ZHAO P, WANG YY, WANG XF, LI MN, LIU LZ, LIU N, JIANG BH. MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1. *PLoS One*, 7(3):e32709, 2012.
167. CUI JG, ZHAO Y, SETHI P, LI YY, MAHTA A, CULICCHIA F, LUKIW WJ. Micro-RNA-128 (miRNA-128) down-regulation in glioblastoma targets ARP5 (ANGPTL6), Bmi-1 and E2F-3a, key regulators of brain cell proliferation. *Journal of Neuro-Oncology*, 98(3):297 – 304, 2010.
168. ZHANG Y, CHAO T, LI R, LIU W, CHEN Y, YAN X, GONG Y, YIN B, LIU W, QIANG B, ZHAO J, YUAN J, PENG X. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *Journal of Molecular Medicine*, 87(1):43 – 51, 2009.
169. GODLEWSKI J, NOWICKI MO, BRONISZ A, WILLIAMS S, OTSUKI A, NUOVO G, RAYCHAUDHURY A, NEWTON HB, CHIOCCA EA, LAWLER S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Research*, 68(22):9125 – 9130, 2008.
170. CHEN L, WANG X, WANG H, LI Y, YAN W, HAN L, ZHANG K, ZHANG J, WANG Y, FENG Y, PU P, JIANG T, KANG C, JIANG C. miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2. *European Journal of Cancer*, 48(16):3104 – 11, 2012.
171. CALIN GA, CROCE CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6: 857 – 866, 2006.
172. LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, SWEET-CORDERO A, EBERT BL, MAK RH, FERRANDO AA, DOWNING JR, JACKS T, HORVITZ HR, GOLUB TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435: 834 – 838, 2005.
173. VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG, AMBS S, CIMMINO A, PETROCCA F, VISONE R, IORIO M, ROLDO C, FERRACIN M, PRUEITT RL, YANAIHARA N, LANZA G, SCARPA A, VECCHIONE A, NEGRINI M, HARRIS CC, CROCE CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 2257 – 2261, 2006.
174. GOMES CP, CHO JH, HOOD L, FRANCO OL, PEREIRA RW, WANG K. A Review of Computational Tools in microRNA Discovery. *Frontiers in Genetics*, 15; 4:81, 2013.
175. miScript PCR System Handbook 10/2011

176. ALP A, PINAR A, ESER Ö, SARIBAŞ Z, ERGÜNAY K. Real-Time PCR Kursu notları, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarları, 2012.
177. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402 – 8, 2001.
178. FRIEDLÄNDER MR1, CHEN W, ADAMIDI C, MAASKOLA J, EINSPANIER R, KNESPEL S, RAJEWSKY N. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature Biotechnology*, 26, 407 – 415, 2008.
179. LEE LW, ZHANG S, ETHERIDGE A, MA L, MARTIN D, GALAS D, WANG K. Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. *RNA*, 16: 2170 – 2180, 2010.
180. LEWIS B, SHIH I, JONES-RHOADES M, BARTEL D, BURGE C. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115:787–798, 2003.
181. REHMSMEIER M, STEFFEN P, HOCHSMANN M, GIEGERICH R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10:1507–1517, 2004.
182. FRIEDMAN RC, FARH KK, BURGE CB, BARTEL DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19: 92–105, 2009.
183. GRIMSON A, FARH KK, JOHNSTON WK, GARRETT-ENGELE P, LIM LP, BARTEL DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, 27: 91–105, 2007.
184. KERTESZ M, IOVINO N, UNNERSTALL U, GAUL U, SEGAL E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics*, 39:1278 – 1284, 2007.
185. ZHENG H, FU R, WANG JT, LIU Q, CHEN H, JIANG SW. Advances in the Techniques for the Prediction of microRNA Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 15; 14(4):8179 – 87, 2013.
186. YU Z, PESTELL TG, LISANTI MP, PESTELL RG. Cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12):2144 – 51, 2012.
187. Dirks PB. Brain tumor stem cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 11(2:2):12-3, 2005.
188. LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J, MURDOCH B, HOANG T, CACERES-CORTES J, MINDEN M, PATERSON B, CALIGIURI MA, DICK JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367:645 – 8, 1994.

189. AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ, CLARKE MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:3983 – 8, 2003.
190. SINGH SK, CLARKE ID, TERASAKI M, BONN VE, HAWKINS C, SQUIRE J, DIRKS PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63:5821 – 8, 2003.
191. LEFRANC F, RYNKOWSKI M, DEWITTE O, KISS R. Present and potential future adjuvant issues in high-grade astrocytic glioma treatment. *Advances and Technical Standards in Neurosurgery*, 34:3 – 35, 2009.
192. LEAL JA, LLEONART ME. MicroRNAs and cancer stem cells: Therapeutic approaches and future perspectives. *Cancer Letters*, 10;338(1):174 – 83, 2012.
193. WANG CY, WEI Q, HAN I, SATO S, GHANBARI-AZARNIER R, WHETSTONE H, POON R, HU J, ZHENG F, ZHANG P, WANG W, WUNDER JS, ALMAN BA. Hedgehog and notch signaling regulate self-renewal of undifferentiated pleomorphic sarcomas, *Cancer Research*, 72:1013–1022, 2012.
194. KARAMBOULAS C, AILLES L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(2):2481 – 95, 2013.
195. LAI EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate, *Development*, 131: 965 – 973, 2004.
196. WANG Z, LI Y, SARKAR FH. Notch signaling proteins: legitimate targets for cancer therapy. *Current Protein & Peptide Science*, 11(6):398 – 408, 2010.
197. CHAN EF, GAT U, MCNIFF JM, FUCHS E. A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin, *Nature Genetics*, 21(4):410 – 3, 1999.
198. PALMA V, LIM DA, DAHMANE N, SÁNCHEZ P, BRIONNE TC, HERZBERG CD, GITTON Y, CARLETON A, ALVAREZ-BUYLLA A, RUIZ I ALTABA A. SonicHedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain, *Development*, 132: 335 – 344, 2005.
199. MERCHANT AA, MATSUI W. Targeting Hedgehog—a cancer stem cell pathway, *Clinical Cancer Research*, 16: 3130–3140, 2010.
200. BEACHY PA, KARHADKAR SS, BERMAN DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 18; 432(7015):324-31, 2004.
201. YAMANAKA S. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 363: 2079 – 2087, 2008.

202. GROTENHUIS BA, WIJNHOVEN BP, VAN LANSCHOT JJ. Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors. *Journal of Surgical Oncology*, 1;106(2):209 – 15, 2012.
203. MAITLAND NJ, COLLINS AT. Cancer stem cells - A therapeutic target? *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 12(6):662 – 73, 2010.
204. VENERE M, FINE HA, DIRKS PB, RICH JN. Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia*, 59: 1148 – 1154, 2011.
205. GOIDTS V, BAGERITZ J, PUCCIO L, NAKATA S, ZAPATKA M, BARBUS S, TOEDT G, CAMPOS B, KORSHUNOV A, MOMMA S, VAN SCHAFTINGEN E, REIFENBERGER G, HEROLD-MENDE C, LICHTER P, RADLWIMMER B. RNAi screening in glioma stem-like cells identifies PFKFB4 as a key molecule important for cancer cell survival, *Oncogene*, 31: 3235 – 3243, 2012.
206. MIR SE, DE WITT HAMER PC, KRAWCZYK PM, BALAJ L, CLAES A, NIERS JM, VAN TILBORG AA, ZWINDERMAN AH, GEERTS D, KASPERS GJ, PETER VANDERTOP W, CLOOS J, TANNOUS BA, WESSELING P, ATEN JA, NOSKE DP, VAN NOORDEN CJ, WÜRDINGER T. In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell*, 18:244 – 257, 2010.
207. SEIDEL S, GARVALOV BK, WIRTA V, VON STECHOW L, SCHÄNZER A, MELETIS K, WOLTER M, SOMMERLAD D, HENZE AT, NISTÉR M, REIFENBERGER G, LUNDEBERG J, FRISÉN J, ACKER T. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2a, *Brain*, 133: 983 – 995, 2010.
208. YAN X1, MA L, YI D, YOON JG, DIERCKS A, FOLTZ G, PRICE ND, HOOD LE, TIAN Q. A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:1591 – 1596, 2011.
209. FILATOVA A, ACKER T, GARVALOV BK. The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(2):2496 – 508, 2013.
210. HEMPHILL JC 3RD, SMITH WS, SONNE DC, MORABITO D, MANLEY GT. Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: feasibility and initial results, *American Journal of Neuroradiology*, 26:1095 – 1100, 2005.

211. ACKER T, ACKER H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 3171 – 3188, 2004.
212. BAR EE, LIN A, MAHAIRAKI V, MATSUI W, EBERHART CG. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *American Journal of Pathology*, 177: 1491–1502, 2010.
213. EVANS SM, JENKINS KW, JENKINS WT, DILLING T, JUDY KD, SCHRLAU A, JUDKINS A, HAHN SM, KOCH CJ. Imaging and analytical methods as applied to the evaluation of vasculature and hypoxia in human brain tumors. *Radiation Research*, 170: 677 – 690, 2008.
214. EVANS SM, JUDY KD, DUNPHY I, JENKINS WT, HWANG WT, NELSON PT, LUSTIG RA, JENKINS K, MAGARELLI DP, HAHN SM, COLLINS RA, GRADY MS, KOCH CJ. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clinical Cancer Research*, 10: 8177 – 8184, 2004.
215. ACKER T, FANDREY J, ACKER H. The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. *Cardiovascular Research*, 71: 195 – 207, 2006.
216. SEMENZA GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148: 399 – 408, 2012.
217. CHI JT, WANG Z, NUYTEN DS, RODRIGUEZ EH, SCHANER ME, SALIM A, WANG Y, KRISTENSEN GB, HELLAND A, BØRRESEN-DALE AL, GIACCIA A, LONGAKER MT, HASTIE T, YANG GP, VAN DE VIJVER MJ, BROWN PO. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Medicine*, 3:e47, 2006.
218. LI Z, BAO S, WU Q, WANG H, EYLER C, SATHORNSUMETEE S, SHI Q, CAO Y, LATHIA J, MCLENDON RE, HJELMELAND AB, RICH JN. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells, *Cancer Cell*, 15 501 – 513, 2009.
219. COVELLO KL, KEHLER J, YU H, GORDAN JD, ARSHAM AM, HU CJ, LABOSKY PA, SIMON MC, KEITH B. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & Development*, 20: 557 – 570, 2006.
220. MORENO-MANZANO V, RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ FJ, ACEÑA-BONILLA JL, FUSTERO-LARDÍES S, ERCEG S, DOPAZO J, MONTANER D, STOJKOVIC M,

- SÁNCHEZ-PUELLES JM. FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 1333 – 1342, 2010.
221. GORDAN JD, BERTOUT JA, HU CJ, DIEHL JA, SIMON MC. HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*, 11: 335 – 347, 2007.
222. SOEDA A, PARK M, LEE D, MINTZ A, ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS A, MCKAY RD, ENGH J, IWAMA T, KUNISADA T, KASSAM AB, POLLACK IF, PARK DM. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene*, 28: 3949 – 3959, 2009.
223. CHICHE J, BRAHIMI-HORN MC, POUYSSÉGUR J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14: 771 – 794, 2010.
224. HJELMELAND AB, WU Q, HEDDLESTON JM, CHOUDHARY GS, MACSWORDS J, LATHIA JD, MCLENDON R, LINDNER D, SLOAN A, RICH JN. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death & Differentiation*, 18: 829 – 840, 2011.
225. CALABRESE C, POPPLETON H, KOCAK M, HOGG TL, FULLER C, HAMNER B, OH EY, GABER MW, FINKLESTEIN D, ALLEN M, FRANK A, BAYAZITOV IT, ZAKHARENKO SS, GAJJAR A, DAVIDOFF A, GILBERTSON RJ. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 11: 69 – 82, 2007.
226. ZHU TS, COSTELLO MA, TALSMA CE, FLACK CG, CROWLEY JG, HAMM LL, HE X, HERVEY-JUMPER SL, HETH JA, MURASZKO KM, DIMECO F, VESCOVI AL, FAN X. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Research*, 71: 6061 – 6072, 2010.
227. RAO M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in Mouse and human embryonic stem cells. *Developmental Biology*, 275: 269 – 286, 2004.
228. LI Y, GUESSOUS F, ZHANG Y, DIPIERRO C, KEFAS B, JOHNSON E, MARCINKIEWICZ L, JIANG J, YANG Y, SCHMITTGEN TD, LOPES B, SCHIFF D, PUROW B, ABOUNADER R. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Research*, 69: 7569 – 7576, 2009.
229. DE ANTONELLIS P, MEDAGLIA C, CUSANELLI E, ANDOLFO I, LIGUORI L, DE VITA G, CAROTENUTO M, BELLO A, FORMIGGINI F, GALEONE A, DE

- ROSA G, VIRGILIO A, SCOGNAMIGLIO I, SCIRO M, BASSO G, SCHULTE JH, CINALLI G, IOLASCON A, ZOLLO M. MiR-34a targeting of Notch ligand delta-like 1 impairs CD15+/CD133+ tumorpropagating cells and supports neural differentiation in medulloblastoma. *PLoS One*, 6: e24584, 2011.
230. LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, SWEET-CORDERO A, EBERT BL, MAK RH, FERRANDO AA, DOWNING JR, JACKS T, HORVITZ HR, GOLUB TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435: 834 – 838, 2005.
231. GODLEWSKI J, NOWICKI MO, BRONISZ A, WILLIAMS S, OTSUKI A, NUOVO G, RAYCHAUDHURY A, NEWTON HB, CHIOCCA EA, LAWLER S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Research*, 68: 9125 – 9130, 2008.
232. YANG YP, CHIEN Y, CHIOU GY, CHERNG JY, WANG ML, LO WL, CHANG YL, HUANG PI, CHEN YW, SHIH YH, CHEN MT, CHIOU SH. CHIOU. Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI. *Biomaterials*, 33: 1462 – 1476, 2012.
233. Tecnical researches, Stem cell Technologies ([http://www.stemcell.com/en/ Technical-Resources.aspx](http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources.aspx))
234. KOKURYO T, YOKOYAMA Y, NAGINO M. Recent advances in cancer stem cell research for cholangiocarcinoma. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 19(6):606 – 13, 2012.
235. SATHORNSUMETEE S, REARDON DA, DESJARDINS A, QUINN JA, VREDENBURGH JJ, RICH JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer*, 1; 110(1):13 – 24, 2007.
236. MERCER RW, TYLER MA, ULASOV IV, LESNIAK MS. Targeted therapies for malignant glioma: progress and potential. *BioDrugs*, 23(1):25-35, 2009.
237. HERMISSON M, KLUMPP A, WICK W, WISCHHUSEN J, NAGEL G, ROOS W, KAINA B, WELLER M. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, 96(3):766 – 76, 2006.
238. CHALMERS AJ, RUFF EM, MARTINDALE C, LOVEGROVE N, SHORT SC. Cytotoxic effects of temozolomide and radiation are additive- and schedule-dependent. *International Journal of Radiation Oncology*, 1;75(5):1511 – 9, 2009.

239. BRAMBILLA G, MARTELLI A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 681(2 – 3):209-29, 2009.
240. KELEŞ O, AK S, BAKIREL T, AKPINAR K. Türkiye’de yetişen bazı bitkilerin antibakteriyel etkisinin incelenmesi, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, Tubitak, 25: 559 – 565, 2001.
241. HOAREAU L, DASILVA E. Medicinal plants: a re-emerging health aid, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 2:2, 56 – 70, 1999.
242. ZEYBEK N. *Farmasötik Botanik, Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri*. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1985.
243. HAJTO T, HOSTANSKA K, BERKI T, PALINKAS L, BOLDIZSAR F, NEMETH P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* agglutinin-I): overview of recent results from in vitro experiments and in vivo animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2:59 – 67, 2005.
244. FRANZ H. Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology*, 43: 23-34, 1986.
245. MELZER J, ITEN F, HOSTANSKA K, SALLER R. Efficacy and safety of mistletoe preparations (*Viscum album*) for patients with cancer diseases. A systematic review. *Forsch Komplementmed*, 16(4):217 – 26, 2009.
246. KIENLE GS, GLOCKMANN A, SCHINK M, KIENE H. *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 11;28:79, 2009.
247. KHIL LY, KIM W, LYU S, PARK WB, YOON JW, JUN HS. Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 28; 13(20):2811 – 8, 2007.
248. KIM WH, PARK WB, GAO B, JUNG MH. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Molecular Pharmacology*, 66(6):1383 – 96, 2004.
249. GALANINA OE, KALTNER H, KHRALTSOVA LS, BOVIN NV, GABIUS HJ. Further refinement of the ligand-binding characteristics for the galactoside-binding mistletoe lectin, a plant agglutinin with immunomodulatory potency. *Journal of Molecular Recognition*, 10 (3): 139 – 147, 1997.
250. LUTHER P, MEHNERT W, GRAFFI A, PROKOP O. Reaktioneneiniger antikörperähnlicher substanzen aus insekten. In: Franz H. Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology*, 43: 23-34, 1986.

251. NARESH, AR, UDUPA N, UMADEVI P. Niosomal plumbagin with reduced toxicity and improved anticancer activity in BALB/c-mice. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 48: 1128 – 1132, 1996.
252. ZUZAK TJ, RIST L, EGGENSCHWILER J, GROTZER MA, VIVIANI A. Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to *Viscum album* (Mistletoe) preparations. *Anticancer Research*, 26(5A):3485-92, 2006.
253. PODLECH O, HARTER PN, MITTELBRONN M, PÖSCHEL S, NAUMANN U. Fermented mistletoe extract as a multimodal antitumoral agent in gliomas. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:501796, 2012.
254. TANGOLAR SG, SOYDAM S, BAKIR M, KARAAĞAÇ E, TANGOLAR S, ERGÜL A. Genetic Analysis of Grapevine Cultivars from the Eastern Mediterranean Region of Turkey, Based on SSR Markers. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Dergisi*, 15(1) 1 – 8, 2009.
255. CIBIRCIOĞLU C. Plant Parasitic Nematodes Associated with *Olea europea* L. Fauna of Turkey. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 24(4): 227 – 231, 2007.
256. SHI J, YU J, POHORLY JE, KAKUDA Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6(4):291 – 9, 2003.
257. ESCRIBANO-BAITON T, GUTIERREZ-FERNANDEZ Y, RIVAS-GONZALO JC, SANTOS-BUELGA C. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety tintal del pais Grape Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1794 – 1799, 1992.
258. ZHAO J, WANG J, CHEN Y, AGARWAL R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B 5-3'gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*, 20(9):1737 – 1745, 1999.
259. WANG H, RACE EJ, SHRIKHANDE AJ. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1839 – 1844, 2003.
260. IRITI M, FAORO F. Grape phytochemicals: A bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Medical Hypotheses*, 67: 833 – 838, 2006.
261. NASSIRI-ASL M, HOSSEINZADEH H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, 23(9):1197 – 204, 2009.

262. KAUR M, SINGH RP, GU M, AGARWAL R, AGARWAL C. Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, 12:6194 – 6202, 2006.
263. AGARWAL C, VELURI R, KAUR M, CHOU SC, THOMPSON JA, AGARWAL R. Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3'-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 28(7):1478 – 84, 2007.
264. SHARMA G, TYAGI AK, SINGH RP, CHAN DC, AGARWAL R. Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 85(1):1 – 12, 2004.
265. PEREIRA AP, FERREIRA IC, MARCELINO F, VALENTÃO P, ANDRADE PB, SEABRA R, ESTEVINHO L, BENTO A, PEREIRA JA. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrancosa) leaves. *Molecules*, 12:1153 – 1162, 2007.
266. FERREIRA ICFR, BARROS L, SOARES ME, BASTOS ML, PEREIRA JA. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, 103:188 – 195, 2007.
267. PEREIRA JA, PEREIRA AP, FERREIRA IC, VALENTÃO P, ANDRADE PB, SEABRA R, ESTEVINHO L, BENTO A. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:8425 – 8431, 2006.
268. BENAVENTE-GARCIA J, CASTILLO J, LORENTE A, ORTUNO A, DEL RIO JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68:457 – 462, 2000.
269. EL SN, KARAKAYA S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67(11): 632 – 8, 2009.
270. BARTOLÍ R, FERNÁNDEZ-BAÑARES F, NAVARRO E, CASTELLÀ E, MAÑÉ J, ALVAREZ M, PASTOR C, CABRÉ E, GASSULL MA. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E (2) synthesis. *Gut*, 46: 191 – 199, 2000.

271. STARK AH, KOSSOY G, ZUSMAN I, YARDEN G, MADAR Z. Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rats influences mammary cancer development in female offspring, *Nutrition and Cancer*, 46: 59 – 65, 2003.
272. HAMDI HK, CASTELLON R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2;334(3):769 – 78, 2005.
273. HAN J, TALORETE TP, YAMADA P, ISODA H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 59(1):45 – 53, 2009.
274. REYES-ZURITA FJ, PACHO'N-PEN'A G, LIZA'RRAGA D, RUFINO-PALOMARES EE, CASCANTE M, LUPIA'N'EZ JA. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53- dependent mechanism. *BMC Cancer*, 27:154, 2011.
275. FARES R, BAZZI S, BAYDOUN SE, ABDEL-MASSIH RM. The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* Extract. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66:58 – 63, 2011.
276. TUNCA B, TEZCAN G, CECENER G, EGELI U, AK S, MALYER H, TUMEN G, BILIR A. *Olea europaea* leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(11):1831 – 44, 2012.
277. SEÇMEN Ö, GEMICI Y, GÖRK G, BEKAT L, LEBLEBICI E. Tohumlu bitkiler sistematığı. Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir, 2000.
278. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Teşkilatlandırma Genel Müdürlüğü 2010 yılı incir raporu. (2010).
279. ULLMAN SB. The inhibitory and necrosis-inducing effects of the latex of *Ficus carica* L. on transplanted and spontaneous tumors. *Experimental medicine and surgery*, 10(1):26 – 49, 1952.
280. ULLMAN SB, CLARK GM, ROAN KM. The effects of the fraction R3 of the latex of *ficus carica* L. on the tissues of mice bearing spontaneous mammary tumors. *Experimental medicine and surgery*, 10(4):287-305, 1952.
281. RUBNOV S, KASHMAN Y, RABINOWITZ R, SCHLESINGER M, MECHOULAM R. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. *Journal of Natural Products*, 64(7):993 – 6, 2001.

282. HEMMATZADEH F, FATEMI A, AMINI F. Therapeutic effects of fig tree latex on bovine papillomatosis. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and Public Health*, 50(10): 473 – 6, 2003.
283. HASHEMI SA, ABEDIANKENARI S, GHASEMI M, AZADBAKHT M, YOUSEFZADEH Y, DEHPOUR AA. The Effect of Fig Tree Latex (*Ficus carica*) on Stomach Cancer Line. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 13(4):272 – 5, 2011.
284. LAZREG AREF H, GAALICHE B, FEKIH A, MARS M, AOUNI M, PIERRE CHAUMON J, SAID K. In vitro cytotoxic and antiviral activities of *Ficus carica* latex extracts. *Natural Product Research*, 25(3):310 – 9, 2011.
285. BOHLOOLI S, MOHEBIPPOOR A, MOHAMMADI S, KOUHNAVARD M, PASHAPOOR S. Comparative study of fig tree efficacy in the treatment of common warts (*Verruca vulgaris*) vs. cryotherapy. *International Journal of Dermatology*, 46(5):524 – 6, 2007.
286. ANDERSEN BD, WISE BL. *Textbook of clinical chemistry*. WB Saunders Company, Philadelphia, 197-208, 1986.
287. COOKS RG, BUSCHKL, GLISH GL. Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials. *Science*, 21: 222(4621):273 – 91, 1983.
288. LEHRER M. IN KAPLAN LA. *Mass spectrometry*. Mosby Company, St. Louis, 1996; 167-84.
289. SKOOG DA, HOLLER FJ, NIEMAN TA. *Principles of Instrumental Analysis*, Çevirmenler: KILIÇ E, KÖSEOĞLU F, YILMAZ H. 1. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, syf: 695, 725–739, 1998.
290. BROWN JM, ATTARDI LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*, 5:231 – 237, 2005.
291. DIMRI GP. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*, 7:505 – 512, 2005.
292. DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 116:205 – 219, 2004.
293. LUM JJ, DEBERARDINIS RJ, THOMPSON CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:439 – 448, 2005.
294. CASTEDO M, PERFETTINI JL, ROUMIER T, ANDREAU K, MEDEMA R, KROEMER G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23:2825 – 2837, 2004.

295. YUAN J, LIPINSKI M, DEGTEREV A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron*, 40:401 – 413, 2003.
296. ZONG WX, THOMPSON CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development*, 2006; 20:1 – 15.
297. SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *The EMBO Journal*, 21:4338 – 4348, 2002.
298. DEGTEREV A, HUANG Z, BOYCE M, LI Y, JAGTAP P, MIZUSHIMA N, CUNY GD, MITCHISON TJ, MOSKOWITZ MA, YUAN J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1:112 – 119, 2005.
299. RICCI MS, ZONG WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*, 11(4):342 – 57, 2006.
300. NAGATA S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88:355 – 365, 1997.
301. CORY S, ADAMS JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2:647–656, 2002.
302. THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281:1312 – 1316, 1998.
303. SCORRANO L, OAKES SA, OPFERMAN JT, CHENG EH, SORCINELLI MD, POZZAN T, KORSMEYER SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, 300:135 – 139, 2003.
304. WILLIS SN, CHEN L, DEWSON G, WEI A, NAIK E, FLETCHER JI, ADAMS JM, HUANG DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development*, 19:1294 – 1305, 2005.
305. DU C, FANG M, LI Y, LI L, WANG X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102:33 – 42, 2000.
306. SUZUKI Y, IMAI Y, NAKAYAMA H, TAKAHASHI K, TAKIO K, TAKAHASHI R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular Cell*, 8:613 – 621, 2001.
307. VERHAGEN AM, EKERT PG, PAKUSCH M, SILKE J, CONNOLLY LM, REID GE, MORITZ RL, SIMPSON RJ, VAUX DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102:43 – 53, 2000.

308. Cell Biology of Disease and Exercise, Physical Therapy program at The Ohio State University, available at (<http://pt851.wikidot.com/spinal-cord-injury-cell-biology>)
309. LEU JI, DUMONT P, HAFEY M, MURPHY ME, GEORGE DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature Cell Biology*, 6:443–450, 2004.
310. MIHARA M, ERSTER S, ZAIKA A, PETRENKO O, CHITTENDEN T, PANCOSKA P, MOLL UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell*, 11:577 – 590, 2003.
311. LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LENARDO MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104:487 – 501, 2001.
312. LEBLANC HN, ASHKENAZI A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death & Differentiation*, 10:66 – 75, 2003.
313. PETER ME, KRAMMER PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation*, 10:26 – 35, 2003.
314. CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, TEWARI M, DIXIT VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81:505 – 512, 1995.
315. KISCHKEL FC, HELLBARDT S, BEHRMANN I, GERMER M, PAWLITA M, KRAMMER PH, PETER ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, 14:5579 – 5588, 1995.
316. DONEPUDI M, MAC SWEENEY A, BRIAND C, GRÜTTER MG. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Molecular Cell*, 11:543 – 549, 2003.
317. BOATRIGT KM, RENATUS M, SCOTT FL, SPERANDIO S, SHIN H, PEDERSEN IM, RICCI JE, EDRIS WA, SUTHERLIN DP, GREEN DR, SALVESEN GS. A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell*, 11:529 – 541, 2003.
318. GEWIES A, Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1 – 26, 2003.
319. LI H, ZHU H, XU CJ, YUAN J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94:491 – 501, 1998.
320. LUO X, BUDIHardjo I, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94:481 – 490, 1998.
321. KESHELAVA N, FRGALA T, KREJSA J, KALOUS O, REYNOLDS CP. DIMSCAN: a microcomputer fluorescence-based cytotoxicity assay for preclinical

- testing of combination chemotherapy. *Methods in Molecular Medicine*, 110: 139 – 53, 2005.
322. STODDART MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods in Molecular Biology*, 740: 1 – 6, 2011.
323. O'BRIEN J, WILSON I, ORTON T, POGNAN F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5421 – 6, 2000.
324. KUPCSIK L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods in Molecular Biology*, 740: 13 – 9, 2011.
325. TOMINAGA H, ISHIYAMA M, OHSETO F, SASAMOTO K, HAMAMOTO T, SUZUKI K, WATANABE M. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications*, 36: 47 – 50, 1999.
326. NGAMWONGSATIT P, BANADA PP, PANBANGRED W, BHUNIA AK. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of Microbiological Methods* 73: 211 – 5, 2008.
327. PANNECOUQUE C, DAELEMANS D, DE CLERCQ E. Tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of HIV replication inhibitors: revisited 20 years later. *Nature Protocols*, 3: 427 – 34, 2008.
328. MOSS BJ, KIM Y, NANDAKUMAR MP, MARTEN MR. Quantifying metabolic activity of filamentous fungi using a colorimetric XTT assay. *Biotechnology Progress*, 24: 780 – 3, 2008.
329. BUTTKE TM, MCCUBREY JA, OWEN TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunological Methods*, 157: 233 – 40, 1993.
330. BERRIDGE MV, HERST PM, TAN AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11: 127 – 52, 2005.
331. YIN LM, WEI Y, WANG Y, XU YD, YANG YQ. Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*, 10(1):68 – 72, 2013.
332. CASCIOLA-ROSEN L, ROSEN A, PETRI M, SCHLISSEL M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation

- events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:1624 – 1629, 1996.
333. VAN ENGELAND M, RAMAEKERS FC, SCHUTTE B, REUTELINGSPERGER CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 24:131 – 139, 1996.
334. VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER CP. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184:39 – 51, 1995.
335. MIGHELI A, ATTANASIO A, SCHIFFER D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by in situ endlabeling techniques. *The Journal of Pathology*, 176:27 – 35, 1995.
336. THIRY M. Highly sensitive immunodetection of DNA on sections with exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase and non-isotopic nucleotide analogs. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40: 411 – 419, 1992.
337. BROWN DG, SUN XM, COHEN GM. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 3037 – 3039, 1993.
338. WALKER PR, KOKILEVA L, LEBLANC J, SIKORSKA M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques*, 15: 1032-1047, 1993.
339. WALKER PR, WEAVER VM, LACH B, LEBLANC J, SIKORSKA M. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Experimental Cell Research*, 213: 100 – 106, 1994.
340. ARENDS MJ, MORRIS RG, WYLLIE AH. Apoptosis: The role of the endonuclease. *American Journal of Pathology*, 136: 593 – 608, 1990.
341. GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119: 493 – 501, 1992.
342. SINNING M, LETELIER R, ROSAS C, FUENZALIDA M, LEMUS D. Angiogenic potential of the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with high-grade gliomas measured with the chick embryo chorioallantoic membrane assay (CAM). *Biological Research*, 2012;45(2):135 – 8, 2012.

343. BAIGUERA S, MACCHIARINI P, RIBATTI D. Chorioallantoic membrane for in vivo investigation of tissue-engineered construct biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomater*, 100(5):1425 – 34, 2012.
344. RIBATTI D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis. In: Ribatti D, editor. *The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis*. Dordrecht, Springer Science and Business Media, 1–124, 2010.
345. RIBATTI D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 270:181 – 224, 2010.
346. STORGARD C, MIKOLON D, STUPSCK DG. Angiogenesis assays in the chick CAM. In: Guan JL, editor. *Methods in Molecular Biology: Cell Migration, Developmental Methods and Protocols*, Vol.294, Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp 123–136, 2005.
347. CAMPBELL N, REECE J. *Biology Concepts and Connections* Publisher: Benjamin-Cummings Publishing Company, Subs of Addison Wesley Longman, Inc. SBN10: 0805374213 ISBN13: 9780805374216 Edition: Paperback; 2001-01-28 (available at: http://virology-mania.blogspot.co.at/2009_01_01_archive.html)
348. YOSHINO A, OGINO A, YACHI K, OHTA T, FUKUSHIMA T, WATANABE T, KATAYAMA Y, OKAMOTO Y, NARUSE N, SANO E, TSUMOTO K. Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. *International Journal of Oncology*, 36:1367 – 1377, 2010.
349. BISSO A, FALESCHINI M, ZAMPA F, CAPACI V, DE SANTA J, SANTARPIA L, PIAZZA S, CAPPELLETTI V, DAIDONE M, AGAMI R, DEL SAL G. Oncogenic miR-181a/b affect the DNA damage response in aggressive breast cancer. *Cell Cycle*, 1;12(11):1679 – 87, 2013.
350. ZHU W, SHAN X, WANG T, SHU Y, LIU P. miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 1; 127(11):2520 – 9, 2010.
351. WANG B, HSU SH, MAJUMDER S, KUTAY H, HUANG W, JACOB ST, GHOSHAL K. TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene*, 25;29(12):1787 – 97, 2010.
352. LU Y, ROY S, NUOVO G, RAMASWAMY B, MILLER T, SHAPIRO C, JACOB ST, MAJUMDER S. Anti-microRNA-222 (anti-miR-222) and -181B suppress growth

- of tamoxifen-resistant xenografts in mouse by targeting TIMP3 protein and modulating mitogenic signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 9;286(49):42292 – 302, 2011.
353. ZIMMERMAN EI, DOLLINS CM, CRAWFORD M, GRANT S, NANA-SINKAM SP, RICHARDS KL, HAMMOND SM, GRAVES LM. Lyn kinase-dependent regulation of miR181 and myeloid cell leukemia-1 expression: implications for drug resistance in myelogenous leukemia. *Molecular Pharmacology*, 78(5):811 – 7, 2010.
354. BOOMINATHAN L. The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS One*, 12;5(5):e10615, 2010.
355. CHEN Z, ZENG H, GUO Y, LIU P, PAN H, DENG A, HU J. miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 22;29:151, 2010
356. RANI SB, RATHOD SS, KARTHIK S, KAUR N, MUZUMDAR D, SHIRAS AS. MiR-145 functions as a tumor-suppressive RNA by targeting Sox9 and adducin 3 in human glioma cells. *Neuro-Oncology*, 15(10):1302 – 16, 2013.
357. CHAUDHRY MA, OMARUDDIN RA. Differential regulation of microRNA expression in irradiated and bystander cells. *Molecular Biology*, 46(4):634 – 43, 2012.
358. LEE HK, BIER A, CAZACU S, FINNISS S, XIANG C, TWITO H, POISSON LM, MIKKELSEN T, SLAVIN S, JACOBY E, YALON M, TOREN A, REMPEL SA, BRODIE C. MicroRNA-145 is downregulated in glial tumors and regulates glioma cell migration by targeting connective tissue growth factor. *PLoS One*, 8(2):e54652, 2013.
359. XU J, LIAO X, LU N, LIU W, WONG CW. Chromatin-modifying drugs induce miRNA-153 expression to suppress Irs-2 in glioblastoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 15;129(10): 2527 – 31, 2011.
360. XU J, LIAO X, WONG C. Downregulations of B-cell lymphoma 2 and myeloid cell leukemia sequence 1 by microRNA 153 induce apoptosis in a glioblastoma cell line DBTRG-05MG. *International Journal of Cancer*, 15;126(4):1029 – 35, 2010.
361. BIER A, GILADI N, KRONFELD N, LEE HK, CAZACU S, FINNISS S, XIANG C, POISSON L, DE CARVALHO AC, SLAVIN S, JACOBY E, YALON M, TOREN A, MIKKELSEN T, BRODIE C. MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1. *Oncotarget*, 4(5):665 – 76, 2013.
362. LUO C, TETTEH PW, MERZ PR, DICKES E, ABUKIWAN A, HOTZ-WAGENBLATT A, HOLLAND-CUNZ S, SINNBERG T, SCHITTEK B, SCHADENDORF D, DIEDERICH S, EICHMÜLLER SB. miR-137 inhibits the

- invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3):768 – 75, 2013.
363. SZULWACH KE, LI X, SMRT RD, LI Y, LUO Y, LIN L, SANTISTEVAN NJ, LI W, ZHAO X, JIN P. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 5;189(1):127 – 41, 2010.
364. JIAO LR, FRAMPTON AE, JACOB J, PELLEGRINO L, KRELL J, GIAMAS G, TSIM N, VLAVIANOS P, COHEN P, AHMAD R, KELLER A, HABIB NA, STEBBING J, CASTELLANO L. MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PLoS One*, 7(2):e32068, 2012.
365. GARZON R, PICHIORRI F, PALUMBO T, VISENTINI M, AQEILAN R, CIMMINO A, WANG H, SUN H, VOLINIA S, ALDER H, CALIN GA, LIU CG, ANDREEFF M, CROCE CM. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 14;26(28):4148 – 57, 2007.
366. SHIMIZU S, TAKEHARA T, HIKITA H, KODAMA T, MIYAGI T, HOSUI A, TATSUMI T, ISHIDA H, NODA T, NAGANO H, DOKI Y, MORI M, HAYASHI N. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 52(5):698-704, 2010.
367. YE H, CHEN J, HUANG X, GUO A, HAO P. Construction of let-7d expression vector and its inhibitory effect on HMGA2 and ras expression in human ovarian cancer cells in vitro. *Journal of Southern Medical University*, 32(12):1752 – 7, 2012.
368. YU ML, WANG JF, WANG GK, YOU XH, ZHAO XX, JING Q, QIN YW. Vascular smooth muscle cell proliferation is influenced by let-7d microRNA and its interaction with KRAS. *Japanese Circulation Society*, 75(3):703 – 9, 2011.
369. WELLER M, PFISTER SM, WICK W, HEGI ME, REIFENBERGER G, STUPP R. Molecular neurooncology in clinical practice: a new horizon. *The Lancet Oncology*, 14(9):e370–e379, 2013.
370. EVERHARD S, TOST J, EL ABDALAOUH H, CRINIÈRE E, BUSATO F, MARIE Y, GUT IG, SANSON M, MOKHTARI K, LAIGLE-DONADEY F, HOANG-XUAN K, DELATTRE JY, THILLET J. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro-Oncology*, 11(4):348–356, 2009.

371. RAMAKRISHNAN V, KUSHWAHA D, KOAY DC, REDDY H, MAO Y, ZHOU L, NG K, ZINN P, CARTER B, CHEN CC. Post-transcriptional regulation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase MGMT in glioblastomas. *Cancer Biomarkers*, 10(3 – 4):185 – 193, 2011.
372. KRETH S, LIMBECK E, HINSKE LC, SCHÜTZ SV, THON N, HOEFIG K, EGENSERGER R, KRETH FW. In human glioblastomas transcript elongation by alternative polyadenylation and miRNA targeting is a potent mechanism of MGMT silencing. *Acta Neuropathologica*, 125(5):671–681, 2013.
373. FUJISHITA K, OZAWA T, SHIBATA K, TANABE S, SATO Y, HISAMOTO M, OKUDA T, KOIZUMI S. Grape Seed Extract Acting on Astrocytes Reveals Neuronal Protection Against Oxidative Stress via Interleukin-6-mediated Mechanisms. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29: 1121 – 1129, 2009.
374. YAMAKOSHI J, SAITO M, KATAOKA S, KIKUCHI M. Safety evaluation of proanthocyanidins-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 40:599 – 607, 2002.
375. ZHANG XY, BAI DC, WU YJ, LI WG, LIU NF. Proanthocyanidin from grape seeds enhances antitumor effect of doxorubicin both in vitro and in vivo. *Pharmazie*, 60:533 – 538, 2005.
376. ROY AM, BALIGA MS, ELMETS CA, KATIYAR SK. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, Bax, and Caspase 3 pathways. *Neoplasia*, 7:24 – 36, 2005.
377. SCHMIDT BM, ERDMAN JW JR, LILA MA. Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. *Cancer Letters*, 231:240 – 246, 2006.
378. MANTENA SK, BALIGA MS, KATIYAR SK. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 27:1682 – 1691, 2006.
379. DINICOLA S, PASQUALATO A, CUCINA A, COLUCCIA P, FERRANTI F, CANIPARI R, CATIZONE A, PROIETTI S, D'ANSEMI F, RICCI G, PALOMBO A, BIZZARRI M. Grape seed extract suppresses MDA-MB231 breast cancer cell migration and invasion. *European Journal of Nutrition*, 53(2): 421 – 31, 2014.
380. SUN Q, PRASAD R, ROSENTHAL E, KATIYAR SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit the invasiveness of human HNSCC cells by targeting EGFR and reversing the epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*, 7(1):e31093, 2012.

381. SUN Q, PRASAD R, ROSENTHAL E, KATIYAR SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit the invasive potential of head and neck cutaneous squamous cell carcinoma cells by targeting EGFR expression and epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 21;11:134, 2011.
382. LIN YS, CHEN SF, LIU CL, NIEH S. The chemoadjuvant potential of grape seed procyanidins on p53-related cell death in oral cancer cells. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 41(4):322 – 31, 2012.
383. CHUNG YC, HUANG CC, CHEN CH, CHIANG HC, CHEN KB, CHEN YJ, LIU CL, CHUANG LT, LIU M, HSU CP. Grape-seed procyanidins inhibit the in vitro growth and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Pancreas*, 41(3):447 – 54, 2012.
384. ZHANG FJ, YANG JY, MOU YH, SUN BS, PING YF, WANG JM, BIAN XW, WU CF. Inhibition of U 87 human glioblastoma cell proliferation and formyl peptide receptor function by oligomer procyanidins (F2) isolated from grape seeds. *Chemico-Biological Interactions*, 79:419 – 429, 2009.
385. KOWALCZYK MC, WALASZEK Z, KOWALCZYK P, KINJO T, HANAUSEK M, SLAGA TJ. Differential effects of several phytochemicals and their derivatives on murine keratinocytes in vitro and in vivo: implications for skin cancer prevention. *Carcinogenesis*, 30:1008 – 1015, 2009.
386. KURISAWA M, CHUNG JE, UYAMA H, KOBAYASHI S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules*, 4:1394 – 9, 2003.
387. NANDAKUMAR V, SINGH T, KATIYAR SK. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Letters*, 269:378 – 387, 2008.
388. ZHANG Y, SHI H, WANG W, KE Z, XU P, ZHONG Z, LI X, WANG S. Antithrombotic effect of grape seed proanthocyanidins extract in a rat model of deep vein thrombosis. *Journal of Vascular Surgery*, 53(3):743 – 53, 2011.
389. VISIOLI F, POLI A, GALL C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22: 65 – 75, 2002.
390. OMAR SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78: 133 – 154, 2010.
391. MIJATOVIC SA, TIMOTIJEVIC GS, MILJKOVIC DM, RADOVIC JM, MAKSIMOVIC-IVANIC DD, DEKANSKI DP, STOSIC-GRUJICIC SD. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *International Journal of Cancer*, 128: 1955 – 1965, 2011.

392. REYES-ZURITA FJ, RUFINO-PALOMARES EE, MEDINA PP, LETICIA GARCÍA-SALGUERO E, PERAGÓN J, CASCANTE M, LUPIÁÑEZ JA. Antitumour activity on extrinsic apoptotic targets of the triterpenoid maslinic acid in p53-deficient Caco-2 adenocarcinoma cells. *Biochimie*, 95: 2157 – 2167, 2013.
393. NEWLANDS ES, STEVENS MF, WEDGE SR, WHEELHOUSE RT, BROCK C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews*, 23: 35 – 61, 1997.
394. EVERHARD S, TOST J, EL ABDALAOUI H, CRINIÈRE E, BUSATO F, MARIE Y, GUT IG, SANSON M, MOKHTARI K, LAIGLE-DONADEY F, HOANG-XUAN K, DELATTRE JY, THILLET J. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro-Oncology*, 11: 348 – 356, 2009.
395. RAMAKRISHNAN V, KUSHWAHA D, KOAY DC, REDDY H, MAO Y, ZHOU L, NG K, ZINN P, CARTER B, CHEN CC. Post-transcriptional regulation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase MGMT in glioblastomas. *Cancer Biomarkers*, 10: 185 – 193, 2011 – 2012.
396. MELGUIZO C, PRADOS J, GONZÁLEZ B, ORTIZ R, CONCHA A, ALVAREZ PJ, MADEDDU R, PERAZZOLI G, OLIVER JA, LÓPEZ R, RODRÍGUEZ-SERRANO F, ARÁNEGA A. MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy. *Journal of Translational Medicine*, 10: 250, 2012.
397. TEZCAN G, TUNCA B, BEKAR A, PREUSSER M, BERGHOFF AS, EGELI U, CECENER G, RICKEN G, BUDAK F, TASKAPILIOGLU MO, KOCAELI H, TOLUNAY S. microRNA expression pattern modulates temozolomide response in GBM tumors with cancer stem cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34: 679 – 92, 2014.
398. KIM TH, KIM YK, KWON Y, HEO JH, KANG H, KIM G, AN HJ. Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. *Histopathology*, 57: 734 – 743, 2010.
399. LIU L, CHEN R, HUANG S, WU Y, LI G, ZHANG B, LIU Q, YIN D, LIANG Y. miR-153 sensitized the K562 cells to As₂O₃-induced apoptosis. *Medical Oncology*, 29: 243 – 247, 2012.

400. WU Z, HE B, HE J, MAO X. Upregulation of miR-153 promotes cell proliferation via downregulation of the PTEN tumor suppressor gene in human prostate cancer. *Prostate*, 73: 596 – 604, 2013.
401. Kheirleiseid EA, Miller N, Chang KH, Curran C, Hennessey E, Sheehan M, Newell J, Lemetre C, Balls G, Kerin MJ. miRNA expressions in rectal cancer as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28: 247-260.
402. ANAYA-RUIZ M, CEBADA J, DELGADO-LÓPEZ G, SÁNCHEZ-VÁZQUEZ ML, PÉREZ-SANTOS JL. miR-153 silencing induces apoptosis in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 14: 2983 – 2986, 2013.
403. ZHAO S, DENG Y, LIU Y, CHEN X, YANG G, MU Y, ZHANG D, KANG J, WU Z. MicroRNA-153 is tumor suppressive in glioblastoma stem cells. *Molecular Biology Reports*, 40: 2789 – 2798, 2013.
404. NARAYAN RS, FEDRIGO CA, STALPERS LJ, BAUMERT BG, SMINIA P. Targeting the Akt-pathway to improve radiosensitivity in glioblastoma. *Current Pharmaceutical Design*, 19: 951 – 957, 2013.
405. TEITEN MH, DICATO M, DIEDERICH M. Curcumin as a regulator of epigenetic events. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57: 1619 – 1629, 2013.
406. O'BRIEN CA, KRESO A, JAMIESON CH. Cancer stem cells and self-renewal. *Clinical Cancer Research*, 16: 3113 – 3120, 2010.
407. JUN HJ, BRONSON RT, CHAREST A. Inhibition of EGFR induces a c-MET-driven stem cell population in glioblastoma. *Stem Cells*, 32: 338 – 348, 2014.
408. ZIV-AV A, TALLER D, ATTIA M, XIANG C, LEE HK, CAZACU S, FINNISS S, KAZIMIRSKY G, SARID R, BRODIE C. RTVP-1 expression is regulated by SRF downstream of protein kinase C and contributes to the effect of SRF on glioma cell migration. *Cell Signal*, 23: 1936 – 1943, 2011.
409. IKUSHIMA H, TODO T, INO Y, TAKAHASHI M, SAITO N, MIYAZAWA K, MIYAZONO K. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 41434 – 41, 2011.
410. XU N, PAPAGIANNAKOPOULOS T, PAN G, THOMSON JA, KOSIK KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 137: 647 – 658, 2009.

411. MAWA S, HUSAIN K, JANTAN I. *Ficus carica* L. (Moraceae): phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013:974256, 2013.
412. MENICHINI G, ALFANO C, PROVENZANO E, MARRELLI M, STATTI GA, SOMMA F, MENICHINI F, CONFORTI F. Fig latex (*Ficus carica* L. cultivar Dottato) in combination with UV irradiation decreases the viability of A375 melanoma cells in vitro. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(8):959 – 965, 2012.
413. ANTER J, ROMERO-JIME'NEZ M, FERNA'NDEZ-BEDMAR Z, VILLATORO-PULIDO M, ANALLA M, ALONSO-MORAGA A, MUN'OZ-SERRANO A. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *J Med Food* 14(3):276 – 283, 2011.
414. YIN MC, LIN CC, WU HC, TSAO SM, HSU CK. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14):6468 – 6473, 2009.
415. LIN HH, CHEN JH, CHOU FP, WANG CJ. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF- κ B pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *British Journal of Pharmacology*, 162(1):237 – 254, 2011.
416. SPILIOTI E, JAAKKOLA M, TOLONEN T, LIPPONEN M, VIRTANEN V, CHINOI I, KASSI E, KARABOURNIOTI S, MOUTSATSOU P. Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. *PLoS One*, 9(4):e94860, 2014.
417. ZHENG Y, YANG W, ALDAPE K, HE J, LU Z. Epidermal growth factor (EGF)-enhanced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression promotes macrophage and glioblastoma cell interaction and tumor cell invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(44):31488 – 31495, 2013.
418. KANG Z, ZHU H, JIANG W, ZHANG S. Protocatechuic acid induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signalling pathway. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 113(4):221 – 227, 2013.
419. KONG AN, ZHANG C, SU ZY. Targeting epigenetics for cancer prevention by dietary cancer preventive compounds—the case of miRNA. *Cancer Prevention Research*, 6(7):622 – 624, 2013.

420. SANLI T, STRANO S, MUTI P. Lifestyle factors and microRNAs: a new paradigm in cancer chemoprevention. *Microna*, 2(2):82 – 90, 2013.
421. PALUSZCZAK J, KRAJKA-KUŹNIAK V, BAER-DUBOWSKA W. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicology Letters*, 192(2):119 – 125, 2010.
422. WANG D, XIA M, YAN X, LI D, WANG L, XU Y, JIN T, LING W. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b. *Circulation Research*, 111(8):967 – 981, 2012.
423. TAKAMIZAWA J, KONISHI H, YANAGISAWA K, TOMIDA S, OSADA H, ENDOH H, HARANO T, YATABE Y, NAGINO M, NIMURA Y, MITSUDOMI T, TAKAHASHI T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*, 1 64(11):3753 – 3756, 2004.
424. DAHIYA N, SHERMAN-BAUST CA, WANG TL, DAVIDSON B, SHIH IEM, ZHANG Y, WOOD W 3RD, BECKER KG, MORIN PJ, MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One* 3(6):e2436, 2008.
425. O'HARA AJ, WANG L, DEZUBE BJ, HARRINGTON WJ JR, DAMANIA B, DITTMER DP. Tumor suppressor microRNAs are underrepresented in primary effusion lymphoma and Kaposi sarcoma. *Blood*, 113:5938 – 5941, 2009.
426. XI YN, XIN XY, YE HM. Effects of HMGA2 on malignant degree, invasion, metastasis, proliferation and cellular morphology of ovarian cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(4):289 – 292, 2014.
427. THUAULT S, VALCOURT U, PETERSEN M, MANFIOLETTI G, HELDIN CH, MOUSTAKAS A. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial mesenchymal transition. *The Journal of Cell Biology*, 174:175 – 183, 2006.
428. HELDIN CH, VANLANDEWIJCK M, MOUSTAKAS A. Regulation of EMT by TGFb in cancer. *FEBS Lett* 586(14):1959 – 1970, 2012.
429. ISHIKAWA F, KANEKO E, SUGIMOTO T, ISHIJIMA T, WAKAMATSU M, YUASA A, SAMPEI R, MORI K, NOSE K, SHIBANUMA M. A mitochondrial thioredoxin-sensitive mechanism regulates TGFb-mediated gene expression associated with epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(3):821 – 827, 2014.

430. PEINADO H, OLMEDA D, CANO A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6):415 – 428, 2007.
431. MU G, LIU H, ZHOU F, XU X, JIANG H, WANG Y, QU Y. Correlation of overexpression of HMGA1 and HMGA2 with poor tumor differentiation, invasion, and proliferation associated with let-7 down-regulation in retinoblastomas. *Human Pathology*, 41(4):493 – 502, 2010.
432. CHEN Z, CHENG Q, MA Z, XI H, PENG R, JIANG B. Overexpression of RKIP inhibits cell invasion in glioma cell lines through upregulation of miR-98. *BioMed Research International*, 695179, 2013.
433. RANGER JJ, LEVY DE, SHAHALIZADEH S, HALLETT M, MULLER WJ. Identification of a Stat3-dependent transcription regulatory network involved in metastatic progression. *Cancer Research*, 69(17):6823 – 6830, 2009.
434. BARBIERI I, PENSA S, PANNELLINI T, QUAGLINO E, MARITANO D, DEMARIA M, VOSTER A, TURKSON J, CAVALLO F, WATSON CJ, PROVERO P, MUSIANI P, POLI V. Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten. *Cancer Research*, 70(6):2558 – 2567, 2010.
435. SUGIMURA K, MIYATA H, TANAKA K, HAMANO R, TAKAHASHI T, KUROKAWA Y, YAMASAKI M, NAKAJIMA K, TAKIGUCHI S, MORI M, DOKI Y. Let-7 expression is a significant determinant of response to chemotherapy through the regulation of IL-6/ STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 18(18):5144–5153, 2012.
436. ZUSHI S, SHINOMURA Y, KIYOHARA T, MIYAZAKI Y, KONDO S, SUGIMACHI M, HIGASHIMOTO Y, KANAYAMA S, MATSUZAWA Y. STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 78(3):326 – 330, 1998.
437. TENG TS, LIN B, MANSER E, NG DC, CAO X. Stat3 promotes directional cell migration by regulating Rac1 activity via its activator betaPIX. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 22):4150 – 4159, 2009.
438. XU Q, BRIGGS J, PARK S, NIU G, KORTYLEWSKI M, ZHANG S, GRITSKO T, TURKSON J, KAY H, SEMENZA GL, CHENG JQ, JOVE R, YU H. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene*, 24(36):5552 – 5560, 2005.

439. FANG B. Genetic interactions of STAT3 and anticancer drug development. *Cancers (Basel)* 6(1):494 – 525, 2014.
440. VO VA, LEE JW, LEE HJ, CHUN W, LIM SY, KIM SS. Inhibition of JNK Potentiates Temozolomide-induced Cytotoxicity in U87MG Glioblastoma Cells via Suppression of Akt Phosphorylation. *Anticancer Research*, 34(10):5509 – 5515, 2014.

TEŞEKKÜR

Tezim boyunca yaptığı katkılardan dolayı danışman hocam Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ünal EGELİ ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gülşah ÇEÇENER'e

GBM hastalarından tümör doku teminindeki emeklerinden dolayı Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Ahmet BEKAR, Doç. Dr. Hasan KOCAELİ ve Yar. Doç. Dr. Mevlüt Özgür TAŞKAPILIOĞLU'na ve Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Şahsine TOLUNAY'a

Anti-kanser etkisi araştırılan bitkisel özütlerin seçimi ile ilgili yol gösteren Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hulusi MALYER'e ve Balıkesir Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülendem TÜMEN'e, ayrıca, çalışmaya dahil edilen bitkisel özütleri ücretsiz olarak laboratuvarımıza temin eden KALE NATUREL firması yöneticilerine,

Bitkisel özütlerin fenolik bileşenlerinin araştırılması aşamasındaki katkılarından dolayı Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Cevdet DEMİR ve Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e,

ELISA ve Akım sitometrik analizlerin gerçekleştirilmesi için laboratuvarlarından yararlanmamıza imkan sağlayan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Güher GÖRAL'a ve yardımlarından dolayı Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ELISA Laboratuvarı çalışanlarına, ayrıca, akım sitometrik analizlerin gerçekleştirilmesindeki yardımlarından dolayı İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ferah BUDAK'a ve İmmünoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Ex-vivo analizlerin gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Murat YALÇIN'a

Tez projesinin her aşamasında gösterdikleri manevi destekten dolayı tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tüm eğitim hayatım boyunca sabır ve emeğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Bursa'da doğdum. İlköğrenimimi Bursa Setbaşı İlk Öğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi ise Bursa Atatürk Lisesi'nde tamamladım. 2001 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne başladım ve 2005 yılında bu bölümden, bölüm üçüncüsü olarak mezun oldum. 2006 yılında 6 ay süre ile Avustralya'nın Queensland eyaletinde bulunan Shafston International Collage'de İngilizce dil eğitimi aldım. 2006-2008 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'de Yüksek Lisans eğitimi aldım. 2009 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'de doktora eğitimime başladım. 2012-2013 öğretim yılında Erasmus öğrenci hareketliliği kapsamında 3 ay süreyle Avusturya, Viyana Tıp Üniversitesi, Tıbbi Onkoloji AD'de misafir araştırmacı olarak çalıştım. 2009 yılından bu yana Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD'de Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.