



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



# LEPTİN VE LEPTİN RESEPTÖR ANTAGONİSTİNİN GLİOBLASTOMA TEMOZOLOMİD DİRENCİNDEKİ ROLÜ

Moleküler Biyolog Farika Nur DENİZLER EBİRİ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR

VAN-2019

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEPTİN VE LEPTİN RESEPTÖR ANTAGONİSTİNİN  
GLİOBLASTOMA TEMOZOLOMİD DİRENCİNDEKİ ROLÜ**

Moleküler Biyolog Farika Nur DENİZLER EBİRİ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR

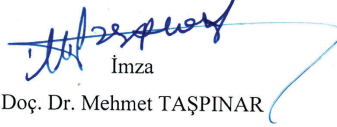
VAN-2019

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2019-7811 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

## KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Farika Nur DENİZLER EBİRİ tarafından hazırlanan “Leptin Ve Leptin Reseptör Antagonistinin Glioblastoma Temozolomid Direncindeki Rolü” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/07/2019

  
İmza

Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR  
Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
İmza

Dr. Öğr. Üyesi Seda SABAH ÖZCAN  
Yozgat Bozok Üniversitesi  
Jüri Üyesi

  
İmza

Dr. Öğr. Üyesi Sedat ÇETİN  
Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

  
İmza

Unvanı Adı ve Soyadı  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans olarak hazırlayıp sunduğum “*Leptin Ve Leptin Reseptör Antagonistinin Glioblastoma Temozolomid Direncindeki Rolü*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Farika Nur DENİZLER EBİRİ

Tarih:09/07/2019

İmza:

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamda yardımlarıyla, desteğiyle ve problemlerin çözümünde yol göstericiliğiyle her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübesini benden hiçbir zaman esirgemeyen, daima hoşgörü ve sabırla yaklaşan tez danışmanım Doç.Dr. Mehmet TAŞPINAR'a, akım sitometri analizlerini yapan Öğr. Gör. Dr. Hande CANPINAR'a, tezin istatistiksel analizlerini yapan Dr. Öğr. Üyesi Can ATEŞ'e, MTT ve COMET deneylerinde benden desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK'e ve Dr. Öğr. Üyesi Sedat ÇETİN'e, tez süresince destekleriyle her zaman yanımda olan Ar. Gör. Filiz TAŞPINAR'a, Bahar KARTAL'a ve Mustafa GÜVEN'e en içten duygularıyla teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Eğitimimin her aşamasında sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana destek olan sevgili annem Candan DENİZLER'e ve babam İsmail Hakkı DENİZLER'e, anlayışı ve sevgisiyle bu süreçte beni yalnız bırakmayan ve destek olan sevgili eşim Osman EBİRİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZET

**DENİZLER EBİRİ FN, Leptin ve Leptin Reseptör Antagonistinin Glioblastoma Temozolomid Direncindeki Rolü, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2019** Glioblastoma (GB) bilinen en malin beyin tümörüdür. GB, radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarına moleküler ve klinik özellikleri açısından sıklıkla dirençlidir. Kemoterapide kullanılan en yaygın ilaç Temozolomid (TMZ)'dir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, leptinin kanser tedavisinde gelişen kemoterapötik dirençte rol oynayabileceği belirtilmektedir. Bu tez çalışmasında; Glioblastoma'da TMZ'ye karşı gelişen kemoterapötik dirençte, leptin ve/veya leptin antagonistinin (SHLA) olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada T98G, U373 MG ve LN-405 GB hücre serileri kullanılmıştır. Bu hücrelerde TMZ, leptin ve SHLA'nın sitotoksitesisi MTT ile saptanmıştır. TMZ, leptin ve SHLA'nın tekli kullanımlarının ve ikili, üçlü kombinasyonlarının TMZ direnç yolağında yer alan MGMT, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 genlerinin ekspresyonları üzerine etkisi RT-PZR ile saptanmıştır. Moleküllerin genomik DNA hasar etkisi COMET ve hücre döngüsüne olan etkileri ise akım sitometri ile belirlenmiştir. TMZ, leptin ve SHLA'nın TMZ direnç yolağındaki genlerin ekspresyonlarına olan etkileri birbirinden farklılık göstermektedir. Genomik DNA hasarı ve hücre döngüsü açısından hücre serileri arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Elde edilen veriler TMZ, leptin ve SHLA'nın hücre tipine göre kemoterapötik dirence farklı düzeyde katkı sağladığı, leptinin özellikle MGMT ekspresyonunu arttırdığı, MMR genlerinde ise genel olarak değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Leptin ve SHLA'nın tek başlarına genomik DNA'da hasar oluşturabildiği ve hücrelerin G1 fazında birikmesine neden olduğu ancak kombinasyonlarda bu etkinin hücre tiplerine göre farklılık gösterdiği saptanmıştır. Sonuçlarımız, leptin ve SHLA'nın tek ve kombine kullanımlarının TMZ kemoterapötik direncinde rol alabileceğini ve bu etkinin hücre tipine göre ve gen spesifik olarak değiştiğini göstermektedir. Bu tez çalışması, leptin ve SHLA'nın TMZ direncindeki etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kemoterapötik direnç, temozolomid, leptin, leptin reseptörü.

## ABSTRACT

**DENİZLER EBİRİ FN, The role of Leptin and Leptin Receptor Antagonist on Temozolomide Resistance in Glioblastoma, Universty of Van Yuzuncu Yil, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, M.Sc. Thesis, Van, 2019** Glioblastoma (GB) is the most malignant brain tumor. GB is often resistant to radiotherapy and chemotherapy treatment in terms of molecular and clinical features. Temozolomide (TMZ) is the most common drug as chemotherapy. Recent studies have indicated that leptin may play a role in chemotherapeutic resistance to cancer treatment. In this thesis; We aimed to investigate the possible role of leptin and/or leptin antagonist (SHLA) in chemotherapeutic resistance to TMZ in GB. T98G, U373 MG and LN405 GB cell lines were used in this study. The cytotoxicity of TMZ, leptin, and SHLA was determined by MTT. The effect of single use of TMZ, leptin and SHLA and combinations of binary and triple on the expressions of MGMT, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 genes in TMZ resistance pathway was determined by RT-PCR. Genomic DNA damage effect of molecules was determined by COMET and cell cycle effects was determined by flow cytometry. The effects of TMZ, leptin and SHLA on the expression of genes in the TMZ resistance pathway differ from each other. It determined that there were significant differences among cell lines in terms of the effects of genomic DNA damage and cell cycle. Data obtained show that TMZ, leptin, and SHLA contribute to chemotherapeutic resistance at different levels in each cell type, leptin especially increases MGMT expression and does not cause general changes in MMR genes. Our results suggest that leptin and SHLA alone can cause DNA damage and accumulation in the G1 phase, but these effects vary in the combination of leptin and SHLA according to cell types. Our results indicate that leptin and SHLA, alone and combined, may play a role in the chemotherapeutic resistance to TMZ, and these effects vary with cell type and gene-specific. This is the first study investigating the effects of leptin and SHLA on TMZ resistance.

**Keywords:** Chemotherapeutic resistance, temozolomid, leptin, leptin receptor.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
ÖZET .....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER .....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XIII
TABLolar LİSTESİ .....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Kanser nedir ve nasıl oluşur .....	3
2.1.2. Kanser genetiği .....	4
2.1.3. Kanser oluşumunda doku değişim süreci.....	5
2.1.4. Kanser yönetimi.....	6
2.1.5. Kanserin mevcut istatistiksel durumu.....	6
2.2. Beyin Kanseri .....	7
2.2.1. Beyin kanseri sınıflandırması .....	7
2.2.2. Beyin kanserine neden olan faktörler.....	11
2.2.3. Beyin kanseri ile ilişkili belirtiler.....	11
2.2.4. Tedavi .....	12
2.2.5. Beyin kanseri tedavisinde uygulanan yenilikçi stratejiler .....	13
2.3. Glioblastoma.....	13
2.4. Kemoterapik Ajan: Temozolomid .....	15
2.5. DNA Tamir Yolakları .....	16
2.5.1. Metil guanin metil transferaz (MGMT) .....	17
2.5.2. Yanlış eşleşme tamir yolağı .....	22
2.5.3. Baz ekleme-çıkarma tamir yolağı.....	23
2.5.4. Tek zincir kırığı tamir yolağı.....	23



2.5.5. Çift zincir kırığı tamir yolağı.....	25
2.5.6. Fankoni anemi yolağı.....	27
2.6. Leptin Hormonu.....	28
2.6.1. Leptin hormonunun kanser ile ilişkisi.....	29
2.6.2. Leptin hormonunun çeşitli ilaçlar ile ilişkisi.....	34
2.6.3. Leptin hormonunun kanser kök hücresi ile ilişkisi.....	35
2.7. Süperaktif İnsan Leptin Antagonisti.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Gereç.....	37
3.1.1. Kullanılan hücre serileri.....	37
3.1.2. Hücre kültürü.....	37
3.1.3. 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT) sitotoksisite testi.....	39
3.1.4. Total RNA izolasyonu.....	40
3.1.5. cDNA sentezi.....	40
3.1.6. Agaroz jel elektroforezi.....	41
3.1.7. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR).....	41
3.1.8. Tek hücre jel elektroforezi (COMET).....	41
3.1.9. Akım (Flow) sitometri.....	43
3.1.10. Çalışmada kullanılan alet/makineler.....	44
3.2. Yöntem.....	44
3.2.1. Hücre kültürü.....	44
3.2.2. Sitotoksisite testi.....	45
3.2.3. RNA izolasyonu.....	47
3.2.4. cDNA (Complementer DNA) sentezi.....	50
3.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PZR;RT-PZR).....	50
3.2.6. Agaroz jel elektroforezi.....	51
3.2.7. Tek hücre jel elektroforezi (COMET).....	52
3.2.8. Akım (Flow) sitometri.....	54
3.2.9. İstatistiksel analiz.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. TMZ Sitotoksisitesi.....	56

4.2. Leptin Sitotoksitesisi .....	58
4.3. SHLA Sitotoksitesisi.....	60
4.4. Gen Ekspresyon Analizi.....	60
4.4.1. MGMT geni ekspresyon değişimi .....	61
4.4.2. MLH1 geni ekspresyon değişimi.....	62
4.4.3. PMS2 geni ekspresyon değişimi.....	63
4.4.4. MSH2 geni ekspresyon değişimi.....	65
4.4.5. MSH6 geni ekspresyon değişimi.....	66
4.3. COMET Analizi.....	66
4.4. Akım Sitometri Analizi .....	68
5. TARTIşMA VE SONUÇ .....	71
5.1. TMZ, Leptin ve SHLA Sitotoksitesisi .....	71
5.2. TMZ, Leptin ve SHLA'nın TMZ Direncinde Rol Alan Genlerin Ekspresyonuna Etkisi .....	73
5.2.1. MGMT geninin ekspresyona etkisi .....	73
5.2.2. MMR genlerinin ekspresyona etkisi .....	76
5.3. TMZ, Leptin ve SHLA'nın DNA Hasarına Etkisi.....	81
5.4. TMZ, Leptin ve SHLA'nın Hücre Döngüsüne Etkisi.....	83
KAYNAKLAR .....	87
ÖZGEÇMİş .....	101
EKLER .....	102
EK1. Etik Kurula gerek olmadığına dair Anabilim Dalı Kurul Kararı.....	102
EK2. Tez Orjinallik Raporu .....	103

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AFP</b>	: Alfa-fetoprotein
<b>AIC</b>	: 5-Aminoimidazole-4-Karboksamid
<b>APE1</b>	: Apirimidinik Endonükleaz 1
<b>APNG</b>	: Alkilpürin-Dna-N-Glikosilaz
<b>ATRT</b>	: Atipik Teroidrhabdoid Tümör
<b>BER</b>	: Baz Eksizyon Tamir Yolağı
<b>BiSEQ</b>	: Bisülfid Sekansı
<b>COMET</b>	: Tek Hücre Jel Elektroforezi
<b>Dd</b>	: Doz Yoğunluk
<b>DDR</b>	: DNA Hasar Tepkisi
<b>DMR2</b>	: Diferansiyel Olarak Metillenmiş 2.Bölgesi
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DR</b>	: Doğrudan Onarım
<b>DSB</b>	: Çift Zincir Kırıkları
<b>FA</b>	: Fanconi Anemi
<b>FSR</b>	: Fraksiyonlu Stereostatik Radyoterapi
<b>GB</b>	: Glioblastoma
<b>GH</b>	: Büyüme Hormonu
<b>HCG</b>	: İnsan koryonik gonadotropin
<b>HIF</b>	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
<b>HR</b>	: Homolog Rekombinasyon
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Yarı Ölüm Konsantrasyonu
<b>ICL</b>	: Bölgeler Arası Çapraz Bağlantıları
<b>IHC</b>	: İmmünohistokimya
<b>IL-2</b>	: Interlökin-2
<b>IR</b>	: İyonlaştırıcı Radyasyon
<b>JAK</b>	: Janus Kinaz
<b>KBB</b>	: Kan Beyin Bariyeri
<b>MAPK</b>	: Mitojen-Aktive Edici Protein Kinaz
<b>MGMT</b>	: Metil Guanin Metil Transferaz
<b>µL</b>	: Mikrolitre

<b>μM</b>	: Mikromolar
<b>MLH1</b>	: MutL Homolog 1
<b>MMR</b>	: Yanlış Eşleşme Tamir Yolağı
<b>MPG</b>	: Metilpurin Dna Glikosilaz
<b>MRN</b>	: Mre-11-Rad50-nbs1
<b>MSH2</b>	: MutS Homolog 2
<b>MSH6</b>	: MutS Homolog 6
<b>MS-PZR</b>	: Metilasyona Spesifik Polimer Zincir Reaksiyonu
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>MTIC</b>	: Metil-Triazen-İmidazol-Karboksamid
<b>NER</b>	: Nükleotit Onarımı
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>NHEJ</b>	: Homolog Olmayan Birleştirme
<b>O6-MeG</b>	: O6-metil guanin
<b>Ob-R</b>	: Leptin Reseptörü
<b>OB-Ra</b>	: Kısa Reseptörler
<b>OB-Rb</b>	: Uzun Reseptörler
<b>OS</b>	: Genel Hayatta Kalma
<b>PAP</b>	: Plazma alkali fosfataz
<b>PARP</b>	: Poli (adp-riboz) polimeraz
<b>PaTrin-2</b>	: 9h-purin-2-amin
<b>PFS</b>	: Progresyonsuz Sağkalım
<b>Ph</b>	: Hidrojen Gücü
<b>PI3K</b>	: Fosfatidilinositol 3 Kinaz
<b>PMS2</b>	: PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
<b>PTEN</b>	: Fosfatas Tensin Homolog
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SHLA</b>	: Süperaktif İnsan Leptin Antagonisti
<b>SRS</b>	: Stereostatik Radyocerrahi
<b>SSB</b>	: Tek Zincir Kırıkları
<b>STAT</b>	: Sinyal Dönüştürücü Ve Transkripsiyon Aktivatörü
<b>TBE</b>	: Tris Borik Asit EDTA

<b>TCGA</b>	: Kanser Genom Atlası
<b>TKI</b>	: Tirozin Kinaz İnhibitör
<b>TMZ</b>	: Temozolomid
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VEGF</b>	: Anti-Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
<b>WBR</b>	: Tüm Beyin Radyoterapisi



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanser oluşum sürecinde ki doku değişimi .....	6
Şekil 2. Beynin anatomisi ve fizyolojisi.....	7
Şekil 3. Beynin farklı bölgelerinde farklı beyin kanseri türleri .....	10
Şekil 4. Beyin kanseri ile ilişkili semptomların oranları .....	11
Şekil 5. Temozolomid ön ilaç oluşumu.....	16
Şekil 6. Metildiazonyum iyonlarının biyolojik kaderi .....	16
Şekil 7. MGMT'nin etki mekanizması ve klinik olarak test edilmiş iki MGMT inaktivatörünün yapıları.....	19
Şekil 8. Temozolomid fonksiyonu ve DNA tamir yollarında aktivasyonu .....	21
Şekil 9. DNA tamir yolları.....	28
Şekil 10. Leptin reseptörü (ObR) aktivasyonu ile kanser tarafından ortak hücre sinyal yolları.....	33
Şekil 11. Total RNA %1'lik agarozdaki görüntüsü .....	49
Şekil 12. COMET testinde kullanılan skorlama ve skorlamaya ait örnek görüntüler .....	53
Şekil 13. TMZ 'nin LN-405 hücre serisinde ki sitotoksitesisi .....	57
Şekil 14. TMZ'nin T98G hücre serisinde ki sitotoksitesisi.....	57
Şekil 15. TMZ'nin U373 MG hücre serisinde ki sitotoksitesisi.....	58
Şekil 16. Leptin molekülünün LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerindeki sitotoksik etkisi .....	59
Şekil 17. SHLA molekülünün LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerindeki sitotoksik etkisi .....	60
Şekil 18. LN-405 hücre serisinde MGMT geni ekspresyon değişimi.....	61
Şekil 19. T98G hücre serisinde MGMT geni ekspresyon değişimi.....	62
Şekil 20. MLH1 geni ekspresyon değişimi .....	63
Şekil 21. LN-405 hücre serisinde PMS2 geni ekspresyon değişimi .....	64
Şekil 22. T98G hücre serisinde PMS2 geni ekspresyon değişimi .....	64
Şekil 23. U-373 hücre serisinde PMS2 geni ekspresyon değişimi .....	65
Şekil 24. MSH2 geni ekspresyon değişimi.....	65
Şekil 25. MSH6 geni ekspresyon değişimi.....	66

## TABLÖLAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre serileri .....	37
<b>Tablo 2.</b> Hücre kültürün uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler .....	38
<b>Tablo 3.</b> MTT testinde kullanılan gereçler .....	39
<b>Tablo 4.</b> Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler .....	40
<b>Tablo 5.</b> cDNA eldesi için için gerekli malzemeler .....	40
<b>Tablo 6.</b> Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler .....	41
<b>Tablo 7.</b> RT-PZR için gerekli malzemeler.....	41
<b>Tablo 8.</b> COMET için gerekli malzemeler.....	42
<b>Tablo 9.</b> Akım sitometri için gerekli malzemeler.....	43
<b>Tablo 10.</b> Tez kapsamında kullanılan alet/makineler .....	44
<b>Tablo 11.</b> cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri.....	50
<b>Tablo 12.</b> RT-PZR için reaksiyon içeriği.....	51
<b>Tablo 13.</b> RT-PZR ile ekspresyonu araştırılan genlerin primer dizileri .....	51
<b>Tablo 14.</b> TMZ' nin glioblastoma hücre serilerinde IC <sub>50</sub> değerleri .....	56
<b>Tablo 15.</b> U373 MG, T98G ve LN-405 hücre serilerinde saptanan DNA hasarı .....	67
<b>Tablo 16.</b> U373 MG, T98G ve LN-405 hücre serilerinde grupların birbirlerine göre DNA hasarı açısından karşılaştırmaları.....	68
<b>Tablo 17.</b> LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerinde moleküllerin hücre döngüsüne olan etkileri .....	69
<b>Tablo 18.</b> LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerinde grupların birbirlerine göre hücre döngüsüne olan etkileri .....	70

## 1. GİRİŞ

Glioblastoma (GB), tedavisi güç kanserlerden biridir, yüksek morbidite ve mortalite özelliklerine sahiptir. GB'in küratif tedavisi yoktur (Rosell ve ark., 2008). Hastaların yaşam süresi, ortalama 14.6 aydır (Kraakstad ve Chekenya, 2010). Güncel standart tedavi biçimleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir (Adamson ve ark., 2009; Omay ve Vogelbaum, 2009).

GB'nin infiltratif yapısı nedeniyle cerrahiyle tümörün tamamının alınabilmesi hemen hemen imkânsızdır. Bu nedenle, primer GB olgularında, cerrahi sonrası sırasıyla veya aynı anda radyoterapi ve kemoterapi uygulaması standart tedavi modelidir (Kim ve Glantz, 2006). Kemoterapötik maddenin seçimi, dozu, uygulama süresi ve hastanın genetik yapısı kemoterapi sürecini doğrudan etkileyen unsurlardır (Hegi ve ark., 2008).

GB tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötikler alkilasyon ajanlarıdır. Son yıllarda GB tedavisinde en çok tercih edilen kemoterapötik ilaç TMZ'nin kullanımı sürecinde karşılaşılan en büyük güçlük hastaların ilaca direnç göstermesidir (Marchesi ve ark., 2007; Kaina ve ark., 2010). TMZ direncinin oluşmasında ve gelişmesinde DNA tamir yollarının rolü büyüktür. Çünkü, TMZ'nin etki mekanizmasında DNA'da baz modifikasyonları yoluyla kırık oluşturulması yatmaktadır. Hücrelerin yanlış eşleşme tamir yolağı (MMR) fonksiyonu ile TMZ duyarlılığı arasında sıkı bir ilişki vardır (Sarkaria ve ark., 2008).

MGMT, monofonksiyonel alkilleyici ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamir ederek bu moleküllere karşı gelişen direnç mekanizmalarından birini oluşturur (Marchesi ve ark., 2007).

Literatürde, glioblastoma da gelişen kemoterapötik direnç ile ilişkili birçok faktör gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda leptin hormonunun gerek kanser gelişimi gerek kemoterapötik dirençte aktif rol oynadığı düşünülmektedir (Han ve ark., 2017) . Bundan dolayı leptinin kanser patogenezindeki rolüne ilişkin araştırmalar önem kazanmaktadır. Ancak kanserin genotipik ve fenotipik heterojenitesi nedeniyle leptinin



kanserdeki önemine ilişkin verilerin daha çok araştırma ile doğrulanması gerektiği vurgulanmaktadır.

GB kemoterapi sürecinde direnç sıklıkla gelişmektedir. Bu nedenle, GB’de kemoterapötik direncin üstesinden gelinebilecek veya direncin azalmasına neden olabilecek tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır. Leptinin doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe veya tetikleyici özelliğe sahip olduğunun bilinmesi ve immün sistem hücrelerinin leptin tarafından tetiklendiğini bildirilmesi leptinin GB’de yeni güncel tedavi yaklaşımı olarak kullanılabilirliğinin sorgulanması gerektiğini akla getirmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında GB hücre serileri kullanılarak TMZ, leptin ve leptin antagonisti SHLA’nın kemoterapötik direncindeki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde hem glioblastomada hem de diğer kanser türlerinde leptin, leptin inhibitörü (SHLA) ve TMZ’nin etkilerine ilişkin her hangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada , glioblastoma hücre serilerine kemoterapi ilacı ile leptin hormonu ve leptin reseptörü inhibitörü ilk kez birlikte verilecektir. Tez çalışmasında TMZ duyarlılıklarının farklı olduğu bilinen hücre serileri kullanılmıştır. Tez çalışması, GB kemoterapisinde leptin temelli yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ve kemoterapi protokollerinin biçimlendirilmesine katkı sunabilecek bilimsel potansiyele sahiptir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

#### 2.1.1. Kanser nedir ve nasıl oluşur

Kanser, normal olmayan hücrelerin sınırlarının dışına çıkarak çoğalan ve daha sonra vücudun diğer kısımlarına hücum ederek organlara yayılabilen bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir (WHO, 2019).

Kanser, insan vücudunun neredeyse her yerinde başlayabilir. Normal süreçte, hücreler büyür ve vücudun ihtiyaç duyduğu yeni hücreler oluşturmak için bölünürler. Hücreler yaşlanır veya hasar görürse ölüm yolağına girerler ve ölürlür. Daha sonra kalan hücreler bölünerek ölen hücrelerin yerini doldurur. Fakat kanser geliştiğinde, bu düzenli süreç bozulur. Hücrelerin yapısı ve genetiğı değışime uğrar. Yaşlı ya da hasarlı hücreler ölüm yolağına girmeyip yaşamaya devam eder. İhtiyaç olmamasına rağmen yeni hücreler oluşur. Bu yeni hücreler durmaksızın bölünür ve tümör oluşur (NIH, 2015).

Kanser hücreleri, tümör mikroçevresini etkileyebilir. Çevresinde bulunan hücre ve dokulardan faydalanarak yeni kan damarları oluşturup bu damarlar vasıtası ile beslenmesini sağlayabilir (NIH, 2015).

Kötü huylu yani maling tümörler, çevresinde bulunan dokulara yayılabilir. Ayrıca bu tümörler damar oluşturup büyüdükçe, kan ya da lenf sistemi vasıtasıyla vücudun uzak kısımlarına ulaşabilir ve orijinal tümörden uzakta yeni tümörler oluşturabilir (NIH, 2015).

Kötü huylu tümörlerin aksine, iyi huylu tümörler yakındaki dokulara yayılmaz veya istila etmez. İyi huylu yani bening tümörler bazen çok büyük olabilir. Cerrahi yoluyla alındıklarında, genelde tekrar büyümmezler, fakat kötü huylu tümörler üreyebilirler. Vücutta herhangi bir yerde ki bening tümörlerin aksine, iyi huylu beyin tümörleri alındıkları veya çok büyüdükleri zaman yaşamı tehdit edebilir (NIH, 2015).

Vücutun ilk başladığı yerinden başka bir yerde çoğalabilen kansere metastatik kanser denir. Kanser hücrelerinin vücudun diğer bölümlerine yayıldığı sürece metastaz denir (NIH, 2015).

Metastatik kanser, orijinal veya birincil kanser ile aynı isimde ve aynı kanser hücrelerine sahiptir. Örneğin, akciğerde metastatik bir tümöre yayılan ve oluşturan meme kanseri, akciğer kanseri değil, metastatik meme kanseridir (NIH, 2015).

Kanser genetik bir hastalıktır. Hücrelerin işleyiş şeklini, özellikle de nasıl büyüdüklerini ve bölündüklerini kontrol eden genlerdeki değişikliklerden kaynaklanır. Kansere neden olan genetik değişiklikler ebeveynlerimizden kalıtsal olabilir. Hücre bölünürken meydana gelen hataların bir sonucu olarak veya belirli çevresel etkilere maruz kalarak DNA'nın zarar görmesi nedeniyle bir insanın yaşamı boyunca da ortaya çıkabilir. Kansere neden olan çevresel riskler arasında tütün dumanındaki kimyasallar gibi maddeler ve güneşten gelen ultraviyole ışınları gibi radyasyon yer alır (NIH, 2015).

Genel olarak, kanser hücreleri, DNA'daki mutasyonlar gibi normal hücrelere göre daha fazla genetik değişikliklere sahiptir. Bu değişikliklerin bazılarının kanserle ilgisi olmayabilir; sebebi yerine kanserin sonucu olabilirler (NIH, 2015).

### **2.1.2. Kanser genetiği**

Kansere katkıda bulunan genetik değişiklikler, üç ana gen tipi (proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri) ile ilişkilidir (NIH, 2015).

Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve bölünmesinde rol oynarlar. Bununla birlikte, bu genler belirli şekillerde değiştirildiğinde ya da normalden daha aktif olduklarında, hücrelerin büyümeleri gerektiğinde büyümelerine ve hayatta kalmalarına izin vererek kansere neden olan genler (veya onkogenler) olabilirler (NIH, 2015).

Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol etmede rol oynarlar. Tümör baskılayıcı genlerde değişiklikler meydana gelirse hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünebilir (NIH, 2015).

DNA onarım genleri hasarlı DNA'nın tamir edilmesinde rol oynar. Bu genlerde mutasyon bulunan hücreler diğer genlerde ek mutasyonlar geliştirme eğilimindedir. Bu mutasyonlar hücrelerin kansere dönüşmesine neden olabilir.

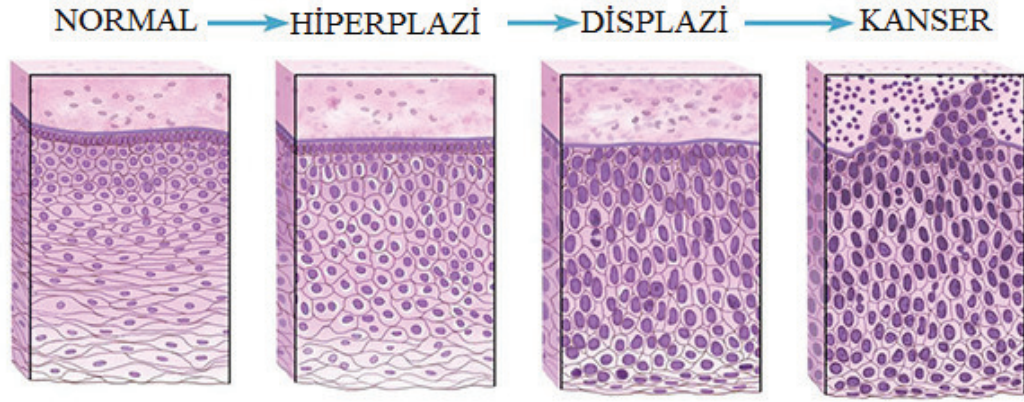
Son dönemlerde kansere yol açan moleküler değişiklikler göz önüne alınca, bazı mutasyonların yaygın olarak birçok kanser türünde ortaya çıktığı görülmüştür. Bu nedenle, kanserler sadece vücutta geliştikleri yer ve kanser hücrelerinin mikroskop altında nasıl görüldüğü ile değil, kanseri tetiklediği belirlenmiş genetik markerler ile de karakterize edilebilir (NIH, 2015).

### **2.1.3. Kanser oluşumunda doku değişim süreci**

Vücudun dokularındaki her değişiklik kanser değildir. Bununla birlikte, bazı doku değişiklikleri, tedavi edilmezse kansere dönüşebilir (NIH, 2015).

Hiperplazi, bir doku içindeki hücreler normalden daha hızlı bölündüğünde ve ekstra hücreler biriktiğinde veya çoğaldığında meydana gelir. Bununla birlikte, hücrelerin ve dokunun şekli mikroskop altında normal görünür. Hiperplazi, kronik iritasyon da dahil olmak üzere birçok faktör veya durumdan kaynaklanabilir (NIH, 2015).

Displazi, hiperplaziden daha ciddi bir durumdur. Displazide, fazladan hücre birikimi de vardır. Bazı displazilerin izlenmesi veya tedavi edilmesi gerekebilir. Displazi örneği ciltte oluşan anormal bir köstebek (displazik nevüs) şeklindedir. Displastik bir nevüs, çoğu olmasa da, melanomaya dönüşebilir. Daha da ciddi bir durum in situ karsinomdur. Bazen kanser denmesine rağmen, in situ karsinoma kanser değildir, çünkü anormal hücreler orijinal dokunun dışına yayılmaz. Ancak, in situ bazı karsinomlar kanser olabileceğinden, genellikle tedavi edilir (NIH, 2015).



**Şekil 1.** Kanser oluşum sürecinde ki doku değişimi (NIH, 2015).

#### **2.1.4. Kanser yönetimi**

Mevcut kanıtlara göre, kanser ölümlerinin %30 ila %50'si, tütün ürünlerinden kaçınmak, alkol tüketimini azaltmak, sağlıklı vücut ağırlığını korumak, düzenli egzersiz yapmak ve enfeksiyonla ilgili risk faktörlerini ele almak dahil olmak üzere kilit risk faktörlerini değiştirerek veya önleyerek önlenebilir (WHO, 2019).

Dünya genelinde kanserin yol açtığı sakatlıkları, acıyı ve ölümleri azaltmak için erken tanı, tarama, tedavi ve palyatif bakımda, etkili aynı zamanda uygun fiyatlı programlara ihtiyaç vardır. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi, ilaçlar ve/veya radyoterapi bulunmaktadır. Tedavi planlaması ise tümör tipi ve evresi göz önüne alınarak mevcut kaynaklar tarafından yönlendirilmeli ve hastanın tercihi ile şekillendirilmelidir (WHO, 2019).

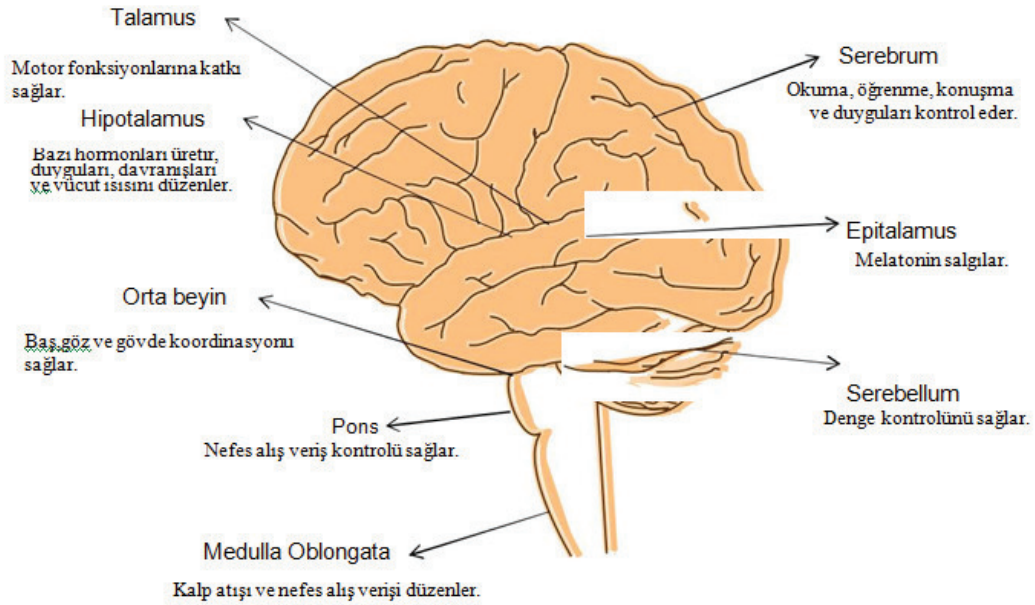
#### **2.1.5. Kanser mevcut istatistiksel durumu**

Kanser, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve 2018'de kanser sebebiyle 9.6 milyon ölüm olduğu tahmin edilmektedir. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser türleri iken; meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid kanseri kadınlarda en yaygın olanıdır (WHO, 2019).

Dünya Sağlık Örgütü, 2035 yılında, dünyada 24 milyon yeni kanser vakası olacağını ve yılda 14,5 milyon kansere bağlı ölüm görülebileceğini öngörüyor (NIH, 2016).

## 2.2. Beyin Kanseri

Beyin kanseri ilk olarak 1873 yılında bir Rus bilim adamı Gupta Longati tarafından keşfedilmiştir. Longati tarafından iyi huylu tümör bulunduğu düşünülen bir hasta gözlemleniyordu fakat hasta öldükten sonra bu tümörün aslında malign bir tümör olduğunu anlaşılmıştır (Shah ve Kochar, 2018). İlk başarılı beyin tümörü ameliyatı, 1879'da William Macewen tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu ameliyatta dura materden fungöz tümörü çıkarılmıştır. 1895'in sonlarında Fedor Krause tarafından, intrakraniyal tümörlerin lokalizasyonunda X-ışınları kullanılmıştır (Preul, 2005).



Şekil 2. Beynin anatomisi ve fizyolojisi (Shah ve Kochar, 2018).

### 2.2.1. Beyin kanseri sınıflandırması

Beyin kanseri, beyinde başlayan ve burada kalan bir tümördür, örn.: Glioma. Ayrıca iyi huylu beyin kanseri veya kötü huylu beyin kanseri olarak sınıflandırılır. İyi huylu beyin kanseri, etrafındaki dokuları nadiren yayan ve istila eden, sınır tanımayan sınırlar gösteren ve çok yavaş büyüyen hücrelere sahip bir kanserdir. İyi huylu bir beyin

tümörünün örnekleri arasında hipofiz tümörleri, meningiomlar ve astrositomlar bulunur. Kötü huylu beyin kanseri, beynin ve omuriliğin diğer kısımlarına kolayca saldıran, farklı sınırları olmayan ve hızla büyüyen hücrelere sahip bir kanserdir. Kötü huylu beyin kanseri tipi incelemeleri arasında yüksek dereceli astrositomlar, oligodendrogliomalar vb. vardır (Shah ve Kochar, 2018).

1. Beyin sapı gliomu: Genellikle üst beyin sapında (orta beyin veya tektum), orta beyin sapında (pons) ve alt beyin sapında (serviko-medüller) görülür. 5-40 yaş arasında değişen yaş grubundaki çocuklarda ve erişkinlerde yaygındır .

2. Craniopharyngioma: Hipofiz sapının yakınında bulunan küçük hücrelerden kaynaklanan bir tümördür. Yetişkinlerde 45 yaşından sonra oluşan tüm primer beyin kanserlerinin %2-5'ni oluşturur ve çocuklarda da görülür. Adamantinomatous ve papiller craniopharyngioma olmak üzere iki tür craniopharyngioma vardır.

3. Germ hücre tümörleri: Beynin pineal veya suprasellar bölgelerinden kaynaklanan bir tür tümördür. Çocuk beyin tümörlerinin yaklaşık %1-3'ünü oluşturur ve ayrıca 11-30 yaş arasındaki genç erişkinlerde de ortaya çıkabilir. Beyin omurilik sıvısı ve kan alfa-fetoproteininde (AFP) bulunan belirteçler kullanılarak teşhis edilebilen primer beyin tümörüdür. Plazma Alkali Fosfataz (PAP) ve İnsan Koryonik Gonadotropin (HCG) belirteçleri, germ hücre tümörünün teşhisinde kullanılır.

4.Glioblastoma: Esas olarak beynin beyin omurilik bölgesinde görülür ve primer beyin tümörü vakalarının yaklaşık %16' sını oluşturur. Primer glioblastoma ve sekonder glioblastoma olarak sınıflandırılır.

5. Glioma: Glial hücreler olarak adlandırılan beynin destekleyici veya tutkal benzeri dokularından kaynaklanan tümöre glioma denir. Üç tip glial hücre vardır; astrositler, oligodendrositler ve ependimal hücreler (Shah ve Kochar, 2018).

6. Astrositom: Beyinde astrosit denilen yıldız şeklindeki hücrelerden kaynaklanan bir tümördür. Astrositom farklı derecelerde sınıflandırılır:

Derece I: Piloitik astrositom: Genellikle iyi huylu olan ve çoğunlukla 20 yaş genç erişkinlerde ve çocuklarda görülen gliomaların %5-6'sını oluşturur, yavaş büyüyen bir tümördür.

Derece II: Difüze astrositom / İnfiltratif astrositomlar / Düşük dereceli astrositom: Çoğunlukla beyin cerebrum bölgesinde ortaya çıkar. İnfiltratif astrositomun, bazal ganglionlarda, beyin sapında, beyincikte, omurilikte ve diğer MSS bölgelerinde meydana geldiği de belirtilmektedir.

Derece III: Anaplastik astrositom: "kötü huylu astrositom" olarak da adlandırılır, hücre karışımı içerir.

Derece IV: Glioblastomalar: 'Glioblastoma-multiforme' olarak da adlandırılan, hızlı büyüyen bir tümördür ve genellikle 50-70 yaş grubundaki erişkinlerde beyin frontal ve temporal loblarında görülür.

7. Ependymoma: Beynin ventriküllerini ve merkezi omurilik bölgesini kaplayan ependimal hücrelerden kaynaklanan bir tümördür. Bu tip primer tümörün oluşumu yetişkinlerde ve çocuklarda çok nadirdir. Ependymoma dört türe ayrılır: Subependimomlar, Miksopapiller ependimomlar, Ependimomlar ve Anaplastik ependimomlar.

8. Oligodendroglioma: Oligodendrositlerden kaynaklanan bir tümör türüdür. Ayrıca tümörlerin üreme eğilimine bağlı olarak farklı derecelerde sınıflandırılır. Oligodendroglioma çoğunlukla genç ve orta yaşlı erişkinlerde görülürken çocuklarda nadiren görülür .

9. Karışık glioma: Farklı hücrelerin, yani astrositlerin, oligodendrositlerin ve ependimal hücrelerin karışımıyla ortaya çıkar.

10. Medulloblastom: Beynin çoğunlukla beyincik kısmında görülen bir tümördür. MSS'nin diğer bölgelerine yayılarak büyür. Çocuklarda beyin tümörü vakalarının %13'ünü, yetişkinlerde % 3'ünü oluşturur (Shah ve Kochar, 2018).



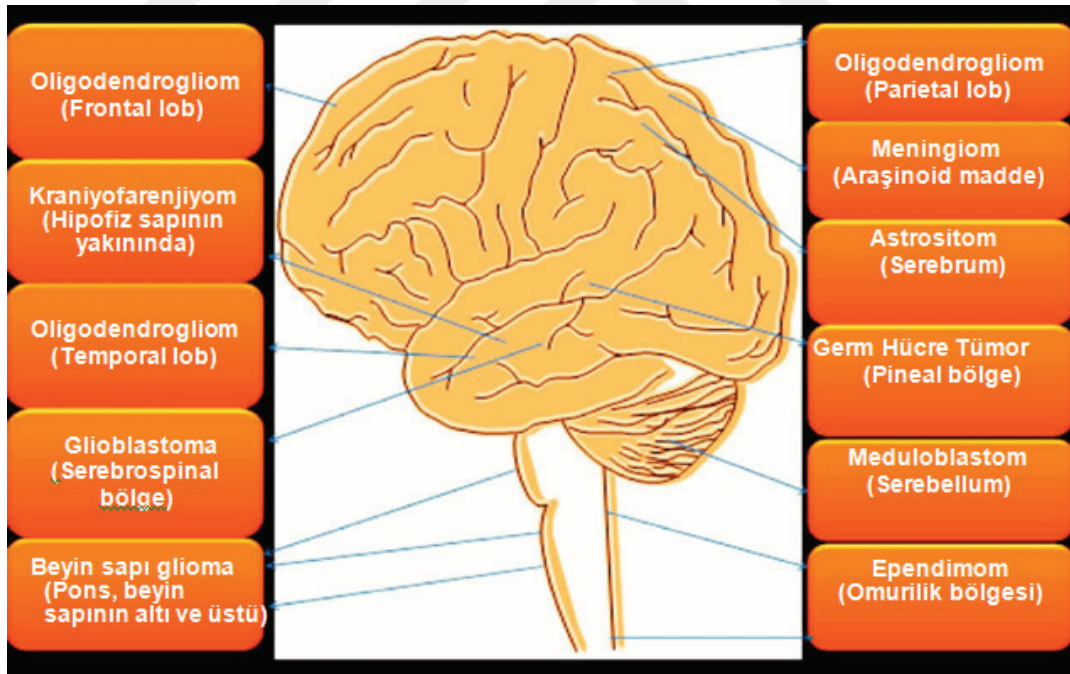
11. Meningiom: Meninlerin araşinoid maddesinden kaynaklanan bir tümör türüdür. Birincil beyin tümörünün %38'ini oluşturur. Orta yaşlı kadınlarda yaygındır. Ayrıca üç sınıfa ayrılır:

Derece I: Benign meningiom yavaş büyüyen bir tümördür.

Derece II: 1. Dereceden meningioma göre daha hızlı büyür ve tümörün tekrarlama eğilimini vardır.

Derece III: Anaplastik veya malign meningiom. Çevre beyin dokularında yayılma eğilimi vardır.

Yukarıda belirtilen beyin tümörü tipleri dışında, akustik nöroma, atipik teroidrhabdoid tümör (ATRT), kondroma, kondrosarkom, kordoma, koroid pleksis gibi tümör tipleri bulunmaktadır (Shah ve Kochar, 2018).



Şekil 3. Beynin farklı bölgelerinde farklı beyin kanseri türleri (Shah ve Kochar, 2018).

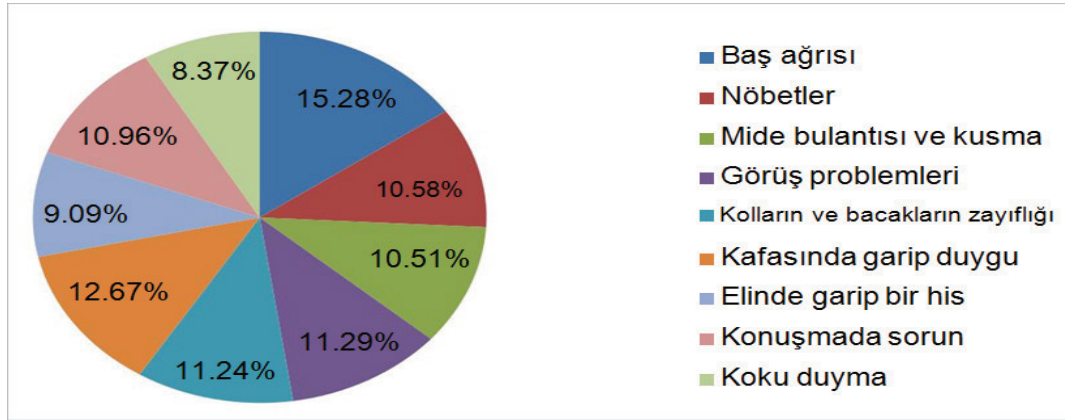
### 2.2.2. Beyin kanserine neden olan faktörler

Beyin kanseri oluşumu ile ilişkili iki ana risk faktörü ya çevresel ya da genetikdir.

Çevresel faktörler şunlardır: sigara içmek, aşırı alkol tüketimi, zayıf beslenme, egzersiz eksikliği, aşırı güneş ışığına maruz kalma, belirli virüslere maruziyeti artıran cinsel davranış, yüksek iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, kurutulmuş gıda tüketme, önceki tıbbi geçmiş epilepsi, kafa travması, nöbetler, uyku hapları gibi ilaçların verilmesi, reçetesiz ilaçlar, anti-histaminik ilaçlar ve zararlı kimyasallara geniş ölçüde maruz kalma. Genetik faktörler ise şunları içerir: vücut hücrelerinde gen değişimleri, kan dolaşımındaki anormal hormon seviyeleri, zayıf bağışıklık sistemi ve kanserojenlere maruz kalma (ABTA, 2015).

### 2.2.3. Beyin kanseri ile ilişkili belirtiler

Beyin kanseri belirtileri, beyindeki tümör tipine, boyutuna ve konumuna bağlı olarak kişiden kişiye değişir. Beyin kanserinden şüphelenilen bir kişi semptomlar, hafıza ile ilgili problemler, nöbetler, konuşma değişiklikleri, işitme veya görme problemleri, davranış değişikliği, baş ağrısına neden olan kafa içi basıncında artış, mide bulantısı, kusma, uyku hali yaşayabilir. Bunların yanı sıra, kafada tuhaf bir his , tuhaf kokular, bilinç kaybı ve genel sinirlilik, depresyon ya da kişilik değişiklikleri görülebilir (ASCO, 2019; MAYFIELD, 2018).



Şekil 4. Beyin kanseri ile ilişkili semptomların oranları (Shah ve Kochar, 2018).

#### 2.2.4. Tedavi

Kanser için kullanılan tedavi stratejileri, tümörün çıkarılması veya tümörün küçültülmesi ile kanser belirtilerinden kurtulma amaçlıdır. Tedavi stratejisinin seçiminde; tümörün tipi, büyüklüğü ve yeri gibi parametrelerin yanında yaş, tıbbi öykü, genel sağlık durumu, semptom tipleri ve hastada gözlenebilecek yan etkiler önemlidir. Beyin kanseri için kullanılan çeşitli tedavi stratejileri şunlardır:

1. Cerrahi: İlk tümör evrelerinde, beynin nörolojik fonksiyonunu korurken bening tümörün cerrahi olarak çıkarılması birincil tedavi stratejisi olarak tercih edilir. Geleneksel olarak, cerrahi düşük dereceli tümör durumunda tam bir tedavi sağlar. Beyin kanserini tedavi etmek için en az ve hiç yan etki göstermediğinden en kolay ve en güvenli yaklaşımdır. Cerrahi tedavi yaklaşımı olarak kullanmanın sınırlılığı, cerrahinin ancak, tümörün önemli beyin fonksiyonlarına zarar vermeden ulaşılabilecek bir konumda olması durumunda mümkün olmasıdır. Ameliyattan sonra yan etkiler arasında baş ağrısı, halsizlik, yorgunluk ve beyin hasarı ciddi bir problem olabilir. Cerrahi aynı zamanda düşünme, konuşma ve görme konusunda nöbet ve problemin gelişmesine de yol açabilir (Friedman ve ark., 2012; Shahpar ve ark., 2016; Shah ve Kochar, 2018 ).

2. Radyasyon Tedavisi: Radyasyon tedavisi, beyin kanserine neden olan kanserli hücreyi öldürmek veya yok etmek için x ışınlarının, gama ışınlarının, proton ışınlarının kullanılmasını içerir. Radyasyon tedavisi genellikle haftanın 5 günü 6 haftaya kadar verilir. Radyasyon tedavileri tek bir tedavide yüksek miktarda radyasyon sağlayan voltlar içeren Stereostatik Radyocerrahi (SRS) radyasyon tedavisi, her tedavide daha düşük bir radyasyon dozu veren Fraksiyonlu Stereostatik Radyoterapi (FSR) ve tüm beyne radyasyon dozu veren Tüm Beyin Radyoterapisi (WBR) olarak sıralanabilir. Dahili ışın tedavisi, implant tabanlı radyasyon tedavisi veya brakiterapi içerir. Radyasyon tedavisinden sonraki yan etkiler şişme, yorgunluk, baş ağrısı, bulantı, olası saç dökülmesi ve hislerin veya hareketlerindeki değişiklikleri içerir.

3. Kemoterapi: Bu tedavi stratejisi, kanseri tedavi etmek için kemoterapötik ilaçların kullanılmasını içerir. Bu tedavi stratejisinin sınırlandırılmasının sebebi kemoterapi ilacının normal dokulara/hücrelere de zarar verebilir olmasıdır.

Kemoterapötik tedaviye bağılı sık görülen yan etkiler, bulantı, zayıflık, yorgunluk, dehidratasyon içerir ve bu da enfeksiyon riskini arttırır (Friedman ve ark., 2012; Shahpar ve ark.,2016; Shah ve Kochar, 2018 ).

### **2.2.5. Beyin kanseri tedavisinde uygulanan yenilikçi stratejiler**

1.Hedefli Terapi: Kanserli hücrelerin büyümesinde rol alan spesifik hücresel elementlere odaklanır ve bunları hedef olarak kullanır. Tirozin Kinaz İnhibitör (TKI) tedavisi ve anti-Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) tedavisi örnek olarak gösterilebilir. Bağışıklık sisteminin kanserle mücadelede önemli bir rol oynadığı ‘Biyoterapi’ veya ‘İmmünoterapi’ olarak adlandırılan hedefli biyolojik tedavi, aynı zamanda kanser tedavisinde kullanılan yeni yaklaşımlardan biridir.

2.Elektrik Alan Tedavileri : Bu terapi, saç derisine yerleştirilen NovoTTF <sup>TM</sup> (Novicure tarafından) adlı bir cihazın kullanılmasını içerir. Burada, normal hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerinin öldürülmesinden elektrik akımı veya elektrotlar sorumludur (Shah ve Kochar, 2018).

3.Aşı Terapisi: Bu tedavide hastanın bağışıklık sistemi önemli bir rol oynar. Burada, beyin dokularından türetilen maddeler (aşılar), kanseri iyileştirmek için vücudun doğal savunma sistemini geri yüklemekle sorumludur.

4.Gen Tedavisi: Bu terapi, tasarlanmış genlerin kanserli hücrelere öldürülmesi için sokulmasını içerir. Ayrıca, kansere karşı savaşmak için vücudun bağışıklık sistemini uyarır (Shah ve Kochar, 2018).

### **2.3. Glioblastoma**

Glioblastoma (GB) çoğunlukla erişkinlerde görülür (ortalama her yüzbinde 3,20 olgu) ve en malin beyin tümörüdür ( Zacharia ve ark., 2017). Tüm primer beyin tümörlerinin %30’ unu oluşturmaktadır (Sander ve ark., 2017). GB her yaşta görülebilir, fakat genellikle 55-60 yaş aralığındaki erişkinlerde görülmektedir (Hanif ve ark., 2017). GB gelişimine neden olan risk faktörü veya faktörleri radyasyon haricinde tam olarak belli değildir. Genel olarak GB etkenleri şu şekildedir: sigara, elektromanyetik dalgalar,

alerji, viral enfeksiyon (Krex ve ark., 2007) ve genetik yatkınlık (Blumenthal ve Schulman, 2005).

GB primer (de novo) ve sekonder olarak iki gruba ayrılır. GB'lerin %90'ını primer GB grubu oluştururken, %10'u sekonder GB grubu oluşturmaktadır. Primer GB'ler glial öncü hücrelerden direkt gelişen ve ilk histopatolojik incelemede glioblastoma tanısı konulan tümörlerdir. Sekonder GB ise düşük dereceli astrositomlardan gelişerek oluşur (Durmaz ve Vural, 2007). Düşük dereceli astrositomların glioblastoma dönüşmesi için geçmesi gereken süre ortalama 4-5 yıldır (Kraakstad ve Chekenya, 2010).

GB' de sağkalım oranı yaklaşık 15 aydır (Balcom ve ark., 2017). Çünkü GB'nin hastalık prognozu çok zayıftır, tedaviyi reddeder. GB tedavisinde cerrahi sonrasında radyoterapi ve kemoterapi uygulaması yer almaktadır. Güncel yaklaşımlarda, GB de en çok tercih edilen kemoterapötik ilaç TMZ'dir. Ancak, hastalarda, tedavi başlangıcında ve/veya sırasında gerek primer gerekse sekonder kemoterapötik direnç ile karşılaşmaktadır (Han, 2013). Kemoterapötik direncin tanımlanması amacıyla Dünya Sağlık Örgütü'nce (Louis ve ark., 2016) kabul edilen bir takım kriterler var olmasına rağmen bu kriterler tüm hastalarda tanısal, prospectif ve prediktif açıdan etkili bir biçimde kullanılamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, GB'de kemoterapötik direncin altında yatan moleküler ve klinik mekanizmaları aydınlatılmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir (Grek ve ark., 2018; Miyauchi ve Tsirka, 2018).

Glioblastoma , genetik olarak kararsız, yüksek derecede infiltratif, anjiyojenik ve kemoterapiye dirençli olan heterojen bir hücre popülasyonu ile karakterize edilen, derece IV beyin tümörüdür (Wen ve Kesari, 2008). GB hücreleri, hipoksik bir ortamda hayatta kalma ve proliferasyonu destekleyen mutasyonlar barındırır (Ligon ve ark., 2007). Örneğin, GB tümörlerinin %30 ila %40'ı, MAPK ve PI3K sinyalini aktive eden bir tirozin kinaz reseptörü olan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) amplifikasyonuna sahiptir (Stommel ve ark., 2007). P53, p21, p16 ve PTEN gibi tümör baskılayıcı genler genellikle GB'lerde mutasyona uğrarlar (Chen ve ark., 2012).

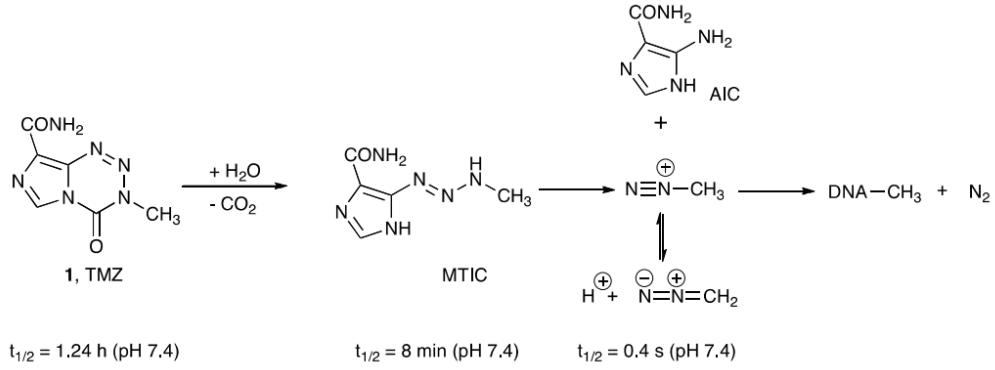
Mevcut tedavi standardı, iyonlaştırıcı radyasyon (IR) ve kemoterapötik ajan temozolomid (Temodar®, Temodal®, TMZ) ile birlikte cerrahi rezeksiyondur. Bununla

birlikte, bu tedavi GB hastalarına sadece tanı sonrası 12-14 aylık sağkalım süresi sağlar (Stupp ve ark., 2009). Cerrahi rezeksiyon ve kemoterapiye rağmen, hemen hemen tüm GB hastaları tümör nüksüne uğramaktadır. GB tümörlerinin yüzde doksanının primer bölgede nüks ettiği gösterilmiştir (Wen ve Kesari, 2008). Bu, kısmen tümörün yayılabilir doğasına bağlanabilir ve tam rezeksiyonun neredeyse imkansız olmasını sağlar (Ramirez ve ark., 2013).

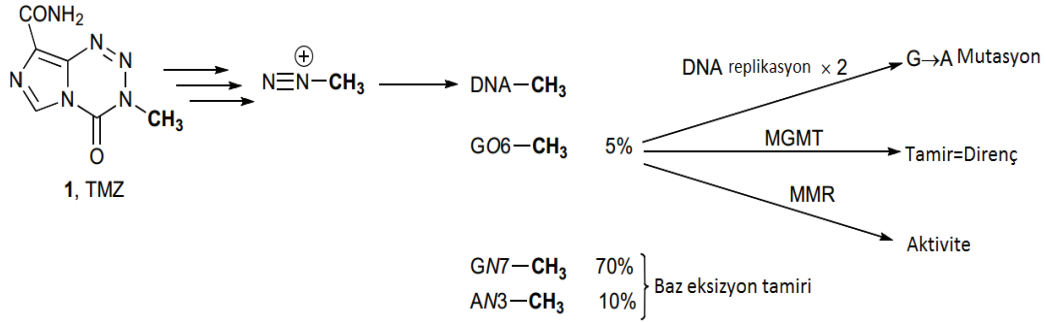
#### **2.4. Kemoterapik Ajan: Temozolomid**

TMZ, kan-beyin bariyeri (KBB)'ni geçen oral yoldan uygulanan bir alkile edici ilaçtır (Zhang ve ark., 2012). Yüksek alım ve dağılım davranışına sahiptir ve doğrudan tümör lokalizasyonuna dair kanıtlar vardır (Spiro ve ark., 2001). TMZ bir ön ilaçtır ve sulu kimyası tipik olarak imidazotetrazin bileşikleridir. Nötr veya alkalın pH'ta hidrolitik halka açılır ve ilk önemli ara madde açık zincirli triazen MTIC (Metil-Triazen-İmidazol-Karboksamid) oluşur (Wheelhouse ve Stevens, 1993). Aktive edilmiş ara MTIC, malign melanom ve beyin kanserine karşı kullanılır.

MTIC, AIC ve Metildiazonyum kationunu oluşturur (Şekil 5). Bu maddenin DNA üzerindeki etkisi, DNA'da metil eklentilerinin oluşturulması esasına dayanmaktadır. Metil eklentileri özellikle N7-guanin ve O6-guaninde meydana gelir. İlacın gerçek sitotoksik mekanizması net değildir. TMZ, DNA iplikleri ile çapraz bağ olmadan DNA, RNA ve protein sentezini inhibe edebilir. TMZ'nin kristal yapısı ile ilgili çalışmalar, DNA-TMZ etkileşimine ilişkin moleküler bir model kurulmasına olanak sağlar. Moleküler model, TMZ halkasının açılma oranının DNA dizisine özgü olabileceğini gösterir. Ayrıca, TMZ'nin in vitro malign glioma modellerinde anjiyogenezi inhibe ettiği ve TMZ'nin anti tümör etkisinin kısmen antianjiogenik etkisinden dolayı olabileceği bildirilmiş ancak bu durum tam olarak açıklanamamıştır (Marchesi ve ark., 2007; Ramirez ve ark., 2013). DNA'ya aktarılan metil gruplarının çoğunluğu (%70) N3-guanin bölgelerinde sadece %10'u N3-adeninde ve %5'i O6-guanin'de görünmektedir (Şekil 6) (Spiro ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2012).



Şekil 5. Temozolomid ön ilaç oluşumu (Ramirez ve ark., 2013).



Şekil 6. Metildiazonyum iyonlarının biyolojik kaderi (Ramirez ve ark., 2013).

## 2.5. DNA Tamir Yolakları

Hüresel DNA, çeşitli DNA hasar indükleyicilere maruz kalır. Reaktif oksijen türleri (ROS), ultraviyole (UV) ışığı ve birçok tür kimyasal bunlardan bazılarıdır, örneğin sigarada bulunan karsinojenler *in vivo* olarak iyi bilinen DNA hasarı indükleyicileridir. DNA hasarına karşı savaşmak için normal hücrelerin, endojen ve eksojen DNA hasar indükleyicilerinden korunmalarını sağlayan iç DNA hasar tepkisi (DDR) sistemleri vardır (Harper ve Elledge, 2007; Jackson ve Bartek, 2009; Ciccia ve Elledge, 2010; Lord ve Ash, 2012). DDR sistemleri, DNA onarımı, hücre döngüsü durması, hücre ölümü ve hücre yaşlanması gibi hasarın türüne ve büyüklüğüne bağlı olarak farklı biyolojik prosesler üretmektedir. Hücre döngüsü, DNA onarılabilir durumda ise DNA onarım işlemi sırasında durdurulur. Bununla birlikte, normal onarım

işlemi bozulduğunda veya değiştirildiğinde, DNA hasarı onarılamaz, tümör hücrelerinde hücre ölümü meydana gelir. Sitotoksik anti-kanser ilaçları klinikte, DNA çoğalmasının ardından doğrudan ve dolaylı olarak hücre ölümünü tetiklemek amacıyla hücrelerde DNA hasarını indüklemek için kullanılır. Bu nedenle, tümör hücrelerindeki DNA onarım özelliği, anti-kanser ilacına verilen terapötik tepki ile ilişkilidir ve GB de dahil olmak üzere kanser tedavisi için umut verici hedefler olarak DNA onarım yolları ele alınır. (Madhusudan ve Hickson, 2005; Ding ve ark., 2006; Helleday ve ark., 2008; Al-Ejeh ve ark., 2010; Kondo ve ark., 2010; Alexander ve ark., 2012; Aziz ve ark., 2012; Bouwman ve Jonkers, 2012).

DNA hasarı, DNA hasarının türüne bağlı olarak çeşitli DNA onarım yolları ile onarılır. DNA onarım yolları arasında doğrudan onarım (DR), baz eksizyon onarımı (BER), nükleotit onarımı (NER), yanlış eşleşme onarımı (MMR) ve DNA iplik kopması onarım yolları vardır (Harper and Elledge, 2007; Jackson and Bartek, 2009; Ciccio and Elledge, 2010). Fanconi anemi (FA) yolağı, bölgeler arası çapraz bağlantıları (ICL'ler) onarır. TMZ de dahil olmak üzere kemoterapötik ilaçlar doğrudan DNA çift sarmal kırılmalarını (DSB'ler) oluşturmasa bile, tamir edilmemiş hasarlı bazlar ve nükleotidler sonuçta DSB'lere neden olur. Bu nedenle, DNA çift zincir kopması tamir yolağının kemoterapiye direnç mekanizmaları yönüyle dikkate alınması gerekmektedir (Moeller ve ark., 2009; Reinhardt ark., 2009; Chan and Giaccia, 2011).

### **2.5.1. Metil guanin metil transferaz (MGMT)**

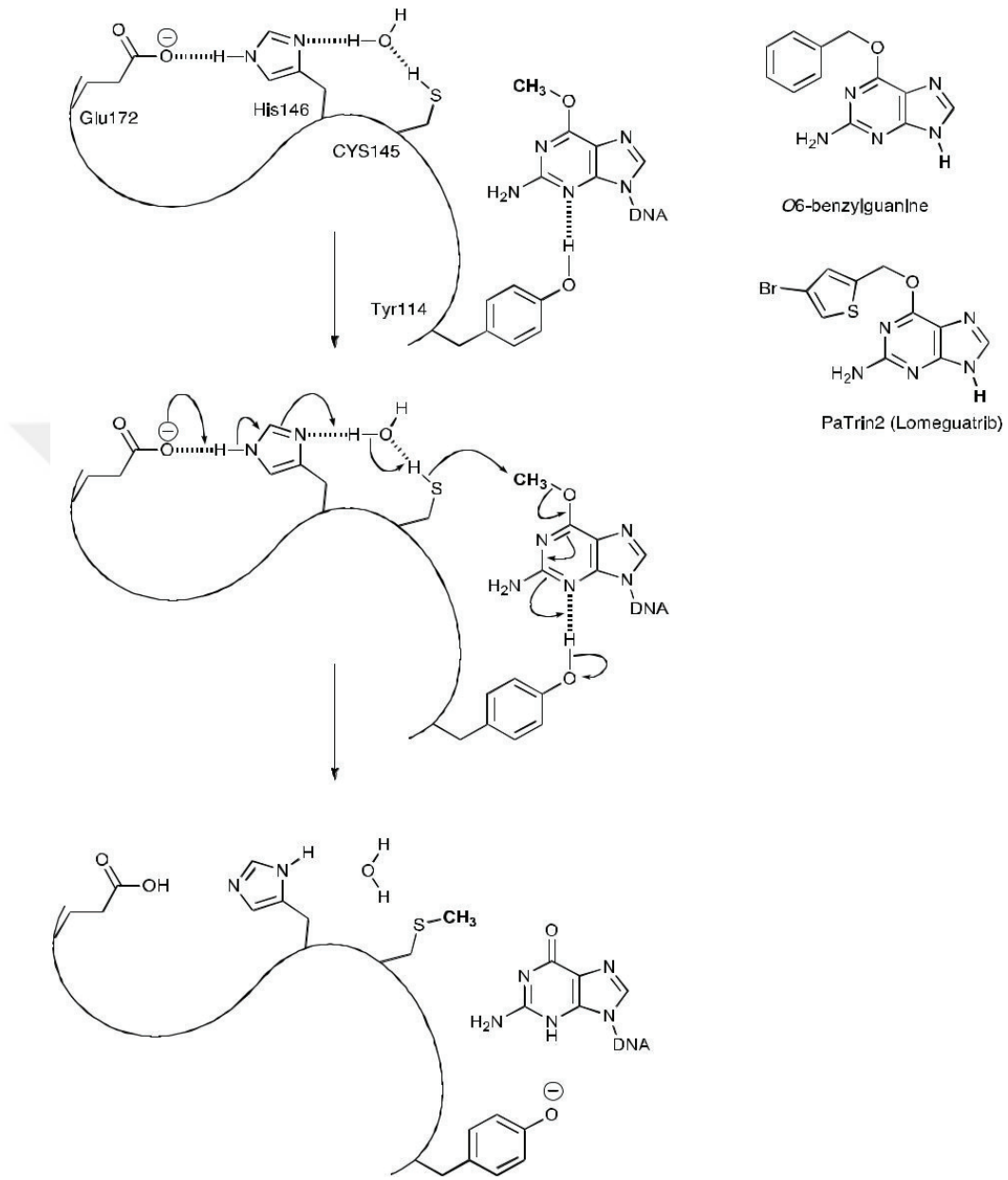
TMZ'ye karşı en iyi bilinen direnç mekanizmasıdır. DNA onarım proteini olan MGMT, O6-MeG lezyonlarından metil gruplarını çıkartarak TMZ tedavisini oluşturur (Park ve ark., 2012). Onarım işlemi sırasında, modifiye edilmiş baz çift sarmal bacadan çevrilir, böylece MGMT aktif alanına girebilir. Enzimin DNA dupleksinde ki pozisyonu bir lizin aminoasidi tarafından sağlanır (Pegg, 2000). Aktif bölgede, sistein 145'ten (insan formunda) reaktif bir tiyolat nükleofili üretir. Bu, O6-MeG'nin C-O bağınu nükleofilik bir süstitüsyon reaksiyonunda tiyoeter ürünü ile sonuçlanır (Şekil 7) (Daniels ve ark., 2000). Bu nedenle MGMT, onarım reaksiyonu sırasında enzim değil stokiyometrik olarak tüketilen bir reaktiftir. TMZ antitümör aktivitesinde, MGMT ile DNA onarımı ilaç direncinin birincil mekanizmasıdır.



MGMT ekspresyonunun, glioma hücrelerinde ve glioma kök benzeri hücrelerde alkilleyici ajanlar olan TMZ ve karmustin'e duyarlılığı ters orantılıdır (Gerson, 2002; Hermisson ve ark., 2006; Sato ve ark., 2011) . Yüksek MGMT seviyelerine sahip farklılaşmış hücre hatları, artmış kemoterapi direnci göstermektedir (Van Nifterik ve ark., 2010; Villalva ve ark., 2012). Lösemi, glioma, yumurtalık ve meme hücre hatlarının tedavisinde , 9H-purin-2-amin (PaTrin-2) (Barvaux ve ark., 2004; Clemons ve ark., 2005; Turriziani ve ark., 2006) kullanılarak MGMT inhibe edilmiştir ve bu durum TMZ tedavisine duyarlılığı arttırmıştır.

Yeni tanı konulan glioblastoma hastalarının yaklaşık %45'inde MGMT promotörü metile durumdadır, ve TMZ tedavisine yanıt için prognostiktir (Hegi ve ark., 2004). MGMT promotör metilasyonu olan hastalara, TMZ ile radyoterapi kombine tedavi uygulandığında sağkalımı arttırmışlardır. MGMT pozitif tümörleri olan hastalar bu ikili tedaviden büyük ölçüde faydalanamamaktadır (Hermisson ve ark., 2006; Stupp ve ark., 2009). MGMT durumunu belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılabilir (mRNA seviyeleri, immünohistokimya ile protein seviyeleri (IHC), promotör metilasyonu ve enzim aktivitesi). Klinik ortamda hangi tekniğin en prognostik değere sahip olduğu belirsizliğini koruyor.

Yeni bir retrospektif çalışmada, Lalezari ve ark. (2013) 410'u TMZ ile tedavi edilen yeni tanı konmuş GB'leri olan 418 hastaya odaklanmışlardır. Tümörlerin MGMT protein ekspresyonu IHC yoluyla, promotör metilasyonu metilasyona spesifik PCR (MS-PCR) ile ve bireysel CpG bölgeleri, bisülfid sekansı (BiSEQ) ile analiz edilmiştir. Düşük MGMT protein ekspresyonu (<%30 pozitif hücreler) ve yüksek promotör metilasyonu OS ve progresyonsuz sağkalım (PFS) ile ilişkilendirilmiştir. MGMT MS-PCR ile MGMT IHC koreledir. Bu veriler, MGMT promotörünün diferansiyel olarak metillenmiş 2.bölgesi (DMR2) içindeki 24 CpG bölgesinin BiSEQ analizi ile daha da doğrulanmıştır. Protein seviyeleri, DMR2'deki metilasyon yoğunluğu ile ters ilişki göstermiştir ve hipermetilasyonun ( $\geq 3$  CpG bölgeleri) yüksek OS ve PFS ile sonuçlandığını göstermiştir. Bu bilgiler ışığında, protein ekspresyonu ve promotör metilasyon analizlerinin birlikte değerlendirilmesi ayrı değerlendirilmesinden daha faydalı olduğu söylenebilir (Lalezari ve ark., 2013).



**Şekil 7.** MGMT'nin etki mekanizması ve klinik olarak test edilmiş iki MGMT inaktivatörünün yapıları (Ramirez ve ark., 2013).

### 2.5.1.1. MGMT terapötik hedefleri

O6-BG, bir benzil grubunu MGMT aktif alanı sistein 145 aminoasidine aktaran, böylece MGMT'yi etkisiz hale getiren ve metil gruplarının DNA'dan ayrılmasını önleyen küçük molekülü bir psödosubstrattır (Pegg , 2000). Faz I klinik çalışmalar O6-BG'nin GB tümörlerinde MGMT'yi etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir, ancak O6-BG ile TMZ kombinasyon halinde tedavisi miyelosupresyon oluşumundan dolayı sınırlıdır (Quinn ve ark., 2005).

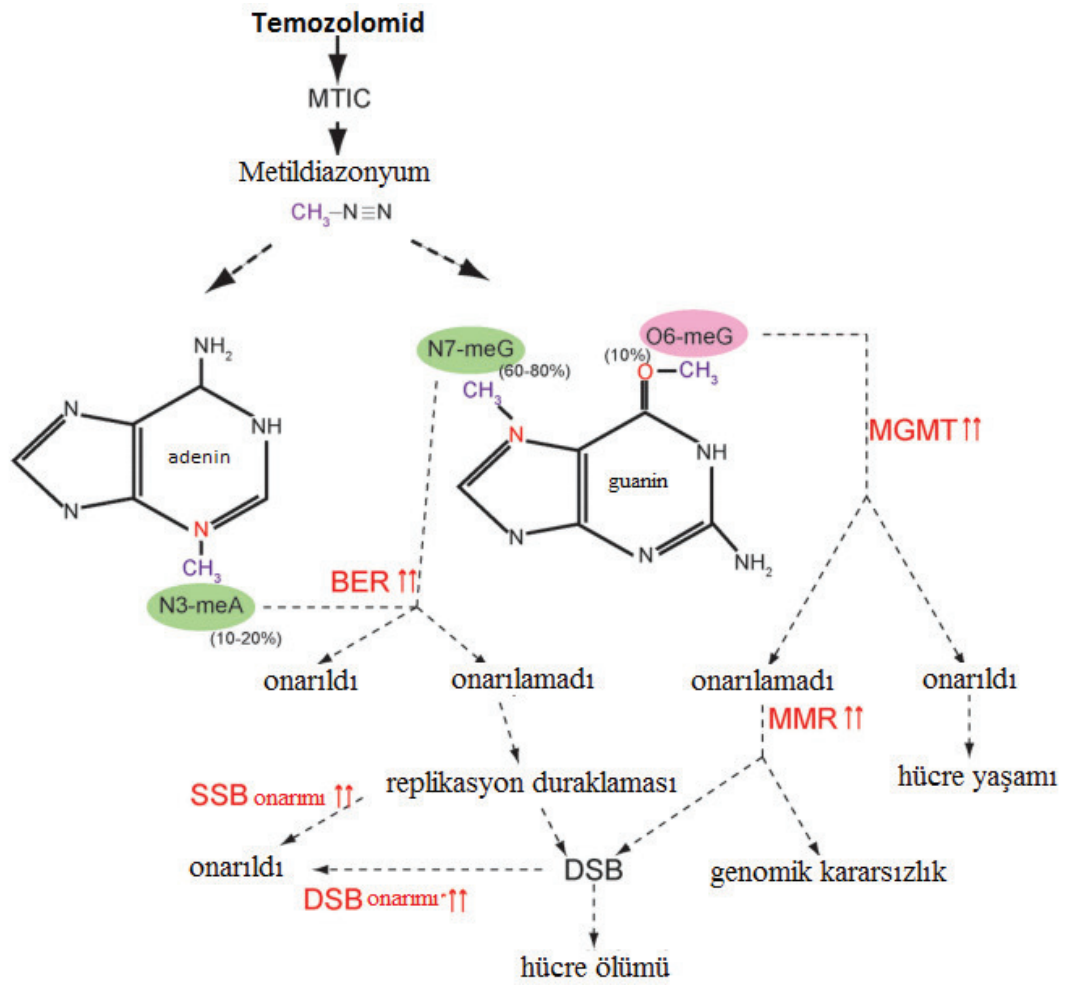
O6-MeG DNA da en az görülen alkilasyondur fakat TMZ tedavisi ile indüklenen majör bir sitotoksik ajandır .Bu nedenle, metil eklentilerini kendi sistein aminoasitlerine aktararak TMZ tarafından üretilen O6-MeG'yi gideren MGMT'nin DR yolağı, TMZ tedavisine tolerans gösterebilir. Bu teori, klinik öncesi çalışan birçok araştırmacı tarafından onaylanmıştır (Pegg, 1990; Gerson, 2004) ve MGMT metilasyonu klinik çalışmada TMZ'ye verilen terapötik duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (Hegi ve ark., 2005; Stupp ve ark., 2009). MGMT inaktivasyonunun, TMZ'ye iyi yanıt veren moleküler bir biyobelirteç olduğu göz önüne alındığında, TMZ duyarlılığını arttırmak amacıyla MGMT aktivitesini azaltmak için çeşitli stratejiler araştırılmıştır (Hegi ve ark., 2008). O6-benzilguaninin (O6-BG) MGMT aktivitesini inhibe ettiği ve TMZ'nin in vitro sitotoksitesini arttırdığı bilinmektedir (Wedge ve Newlands, 1996). Bununla birlikte, son klinik çalışmaların sonucu, O6-BG'nin TMZ ile kombinasyonunun, tekrarlayan ve TMZ-dirençli malign glioma hastaları için klinik yarar göstermediğini göstermiştir (Quinn ve ark., 2009).

Diğer bir yaklaşım olarak, MGMT protein ekspresyonuna doğrudan müdahale etmek için siRNA kullanılır. Bu yöntemle MGMT; glioma hücrelerinde, GB-kök benzeri hücrelerde ve in vivo glioma tümörlerinde etkili bir şekilde azaltılmıştır. Böylece hem in vitro hem de in vivo ortamda MGMT-siRNA, TMZ'ye duyarlılığı arttırmıştır (Kato ve ark., 2010).

Bir başka RNAi yaklaşımı ise küçük saç tokası RNA ile MGMT'yi hedeflemek için lentiviral temelli bir teknoloji kullanmıştır. MGMT, TMZ'ye dirençli glioma kültürlerinde başarıyla inhibe edilmiştir ve bu tümörler farelere aktarıldığında TMZ'ye duyarlılığın arttığı gözlemlenmiştir. MGMT vektörünün GB ksenograftlarına in vivo

transdüksiyonu, MGMT ekspresyonunu azaltmış ve TMZ tedavisinden sonra tümör büyümesini inhibe etmiştir. Bu umut verici bir tedavi gibi görünse de, viral vektörlerin etkinliği ve toksisitesi daha ileri değerlendirmeler gerektirir (Viel ve ark., 2013).

MGMT'nin translasyon sonrası düzenlenmesi 26S proteazomu tarafından gerçekleştirilir ve bu da tedaviye aday olur. Bortezomib (BTZ, PS-341), proteazomu inhibe eden ve MGMT mRNA ve protein seviyelerini belirgin şekilde azaltan bir boronik asit dipeptittir (Vlachostergios ve ark., 2013).



**Şekil 8.** Temozolomid fonksiyonu ve DNA tamir yollarında aktivasyonu (Yoshimoto ve ark., 2012).

### 2.5.2. Yanlış eşleşme tamir yolağı

DNA hasarını ve temel yanlış eşleşmeleri ve ayrıca DNA replikasyonundan kaynaklanan yanlış eklemeleri / silmeleri giderir. MMR'da baz uyumsuzlukları, MLH1 ve PMS2'nin heterodoksik kompleksi ile etkileşime geçerek MSH2 ve MSH6'nın heterodimerleri tarafından tanınır ve böylece onarım işlemi düzenlenir (Şekil 9) (Stojic ve ark., 2004). TMZ'nin indüklediği O6-MeG, MGMT tarafından tamir edilemediğinde onarılmamış O6-MeG, sitozin (C) veya timin (T) ile eşleşebilir. O6-MeG/C veya O6-MeG/T, MMR sistemi tarafından tanınır ve sadece yeni sentezlenen zincirlerde düzeltilebilir. O6-MeG bozulmadan kalır. Başka bir zincir üretildiğinde, bu onarım döngüsü tekrarlanır. Bu “boşuna döngü” DNA sentezi sırasında replikasyon çatalı durmasına neden olur ve sitotoksikite DSB oluşumuna neden olur (Wang ve Edelman, 2006; Fu ve ark., 2012) (Şekil 1). Bu nedenle, MMR yolunun normal işlevi, O6-MeG'nin neden olduğu sitotoksikite için bir önkoşuldur. MMR'nin inaktivasyonu, alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkilerine tolerans ile ilişkilendirilmiştir (Friedman ve ark., 1997; D'Atri ve ark., 1998; Fink ve ark., 1998; Kinsella, 2009).

MSH2, MSH6, MLH1 ve PMS2 gibi MMR genlerinin sadece birkaç gen mutasyonunun keşfedilmiş olmasına rağmen, son araştırmalar, MSH6 mutasyonlarının GB'lerde TMZ tedavisi sırasında ortaya çıktığını ve TMZ direncine aracılık ettiğini ortaya koymuştur. Hunter ve ark. (2006), bir çalışmada MSH6 geninde mutasyon olmadan alkilasyon ajanı verilerek yapılan tedaviden sonra tekrarlayan GB dokularında somatik MSH6 mutasyonları tanımlamıştır, bu da MSH6 mutasyonlarının TMZ'ye klinik direnç gösterdiğini göstermektedir. Ek olarak; Cahill ve arkadaşları (2007), tedavi öncesi GB örneklerinde MSH6 mutasyonlarının görülmemesine rağmen, tekrar nükseden vakaların 14'ünün 3'ünde (% 21) somatik mutasyonlara sahip olduğunu ve 17'sinin 7'sinde (% 41) MSH6 ekspresyonunda azalma olduğunu göstermiştir. Bu durum, TMZ ve radyoterapiden sonra, MSH6 fonksiyon kaybının TMZ tedavisi sırasında tümör nüksüne katkıda bulunduğunu göstermektedir. Daha sonraki çalışmalar, tedavi sonrası TCGA örneklerinde MSH6 mutasyonlarını doğrularken tedavi öncesi mutasyonların bulunmadığını doğruladı ve MSH6 mutasyonlarının in vitro tümör modelinde TMZ direncine aracılık ettiğini göstermiştir (Yip ve ark., 2009). Dahası, Alman Glioma Grubu kısa süre önce MMR proteininin ekspresyonunun azalmasını,

TMZ tedavisinden sonra GB'nin nüksetmesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Felsberg ve ark., 2011).

### **2.5.3. Baz ekleme-çıkarma tamir yolağı**

Baz eksizyon tamiri, DNA'yı oksidasyon, alkilasyon, deaminasyon ve tek zincir kırıklarının (SSB'ler) zarar verici etkilerini ortadan kaldırır. TMZ kaynaklı N7-MeG ve N3-MeA, BER yolu tarafından algılanır ve onarım işlemi başlatılır (Fu ve ark., 2012). BER'in TMZ direncinin toleransında rol oynadığı bildirilmiştir (Trivedi ve ark. 2005). DNA glikosilazlar hasarlı bazları tanımına ve çıkarılmasına ek olarak onarım sürecinin başlatılmasında da rol oynar. 11 tane memeli DNA glikosilazı arasında, N-metilpurin DNA glikosilaz (MPG) [veya alkilpurin-DNA-N-glikosilaz (APNG)], alkilenmiş bazları DNA'dan kesilmesini sağlayan bir DNA glikosilazdır (Jacobs ve Schar, 2012). Hasarlı bazlar DNA glikosilaz ile uzaklaştırıldıktan sonra, apuridik/apirimidinik endonükleaz 1 (APE1), abazik bölgeleri tanır ve DNA'nın 5 ucundan ayırır. Daha sonra, XRCC1-Ligaz III (Lig III) kompleksi ile birlikte DNA polimeraz  $\beta$  (poli  $\beta$ ) onarım işlemini tamamlar (Fortini ve Dogliotti, 2007; Svilar ve ark., 2011) (Şekil 2).

DNA glikosilazlarının ekspresyonu, alkilasyon ajanlarına karşı duyarlılık göstermektedir. Agnihotri ve arkadaşları (2012) son zamanlarda APNG ekspresyonunun TMZ'nin neden olduğu DNA hasarının onarımını modüle ettiğini ve APNG'nin in vitro ve in vivo ortamda GB modellerinde TMZ'ye direnç sağladığını göstermiştir. Ayrıca, APNG'nin GB dokularında epigenetik olarak susturulduğunda APNG'nin, GB hastalarında zayıf genel hayatta kalmayı sağladığını ve bu da APNG'nin TMZ direncinin üstesinden gelmek için moleküler bir hedef olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, poli $\beta$  inhibisyonunun, TMZ'nin neden olduğu toksisiteye olan duyarlılığı arttırmıştır. O halde BER yolunun da, artan TMZ duyarlılığı için terapötik bir hedef olabileceğini göstermiştir (Trivedi ve ark., 2005).

### **2.5.4. Tek zincir kırığı tamir yolağı**

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), SSB'leri tanır ve onarım işlemini başlatır. PARP, NAD<sup>+</sup>, PAR polimerlerinin ve diğer tamir proteinlerinin kovalent bağ

yapmasını katalize eder ve DNA onarım proteinleri hasarlı bölgeye bağlanarak onarım işlemlerini kolaylaştırır (Kim ve ark., 2005; Schreiber ve ark., 2006; De Vos ve ark., 2012; Luo ve Kraus, 2012). SSB'ler PARP tarafından tanındıktan sonra, onarım işlemi BER yolağı ile ortaklaşarak başlatılabilir (Almeida ve Sobol, 2007) (Şekil 2).

PARP, sadece SSB onarımı ile değil aynı zamanda BER yolağıyla da ilişkili olduğundan önemli bir terapötik hedef olmaktadır. PARP aktivitesini inhibe eden hedefe özgü ilaçlar geliştirilmiştir. PARP inhibitörlerinin GB 'yi tedavi etmek için kullanılanlar dahil olmak üzere geleneksel antikanser ilaçların sitotoksitesini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Malanga ve Althaus, 2005; Chalmers, 2010; Heitz ve ark., 2010; Leonetti ve ark., 2012). Klinik öncesi çalışmalarda ki bu terapötik etkilerden dolayı, GB hastaları için PARP inhibitörleri kullanılarak birçok çalışma sürdürülmektedir (Leonetti ve ark., 2012).

Bu çalışmalar PARP inhibitörleri kullanarak DNA'ya zarar veren maddelerin terapötik etkilerini güçlendirmeyi hedeflemektedir. Klinik öncesi çalışmalarda, TMZ ve PARP inhibitörlerinin kombinasyonunun, TMZ'nin GB de sitotoksik etkilerini arttırdığı gösterilmiştir (Tentori ve ark., 2003). Ek olarak, PARP inhibisyonunun MMR eksikliği olan hücrelerde TMZ direncinin üstesinden gelebileceği gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2005). Bu umut verici sonuçlara dayanarak, GB için PARP inhibitörlerinin birkaç klinik denemesi yapılmış ve TMZ'nin terapötik etkisini arttırdığı görülmüştür. (Yoshimoto ve ark., 2012).

PARP inhibitör tedavisi için umut vaat eden bir diğer strateji, sentetik ölümcül kavramı altında monoterapidir (Mangerich ve Burkle, 2011). PARP inhibisyonunun, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonuna sahip meme ve yumurtalık kanserleri için önemli bir sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. (Farmer ve ark., 2005). BRCA mutasyonu olan tümörlerde, DSB onarım yolu olan homolog rekombinasyon (HR) prosesi ile bozulmaktadır. Bu nedenle, DNA onarım işlemi PARP onarım yolağına bağlıdır ve PARP inhibisyonunun tümör hücreleri üzerinde zararlı etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Her ne kadar bu sentetik öldürücü yaklaşım umut verici bir tedavi gibi görünse de, BRCA mutasyonu GB'de nadiren bildirilmektedir (Parsons ve ark., 2008). Bununla birlikte, son zamanlarda, tümör baskılayıcı PTEN'in mutasyonunun, HR

onarım yolağının bozulması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yoshimoto ve ark., 2012). PTEN mutasyonunun GB hastalarının yaklaşık üçte birinde tanımlandığı göz önüne alındığında PARP inhibitör monoterapisinin PTEN mutasyonlu GB için etkili bir tedavi stratejisi olma potansiyeli vardır. Son zamanlarda, bazı klinik öncesi çalışmalar, HR yolağının yukarı düzenlenmesinin, TMZ ve PARP inhibitörünün kombinasyonuna karşı duyarlılığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir PTEN mutasyonlu GB'de HR'nin durumunu ve bir PARP inhibitörü ile kombinasyon halinde TMZ'ye cevabını değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Yoshimoto ve ark., 2012).

### **2.5.5. Çift zincir kırığı tamir yolağı**

Çift zincir kırıkları iki ana mekanizma ile onarılır: homolog olmayan birleştirme (NHEJ) ve HR (Şekil 9). NHEJ, hücre döngüsü esnasında DNA'nın künt uçlarını onarır ve hücre döngüsünden bağımsız olarak rekombinasyon için kalıp olmasa bile DSB'yi onarır. Buna karşılık, HR yolağı, kalıp olarak kardeş-kromatid dizileri kullanarak homoloji aracılı rekombinasyon işlemleriyle DSB'yi onarır. Bu nedenle, HR sadece hücre döngüsünün S ve G2 fazlarında çalışır, bu da HR'nin sadece çoğalan tümör hücrelerinde işlev görebileceğini gösterir. Topoizomeraz II inhibitörü ve radyoterapi hariç, alkilasyon ajanları ve replikasyon inhibitörleri gibi anti-kanser ilaçlarının çoğu doğrudan DSB'yi indükleyemez. Bununla birlikte, sitotoksik ilaçların zarar verdiği bazılar, BER veya tek iplikçikli onarım yolu tarafından tamir edilmediğinde, DNA replikasyon hataları, replikasyon stresine (replikasyon durakları veya replikasyon çatalının çökmesi) neden olur ve bunların sonucunda DSB oluşur. Yapılan çalışmalar HR yolağının, replikasyon stresinden sonra oluşabilen DSB'lerin onarımına aracılık etmede önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Roy ve ark., 2012). Teorik olarak, TMZ dolaylı olarak DSB'yi tetikleyerek tümör hücresi ölümünü indükler. Birlikte ele alındığında, tümör hücresindeki DSB onarım aktivitesinin durumunun TMZ tedavisine klinik cevabı belirleme potansiyeline sahip olabilir. DSB onarım proteinlerinin klinik öncesi GB modellerinde TMZ'ye duyarlılığını belirlemede önemli rolünün olduğu birkaç çalışma mevcuttur.

Hasar oluşuktan sonra birkaç dakika içerisinde; NHEJ yolağı devreye girer. Ku70/80 proteinleri tarafından kırık tespit edilir. Oluşan boşluğu kapatmak için XRCC4



ve DNA ligaz IV (Lig IV) toplanır, protein kinaz DNA-PKcs ile bağlanır. Böylece DSB körelir.

Homolog rekombinasyon, iki uçlu DSB'de 5'-3' rezeksiyonla başlatılır ve tek iplikli DNA üretilir. MRE-11-RAD50-NBS1 (MRN) kompleksi, DSB'nin bir sensörü olarak işlev görür ve uçlarda ki kırılmaya bağlanır. Ataxia telanjiektazi mutasyonlu (ATM) ve fosforile edilmiş H2AX ettiği kırılma bölgelerine alınır. DNA hasarı kontrol noktası proteini 1 (MDC1)  $\gamma$  H2AX'e bağlanır ve bir rekombinasyon işlemi başlar (Şekil 9). İki uçlu DSB'nin aksine, DNA replikasyon stresinin, tek iplikli DNA üreten tek uçlu DSB'ye neden olduğu bilinmektedir. Bu durumlarda ATM ve Rad3 ile ilişkili (ATR) sinyalleri, HR tarafından bir uçlu DSB'yi onarmak için etkinleştirilir. Tek iplikli DNA, kırık bölgeye ATR ve ATR ile etkileşime giren proteini (ATRIP) toplanmasıyla, alan replikasyon proteini A (RPA) tarafından bağlanır. Bu kompleksin hazırlığında, Rad17 ve 9-1-1 sonradan eklenir. Sonunda ATR-ATRIP yolağı, DNA topoizomeraz II bağlayıcı protein 1 (TOPBP1) yardımıyla aktive edilir. HR yolağına, efektör proteinleri Rad51 ve Rad52 ile birlikte BRCA1, PALB2 ve BRCA2 proteinleri aracılık eder (Şekil 9) (Yoshimoto ve ark., 2012).

Daha önce açıklandığı gibi, TMZ indüklenmiş O6-MeG sonucu oluşan yanlış eşleşme boşuna döngüye sebep olur ve sonucunda DSB oluşur. Ek olarak, TMZ, doğrudan DSB oluşturmamasına rağmen, TMZ'nin, HR'yi bilinen bir DSB indükleyicisi olan iyonlaştırıcı radyasyondan 10 kat daha fazla tetikleyebileceği rapor edilmiştir (Helleday, 2010). Bu sonuçlar, DSB yolunda yer alan sinyalizasyon moleküllerinin TMZ duyarlılığına aracılık etmede rol oynadığını göstermektedir. Aslında, DSB yolağında yer alan tüm sinyal proteinlerinin NBS1 (MRN kompleksinin bir üyesi), Rad51 ve BRCA2'nin, in vitro tümör modelinde TMZ duyarlılığının modülatörleri olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, çeşitli araştırmalar, MMR yolağında; ATM, ATR ve MRN proteinlerinin, TMZ'nin neden olduğu G2 fazında durdurma ve sitotoksisteye katkıda bulunabileceğini göstermiştir, bu moleküllerin TMZ direncinin üstesinden gelmek için potansiyel hedefler olabileceğini düşündürmektedir (Caporali ve ark., 2004; Yoshimoto ve ark., 2012).

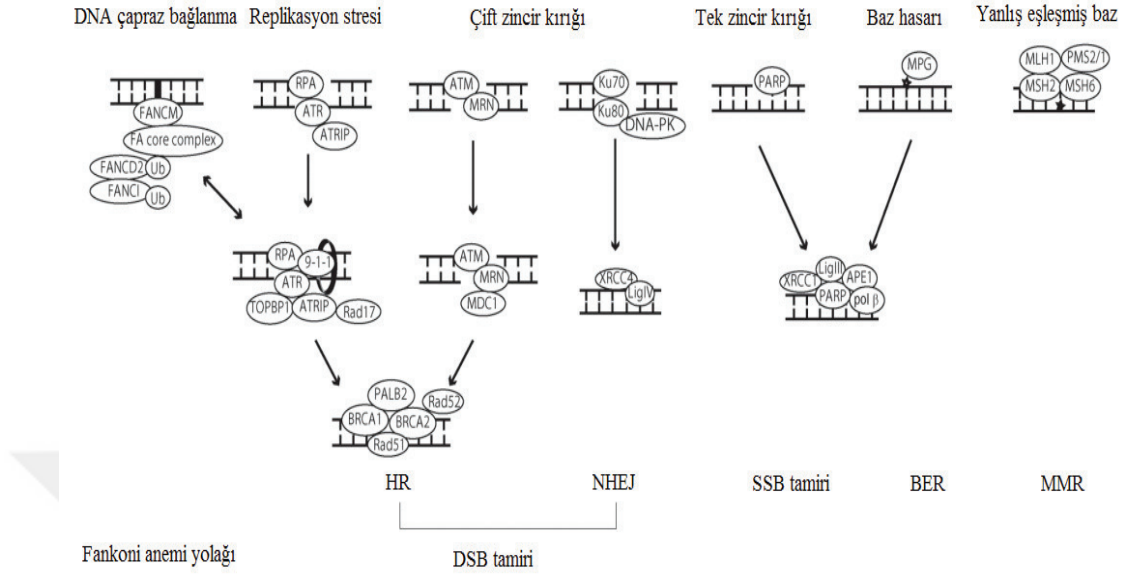
### 2.5.6. Fankoni anemi yolağı

Fankoni anemi, ana organ sistemlerindeki gelişimsel anormallikler, kemik iliği yetmezliği ve kansere yüksek yatkınlık ile karakterize edilen genomik kararsızlık sendromudur (D'Andrea ve Grompe, 2003). FA'nin şu anda bilinen 15 FA gen ailesinden en az birinin mutasyonundan kaynaklandığı bilinmektedir. FA yolağının, sisplatin ve topoizomeraz inhibitörleri tarafından çapraz bağlanan DNA'nın zincirlerinin onarımında ve bu ilaç türüne karşı direncin oluşmasına aracılık ettiği düşünölmektedir. Bununla birlikte, son zamanlardaki çalışmalar FA yolağının alkilasyon hasarlarının onarım sürecinde ve alkilasyon ajanlarının terapötik duyarlılığının belirlenmesinde rol oynayabileceğini göstermiştir (Chen ve ark., 2007).

FA yolağında, FANCM, DNA ICL'sini tanır ve hasarlı bölgeye sekiz FA çekirdek kompleksi (FANCA/B/C/E/F/G/L/M) alarak onarım yolağını başlatır. FA çekirdek protein kompleksi , monoubikitine FANCD2 ve FANCI ile birlikte, BRCA1, BRCA2 (FANCD1), PALB2 (FANCN) ve FANCI (BACH1 / BRIP1) gibi DNA onarım proteinleri ile etkileşime girerek, onarımı sağlar (şekil 9) (Kee ve D'Andrea, 2010).

Chen ve ark. (2007), FANCD2 monoubikitinasyon inhibisyonunun glioma hücre hattını TMZ'nin sitotoksik etkilerine duyarlı hale getirdiğini ve FA yolağının TMZ direncinde bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca, son zamanlarda yapılan diğer çalışmalar, BRCA2'nin (FANCD1), TMZ tarafından indüklenen DNA hasarının onarımında baskın bir rol oynadığını ve BRCA2'nin inhibe edilmesinin, glioma hücre hatlarını TMZ tedavisine karşı duyarlı hale getirdiğini göstermiştir (Yoshimoto ve ark., 2012).

DNA onarım mekanizmaları dışında başka faktörler de kemoterapötik dirence yol açabilmektedir (Xi ve ark., 2015; Murphy ve ark., 2016; Li ve ark., 2017) . Yapılan çalışmalar leptinin hücreleri genel olarak S fazına sürüklediği ve hücre proliferasyonunu arttırdığını göstermiştir (Saxena ve ark., 2007; Catalano ve ark., 2009; Lawrence ve ark., 2012; Han ve ark., 2017). Bundan dolayı, replikasyon aşamasında etki gösteren TMZ'nin leptin varlığında etkisinin artması beklenmektedir. Bu tez çalışmasında leptin molekölü kemoterapötik dirençte ki rolü belirlenmesi amacıyla seçilmiştir.



Şekil 9. DNA tamir yolları (Yoshimoto ve ark., 2012).

## 2.6. Leptin Hormonu

Zhang ve arkadaşları tarafından ilk kez 1994 yılında keşfedilen leptin, adını Yunanca leptos (ince) kelimesinden alan, sitokinlere benzeyen ve 167 aminoasit içeren protein yapısında bir hormondur (Zhang ve ark., 1994; Pelleymounter ve ark., 1995). Leptin, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda bulunan (7q31) ob/ob geni tarafından kodlanmaktadır. Leptin ob (obese) gen ürünü olup, başlıca adipositlerden kaynaklanan bir hormondur. Yapısal olarak uzun zincirli helikal sitokin yapısındadır. Leptin, Interleukin-2 (IL-2), IL-12 ve Growth Hormon (GH) ile benzer yapıdadır. Ayrıca, sınıf I (Class I) sitokin reseptör ailesi, leptin reseptörü (Ob-R) ile benzerlik göstermektedir. Yapılan son çalışmalarda, Ob-R'nin de bu ailenin bir üyesi olduğu gösterilmiştir (Tartaglia ve ark., 1995).

Leptin, insanda, başlıca adipoz doku tarafından salınmakla birlikte mide fundusunda, iskelet kaslarında, karaciğerde, plasentada, kalpte, yumurtalıklarda, meme bezlerinde ve gastrik epitelyumda da ifade edildiği gösterilmiştir (Baratta M., 2002; Green ve ark.,1995; Cioffi ve ark., 1997; Smith-Kirwin ve ark.,1998).

Leptin, hücresel fonksiyonlarını hücre membranında bulunan reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. Leptinin vücuttaki başlıca rolü, beyin (özellikle hipotalamus) üzerine negatif “feedback” etki ile gıda alımını ve enerji metabolizmasını düzenlemek ve obezite gelişmesini engellemektir. Bunun yanı sıra, leptinin hem beyin hem de periferik dokularda yerleşik reseptörlere sahip olduğu ve bu reseptörler aracılığıyla organizmada birçok fonksiyonun düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir. Bu fonksiyonları; beslenme, genel metabolizma düzenlenmesi, immun sistem düzenlenmesi, üreme sistemi gelişimi, kemik dansitesi, beyin gelişimi, hemodinami, solunum fonksiyonu, anjiyogenez, osteogenez, sempatik sinir aktivitesi ve karaciğerde insülin-ilişkili fonksiyonların düzenlenmesi şeklinde özetlenebilir (Schwartz ve ark., 1996; Lin ve ark., 2018).

Bilinen leptin reseptörlerinin tümü aynı genin varyantlarıdır. Buna göre leptin reseptörleri OB-Rb (uzun reseptörler) ve OB-Ra (kısa reseptörler) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. OB-Rb reseptörleri sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptirler ve en çok hipotalamusta (nükleus arkuatus) bulunmalarına rağmen vücudun diğer dokularında da (akciğer, böbrek, karaciğer, iskelet kası, kalp, testis, hematopoetik hücreler, yağ dokusu) daha az miktarlarda saptanmışlardır. Kısa form reseptörler (OB-Ra) ise intrasellüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde rolleri çok az veya yoktur. OB-Ra reseptörlerinin bulunduğu başlıca dokular ise böbrek, akciğer, pleksus koroideus ve beyin kapillerleridir. Beyin kapillerleri ve pleksus koroideus’da OB-Ra reseptörlerinin bol olarak bulunması, kısa form reseptörlerin leptinin merkezi sinir sistemine transportunda önemli görevleri olduğunu düşündürmektedir (Tartaglia, 1997). Çünkü, yukarıda belirtilen leptin fonksiyonlarının büyük bir kısmı, merkezi sinir sistemi (MSS) aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu nedenle, leptinin merkezi sinir sisteminde ki etkileri çok daha yaygındır. Leptin eksikliğinde beyin ağırlığında azalma ve nöronlarda yapısal bozuklukların ortaya çıktığı belirlenmiştir (Schwartz ve ark., 1996).

### **2.6.1. Leptin hormonunun kanser ile ilişkisi**

Son yıllarda, leptin kanser ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda, leptinin tümörjenez ve gelişme ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Han ve ark., 2017; Khabaz

ve ark., 2017; Lin ve ark., 2018). Adipositlerden kaynaklanan obezite geninin bir ürünü olarak leptin, tümörigenezis, anjiogenezis ve metastaz ile ilgili güçlü bir anjiyojenik faktör olarak tanımlanır ve maling karsinomada ki leptin reseptörünün (ObR) ekspresyonunun tümör neoanjiyogenezi ile anlamlı bir şekilde uyumlu olduğu teyit edilmiştir (Han ve ark., 2017; Khabaz ve ark., 2017).

Iwaniec ve ark. (1998)'nin yaptığı bir çalışmada, insan endotelial hücrelerinde leptin reseptörlerinin olduğu ve leptinin anjiyogenezisi hem in vitro hem de in vivo indüklediği saptanmıştır (Iwaniec ve ark., 1998).

Zheng ve ark.(2011)'tarafından yapılan çalışmada, leptinin lepRB (leptin reseptör) ifade eden kanser hücrelerinin kök hücre özelliği gösterebileceği ve tümör hücrelerinin canlılığını tetiklediği bildirilmiştir (Zheng ve ark., 2011).

Leptinin normal ve tümör hücre büyümesini uyarması, hücrenin yayılım ve invazyonuna katkıda bulunması ve angiogenezisteki artırıcı rolü nedeniyle östrojen bağımsız meme kanseri gelişiminde rolü olabileceği bildirilmiştir (Topal , 2004).

Beyin tümörünün evresinin, invazyonun ve farklılaşmanın leptin ekspresyonuyla ilişkili olduğu belirtilmektedir (Ribatti ve ark., 2008; Hui ve ark., 2011).

İnsan glioblastoma hücrelerinde normal sağlıklı beyin hücrelerine göre daha fazla leptin ve leptin eksprese edildiği ve otokrin etki ile leptinin hücre proliferasyonunu tetiklediği bildirilmiştir (Lawrence ve ark., 2012).

Hücre kültürü ortamında insan GB hücrelerinin, endotel hücrelerinde büyüme ve pro-anjiyojenik etkilere neden olan biyolojik olarak aktif leptin ürettiğini gösterilmiştir (Han ve ark., 2017).

Leptin, birçok hücre tipinde metabolik ve neoplastik aktiviteleri düzenleyen çok işlevli bir sitokin olduğu, leptin ve reseptörünün (ObR) farklı insan beyin tümörlerinde aşırı eksprese edildiği ve bunların GB'de malignite derecesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2005; Riolfi ve ark., 2010; Scolaro ve ark., 2010). Ayrıca, leptinin, LN229 ve LN18 glioma hücrelerinde, mitojenik ve anjiyojenik faktör olarak hücre göçünü indüklediği bildirilmektedir (Ferla ve ark., 2012).

Leptinin U87-MG tümör hücrelerinin büyümesini zamana ve doza bağımlı olarak önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Leptinin, hücrelerin G0/G1 fazından S faz geçişini ve DNA sentezini arttırdığı ancak apoptoz üzerinde herhangi bir etki yapmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, leptinin Jak/STAT3 sinyal yolağını kullanarak U87-MG glioblastoma hücrelerinin büyümesini arttırdığı ve bu nedenle leptin yolağının glioblastom için yeni bir kemoterapötik hedef olabileceği belirtilmektedir. (Han ve ark., 2012).

Leptin reseptörü (ObR) pozitif (+) kanser hücrelerinde leptinin hücre proliferasyonuna, göçüne ve invazyonuna doğrudan katkı sağladığı ve TMZ dirençli hücrelerde ObR ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmiştir (Han ve ark., 2013).

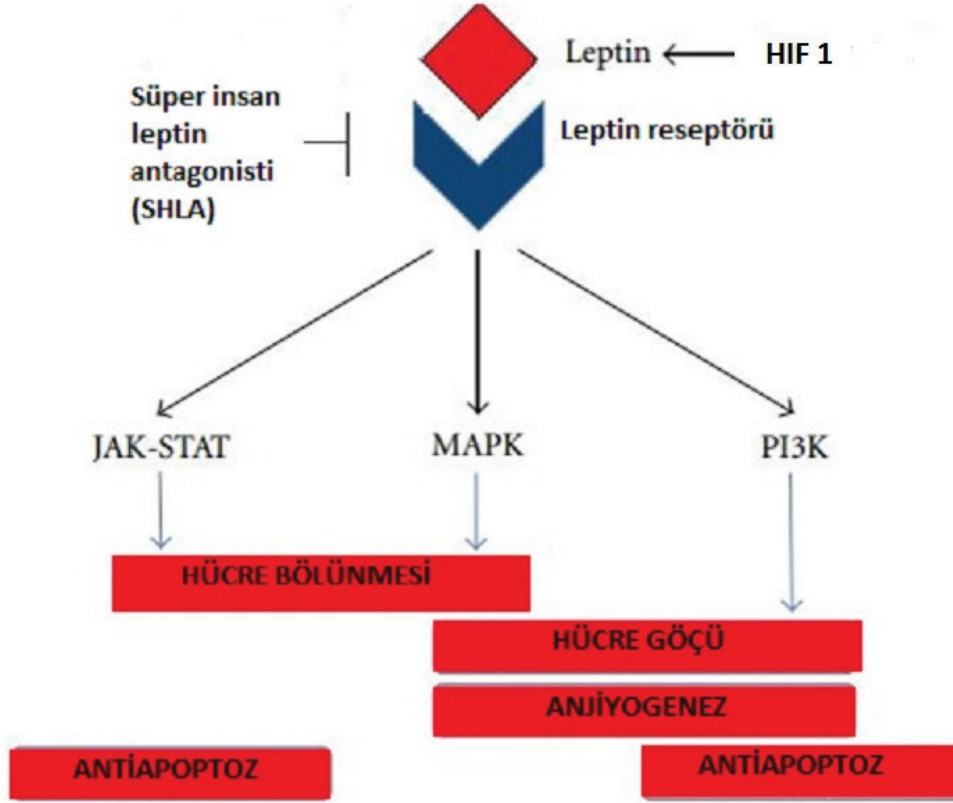
Sistemik leptin kanserli büyüme üzerinde etkili olabilirken, leptin ayrıca çeşitli tümör tipleri tarafından salgılanan bir parakrin faktörü olarak lokal olarak hareket eder ve bitişik kanserli hücrelerde sistemik leptinden bağımsız olan leptin reseptörlerine bağlanmaktadır. Leptin veya reseptörünün aşırı ekspresyonu yumurtalık, kolorektal ve meme kanseri dahil birçok kanserde meydana gelir ancak leptin, tümörü çevreleyen dokuda bulunmamaktadır (Choi ve ark., 2005; Koda ve ark., 2007; Pi-Sunyer, 2009).

Leptinin, onkomodülatör olduğu, kolon kanseri, prostat kanseri, neuroblastoma ve glioblastoma' da invazifliği ve agresifliği arttırdığı gösterilmiştir. Beyin tümörlerinde leptin ve leptin reseptörü aşırı eksprese edilir ancak normal beyin dokusunda ve düşük dereceli tümörlerde eksprese edilmez. GB ve anaplastik astrositomda Riolfi'nin çalışmasından elde edilen 87 örneğin% 80.5'i leptin ve reseptörü için pozitif olduğu, düşük dereceli beyin tümörleri (gangliogliomalar ve 1. ve 2. astrositomlar) daha düşük leptin ve reseptörü ekspresyon düzeylerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile, leptin ve leptin reseptörü arasında beyin tümörü malignitesi ile anlamlı bir ilişki olduğunu bildirilmiştir (O'Brien ve ark.; 1999; Deo ve ark., 2008; Ratke ve ark., 2010).

Leptinin anti-apoptotik yolların aktivasyonunda rol aldığı belirtilmiştir. SiRNA kullanılarak leptin ekspresyonunun %50 azaltılmasının, in vitro ortamda sıçan C6 GB hücrelerinin apoptozisini arttırdığı gösterilmiştir. MAPK ve JAK/STAT yolunun proliferasyona aracılık etmek için leptin tarafından aktive edildiği bilinmektedir (Şekil 10). Leptin apoptozise karşı korumak için PI3K yolunu aktive etmektedir. Leptinin

GB'deki insanlardaki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. GB'deki leptinin doğrudan etkileri belirsiz olsa da, siRNA tarafından inhibe edildiğinde leptin reseptörünün (STAT3) akış aşağı sinyal yollarından biri insan GB hücrelerinde hücre çoğalmasını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Cross ve Claesson-Welsh, 2001; Russo ve ark., 2004; Brown ve ark., 2005; Pérez-Pérez ve ark., 2008; Gao ve ark., 2009).

Leptinin ayrıca PI3K ve MAPK yolları üzerinden anjiyojenik faktör olarak etki ettiği, ayrıca vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'nin ekspresyonunu arttırmak için sinerjistik olarak davrandığı gösterilmiştir. Hem VEGF hem de leptin, hipoksi sırasında artış gösterir. GB'nin mikro-ortamı, %0.1 kadar az oksijenle aşırı derecede hipoksik olabileceğinden dolayı önem taşır. Artmış hipoksi, tümörün agresifleşmesi ile ilişkilendirilmiştir (Evans ve ark., 2004). Anjiyogenez, hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF) 1 ve 2'deki artışlara aracılık eder. HIF'in bu iki alt familyasından, HIF 2 kronik hipoksi sırasında artmakta ve HIF 1, akut hipoksi sırasında artmaktadır, anjiyogenezde daha büyük bir rol oynamaktadır. Anjiyogenez, hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF) 1 ve 2'deki artışlara aracılık eder. HIF'in bu iki alt familyasından, HIF 2 kronik hipoksi sırasında artmakta ve HIF 1, akut hipoksi sırasında artmaktadır ve anjiyogenezde daha büyük bir rol oynamaktadır. Hipoksi kaynaklı leptin ekspresyonu, kolorektal kanserde ve ayrıca adipoz dokuda tanımlanmıştır (O'Brien ve ark.; 1999).



**Şekil 10.** Leptin reseptörü (ObR) aktivasyonu ile kanser tarafından ortak hücre sinyal yolları. Yollar, Janus Kinase (JAK), Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon 3'ün Aktivatörü (STAT) ve Mitogen Aktive Protein Kinaz (MAPK) sinyal kaskadını içerir, bunların ikisi de hücre çoğalmasına neden olur. MAPK ve Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) sinyal yolu, her ikisinin de göçü ve anjiyogenez veya vaskülarizasyonunu artırarak invazivliğe yol açar. Ayrıca PI3K ve JAK-STAT yolu apoptoz direnci sağlar. Leptinin inhibisyonu, leptinin reseptörüne bağlanmasını inhibe eden Süper insan leptin antagonisti ve HIF 1 boyunca hipoksi ile leptin gen ekspresyonunu arttırırken, leptin ve leptin reseptörü gen ekspresyonunu aşağı indiren regüle agonisti içerir (Cook, 2014).



## 2.6.2. Leptin hormonunun çeşitli ilaçlar ile ilişkisi

Leptin, onkomodulator rolüne bağlı olarak çeşitli kanser tedavilerine direnç sağlamada rol oynadığı düşünülmektedir.

Leptinin, muhtemelen JAK-STAT yolağının aktivasyonu ile meme kanserinde anti-östrojen ICI 182,780'in etkinliğini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu etkiler obezitenin (dolaşımdaki leptinin artması) anti-östrojen tedavisine direnci arttırdığını gösteren klinik verileri desteklemektedir (Cook, 2004).

Leptinin, kolon kanserinde 5'florourasil (5-FU) sitotoksitesini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum leptinin apoptotik dirençte rol aldığını düşündürmektedir (Meleń-Mucha ve Lawnicka, 2007).

Bevacizumab, kolon kanserinde kullanılan bir anti-VEGF ajanıdır. GB'de Bevacizumab, sağkalımda 6 ayda %32'den %42'ye kadar değişiklik sağlar. VEGF inhibisyonundan dolayı oluşabilecek yüksek akut hipoksi, bağımsız olarak bir anjiyojenik faktör olarak işlev görebilen leptin ekspresyonunu tetikleyebilir ve tümör vaskülerize olur (Guiu ve ark., 2010; Renehan, 2010).

Leptin birçok kanserde bir oncomodulator rolü oynadığından ve mevcut tedavilere direnç sağlayan GB'de oldukça yaygın olduğu için, leptinin GB'deki rolünü araştırmak çok önemlidir (Chamberlain, 2011).

GB'de yeni bir tedavi diyabetik ilaç metformindir. Klinik çalışmalarda metformin, genel sağkalımda 14.6-12.1 ay arasında orta düzeyde artışlar sunmuş ve GB hastalarında 2 yıllık sağkalımı %16 artırmıştır (Soritau, 2011). Metformin, insanlarda serum leptin seviyesini azaltır (Kim, 2006). Ayrıca, metforminin GB hücre hatlarında leptin uyarımı ile ilişkili büyüme ve göçü azalttığı gösterilmiştir. Metforminin GB üzerindeki etkilerinin son bir bulgusu, tümör başlatan hücrelerin veya kanser kök hücrelerinin (CSC) inhibisyonudur (Ferla, 2012). Metformin ile tedavi edildiğinde CSC proliferasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Würth ve ark., 2013). Bu gözlemlenen etkiler, metforminin leptin üzerindeki etkilerinden de kaynaklanıyor olabilir. Tüm bu veriler

anti-leptin tedavisinin daha fazla araştırılması gerektiğini düşündürmektedir (Cook, 2014).

### **2.6.3. Leptin hormonunun kanser kök hücresi ile ilişkisi**

Kanser kök hücresi (CSC), GB'de nüks nedeni olan mevcut tedavilere dirençli küçük bir hücre popülasyonudur. Farklılaştırılmış tümör hücreleri bir tümör oluşturamazken, CSC'ler, farelere az sayıda hücre (<100) enjekte edildiğinde tümörü tekrar sağlayabilir (Galli ve ark., 2004). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada GB'de; leptin reseptörünün, CSC'de, farklılaştırılmış tümör hücrelerine kıyasla daha yüksek bir dereceye kadar eksprese ettiği gösterilmiştir (Han ve ark., 2014). Ayrıca Meme CSC'si farklılaşmış tümör hücrelerine kıyasla daha yüksek leptin reseptörü seviyelerine sahiptir. Meme tümörlerinde, kök hücre çoğalması ve yenilenmesi için leptine ihtiyaç vardır (Guo ve ark., 2012). Transgenik farelerden türetilen ve daha sonra leptin eksikliği bulunan farelere (ob/ob fareler) ortotopik olarak enjekte edilen meme kanseri hücreleri, yabancı tip fareler kadar etkili bir tümör oluşturmamıştır (Zheng ve ark., 2011). Ayrıca db/db farelerde (yüksek leptinli, ancak fonksiyonel olmayan leptin reseptörlerine sahip obez fareler), yabancı tip obez farelere kıyasla kanser kök hücrelerinin ortotopik enjeksiyonları yapıldığında tümör oluşumunun arttığı göstermiştir. GB CSC'de, Stat3'ü inhibisyonu aracılığıyla proliferasyonun inhibe edildiği ve CSC, Stat3 inhibisyonundan sonra kendi kendini yenileme yeteneğini geri kazanamadığı tespit edilmiştir (Sherry ve ark., 2009).

Son dönemlerde GB tedavisinde ortaya çıkan kemoterapötik direnci önlemek amacıyla TMZ ve TMZ benzeri kemoterapötik ilaçların etkisini arttırmak amacıyla, başka bir molekül veya moleküller ile beraber kullanımı ön plana çıkmaktadır (Kardosh ve ark., 2008; Friedman ve ark., 2009; Stupp ve ark., 2014). Yukarıda sözü edilen çalışmalar göz önüne alındığında leptin, GB gibi agresif tekrarlayan kanserlerin tedavisi için önemli bir araştırma alanı olmaya adaydır. Bu tez çalışmasında leptinin etkisini araştırmak için mevcut leptin antagonistleri içerisinde en etkili çalışan antagonist olan SHLA seçilmiştir (Shpilman ve ark., 2011; Candelaria ve ark., 2017).

## 2.7. Süperaktif İnsan Leptin Antagonisti

Son dönemlerde yapılan çalışmalar leptinin kanser ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum leptin antagonistlerinin geliştirilmesi ve bunların kanser tedavisinde kullanılarak yeni bir tedavi yaklaşımının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Laboratuvar ortamında çeşitli leptin antagonistleri üretilmiştir.

Leptinin mutant proteinleri, leptin dizisinin rastgele mutasyona uğratılarak üretilmiştir ve mayalarda yüksek afiniteli leptin varyantları kullanılarak gösterilmiştir. Süperaktif fare leptin antagonisti (SMLA) ve süperaktif insan leptin antagonisti (SHLA) adlı iki mutant antagonisti, 23. pozisyonda aspartat amino asidi yerine lösin amino asidi getirilerek elde edilmektedir yani bir Asp23 mutasyonunun eklenmesiyle yapılmıştır. 4 aminoasit mutasyonu (D23L/L39A/D40A/F41A) içeren bu antagonistlerin, Ob-R için 60 kat arttırılmış afiniteye sahip olduğu gösterilmiştir ve 3 aminoasit mutasyonu (L39A/D40A/F41A) gösteren orijinal leptin antagonistine kıyasla 14 kat daha büyük antagonistik etki gösterir (Shpilman ve ark., 2011; Candelaria ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında insan kökenli GB hücre serileri kullanıldığı için leptin antagonisti olarak SHLA seçilmiştir. Leptin antagonistlerin kemoterapötik yanıtı olan cevabına ilişkin hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deneyleri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Kullanılan hücre serileri

Tez çalışmasında 3 adet glioblastoma hücre serisi kullanılmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre serileri.

	LN405	T98G	U373 MG
<b>Organizma</b>	İnsan	İnsan	İnsan
<b>Cinsiyet, yaş</b>	Kadın, 62	Erkek, 61	
<b>Doku</b>	Beyin	Beyin	Beyin
<b>Morfoloji</b>	Fibroblast	Fibroblast	Astrosit
<b>Yüzey tutunumu</b>	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler
<b>Tümörjenik</b>	Hayır	Hayır	
<b>Karyotip</b>	Hipertetraploid ve poliplid (%37)	Hiperpentaploid	
<b>Besi yeri</b>	DMEM (High glukoz)-%10 FBS	RPMI-1640, %10 FBS	DMEM (düşük glukoz)-,%10FBS
<b>Besi yeri yenileme süresi</b>	Haftada 2 kez	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez
<b>Pasaj metodu</b>	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA
<b>Ayrırma oranı</b>	1:2-1:3	1:3- 1:10	1:2- 1:5
<b>Biyogüvenlik düzeyi</b>	1	1	1

##### 3.1.2. Hücre kültürü

Hücre kültürün uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Temozolomid	Sigma	T2577 (25mg), HPLC
Leptin	Sigma	Leptin insan, L4146
SHLA	MyBiosource	MBS400098, SHLA rekombinant protein
Besi yeri	Capricorn Scientific	DMEM-HA (DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine) Lot No: CP18-2472
Fötal Bovine Serum	Biological Industries	European grade, 0.1µM filtre edilmiş (Lot No: 1407738)
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific	100X, PS-B, Lot No: CP14-1209 (100 ml)
L-Glutamine	Capricorn Scientific	200 mM, GLN-B (100 ml)
Trypsin-EDTA	Capricorn Scientific	DBPS içinde, Lot No: C17-1635
Flask (25cm <sup>2</sup> )	Biologix	Polystrene, 07-8025
Flask (75cm <sup>2</sup> )	Biologix	Polystrene, 07-8075
15 ve 50 ml Tüp	Biologix	10-9151 (15 ml), 10-0502 (50 ml)
96 kuyuklu plak	Costar	CLS3599
12 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-12
6 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-6
Dondurma tüpleri	Corning	430659
Transfer pipeti	Biologix	30-135A1 (3ml)
Hücre sayım lamı	Neubauer Haemocytometry	68052-14, 68052-15
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applichem	A3672,0100
Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	Sigma	P4417, Tablet, (pH: 7,4) (Ca <sup>++</sup> ve Mg <sup>++</sup> içermeyen)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): Applichem marka, No: 6381-92-6	Vivantis	PC0706
Serolojik Pipet : Greiner bio-one, 5 ve 10 ml'lik Sterilizasyon amaçlı Etil Alkol (%75'lik) Riedel-de Haen, No: 64-17-5 :	Greiner Cellstar	P7615 (5 ml) ve P7740 (10 ml)
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2;0,5;1,5;2 ml tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüp

### 3.1.3. 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT) sitotoksosite testi

MTT testi için gerekli malzemeler Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3.** MTT testinde kullanılan gereçler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma	M5655-1g
MTT stok solüsyonu		5 mg toz MTT 1 ml steril PBS içerisinde çözüldü ve filtre edilerek (0,20 µm'lik) kullanıldı
MTT çalışma solüsyonu (96 kuyucuklu plakta bir kuyucuk için)		10 µl MTT solüsyonu (5 mg/1 ml) 90 µl besi yeri karıştırılır ve her bir kuyucuğa eklenir
DMSO	Applichem	A3672,0100
96 kuyuklu plak	Costar	CLS3599
MTT lizis solüsyonu	Triton-X (Sigma) HCl (0,1 N Fischer Scientific) İsopropanol (Merck)	Her bir kuyucuğa hazırlanan solüsyondan 100 ml eklenir. 100 ml lizis solüsyonu hazırlanması: Triton X (T8787) (1 ml) HCl (AC 12420-0010 ) 0,1 N (10 ml) İsopropanol (109634) (89 ml)
Filtre	Sartorius Minisart	16532; 0,22 µm'lik
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml'lik), Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.4. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler Tablo 4’te verilmiştir.

**Tablo 4.** Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Trizol	Thermo-Scientific,	1029608
Kloroform	Sigma	24216
İsopropanol (=Propanaol-2)	Merck	109634
Etil Alkol	Sigma	3221
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml’lik) tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma	D5758-50 ml %0,1 konsantrasyonda 100 ml steril distile su (dH <sub>2</sub> O)’ya 0,1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklanıp (15 dakika, 100°C) soğutulmuş kullanıldı
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.5. cDNA sentezi

cDNA eldesi için gerekli malzemeler Tablo 5’te verilmiştir.

**Tablo 5.** cDNA eldesi için için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
cDNA izolasyon kiti	GeneAll	HyperScriptFirst Strand Sythesis Kit/601-005
Steril Tüpler	Biologix	0,2ml’lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Steril Su	BioShop	WAT222.100
PZR cihazı	Rotor Gene	Gerçek zamanlı PZR aleti cDNA sentezinde kullanılmıştır.
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.6. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler Tablo 6’da verilmiştir.

**Tablo 6.** Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Tris baz	Vivantis	PR 0612
Borik asit	Vivantis	PR 0607
EDTA	Vivantis	PC 0706
10XTBE solüsyon (pH:7,5)		Tris baz (54 gr ), borik asit (27,5) ve 20 ml EDTA (0,5 M) steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.
Agaroz	Vivantis	PC 0701
% 1’lik agaroz		1 g agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 2,5 µl Etidyum bromür (10 mg/ml) karıştırıldı.
Etidyum Bromür	Vivantis	PC 0707
Brom fenol mavisi	Ambresco	115-39-9
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.7. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR)

RT-PZR için gerekli malzemeler Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** RT-PZR için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
GeneAll® RealAmp SYBR qPCR Master mix	GeneAll	801-020
Steril Tüpler	Biologix	0,2ml’lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.8. Tek hücre jel elektroforezi (COMET)

COMET testi için gerekli malzemeler Tablo 8’de verilmiştir.



**Tablo 8.** COMET için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Lam	Isotherm	25,4*76,2 mm (1.0mm-2mm kalınlık)
Lamel	Laborant	24 *60 mm (0,13-0,16 mm kalınlık)
Normal Melting Agaroz (NMA)	Vivantis	PC 0701
Low Melting Agaroz (LMA)	Sigma	A9414
Tris baz	Vivantis	PR 0612
Borik asit	Vivantis	PR 0607
EDTA	Vivantis	PC 0706
TBE Solüsyonu		
NaCl	Merck	106404
NaOH	Sigma	06203
Triton-X 100	Sigma	T8787
Na Lauril Sarkozinat	Sigma	Y0001772
DL-Dithiothreitol (DTT)	Vivantis	PC0705
Cam malzemeler		100, 200, 500 ve 100 ml'lik erlen ve mezürler Dikey şaleler
Pipet uçları	Biologix	10, 100, 1000µl büyüklükte
TBE Solüsyonu		Tris baz : 54 gr Borik asit : 27,5 EDTA (0,5M) : 20ml (0,5M EDTA : 18,61gr EDTA+ 2gr NaOH + 80 ml dH2O) Steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.
Lizing stok solüsyon		NaCl : 146.1 gr EDTA : 37.2 gr Tris : 1.2 gr
Lizing çalışma solüsyon		Lizing stok solüsyon : 99 ml Triton X : 1 ml Na lauril sarkosinat : 1 gr DTT ( 65 ml için ) : 0,09 gr Solüsyon + çalışma öncesi taze hazırlanmış ve soğuması için 4°C'de saklanmıştır.
Lamların Hazırlanması		Lamlar %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile oda sıcaklığında kaplanmıştır. 100 ml PBS içerisinde hazırlanmış %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz bir şale içerisine aktarılmıştır. Temiz lamlar, şale içerisinde ortalama 55-65°de tutulan NMA'ya yaklaşık 4 saniye batırılmış ve 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Tablo 8'in devamı sonraki sayfada

Etidyum bromür (8 µg/ml)	Vivantis	Hazırlanan COMET preparatlarının görüntülenmesinde 10 mg/ml konsantrasyondan (8 µg/ml) olarak hazırlanan Etidyum Bromür kullanılmıştır.
Soğutucu Bloklar (Akü)		
Alimünyum Folyo		Koroplast veya diğer muhtelif markalar

### 3.1.9. Akım (Flow) sitometri

Akım sitometri için gerekli malzemeler Tablo 9’da verilmiştir.

**Tablo 9.** Akım sitometri için gerekli malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Etil Alkol	Sigma	3221
RNase	Sigma	R6513
Propidium Iodide	Sigma	81845
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

### 3.1.10. Çalışmada Kullanılan Alet/Makineler

Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan alet/makineler Tablo 10'da verilmiştir.

**Tablo 10.** Tez kapsamında kullanılan alet/makineler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Laminar Kabin	Metisafe	Clas II
CO <sub>2</sub> 'li inkübatör	Memmert	UNB 200
İnverted Mikroskop	Olympus	CKX31
Soğutmalı Santrifüj	Universal	320R (mikro ve 15ml'lik falkon rotorlarıyla)
Vortex	MRC	SI-100
Hassas Terazi	Dikoman	FGH
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Isıtılmalı plak	MRC	HSD-135
Mikrofüj	INOVIA	MINO-10K
Translimünatör	MRC	UV-26
Elektorforez Tankı	SCIE-PLAS	SVG-SYS Vari-gel
Güç Kaynağı	Consort	EV231
Mikrodalga Fırın	Arçelik	MD 574
Su banyosu	MRC	WBO-100
Biodrop		
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Spektrofotometre		
RT-PZR	Rotor Gene	
Azot tankı	International Cryogenics	35 ve 20 lt'lik
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo	Sanyo
Akım Sitometri	Beckman Coulter	EPICS XL MCL,

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hücre kültürü

LN-405, T98G ve U373 MG hücre serileri 37°C'de, CO<sub>2</sub>-li inkübatörde, steril kültür ortamında, standart kültür şartlarında çoğaltılmıştır. Tez çalışması kapsamında yapılan tüm deneyler 20'nin altında olan düşük pasaj sayısına sahip hücreler ile

gerçekleştirilmiştir. Standart kültür işlemleri aşağıda belirtilen süreçler takip edilmiştir.

Hücreler yukarıda belirtilen besi yeri kullanılarak kültür flaskları içerisinde ekilmiş ve çoğaltılmıştır. Flask içerisinde hücre yoğunlukları %70-80 oranına ulaştığında, hücrelerin üzerindeki besi yeri atılarak flasklar 1-2ml PBS ( $Ca^{++}$  ve  $Mg^{++}$  içermeyen) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 25 cm<sup>2</sup>'lik flaska 0.4 ml, 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska 1 ml Tripsin/EDTA eklenmiş, böylece yapışmış olan hücrelerin tripsinasyon işlemi ile birbirlerinden ve flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında hücreler steril serolojik pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüplerine toplanmıştır. Tüpler 1500 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı)'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüpün üst kısmı atılmış ve hücre peletinin yoğunluğu da dikkate alınarak ortalama 2ml besi yeri eklenmiştir. Mikropipet yardımıyla (1000 µl'lik) hücrelerin besi yeri ile karışması sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında hücreler Thoma lamı kullanılarak sayılmış ve ardından pasaj ve diğer test süreçlerine geçilmiştir. Hücrelerin dondurularak stoklama yapılması sürecinde ise uygun sayıdaki hücre popülasyonunun üzerine dondurma solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve sonrasında özel dondurma tüplerine (cryovial) aktarılmıştır. Bu tüpler, buz içerisinde -20°C'de 1 saat ve -80°C'de 24 saat tutulduktan sonra likit nitrojen bulunan tanklara aktarılmıştır.

### 3.2.2. Sitotoksikite testi

Tez çalışmasında kemoterapötik etkileri araştırılan TMZ, leptin ve SHLA'nın olası sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde ve inhibitör dozlarının ( $IC_{50}$ ) saptanmasında MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT yönteminde aşağıda yer alan protokol izlenmiştir. MTT yöntemi her bir madde için 3 kez ve her bir deneyde 4 tekrarlı olacak biçimde yapılmıştır.

İlgili moleküllerin uygun konsantrasyonlarının hazırlanması için öncelikle uygun çözücüler kullanılarak ana ve arastoklar hazırlanmıştır. TMZ için DMSO kullanılarak 200.000 µM, leptin için DMSO kullanılarak 3000 µM ve SHLA için steril dH<sub>2</sub>O kullanılarak 500.000 ng olacak biçimde ana stoklar hazırlanmıştır. Çözücü olarak DMSO kullanılan TMZ ve leptinin hücrelere uygulanacak en yüksek

konsantrasyonunda DMSO oranının %5'in altında tutulması sağlanmıştır.

Çoğaltılan hücreler tripsinasyon ve sayım işlemleri sonucunda 96'lık plağın her bir kuyucuğuna  $8 \times 10^3$  olacak biçimde ekilmiştir. Ekim sonrası hücrelerin plak tabanına yapışması ve uyum süreci için hücreler bir gece  $37^\circ\text{C}$ 'de  $\text{CO}_2$ 'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda her bir hücre tipinin yer aldığı plaklar hücrelerin hücre döngülerinin eşitlenmesi amacıyla 8 saatlik serum açlığına bırakılmıştır. Bu işlem sayesinde hücreler senesens sürecine girmeden hücre döngülerinin eşitlenmesi sağlanmıştır. Serum açlık süresinin 8 saat olarak seçilmesinin nedeni, çalışılan hücrelerin serum açlık sürelerinin 8 saati aştığı durumlarda hücre morfolojilerinin değiştiğinin ve ölüm süreçlerini başlattıklarının tespit edilmesinden dolayıdır.

Serum açlığı süreci sonunda, farklı konsantrasyonları hazırlanmış olan TMZ, leptin ve SHLA molekülleri hücrelere uygulanmıştır. Yukarıda belirtilen ana stoklardan TMZ için büyüme besi yeri içerisinde 25, 50, 100, 150, 250, 350, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları; leptin için, 0.01, 0.1, 0.2 ve 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları, SHLA için 10, 100, 500, 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Hazırlanan konsantrasyonlar farklı hücre tiplerinin ekildiği 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 100  $\mu\text{l}$  büyüme besi yeri içerisinde olacak biçimde verilmiştir.

Madde uygulanmasından 72 saat sonra MTT süreci başlatılmıştır. 24 ve 48. saat morfolojik değerlendirme sonunda inhibitor konsantrasyonun tespit edileceği sürenin 72. saat olduğuna karar verilmiştir. Bu nedenle toplam inkübasyon süresi 72 saat olarak seçilmiştir. 72 saat sonunda hücrelerin üzerindeki medyum atılmış ve her bir kuyucuğa MTT çalışma solüsyonunda 100 $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{l}$  MTT (5 mg/ml) +90  $\mu\text{l}$  besi yeri) eklenmiştir.

MTT çalışma solüsyonunun eklenmesinden sonra hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de,  $\text{CO}_2$  inkübatörde 3 saat inkübe edilmiştir.

Üç saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri atılmış ve her bir kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  lizing solüsyonu eklenerek yaşayan hücrelerce oluşturulan

formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır.

Formazan kristallerinin çözünmesinden sonra plak okuyucu spektrofotometrede plakların her bir kuyucuğunun 570 nm'deki absorbans değerleri tespit edilmiştir.

Elde edilen absorbans değerleri excel ve Graphad Prism programları kullanılarak IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır.

### **3.2.3. RNA izolasyonu**

IC<sub>50</sub> değerleri saptananan TMZ, leptin ve SHLA moleküllerinin, hücrelerde, TMZ kemoterapi direncinde rol alan genler ile hücre ölüm yollarında rol alan genlerin ekspresyonları üzerinde meydana getireceği olası değişikliklerinin saptanması amacıyla gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Bu amaçla ilgili moleküller IC<sub>50</sub> değerlerinde tek tek , ikili ve üçlü kombinasyonları hücrelere uygulanmış ve IC<sub>50</sub> değeri saptanan sürede inkübe edildikten sonra total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için izlenen Trizol temelli izolasyon protokolü aşağıda yer almaktadır.

Moleküller yukarıda belirtilen IC<sub>50</sub> değerlerinde hücrelere uygulanmıştır. Bu uygulama için oluşturulan gruplar sırasıyla hiçbir molekül uygulanmayan kontrol grubu, TMZ, Leptin, SHLA, TMZ+Leptin, TMZ+SHLA, Leptin+SHLA, TMZ+Leptin+SHLA olmak üzere 8 farklı grup oluşturulmuştur.

25cm<sup>2</sup>'lik flasklara ortalama 1x10<sup>6</sup> yoğunlukta ekilen hücreler bir gece (16/24 saat) flask tabanına tutunması ve uyum için bir gece inkübe edildikten sonra 8 saat serum açlığına bırakılmıştır. Serum açlığı sonrasında IC<sub>50</sub> değerlerinde tek ve kombine edilen moleküller hücreler verilmiş ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

72. saatin sonunda hücreler tripsine edilerek, toplandı ve hücreler 1500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası supernatant kısmı atılarak üzerine 2 ml steril soğuk PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) eklenerek, 1000µl'lik pipet yardımıyla pipetaj yapılarak karışması

sağlanmıştır. Bu basamaktan sonraki işlemler aksi belirtilmedikçe buz üzerinde devam edilmiştir.

PBS içeren 15ml'lik falkon tüpler 1500 rpm'de 5 dakika +4°C'de tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısım atılarak tüpün içerisinde bulunan hücelere 1000 µl soğuk Trizol eklendi ve mikropipet yardımıyla homojenize edilmiştir. Bu karışım 1,5ml'lik steril tüpe alınmıştır.

Trizol hücre karışımı 5 dk oda sıcaklığında nükleoproteinlerin kompleksinin tamamen parçalanması için bekletilmiştir. Bekleme sonrası örnekler +4°C'de, 3500 rpm'de, 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üste kalan süpernatant kısmı pellet kısma yaklaşımadan yalnızca üst kısım alınarak steril 1.5 ml'lik yeni steril bir tüpe aktarılmıştır. Pellet kısmı ise atılmıştır.

Yeni tüpe aktarılan süpernatant üzerine 200 µl soğuk kloroform ilave edilmiş ve tüpler 15 saniye (sn) şiddetli bir şekilde vortekslenmiştir.

Vorteks sonrası tüpler 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan aşamasından sonra örnekler 12000 x g'de +4°C'de, 15dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj aşaması sonrasında karışım üç fazlı bir yapı halini almıştır; alta kloroformlu faz, ortada hafif beyazımsı interfaz ve en üste RNA'nın bulunduğu şeffaf fazdır. Üste kalan şeffaf faz mikropipet yardımıyla dikkatlice alınarak temiz steril bir 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarılmıştır.

Yeni steril tüpe aktarılan bu supernatant kısma 500 µl izopropil alkol eklenmiş ve pipet yardımıyla iyice karıştırılmıştır.

Bu karışım 15-30°C'de 10 dk inkübe edilmiş ve inkübasyonun ardından +4°C'de, 12000 g'de, 10 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası tüpün üstü tamamen atıldıktan sonra tüpün alt kısmında beliren beyazımsı jel benzeri pellet üzerine 1 ml %75'lik etil alkol eklenmiş ve ardından vortex yardımıyla ile hafifçe vortekslenerek pelletin kalkması ve yıkanması sağlanmıştır.

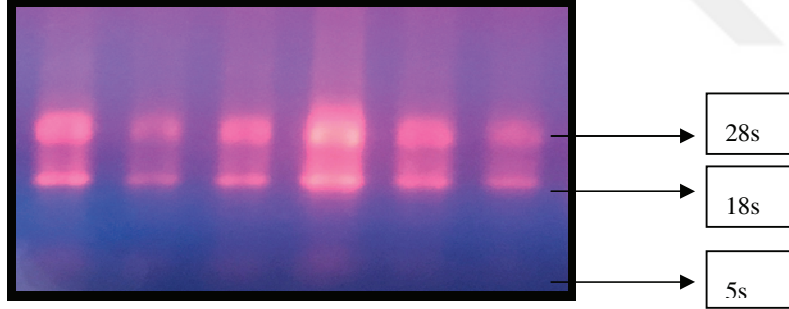
Pellet kalktıktan sonra tüpler +4°C’de, 7500 x g’de, 5dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası bu basamak iki defa tekrarlanmıştır.

İkinci santrifüj sonrasında tüpün üst kısmı atılarak tüpler hücre kültürü laminar kabinde 12-15 dk tüpün ağzı açık bırakılarak kurumaya alınmıştır.

Tüplerin kurutulması sonrası RNA 30-50 µl DEPC’li su ile çözülmüştür. Ayrıca elde edilen total RNA’nın görüntülenmesi için 3-5 µl RNA başka bir steril tüpe alınmış ve tüm RNA’lar cDNA sentezi yapılana kadar -80°C’ye kaldırılmıştır.

### 3.2.3.1. RNA’nın kalitatif değerlendirilmesi

Total RNA’ların kalitatif değerlendirilmesi (parçalanma olup olmadığının anlaşılması gibi) amacıyla total RNA’lardan ortalama 3-5 µl RNA agaroz jel (%1’lik) elektroforezinde yürütülmüştür. Yürütme sonrası elde edilen görüntülerde 28S, 18S ve 5S RNA net bir şekilde saptanmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. Total RNA %1’lik agarozdaki görüntüsü.

### 3.2.3.2. RNA’nın kantitasyon değerlendirilmesi

Total RNA’nın kantitatif değerlendirilmesinde BioDrop marka cihaz kullanılmıştır. Ortalama 1,5-2 µl total RNA’nın 260 ve 280 nm’de ki absorban değerleri saptanmıştır. Bu değerlerle RNA’nın hem miktarı hem de saflığı saptanmıştır. 1 optik dansite (OD) RNA için 40 µg/ml dir.



### 3.2.4. cDNA (Complementer DNA) sentezi

Hücrelerden elde edilen total RNA'dan ekspresyon analizi yapmak için öncelikle bu RNA'lardan cDNA elde edilmesi gerekmektedir. cDNA sentezi için GeneAll HyperScriptFirst Strand Synthesis Kit (Katalog: 601-005) kullanılmıştır. Bu kitin önerdiği protokol uygulanarak her bir gruba ait örneklerin 1µg RNA'sından cDNA elde edilmiştir. cDNA sentezi için izlenen protokol aşağıda yer almaktadır.

**Tablo 11.** cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri.

Primer (50 µM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Total RNA (1µg)	---(miktar örneğe göre değişir)
dH <sub>2</sub> O	15'ye tamamlanmıştır

0.2ml'lik steril tüp içerisinde hazırlanan reaksiyon içeriği 65°C 5 dk ısıtıcı blokta inkübe edilmiş ve bu sürecin hemen ardından örnekler 1 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.

Bu tüp içerisine 2 µl 10x revers transkriptaz (RTaz) buffer, 0.1 M, 2 µl DTT, 1 µl ters transkriptaz enzimi ve 1 µl Rnaz eklenerek 5 sn santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası tüpler PZR aletine ait bloklara yerleştirilmiş ve 55 °C 60 dakika ve 85°C 5 dk inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda elde edilen cDNA'lar RT-PZR'da kullanılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PZR; RT-PZR)

Elde edilen cDNA'larda tez çalışmasında araştırılması planlanan genlerin ekspresyonlarının saptanması amacıyla RT-PZR yapılmıştır. Bu amaçla GeneAll® RealAmp SYBR qPCR Master mix kullanılmıştır (Tablo 12). Hedef genlere karşı kontrol geni olarak ACTB Beta Aktin geni üç hücre serisi içinde kullanılmıştır. Ekspresyonu araştırılan genlerin RT-PZR'da kullanılan primer dizileri Tablo 13'te verilmiştir. Her örnek için 3 bağımsız tekrar yapılmıştır. Ekspresyonlar arası rölatif

farklılığın saptanmasında  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formülasyonu kullanılmış buradan ekspresyonlar arası kat değişimleri saptanmıştır. RT-PZR'ın etkinlik değeri genel olarak 0.98-0.99'dur. Reaksiyon içerikleri hem hedef hem de kontrol geni (housekeeping) için aynıdır.

**Tablo 12.** RT-PZR için reaksiyon içeriği.

Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon Döngüsü
Tampon (2X) SYBR qPCR master miks	10 $\mu$ l	1-95°C 5' denatürasyon (1 döngü) 2-95°C 15"
Primer (DPD, hENT1, TP, TS MDR1 ve MRP5, ACTB)	Forward : 0.5 $\mu$ l (10pmol/ $\mu$ l) Reverse : 0,5 $\mu$ l (10pmol/ $\mu$ l)	3-55°C (54-61°C, gene göre değişkenlik gösterdi) 50" 4-72°C 30" 40 döngü (2'den 4'e)
dH2O	7 $\mu$ l	
cDNA	2 $\mu$ l	
Toplam	20 $\mu$ l	Meting Curve (erime eğrisi) Analizi Ramp: 50-99 (0.5°C artış, her basamakta 3 saniye ) 90 °C 5 saniye

**Tablo 13.** RT-PZR ile ekspresyonu araştırılan genlerin primer dizileri.

GEN	SENSE	ANTISENSE
MLH1	F: 5'- TTA TCC AGC GGC CAG CTA ATG	R: 5'- GCC TCC CTC TTT AAC AAT CAC TT
MSH2	F: 5'- GGA GGA GAG ACT GCT GGA GA	R: 5'- TCC CTT TTT GCC TTT CAA CA
MSH6	F:5'- CAG TGA ACT GGG GCT GGT AT	R: 5'- CTG CAC CAG GGA ATC TGA AT
PMS-2	F:5'- AGC AGT TGC AAA GCC TCA TT	R:5'- TAT GCA GAG CAT CCG AAC AG
MGMT	F: 5'- GGG TCT GCA CGA AAT AAA GC	R: 5'- CTC CGG ACC TCC GAG AAC
GAPDH	F: 5'- AGG GCT GCT TTT AAC TCT GGT	R: 5'- CCC CAC TTG ATT TTG GAG GGA

### 3.2.6. Agaroz Jel Elektrofrez

Tez çalışması sırasında izole edilen total RNA ve elde edilen cDNA'ların kalitatif değerlendirilmesinde %1'lik agaroz jel hazırlanarak elektroforetik yürütme yapılmıştır.

### 3.2.7. Tek Hücre Jel Elektrofözezi (COMET)

TMZ, leptin ve SHLA moleküllerinin hücrelerde meydana getireceği genomik DNA hasarının tespitinde tek hücre elektrofözezi testi (COMET) gerçekleştirilmiştir. Bu test için izlenilen protokol aşağıda yer almaktadır. Bu testin hücre kültürü kısmından sonraki aşamaları ilgili laboratuvar ortamı karartılarak (loş sayılan bir görünüm) gerçekleştirilmiştir. COMET testi için izlenilen protokol aşağıda yer almaktadır.

Hücrelerimiz 25cm<sup>2</sup>'lik flasklara 1x10<sup>6</sup> konsantrasyonda ekildikten ve yukarıda MTT başlığı altında belirtilen serum açlığı uygulaması yapıldıktan sonra TMZ, leptin ve SHLA molekülleri IC<sub>50</sub> değerlerinde tek tek ve kombine halinde hücrelere verilmiştir. Hücreler 37°C'de, CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda hücreler tripsine edilip, 15ml'lik tüplere standart hücre kültürü teknikleri kullanılarak toplanmıştır.

Bu tüpler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve hücrelerin üzerine transfer pipeti ile 2 ml PBS eklenmiştir.

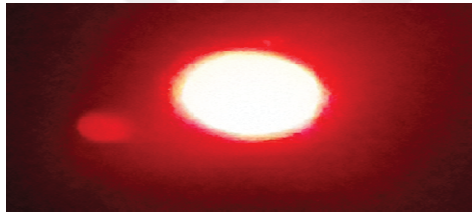
PBS ile karışan hücrelerin 18 µl'si (ortalama 100.000 hücre) 36 µl %0.75'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz (LMA) ile karıştırılıp oda ısısında bekleyen ve normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile kaplı lamların üzerine yayılarak üzerleri ince lameller (tüm lamı kaplayan) ile kaplanmıştır. Bu aşamadaki işlemde, hücreler, alındıkları hacmin 2 katı kadar LMA ile karıştırılıp lam üzerine yayılarak işlem yapılmalıdır. Lam üzerine toplamda 100 µl hacimden daha fazla bir hücre LMA karışımının aktarılmasına dikkat edilmiştir.

Üzeri hücre ve agaroz karışımıyla kaplanan lamlar buz üzerine alınarak 20 dakika donmaları beklenmiştir. Agaroz lam üzerinde donduktan lam ve lamel arasında su buharı benzeri oluşumlar meydana gelir ve bu aşamadan sonra lameller dikkatlice kaldırılmış ve lamlar daha önce hazırlanmış olan ve +4°C'de şale içerisinde bekleyen soğuk lizing solüsyonunda 1 saat bekletilmiştir.

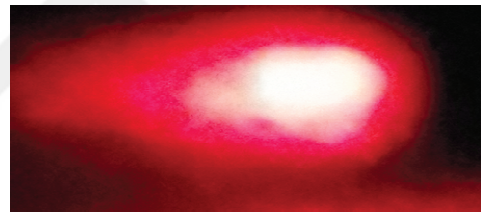
Bekleme sonunda bu solüsyona 14 µl (20 µg/ml) Proteinaz K eklenerek örnekler şale içerisinde 37°C'lik etüve kaldırılmış ve 2 saat inkübe edilmiştir.

İki saat sonunda lamalar soğuk TBE nötral solüsyonunda 20 dakika bekletilmiş ve ardından 25V'ta 20 dakika yürütülmüştür. Yürütme işlemi süresince elektoroforez tankının üstüne soğuk aküler ve buz parçaları konarak TBE solüsyonunun ısınması engellenmiştir.

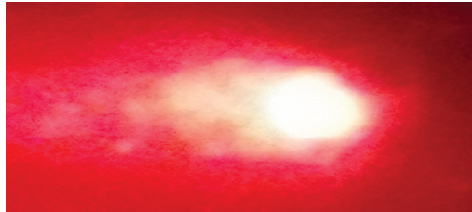
Yürütme işlemi sonunda elektroforez tankından alınan lamalar karanlıkta, oda ısısında kurutulduktan sonra her bir lamel 50 µl etidyum bromid (8µg/ml) ile boyanmıştır. Boyanan preparatlar floresan mikroskopta (Euromexx, Onion, OX Range, AE3199) ilgili filtrede incelenmiştir. Her bir hücre DNA görüntüsü kuyruk uzunluğu ve kafa bölgesine göre değerlendirilmiş ve hasar miktarına göre 0 (hasarsız), 1 (az hasarlı), 2 (orta hasarlı), 3 (hasarlı), 4 (çok hasarlı) olarak kategorize edilmiştir (Şekil 12). Her bir preparat için 300 hücre sayılmıştır.



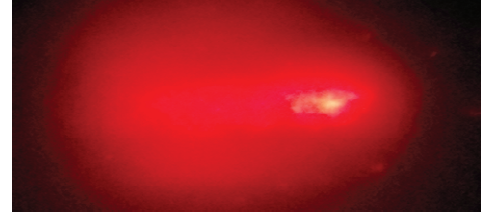
Hasarsız, 0



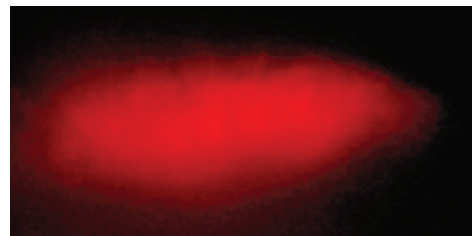
Az Hasarlı, 1



Orta Hasarlı, 2



Hasarlı, 3



Çok Hasarlı, 4

Şekil 12. COMET testinde kullanılan skora ve skorlamaya ait örnek görüntüler.

### 3.2.8. Akım (Flow) sitometri

TMZ, leptin ve SHLA moleküllerinin hücrelerin hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin saptanması amacıyla akım sitometri testi uygulanmıştır. Bu amaçla izlenen protokol aşağıda yer almaktadır.

Hücrelerimiz 25cm<sup>2</sup>'lik flasklara 1x10<sup>6</sup> konsantrasyonda ekildikten ve yukarıda MTT başlığı altında belirtilen serum açlığı uygulaması yapıldıktan sonra TMZ, leptin ve SHLA molekülleri IC<sub>50</sub> değerlerinde tek ve kombine halinde hücrelere verilmiştir. Hücreler 37°C'de, CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda hücreler tripsine edilip, 15ml'lik tüplere standart hücre kültürü teknikleri kullanılarak toplanmıştır.

Bu tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısım atılmış ve hücrelerin üzerine transfer pipeti ile 3 ml steril PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) eklenerek tekrar 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası üst kısım tekrar atılmış ve hücrelerin üzerine bir önceki aşamada olduğu gibi 3 ml PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) eklenerek pipetle hafifçe karıştırılarak yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından tekrar 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.

Santrifüj sonrası üst süpernatant kısım atılmış ve hücrelerin üzerine 2 ml steril PBS (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen) eklenmiştir.

Fiksasyon için vorteks üzerinde alınan tüplerin üzerine toplamda 2-3 ml soğuk %99'luk alkol hafif vorteks altında damla damla bırakılarak hücrelerin fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyon işlemi sonrasında hücre akım sitometrisi süreci başlatılana kadar +4°C'de saklanmıştır.

Akım sitmotrisi ölçüm süreci başladığında öncelikle ortamdaki alkolü uzaklaştırmak için 2 ml daha PBS ilave edilmiş ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 70 µl RNase ve 50 µl Propidium Iodide eklenerek mikropipet yardımıyla karışması sağlanmıştır. Bu işlem sonunda örnekler 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda hücreler 37 µm'lik nylon mesh'den süzölmüş ve akım sitometri cihazında (EPICS XL MCL, Beckman Coulter) 10000 hücre sayılarak hücre döngüsü ve DNA analizi yapılmıştır.

G0/G1, sentez ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı ile apoptotik hücre oranı iki değişkenli DNA histogramları MCYCLE (Phonex Sys) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

### **3.2.9. İstatistiksel Analiz**

Tez çalışmasında elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 15.0 paket programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı tipte bir araştırma olan çalışmada değişkenlere ilişkin frekanslar ve yüzdeler verilmiş ve bu veriler çeşitli grafikler yardımıyla görsel olarak da özetlenmiştir. Kategorik değişkenlerin gruplardaki dağılımlarının test edilmesinde ki-kare ya da Fisher'in exact testi kullanılmış, sonuçlar frekans dağılımları ve yüzdelerin tanımlayıcı istatistik olarak kullanıldığı tablolarla ifade edilmiştir. Çalışmada istatistiksel anlamlılık sınırı olarak  $p < 0.05$  alınmıştır.

## 4. BULGULAR

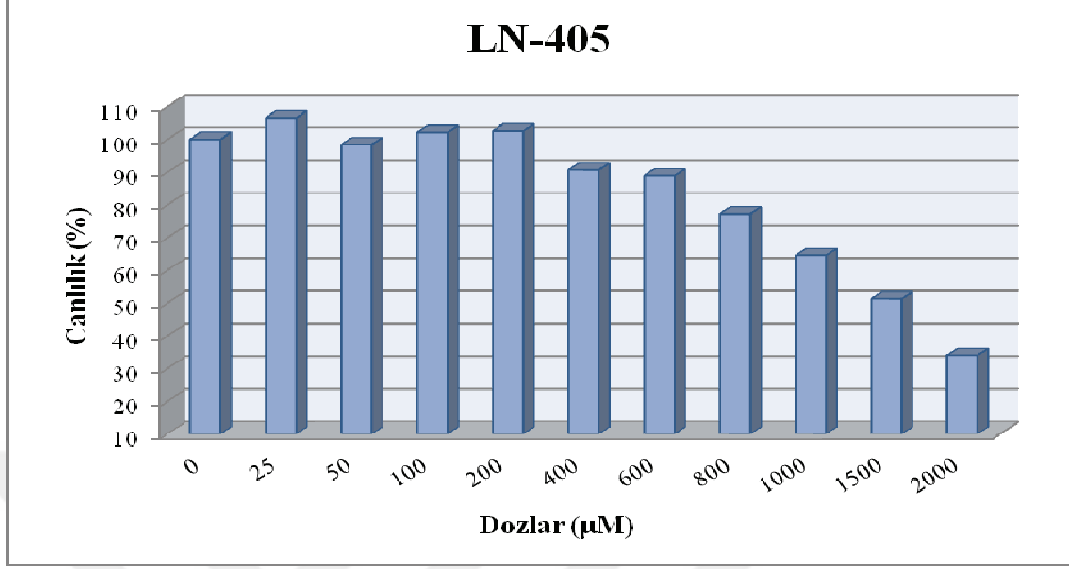
Tez kapsamında çalışılan TMZ, leptin ve SHLA moleküllerinin LN-405, T98G ve U373 MG hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile saptanmıştır.

### 4.1. TMZ Sitotoksitesi

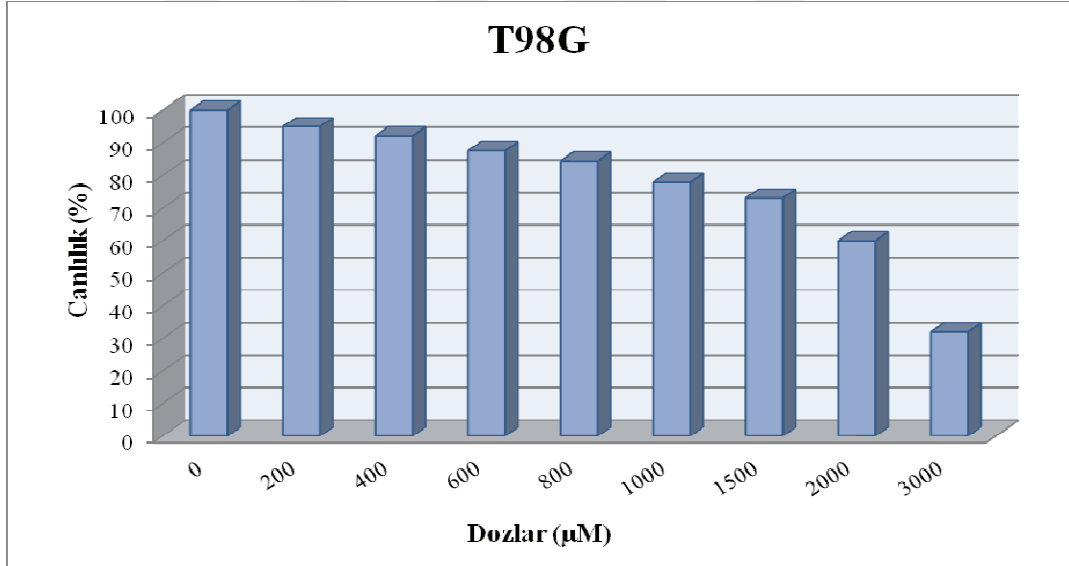
Sitotoksosite testi sonucu her 3 hücre serisinde de 72. saatte yalnızca TMZ'nin IC<sub>50</sub> değeri saptanmıştır (Tablo 14). TMZ'nin dozlarına göre hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkileri Şekil 13, 14 ve 15'te verilmiştir. Aynı inkübasyon süresinde leptin ve SHLA moleküllerinin IC<sub>50</sub> değerinin saptanabileceği bir sitotoksisite bulunmamaktadır. Bu test her bir hücre serisi için 3 kez ve her bir testte 4 tekrarlı olacak biçimde yapılmıştır.

**Tablo 14.** TMZ'nin glioblastoma hücre serilerinde IC<sub>50</sub> değerleri

Hücre Serisi	IC <sub>50</sub> değeri (µM)
LN-405	1541.85
T98G	2352.96
U373 MG	800

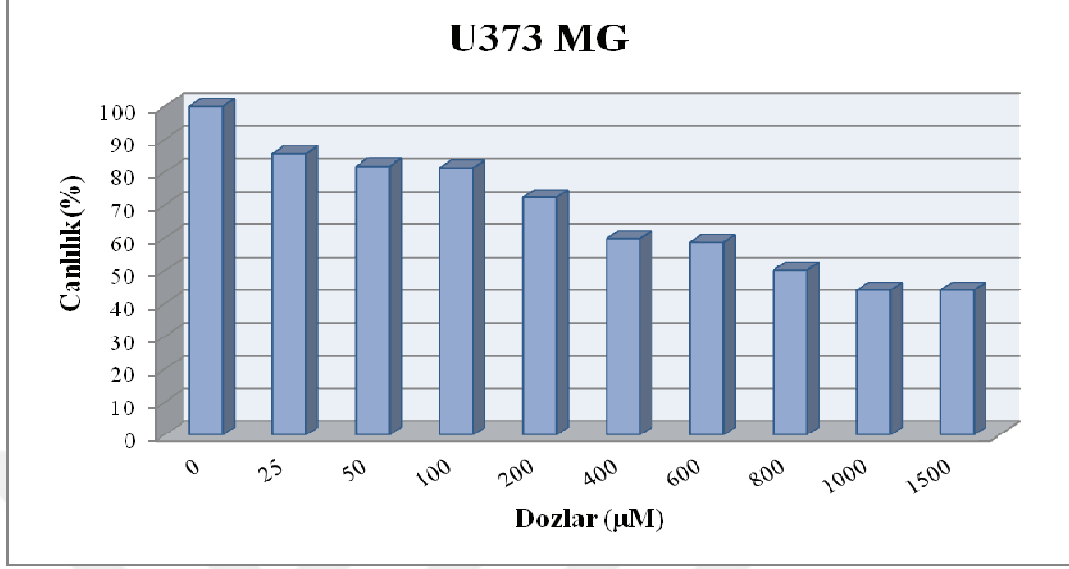


Şekil 13. TMZ 'nin LN-405 hücre serisinde ki sitotoksitesi.



Şekil 14. TMZ'nin T98G hücre serisinde ki sitotoksitesi.

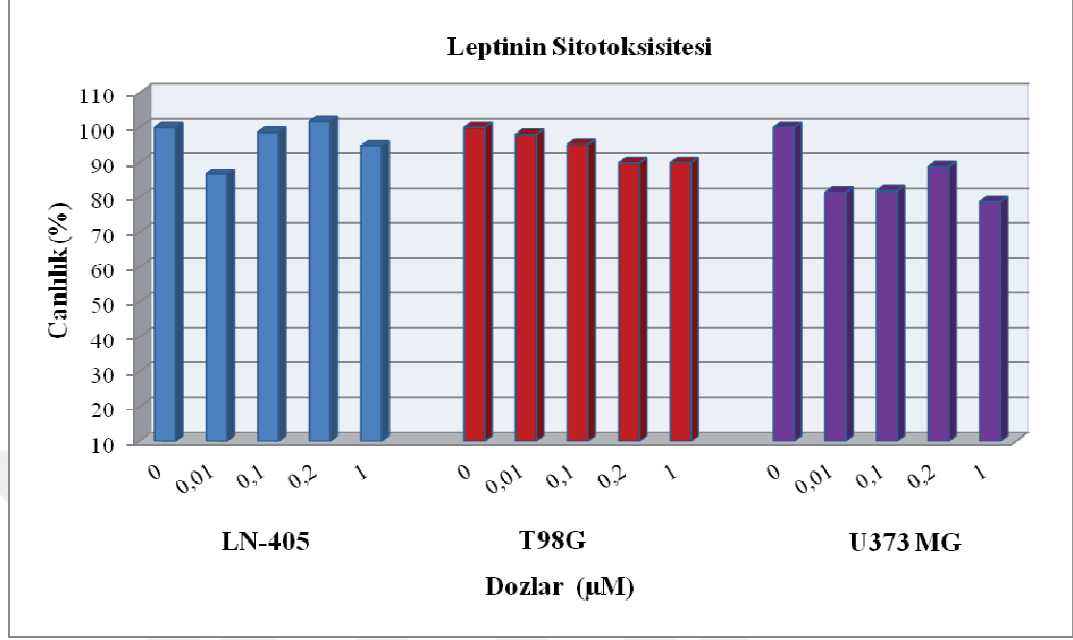




**Şekil 15.** TMZ'nin U373 MG hücre serisinde ki sitotoksitesi.

#### **4.2. Leptin Sitotoksitesi**

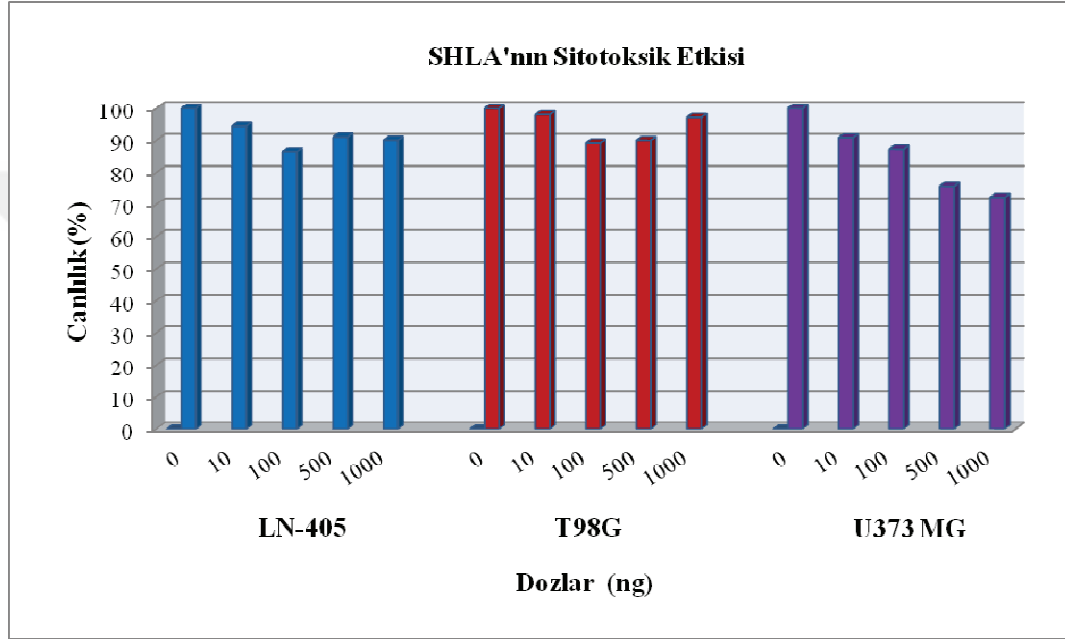
Leptin molekülünün hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisi Şekil 16' da verilmiştir. Bu sitotoksite sonucuna göre, tez kapsamında yapılacak diğer testlerde leptin'in uygulama dozu 0.1  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir.



**Şekil 16.** Leptin molekülünün LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerindeki sitotoksik etkisi.

### 4.3. SHLA Sitotoksitesi

SHLA molekülünün hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisi Şekil 17’de verilmiştir. Bu sitotoksite sonucuna göre, tez kapsamında yapılacak diğer testlerde SHLA’in uygulama dozu 1000 ng olarak belirlenmiştir



Şekil 17. SHLA molekülünün LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerindeki sitotoksik etkisi.

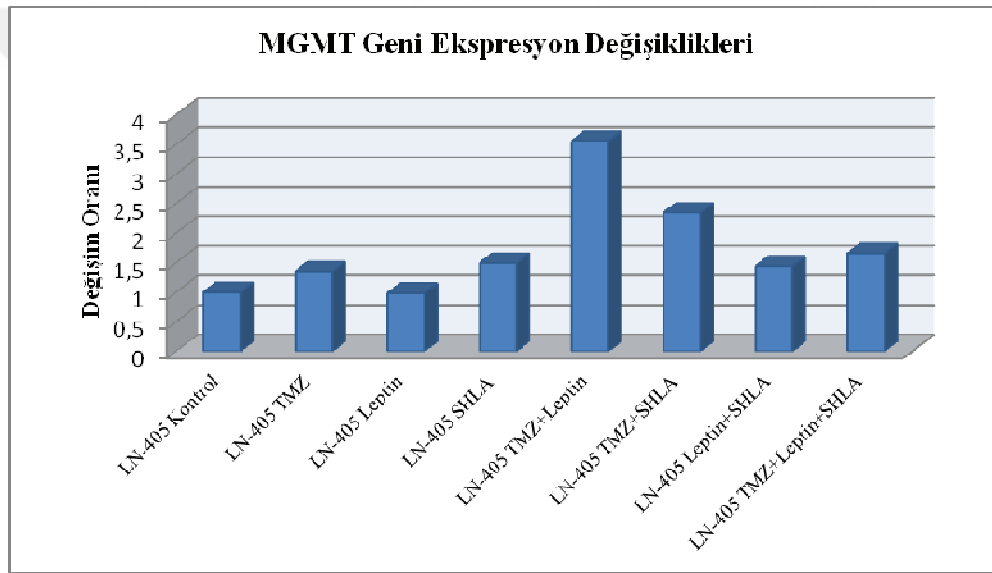
### 4.4. Gen Ekspresyon Analizi

IC<sub>50</sub> değeri belirlenen TMZ molekülü ile sitotoksik etkileri bulunmayan leptin (0.1 µM) ve SHLA (1000 ng) moleküllerinin tek tek ve kendi aralarındaki kombinasyonları hücrelere sunulduktan sonra hücrelerdeki TMZ kemoterapötik direncinde rol alan MGMT, MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 genlerinin ve kontrol için GAPDH geninin ekspresyon değişiklikleri RT-PZR ile saptanmıştır. LN-405 için “Kontrol, TMZ (1541.85 µM) , Leptin (0.1 µM), SHLA (1000 ng), TMZ + Leptin (1541 µM+0.1 µM), TMZ + SHLA (1541 µM +1000 ng), Leptin + SHLA (0.1 µM + 1000 ng) ve son olarak 3’lü kombinasyon TMZ+ Leptin + SHLA (1541.85 µM + 0.1 µM + 1000 ng) olarak toplam 8 grup belirlenmiştir. T98G ve U373 MG hücre serileri

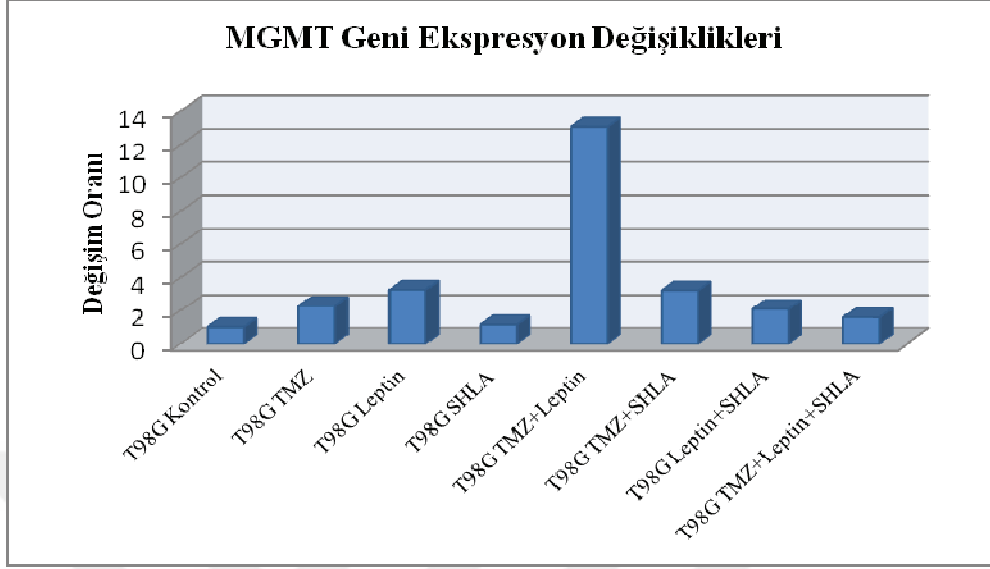
in de yalnızca TMZ değerleri değişkenlik (T98G  $IC_{50} = 2352.96 \mu M$  ve U373 MG  $IC_{50} = 800 \mu M$ ) gösteren benzer gruplar oluşturulmuştur.

#### 4.4.1. MGMT geni ekspresyon değişimi

Glioblastoma hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra MGMT geninde meydana gelen ekspresyon değişimi hücre tipine göre farklılık gösterdiği için bu değişiklikler LN-405 için Şekil 18’de, T98G için 19’da verilmiştir. U373 MG hücre hattında ekspresyon gözlemlenmemiştir.



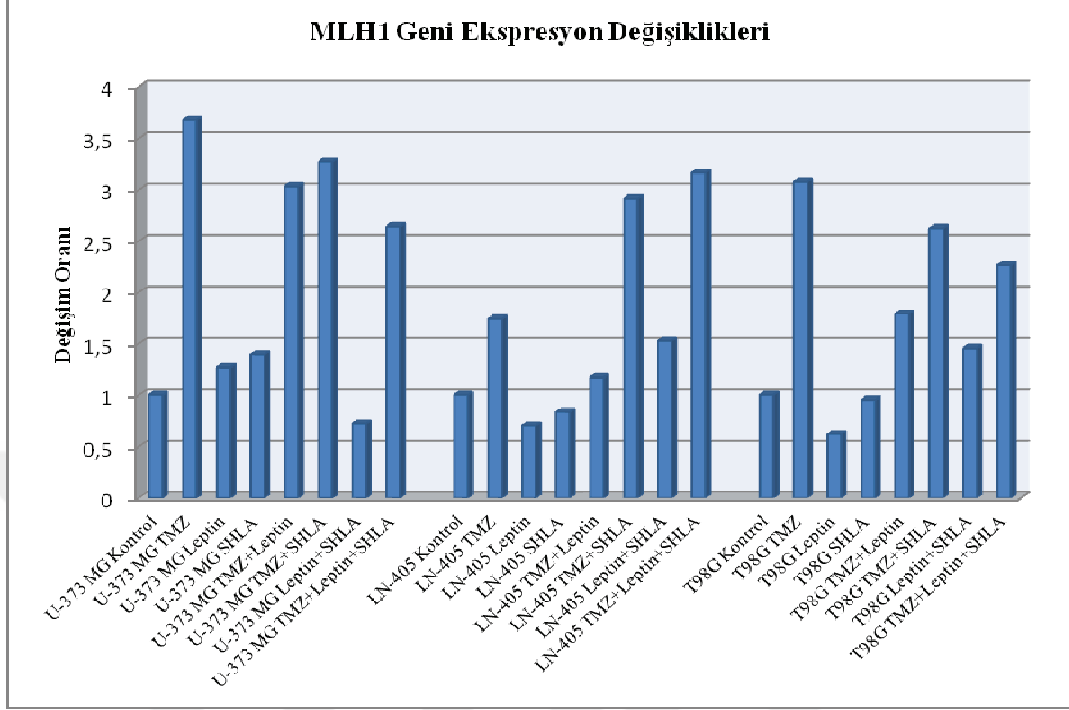
Şekil 18. LN-405 hücre serisinde MGMT geni ekspresyon değişimi.



**Şekil 19.** T98G hücre serisinde MGMT geni ekspresyon değişimi.

#### 4.4.2. MLH1 geni ekspresyon değişimi

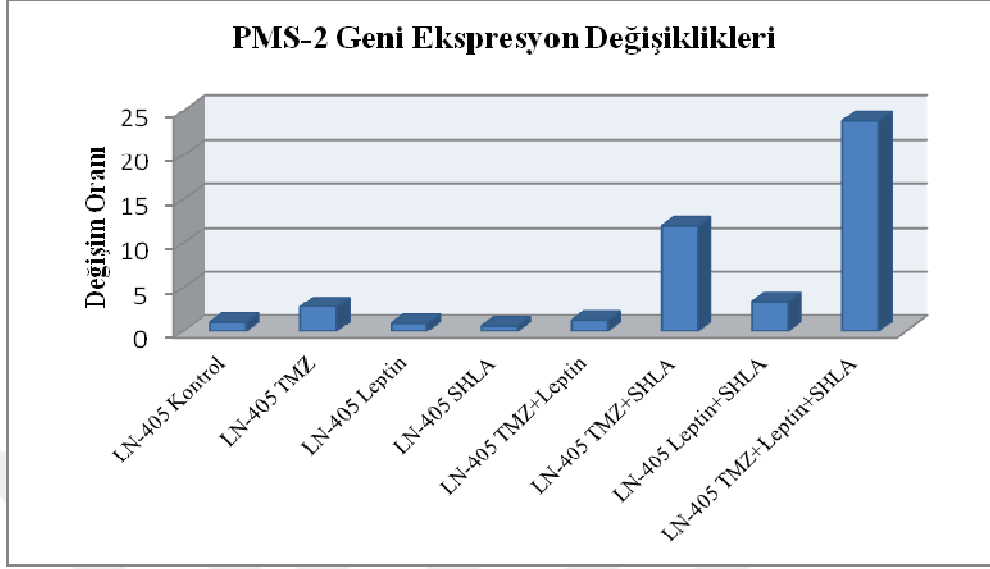
Glioblastoma hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra MLH1 geninde meydana gelen ekspresyon değişimi Şekil 20’de verilmiştir.



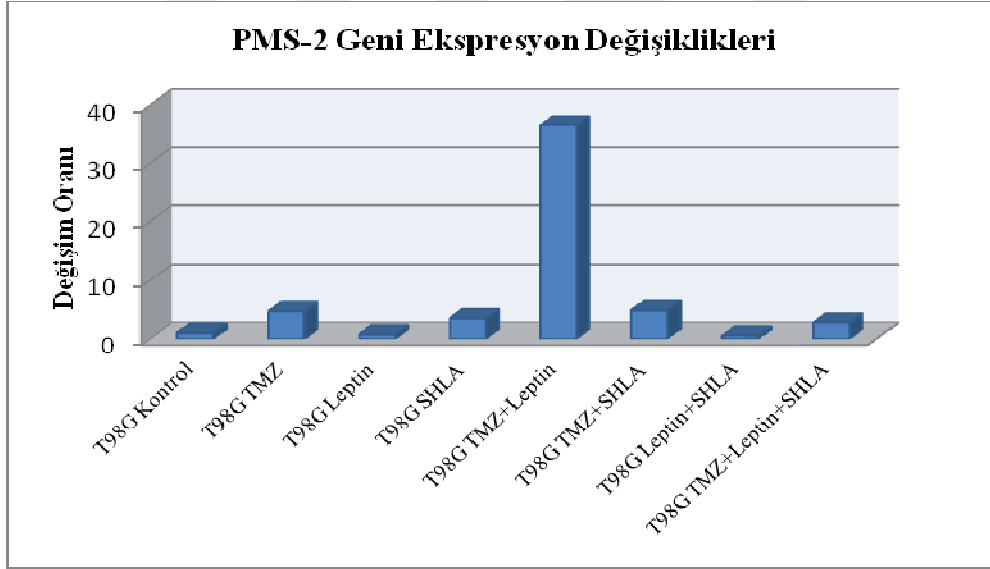
**Şekil 20.** MLH1 geni ekspresyon değişimi.

#### 4.4.3. PMS2 geni ekspresyon değişimi

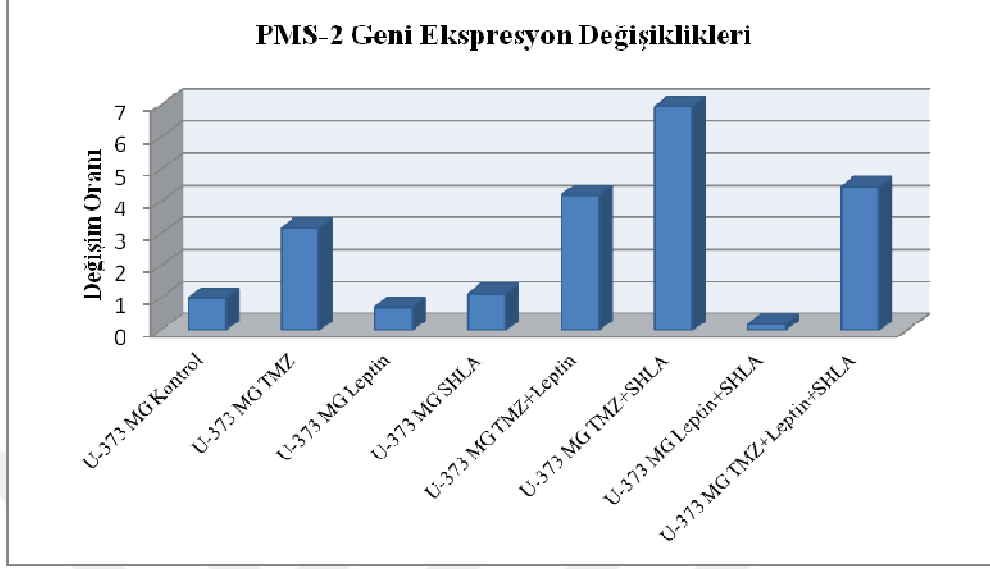
Glioblastoma hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra PMS2 geninde meydana gelen ekspresyon değişimi hücre tipine göre farklılık gösterdiği için bu değişiklikler LN-405 için Şekil 21’de, T98G için Şekil 22’de ve U373 MG Şekil 23’de verilmiştir.



Şekil 21. LN-405 hücre serisinde PMS2 geni ekspresyon değişimi.



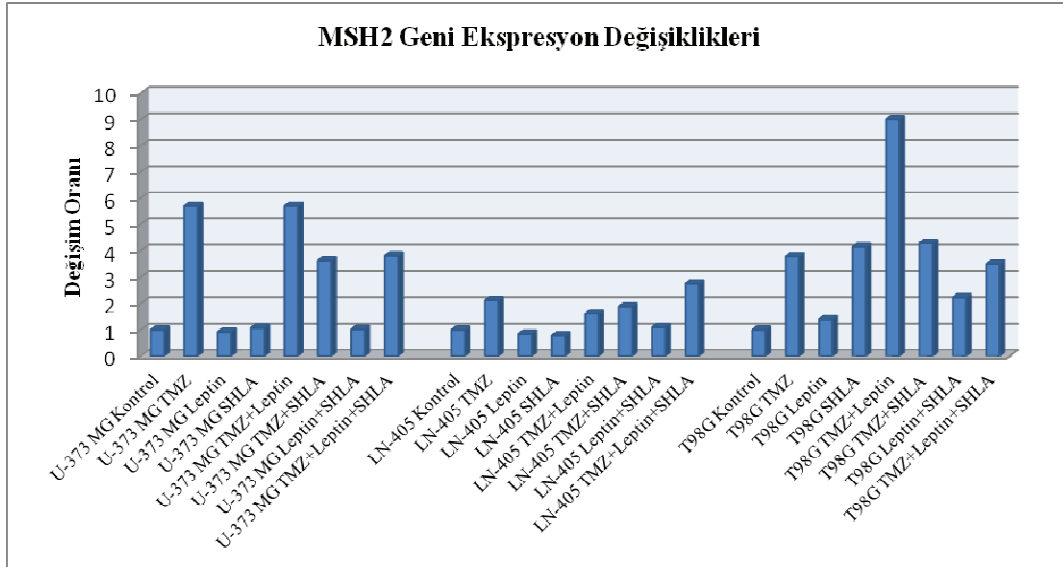
Şekil 22. T98G hücre serisinde PMS2 geni ekspresyon değişimi.



**Şekil 23.** U-373 MG hücre serisinde PMS2 geni ekspresyon değişimi.

#### 4.4.4. MSH2 geni ekspresyon değişimi

Glioblastoma hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra MSH2 geninde meydana gelen ekspresyon değişimi Şekil 24'te verilmiştir.

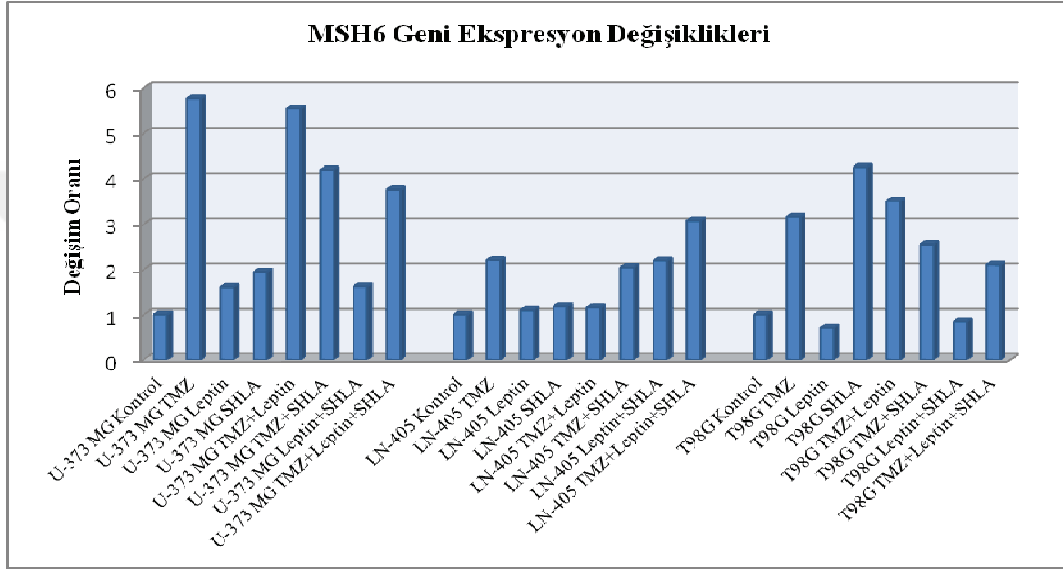


**Şekil 24.** MSH2 geni ekspresyon değişimi.



#### 4.4.5. MSH6 geni ekspresyon değişimi

Glioblastoma hücrelerinde oluşturulan çalışma gruplarında, moleküller uygulandıktan sonra MSH6 geninde meydana gelen ekspresyon değişimi şekil 25'te verilmiştir.



şekil 25. MSH6 geni ekspresyon değişimi.

#### 4.3. COMET Analizi

Her bir hücre serisinde, TMZ (IC<sub>50</sub> değeri), leptin (0.1  $\mu$ M) ve SHLA (1000 ng) moleküllerin tek tek ve kendi aralarındaki kombinasyonları hücrelere sunulduktan sonra hücrelerdeki olası genomik DNA hasarı COMET yöntemi ile belirlenmiştir. Her bir grupta saptanan DNA hasarı oranı ve DNA hasarı açısından grupların birbirlerine göre karşılaştırmaları sırasıyla Tablo 15'te ve Tablo 16'da verilmiştir. Her 3 glioblastoma hücre serisinde de gruplar arasında DNA hasarı açısından anlamlı bir fark bulunmaktadır ( $\leq 0.001$ ).

**Tablo 15.** LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerinde saptanan DNA hasarı.

Hücre serisi	LN-405	T98G	U373 MG	
Gruplar	Hasar oranı (%)	Hasar oranı (%)	Hasar oranı (%)	p
Kontrol	19.6	5.0	1.9	≤0.001
TMZ	60.3	37.4	5.2	≤0.001
Leptin	25.3	11.7	6.9	≤0.001
SHLA	14.1	9.7	6.5	≤0.001
TMZ + Leptin	26.2	42.9	10.1	≤0.001
TMZ + SHLA	8.7	32.6	10.9	≤0.001
Leptin + SHLA	28.4	24,1	3.8	≤0.001
TMZ + Leptin+ SHLA	40.4	36.7	11.4	≤0.001

**Tablo 16.** LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerinde grupların birbirlerine göre DNA hasarı açısından karşılaştırmaları.

Grup	Karşılaştırma Grubu	LN405 P	T98G p	U373 MG p
Kontrol	TMZ	<0.001	<0.001	0.143
	Leptin	0.388	0.042	0.070
	SHLA	0.319	0.142	0.076
	TMZ + Leptin	0.398	<0.001	0.008
	TMZ + SHLA	0.048	<0.001	0.006
	Leptin + SHLA	0.252	<0.001	0.362
	TMZ+ Leptin + SHLA	0.021	<0.001	0.004
	TMZ	Leptin	<0.001	<0.001
SHLA		<0.001	<0.001	0.564
TMZ + Leptin		<0.001	0.511	0.035
TMZ + SHLA		<0.001	0.558	0.034
Leptin + SHLA		<0.001	0.019	0.463
TMZ + Leptin + SHLA		0.034	0.937	0.019
Leptin	SHLA	0.008	0.538	0.897
	TMZ + Leptin	0.882	<0.001	0.327
	TMZ + SHLA	0.001	0.001	0.279
	Leptin + SHLA	0.609	0.005	0.227
	TMZ + Leptin + SHLA	0.040	<0.001	0.216
SHLA	TMZ + Leptin	0.031	<0.001	0.209
	TMZ + SHLA	0,183	<0.001	0.180
	Leptin + SHLA	0.008	0.001	0.244
	TMZ + Leptin + SHLA	<0.001	<0.001	0.127
TMZ + Leptin	TMZ + SHLA	0.003	0.327	0.836
	Leptin + SHLA	0.781	0.023	0.015
	TMZ + Leptin + SHLA	0.118	0.552	0.704
TMZ + SHLA	Leptin + SHLA	0.001	0.286	0.014
	TMZ + Leptin + SHLA	<0.001	0.675	0.881
Leptin + SHLA	TMZ + Leptin + SHLA	0.170	0.100	0.008

#### 4.4. Akım Sitometri Analizi

Her bir hücre serisinde, TMZ (IC<sub>50</sub> değeri), leptin (0.1 µM) ve SHLA (1000 ng) moleküllerinin tek tek ve kendi aralarındaki kombinasyonları hücrelere sunulduktan sonra moleküllerin hücre döngüsüne olan etkileri Tablo 17’de ve Tablo 18’de verilmiştir. Moleküllerin hücre döngülerine etkileri açısından hücre serilerinde ki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (≤0.001).

**Tablo 17.** LN-405, T98G ve U373 MG hücre serileride moleküllerin hücre döngüsüne olan etkileri.

Hücre serisi	LN-405			T98G			U373 MG			
Döngü Gruplar	G0/G1 1 (%)	G2/M (%)	S (%)	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)	p
Kontrol	82	0	18	90	0	10	75	13	12	≤0.001
TMZ	*	-	-	99	0	1	-	-	-	≤0.001
Leptin	83	0	17	100	0	0	73	9	18	≤0.001
SHLA	89	0	11	87	0	13	78	9	13	≤0.001
TMZ + Leptin	-	-	-	80	0	20	20	6	74	≤0.001
TMZ + SHLA	-	-	-	84	0	16	3	0	97	≤0.001
Leptin + SHLA	85	0	15	88	0	12	70	12	18	≤0.001
TMZ + Leptin+ SHLA	-	-	-	84	0	16	19	0	81	≤0.001

\* Hücreler parçalandığından dolayı veri alınamamıştır.

**Tablo 18.** LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerinde grupların birbirlerine göre hücre döngüsüne olan etkileri.

Grup	Karşılaştırma Grubu	LN-405 P	T98G p	U373 MG p
Kontrol	TMZ	-	0.005	-
	Leptin	0.852	0.001	0.376
	SHLA	0.160	0.506	0.662
	TMZ + Leptin	-	0.048	≤0.001
	TMZ + SHLA	-	0.207	≤0.001
	Leptin + SHLA	0.568	0.651	0.494
	TMZ + Leptin + SHLA	-	0.207	≤0.001
	TMZ	Leptin	-	0.316
SHLA		-	0.001	-
TMZ + SHLA		-	≤0.001	-
Leptin + SHLA		-	0.002	-
TMZ + Leptin + SHLA		-	≤0.001	-
Leptin		SHLA	0.221	≤0.001
	TMZ + Leptin	-	≤0.001	≤0.001
	TMZ + SHLA	-	≤0.001	≤0.001
	Leptin + SHLA	0.700	≤0.001	0.782
	TMZ + Leptin + SHLA	-	≤0.001	≤0.001
SHLA	TMZ + Leptin	≤0.001	0.182	≤0.001
	TMZ + SHLA	-	0.547	≤0.001
	Leptin + SHLA	0.400	0.831	0.434
	TMZ + Leptin + SHLA	-	0.547	≤0.001
TMZ + Leptin	TMZ + SHLA	-	0.462	≤0.001
	Leptin + SHLA	≤0.001	0.123	≤0.001
	TMZ + Leptin + SHLA	-	0.462	0.042
TMZ + SHLA	Leptin + SHLA	≤0.001	0.415	≤0.001
	TMZ + Leptin + SHLA	-	0.1000	≤0.001
Leptin + SHLA	TMZ + Leptin + SHLA	≤0.001	0.415	≤0.001

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında; leptin ve SHLA moleküllerinin TMZ kemoterapötik direncine olan etkileri glioblastoma hücre serilerinde araştırılmıştır. TMZ, leptin ve SHLA molekülleri tek ve kombine formlarıyla GB hücre serilerine uygulandıktan sonra TMZ kemoterapötik direncinde rol aldığı bilinen MGMT, MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 genlerinin ekspresyonları RT-PZR, genomik DNA hasar etkileri COMET ve hücre döngüsüne olan etkileri de akım sitometrisi ile saptanmıştır.

### 5.1. TMZ, Leptin ve SHLA Sitotoksitesi

GB hücre serilerinin TMZ duyarlılığına ilişkin yapılan çalışmalarda, hücrelerin birbirinden farklı düzeyde TMZ duyarlılığına sahip olduğu belirtilmektedir (Kamzawa ve ark., 2003; Torres ve ark., 2011; Lan ve ark., 2016; Lee , 2016; Urdiciain ve ark., 2018)

Lan ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada T98G ve U373 MG hücre serilerinin TMZ duyarlılığını ( $IC_{50}$ ) 48.saat için sırasıyla 3457.8  $\mu M$  ve 483.5  $\mu M$  olarak saptadıkları belirtilmektedir. Guo ve ark. (2019) tarafında yapılan çalışmada da T98G hücre serisi için TMZ  $IC_{50}$  değeri 3468.8  $\mu M$  ve U373 MG için ise 529.8  $\mu M$  olarak saptandığı bildirilmektedir. Ayrıca, Zhang ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada U373 MG için TMZ  $IC_{50}$  değeri 759  $\mu M$ , T98G için 1274  $\mu M$  olarak bildirilmiştir. Bu çalışmalarda belirtildiği gibi TMZ duyarlılığı çalışmalar arası farklılık göstermektedir. Web kaynaklı veri bankaları aracılığıyla yapılan araştırmada [https://www.cancerrxgene.org/translation/Drug/1375#t\\_IC50](https://www.cancerrxgene.org/translation/Drug/1375#t_IC50) uzantılı web adresinden GB hücre serilerinde TMZ  $IC_{50}$  değerinin 37-926  $\mu M$  arasında değiştiği belirtilmiştir. Çalışmalarda, TMZ duyarlılığının birbirlerinden farklı çıkmasının birçok nedeni vardır. Bunları, kullanılan hücrelerin tümör derecesi ve pasaj sayısı, kullanılan medyum ve içeriği, flaskların yüzey içeriği, laboratuvar şartları (Damiani ve ark., 2019), test tipi (MTT, XTT, WST1, vb), moleküllerin çözündüğü solüsyon, moleküllerin inkübasyon süresi ve verilerin analiz edildiği programlar (He ve ark., 2016) şeklinde özetleyebiliriz.

Bu tez çalışmasında TMZ'ye dirençli olduğu bilinen (Lee ve ark., 2016) T98G hücre serisinin IC<sub>50</sub> değerini 2352.96 µM ve TMZ'ye duyarlı (Lee ve ark., 2016) olduğu bilinen U373 MG hücre serisinin ise 800 µM olarak saptanmıştır. LN-405 hücre serisinin 1541.85 µM olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında da T98G'nin TMZ duyarlılığı beklenildiği gibi diğer iki hücre serisinden daha yüksek bulunmuştur. Bu yönüyle TMZ duyarlılığı açısından tez çalışmasından elde edilen veriler bir takım çalışmalara göre (Kanzawa ve ark., 2003; Torres ve ark., 2011; Lo dico ve ark., 2018) yüksek olsa da yukarıda belirtilen (Zhang ve ark., 2015; Lan ve ark. 2016; Guo ve ark. 2019) çalışmalarla uyumludur.

Tez çalışması kapsamında leptinin de GB hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Buna göre leptinin 0.01, 0.1, 0.2 ve 1 µM dozlarıyla yapılan sitotoksik araştırmasında leptinin tüm hücre serilerimiz için sitotoksik olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle, IC<sub>50</sub> değeri belirlenmemiştir.

Normal sağlıklı insandaki leptin düzeyinin in vitro ortamda eşdeğerinin 10 ng/ml olduğu saptanmıştır. Obezler için ise bu değer 100 ng/ml'ye kadar çıkabilmektedir (Dubois ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında 0.01, 0.1, 0.2 ve 1µM konsantrasyonlarda leptin molekülü hücrelere verilerek 72 saat sonra sitotoksikite analizi yapılmıştır. LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerinde en yüksek dozda bile hücre yaşam oranı %80'nin üzerinde saptanmıştır. Hücre hatları içerisinde leptine en hassas cevap veren hücre serisi 0.01, 0.1 ve 1'lik dozlarda %80'e yakın yaşam oranı ise U373 MG olarak saptanmıştır. T98G hücre hattında leptinin tüm dozlarında hücre yaşam oranı kontrole yani %100'e yakın saptanmıştır. LN-405 hücre serisinde ise 0.01 µM'lık dozda hücre yaşam oranı %90'ın altına düşmüş olsa bile doz arttıkça kontrol grubuna yakın bir canlılık saptanmıştır. Tez çalışmasındaki amaçlarımızdan biri de leptinin TMZ duyarlılığındaki rolünün açıklanması olduğundan çalışmada kullanılacak leptin miktarı 0.1 µM olarak seçilmiştir. Çünkü, obez kabul edilen bir insanın periferik kanında bulunan ortalama leptin düzeyinin in vitro karşılığı 0,1 µM olarak belirtilmektedir.

SHLA molekülünün barındırdığı mutasyonlar D23L/L39A/D40A/F41A şeklinde saptanmıştır. OB-R'ye bağlanmak için SHLA molekülünün leptin molekülüne göre 60

kat daha yüksek afiniteye sahip olduğu belirlenmiştir (Candelaria ve ark., 2017). Bu sebepten ötürü tez çalışmasında leptin reseptörü olarak SHLA seçilmiştir.

Bu tez çalışmasında 10, 100, 500 ve 1000 ng'lık konsantrasyonlarda SHLA molekülü hücrelere verilerek 72 saat sonra sitotoksikite analizi yapılmıştır. LN-405 ve T98G hücre hatlarının SHLA'nın hücre yaşam oranı genel olarak %85'in üzerinde saptanmıştır. U373 MG hücre hattında ise doz arttıkça hücre yaşam oranı düşmüştür fakat en yüksek dozda (1000 ng) bile hücre yaşam oranı %70'in üzerine çıkmıştır. Bundan dolayı SHLA için her 3 GB hücre serisinde de sitotoksik bir doza ulaşamamıştır. Fiedor ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışma sonucunda SHLA'nın hücresel etkilerinin hücre tipine göre değişebileceği bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizim tez çalışmasında elde ettiğimiz bulgularla uyumludur.

Yapılan literatür taramasında, SHLA'nın GB dahil diğer kanserler üzerindeki etkisine ilişkin herhangi bir veri ve yayın bulunamamıştır. Bu tez çalışması SHLA'nın GB hücre serileri üzerindeki sitotoksik, genotoksik etkisini araştıran ilk çalışmadır.

Hücre serisi çalışmalarında elde edilen  $IC_{50}$  değerlerinin birbirlerinden farklı olmasının birçok nedeni bulunmaktadır. Bunları, kullanılan hücre serilerinin genomik yapısı, pasaj sayısı, kullanılan medyum, sitotoksikite testinin tipi ve genel laboratuvar şartları olarak özetleyebiliriz (Damiani ve ark., 2019) . Bu nedenle elde edilen veriler çalışmaya özgüdür. Burada önemli olan aynı testin tekrarında aynı sonuçların saptanabilmesidir. Bu tez çalışmasında da veriler her biri 4 tekrarlı 2 bağımsız testle ve morfolojik değerlendirmeler eşliğinde elde edilmiştir. Bu nedenle sonuçlarımızın güvenilirliği yüksektir.

## **5.2. TMZ, Leptin ve SHLA'nın TMZ Direncinde Rol Alan Genlerin Ekspresyonuna Etkisi**

### **5.2.1. MGMT geninin ekspresyona etkisi**

Genel olarak, MGMT ekspresyonunun azalmasının hücrenin TMZ duyarlılığını arttırdığı bilinmektedir. MGMT ekspresyonunun metilasyon aracılığı inhibisyonunun



GB'de TMZ direncinin tespit edilmesinde prognostik bir faktör olabileceği rapor edilmiştir (Esteller ve ark., 1999; Paz ve ark., 2004; Hegi ve ark., 2008)

Bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmada, U373 MG hücre hattında MGMT ekspresyonu saptanmadığı için TMZ, leptin ve SHLA'nın etkisi saptanamamıştır.

LN-405 hücre serisinde ise TMZ'nin leptin ve SHLA ile kombinasyonlarında MGMT ekspresyonunu kontrole göre sırasıyla 3.5 ve 2. kat arttırdığı TMZ'nin ise tek başına kontrole göre 1.3 kat arttığı saptanmıştır. LN-405 hücre serisinde, leptin ve SHLA kullanımının MGMT ekspresyonu üzerinden TMZ direncine katkı sunma potansiyelinin düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tez kapsamında değerlendirilen ve TMZ dirençli olarak rapor edilen (Lee ve ark., 2016) diğer hücre serisi T98G'de, TMZ'nin MGMT ekspresyonunu 2.2 kat arttırdığı ve bu artışın TMZ+Leptin kombinasyonunda TMZ'ye göre yaklaşık 6 kat arttığı saptanmıştır. Ancak hem TMZ hem de leptinden saptanan MGMT ekspresyon artışı SHLA'nın da yer aldığı üçlü kombinasyonda 1,59 kata kadar azalmıştır. Çünkü SHLA'nın MGMT ekspresyonu üzerindeki etkisi kontrole neredeyse aynı düzeyde saptanmıştır. Bu nedenle, sonuçlarımız, SHLA'nın TMZ ve leptinden kaynaklanan MGMT ekspresyon artışının azaltmada aday bir molekül olabileceğini göstermektedir. Obez sınırdaki hastalarda, TMZ uygulaması ile artabilme potansiyeline sahip MGMT ekspresyonun SHLA ile azaltılarak TMZ yanıtı güçlendirilebilir. Bu tez çalışması ile SHLA'nın bu potansiyel terapötik etkisi ilk kez gösterilmiştir.

Kitange ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, TMZ'nin ksenograft orthotopik tümör dokusu üzerindeki MGMT ekspresyonuna olan etkisi araştırılmıştır. GBM43 isimli hücre ile oluşturulan tümörde, TMZ uygulamasının 7 gün sonunda MGMT ekspresyonunu kontrole göre 2.4 kat arttırdığı ancak GBM14 isimli hücre serisinde ise MGMT ekspresyonunda değişikliğe yol açmadığı bildirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan TMZ uygulamasında, TMZ'nin T98G hücre serisinde 2.28, LN-405 hücre serisinde de 1.35 kat artışa neden olduğu saptanmıştır. Tez çalışması sonucumuz, TMZ'nin MGMT ekspresyonu üzerindeki etkisinin hücre tipine

göre farklılık gösterebileceğini işaret etmesi açısından Kitange ve ark. (2009) çalışması ile uyumludur.

Taspınar ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, TMZ uygulanan primer GB kültür hücrelerinde ve GB hücre serilerinde, TMZ'nin MGMT ekspresyonu üzerinde hücre tipine göre farklı etki gösterdiği doğrudan MGMT ekspresyonunu arttırıcı veya azaltıcı bir etkisinden söz edilemeyeceği belirtilmiş ve bu farklılığın GB hücre genetik heterojenitesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da TMZ uygulamasının MGMT ekspresyonu üzerindeki etkisinin Taspınar ve ark (2013) çalışmasıyla uyumlu olduğu ve TMZ'nin MGMT ekspresyonunu değiştirebileceği ancak net bir etkiden söz edilemeyeceği sonucuna ulaşılmıştır.

Hegi ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada, MGMT geni metile (MGMT gen ekspresyonu düşük veya olmayan) olan hastalarda yaşam süresinin, MGMT geni eksprese olan hastalara göre yüksek olduğu ve TMZ uygulamasının radyoterapi ile sağlanan sağkalım süresini (sırasıyla 21.7, 15.3 ay) arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada (Hegi ve ark. 2005) kemoterapinin mutlaka kullanılması gerektiği vurgulanmış ancak TMZ'nin MGMT ekspresyonuna olan etkisi araştırılmamıştır.

McCormack ve ark. (2009) tarafından, hipofiz tümörleri üzerine yapılan çalışmada, tümörün TMZ'ye olan yanıtında MGMT ekspresyonunun etkili olup olmadığı immünohistokimya tekniğinden faydalanılarak araştırılmıştır. TMZ tedavisine duyarlı olan hastadan alınan tümör dokularında düşük MGMT ekspresyon seviyesi saptandığı, TMZ tedavisine direnç gösteren hastaların dokularında ise MGMT ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir.

Perazzoli ve ark. (2015)'nce, düşük (A172 ve LN229) ve yüksek (SF268 ve SK-N-SH) MGMT ekspresyonu saptanan GB hücre hatlarında yapılan TMZ sitotoksikite çalışmasında, düşük MGMT ekspresyonu içeren hücrelerin TMZ'ye karşı daha duyarlı oldukları (TMZ için düşük IC<sub>50</sub> değeri) buna karşın yine bu hücre serilerinde MMR kompleksi üyelerinin ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmektedir.

Guo ve ark. (2019), GB hücre hatlarında MGMT ekspresyon seviyelerinin birbirinden farklı olduğunu ve MGMT ekspresyon yüksekliğinin TMZ direnci ile ilişkili

olduğu belirtilmektedir. Bu alışamada, TMZ'nin MGMT ekspresyonu üzerindeki etkisi değil, TMZ duyarlılığın MGMT ile ilişkili olduğu rapor edildiğinden tez çalışması sonuçlarımızla uyumluluğu tartışılamamaktadır. Çünkü, tez çalışması kapsamında TMZ yanıtının MGMT ekspresyonu ile ilişkisi değil TMZ'nin MGMT ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu nedenle bu tez çalışması sonunda elde edilen verilerin literatürde yer alan birçok TMZ-MGMT ilişkisi yayınları (Hegi ve ark., 2005; McCormack ve ark., 2009; Perazzoli ve ark., 2015; Guo ve ark., 2019) ile tartışması yapılamamıştır.

Literatürde hem leptin hem de SHLA'nın MGMT ekspresyonuna ilişkin her hangi bir yayın tespit edilmemiştir. Bu nedenle, leptin ve SHLA'nın MGMT ekspresyonu üzerindeki etkisi tartışılamamıştır. Bu tez çalışması, hem GB hem de diğer kanser türleri dâhil, leptin ve SHLA'nın tek ve kombine uygulamasında MGMT ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, MGMT ekspresyonu saptanan hücre serilerinde, TMZ uygulamasının MGMT ekspresyonunu hücre tipine bağlı olarak farklı düzeylerde değiştirebildiği, TMZ ve leptin kaynaklı MGMT ekspresyon artışının SHLA kullanımı ile azaltılabileceği ilk kez gösterilmiştir. Buna göre, klinik yaklaşımda, leptin varlığında TMZ kullanımı ile oluşan dirençte SHLA'nın terapötik etkisi dikkate alınabilir. Ancak, bu sonuçlar, primer kültür kaynakları kullanılarak (özellikle GB kanser kök hücreleri) 3 boyutlu ve organoid modellerde doğrulanması, genom ebadında genetik ve epigenetik çalışmalarla klinik çalışma düzeylerine çıkarılmasına gereksinim duymaktadır.

### **5.2.2. MMR genlerinin ekspresyona etkisi**

Hücrelerin MMR fonksiyonu ile TMZ duyarlılığı arasında sıkı bir ilişki vardır (Sarkaria ve ark., 2008; Felsberg ve ark., 2011). TMZ gibi metilleyici ajanlara karşı gelişen direnç sıklıkla yanlış eşleşme tamirinde görevli proteinlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerle ilişkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, MMR fonksiyonuyla MGMT fonksiyonu arasında da zıt bir ilişki vardır (Kaina ve ark., 2010). MMR fonksiyon kaybı DNA'da mutasyon artışına neden olacak ve hücre TMZ kökenli sonuçsuz döngü modeline giremeyecektir. Sonuçsuz döngü modeline giremeyen hücre

mutasyon varlığında yaşamına devam edecek ve yeni mutasyonlar varlığında kemoterapötik yanıtı direnç gösterebilecektir. Bu nedenle genel olarak MMR gen fonksiyonlarının artışının TMZ duyarlılığına katkı sunması beklenmektedir.

Be tez çalışması kapsamında yapılan MMR ekspresyon çalışmasında, TMZ, leptin ve SHLA'nın ayrı ayrı, ikili ve üçlü kombinasyonlarının MMR genlerinin ekspresyonlarına hücre tipine bağlı olarak farklı etki gösterdiği saptanmıştır. Dolayısıyla, TMZ kemoterapötik yanıtında, leptin ve SHLA'nın kemoterapötik duyarlılığı artırabilen veya azaltabilen tanımlanabilir ve net bir katkısının olduğunun belirtilemeyeceği ve olası katkının hücrenin genomik ve epigenetik yapısı bağlamında farklı unsurlarla kontrol edilebileceği anlaşılmaktadır.

Tez kapsamındaki MMR ekspresyon çalışmasında, TMZ'nin her 3 hücre serisinde de MLH1 ekspresyonunu arttırdığı ve TMZ'nin SHLA ile kullanımının TMZ yanıtını güçlendirebileceği saptanmıştır. Ancak leptinin tek ve SHLA ile olan kullanımında TMZ'ye göre MLH1 ekspresyonunu azaltabileceği ve leptin varlığının TMZ yanıtını azaltabileceği saptanmıştır.

PMS2 ekspresyonu açısından sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde, TMZ'nin tek başına PMS2 gen ekspresyonunu arttırdığı ve leptinin TMZ ile kullanımının U373 MG ve T98G'de PMS2 gen ekspresyonunu dramatik biçimde arttırdığı, SHLA'nın ise her üç hücre serisinde de PMS2 gen ekspresyonunu artırarak TMZ yanıtının güçlendirilmesinde rol alabileceği saptanmıştır. PMS2 gen ekspresyon sonucu hem leptinin hem de SHLA'nın TMZ yanıtını güçlendirebileceğini ve bu etkide SHLA'nın daha etkin olabileceğini göstermiştir.

MSH2 ekspresyonu açısından sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde, TMZ'nin tek başına MSH2 gen ekspresyonunu arttırdığı, leptin ve SHLA'nın tek ve kombine kullanımlarında her üç hücre serisinde de farklı etki gösterdiği tespit edilmiştir. TMZ dirençli olduğu bilinen (Lee ve ark., 2016) T98G'de ise leptinin TMZ ile birlikte MSH2 ekspresyonunu kontrole göre 9 yalnız TMZ kullanımına göre 2.3 kat arttırdığı saptandığından leptin MSH2 gen ekspresyonunu dirençli hücre serisinde arttırabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Leptinin MSH2 gen ekspresyonu üzerindeki etkisi, benzer bir biçimde T98G hücre serisinde de PMS2 gen ekspresyonunda da saptanmıştır.

Yine SHLA'nın da yalnızca T98G hücre serisinde ekspresyona olumlu katkı sağladığı saptanmıştır.

MSH6 ekspresyonu açısından sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde, yine TMZ'nin tek başına kullanımının MSH6 gen ekspresyonunu arttırdığı, U373 ve LN-405 hücre serilerinde leptin ve SHLA'nın TMZ ile olan ikili kombinasyonlarındaki MSH6 gen ekspresyon artışının TMZ'nin tek başına gösterdiği ekspresyon artışı ile benzer olduğu, T98G'de leptinin TMZ ile birlikte TMZ'nin tek başına olan etkisine göre kısmi bir ekspresyon artışına neden olduğu, üçlü kombinasyonunda ise yalnızca LN-405'te ekspresyon artışına neden olduğu saptanmıştır. MSH6 gen ekspresyon sonuçları, TMZ'nin tek başına sağladığı ekspresyon artışının leptin ve SHLA ile elde edilemediği, leptin ve SHLA'nın MSH6 gen ekspresyonuna etkisinin hücre tipine göre farklılık gösterdiği sonucunu doğurmuştur.

Ma ve ark. (2002)'lerinin, TMZ duyarlı ve TMZ dirençli insan glioma SF188 hücre serilerinde yaptığı çalışmada, hMLH1 ve PMS proteinlerinin ekspresyonlarının duyarlı ve dirençli hücre serilerinde değişmediği ve SF188 hücrelerinin TMZ direncinin yanlış eşleşme tamiri enzimleriyle ilgili olmasının muhtemel olmadığını belirtmişlerdir (Ma ve ark., 2002). Bu çalışmada TMZ'nin MLH1 ve PMS genlerinin ekspresyon değişimine etkisi araştırılmamıştır.

Mirzoeva ve ark. (2006), U87, U251, SF188 ve T98G insan glioblastoma hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, U87 hücrelerinde MLH1'i siRNA aracılı susturdularında, TMZ-indüklü tek ve çift-iplik DNA kırıklarınının anlamlı şekilde azalttığı COMET yöntemi ile gösterilmiştir. Bununla birlikte, glioblastomada TMZ uygulanmasıyla birlikte MLH1'in Mre11/Rad50/Nbs1'den oluşan MRN kompleksleri ile birlikte etkileşime girerek, TMZ ile indüklenen G2 faz inhibisyonunun ve TMZ sitotoksitesinin arttığı bildirilmiştir (Mirzoeva ve ark., 2006). Ancak bu çalışmada TMZ uygulaması sonrası MLH1ekspresyonu araştırılmamıştır. Bu tez çalışmasında ise TMZ'nin MLH1 ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. MLH1 ekspresyon artışı, hücrede sonuçsuz döngünün başlamasına ve DNA kırıklarını artışına neden olabilir. Bu açıdan sonuçlarımız Mirzoeva ve ark., (2006) çalışmasını dolaylı olarak destekler niteliktedir.

Stark ve ark. (2010) tarafından yapılan ve 42 GB tanılı hastada immunohistokimya ile MLH1, MSH2 ve MSH6 proteinlerinin ekspresyonlarının araştırıldığı çalışmada, MLH1 proteinin tekrarlanmış GB olgularında, primer tanı almış hastalarda göre anlamlı bir biçimde azaldığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, MLH1 ekspresyonunun leptin ve SHLA ile azaltılabileceği gösterilmiştir. Stark ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışma sonuçlarına göre MLH1 ve MSH6 ekspresyon azlığı uzun süreli sağ kalıma katkı sunuyorsa, leptin ve SHLA kullanımı GB’de yaşam süresine katkı sunabilir. Ancak bu sonucun büyük klinik çalışmalar ile doğrulanması gerekmektedir. Çünkü Cahill ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, TMZ tedavisi alan GB hastalarında MSH6 protein kaybının tümör progresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla sonuçlar arasında da uyumsuzluklar bulunmaktadır. Bunun temel nedeni çalışma dizaynı ve araştırma tekniklerinin birbirlerinden farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Felsberg ve ark. (2011)’de 80 glioblastoma tanısı almış hastalar (58 erkek, 22 kadın) üzerinde yaptıkları çalışmada, tekrar eden GB’ler MMR genlerinin ekspresyonunun azaldığını bildirmektedir. MMR genlerinin en az birinin mutasyon sonucu protein düzeyinde ekspresyon azlığı hücrelerin sonuçsuz döngüye girmesini engelleyerek hücrenin yaşamını devam ettirecektir. Bu tez çalışmasında leptin ve özellikle SHLA’nın TMZ ile MMR genlerinden PMS2 ve MSH2 ekspresyonunu değiştirerek hücrenin sonuçsuz döngüye girmesini tetikleyebileceği böylece TMZ yanıtını güçlendirebileceğini işaret etmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde TMZ yanıtında leptin ve/veya SHLA potansiyel bir etkiye sahip olabilir.

Shinsato ve ark. (2013)’larının TMZ’ye duyarlı ve dirençli hale getirdikleri U251 insan glioblastoma hücrelerinde, MLH1 mRNA ve protein ekspresyonunun U251 hücrelerine göre, TMZ-dirençli hücrelerde daha düşük olduğu, MLH1 mRNA ekspresyonunun zamana bağlı olarak U251 hücrelerinde anlamlı olarak arttığı fakat TMZ-dirençli hücrelerde çok az bir indüklenmenin olduğu görüldüğü belirtilmektedir. PMS2 protein ekspresyonu ise MLH1 protein ekspresyonu ile korelasyon göstermiş fakat mRNA ekspresyonu bakımından bir uyumluluk göstermemiştir. Ayrıca, TMZ uygulamasından sonra MLH1’deki gibi PMS2 proteininin ve mRNA’sının artışı U251 hücrelerine göre daha düşük olarak saptanmıştır. Bu nedenle, araştırmacılar, MLH1 ve/veya

PMS2'deki azalışın TMZ direncinde rol oynadığını önermişlerdir. TMZ direncinde bu genlerin ekspresyonunun azalması beklenen bir durumdur. Bu tez çalışmasında da TMZ uygulaması sonucunda MLH1 ve PMS2 gen ekspresyonunda artış saptanmıştır. Aynı çalışmada (Shinsato ve ark., 2013), TMZ uygulanmış 11 GBM hastasının ilk teşhisteki ve hastalığın tekrar ettiği dönemdeki dokularından, immünohistokimya yöntemine göre MLH1 ve PMS2 protein ekspresyonlarını incelediklerinde, her iki protein için hastalığın tekrar ettiği dönemdeki ekspresyonlarının ilk teşhisteki ekspresyonlara göre azaldığı bulunmuştur (Shinsato ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında leptinin MLH1 ekspresyonunu azaltarak TMZ duyarlılığını azaltabileceği ancak SHLA ile PMS2 ekspresyonu üzerinden ise TMZ yanıtının artırılabilirliği sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bu sonuç, leptin düzeyinin azaltılarak (MLH1 etkisinin azaltılmasıyla) PMS2 üzerinden TMZ yanıtının güçlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Castro ve ark., (2015) yapılan çalışmada, Gli36, U87 ve DBRTG insan glioblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 25 µM TMZ uygulamasının her üç hücre hattında da MLH1 ve MSH2 ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında da TMZ'nin MLH1 ve MSH2 ekspresyonlarını arttırdığı saptanmıştır. Bu bakımdan tez çalışması sonucumuz Castro ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışma sonuçlarıyla uyumludur.

Sun ve ark. (2018)'lerinin tekrarlamış GB hastalarında ve LN18, RG GB hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, western blot analizleri sonucu TMZ-tedavi alan hastalarda MSH6 protein ekspresyonunun hastalığın ilk teşhis edildiği dönemdekine göre anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur. Gerçekleştirilen immünohistokimya analizinde de MSH6 protein ekspresyonunun anlamlı şekilde upregüle olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada, TMZ'ye dirençli hale getirilen LN18 ve RG hücre hatlarında dirençsiz durumdaki hallerine göre MSH6 protein ekspresyonunun arttığı western blot analizleri sonucu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında da IC<sub>50</sub> değerindeki TMZ uygulamasının GB hücre serilerinde MSH6 gen ekspresyonunu arttırdığı ve bu nedenle TMZ uygulaması sonucu elde edilen MSH6 gen ekspresyon sonuçlarımız Sun ve ark. (2018) çalışması ile uyumludur.

Tez çalışması kapsamında elde edilen TMZ, leptin ve SHLA uygulaması MMR gen ekspresyon çalışma sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde, TMZ'nin tek başına MMR genlerinin ekspresyonlarını arttırdığı ve MMR genlerinin ekspresyonunu arttırdığı için SHLA'nın tek veya TMZ ile kombine kullanılabileceği, SHLA'nın kendisinin terapötik ajan olarak etki gösterebileceği ve leptin miktarının dikkate alınarak üçlü kombine uygulamaların terapötik etki açısından potansiyelinin olduğu ancak verilerin doğrulanması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

### **5.3. TMZ, Leptin ve SHLA'nın DNA Hasarına Etkisi**

Bu tez çalışmasında, LN-405, T98G ve U373 MG hücre serilerinde, TMZ, leptin ve SHLA moleküllerinin tek başına ve kombine uygulamalarının DNA hasarına olan etkisi COMET tekniği kullanılarak araştırılmıştır.

Araştırmalar, TMZ uygulamasının GB hücrelerinde doza bağlı DNA hasarının arttığını bildirmektedir (Marchesi ve ark., 2007; Annovazzi ve ark., 2015; Taspınar ve ark., 2013; Yanxin ve ark., 2017). TMZ gibi kemeterapötik ajanların hepsi DNA hasarını indükleme özelliğine sahiptir. Bu nedenle TMZ uygulaması sonucunda DNA hasarı artışı beklenen bilimsel bir durumdur. Bu tez çalışmasında da TMZ uygulanan hücre gruplarında genomik DNA hasarı kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır.

Ayrıca leptin ve SHLA'nın tek başlarına uygulandığı hücre gruplarında da DNA hasarının herbir grubunun kontrole göre arttığı saptanmıştır. Literatürde leptin ve SHLA'nı genomik DNA hasarına olan etkilerine ilişkin herhangi bir çalışma tespit edilmemiştir.

Hücre tipine göre gruplar arası DNA hasar ilişkisi incelendiğinde, LN-405 hücre serisinde TMZ ve leptinin DNA hasarını tetiklediği, SHLA'nın ise TMZ ve leptin gruplarında saptanan DNA hasar oranını azaltıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca üçlü kombinasyon ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, TMZ+Leptin+SHLA ve TMZ+Leptin ilişkisi hariç üçlü kombinasyonda saptanan DNA hasar oranını kontrol, tekli ve ikili kombinasyonlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p < 0.05$ ) yüksek saptanmıştır.



T98G hücre serisinde DNA hasarı istatistiksel olarak incelendiğinde, TMZ, leptin uygulaması kontrole göre DNA hasarını anlamlı biçimde arttırırken, SHLA'nın tek başına uygulanmasında saptanan DNA hasarı artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Genel olarak tüm ikili ve üçlü gruplar incelendiğinde, TMZ, leptin ve SHLA'dan bağımsız DNA hasarını arttırmaktadır. Ayrıca, leptin , TMZ varlığında DNA hasarını arttırmakta ancak ikili kombinasyonlarında SHLA varlığında, TMZ ve leptin ikili kombinasyonlarına göre DNA hasarı azalmaktadır. Bu sonuçlar leptinin DNA hasarını arttırabileceği ancak SHLA'nın TMZ ve leptine göre DNA hasarını kombinasyonlarda azaltıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. İlginç olan bir diğer durum ise leptinin SHLA ile olan kombinasyonunda saptanmıştır. SHLA, TMZ ile olan kombinasyonlarda DNA hasarını azaltıcı etki gösterirken leptin ile birlikte kullanıldığında ise DNA hasarını leptinin ve SHLA'nın tekli kullanımına göre anlamlı bir biçimde arttırmıştır.

U373 MG hücre serisinde ise, TMZ, leptin ve SHLA tekli kullanımda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da DNA hasarını arttırmakta, leptin ve SHLA TMZ ile ikili kombine uygulandığında TMZ'nin hasar etkisini istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde (sırasıyla  $p=0.035$ ,  $p=0.034$ ) arttırdığı saptanmıştır. Bu sonuç, leptin ve SHLA'nın TMZ'nin hasar etkisini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, leptin ve SHLA'nın tekli uygulanmasında saptanan DNA hasarı bu moleküller birlikte kullanıldığında azalmıştır. Bu veri TMZ dirençli olarak bilinen T98G hücre serisinde ise tam tersi bir biçimde saptanmıştır. Bu durum, yine leptin ve SHLA'nın literatürde tanımlanan fonksiyonlardan bağımsız farklı fonksiyonlarda rol alabileceklerini ancak bu özelliklerin hücre tipine göre farklılık gösterdiğini işaret etmektedir.

Yukarıdaki veriler bir bütün olarak ele alındığında, TMZ, leptin ve SHLA genomik DNA hasarını arttırmakta, bu etkileri ikili ve üçlü kombinasyonlarda farklılık göstermektedir. DNA hasar etkisi verileri, leptin ve SHLA'nın tanımlanan fonksiyonları dışından fonksiyonları olabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışması leptin ve SHLA'nın genomik DNA hasarına neden olabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

#### 5.4. TMZ, Leptin ve SHLA'nın Hücre Döngüsüne Etkisi

TMZ, leptin ve SHLA'nın tek başına, ikili ve üçlü kombinasyon uygulamalarının GB hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkisi akım sitometri yöntemi ile saptanmıştır. Bu tez çalışmasında, TMZ, leptin ve SHLA'nın hücre döngüsü üzerine olan etkilerine ilişkin veriler literatüre göre farklılık taşımaktadır.

LN-405 hücre serisinde TMZ içeren gruplarda yer alan hücreler deney aşamasında parçalandığından, TMZ içeren gruplar ile leptin ve SHLA içeren grupların hücre döngüsüne olan etkileri karşılaştırılamamıştır. Leptin ve SHLA'nın tek başlarına uygulanmasında ise kontrole göre hücre döngüsü açısından herhangi bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Genel olarak tekli kullanımda kontrolde olduğu gibi hücrelerin G0/G1 faz birikimi saptanmıştır.

T98G hücre serisinde tüm gruplara ait veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, TMZ'nin G2/M ve S fazı birikmesine neden olmadığı aksine, leptin gibi G1'de hücre birikmesine neden olduğu, TMZ'nin leptin ve SHLA varlığında S fazına geçişi indüklediği ve SHLA'nın TMZ ve leptine göre S fazına geçişi indükleyici etkisi olduğu saptanmıştır.

U373 MG hücre serisinin hücre döngüsü sonuçları incelendiğinde, TMZ'nin tek uygulanmasında hücre parçalandığından TMZ'nin tek başına olan hücre döngüsü etkisi saptanamamıştır. Ancak diğer gruplara ait veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, leptin ve SHLA'nın tek uygulandığında G0/G1'de hücre birikmesine neden olduğu ancak TMZ ile olan ikili kombinasyonlarda ise hücrelerin istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde S fazına girdiği ve S fazına yığılma etkisi bakımından SHLA'nın leptine göre daha tetikleyici olduğu saptanmıştır.

TMZ'nin alkilasyon ajanı olarak hücrelerde G2/M ve S faz birikmesine neden olduğu bilinmektedir. Bu özelliğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Perazzoli ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017; Alexiou ve ark. 2019; Li ve ark., 2019). TMZ'nin geç S fazı ve G2/M birikmesine neden olan etkisinde hücre tipi, TMZ'nin dozu ve inkübasyon süresi etkilidir. Li ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada, U251 hücre serisinde uygulanan TMZ'nin ( $>500 \mu\text{M}$ ) 72 saatlik inkübasyonunda hücrelerde G2/M

fazında hücre birikmesine neden olduğu, Perazzoli ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise IC<sub>50</sub> değerinde TMZ uygulanan ve ardından 120.saat inkübe edilen GB hücre serilerinde G2/M fazında hücre birikimi olduğu bildirilmiştir.

Wang ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada ise 12.5;25;50;100 µg/ml dozlarda TMZ uygulanan U87 MG hücrelerinde 96.saatın sonunda kontrol hariç tüm gruplarda G2/M ve S fazında hücre artışı olduğu, 25µg/ml lik olan hücre grubunda ise S fazındaki hücre artışının diğerlerine göre daha fazla olduğu belirtilmektedir.

Bu tez çalışmasında TMZ'nin tekli uygulamasının hücre döngüsüne olan etkisi yalnızca T98G hücre serisinde tespit edilmiştir. Diğer iki hücre serisinde (LN-405 ve U373 MG) TMZ grubunda yer alan hücreler parçalanmıştır. Ancak T98G hücre serisinde elde edilen verilerde TMZ'in G0/G1 fazında hücre birikmesine neden olduğu ancak TMZ'nin leptin ve SHLA ile kombine uygulamasında ise hücrelerin anlamlı bir biçimde S fazına geçiş gösterdiği saptanmıştır. TMZ'nin literatürde verilen G2/M, S faz birikme etkisi (Perazzoli ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017; Alexiou ve ark., 2019; Li ve ark., 2019) bu tez çalışmasında leptin ve SHLA varlığında saptanmıştır. Verilerimizin literatürle uyumlu olmamasının akım sitometri çalışmasının protokolünden kaynaklanan birçok nedeni olabilir. Hücre tipi, hücrenin pasaj sayısı, moleküllerin çözündüğü solüsyon, inkübasyon süresi ve akım sitometri yaklaşımındaki farklılıklar hücre döngüsü sonuçlarının farklı çıkmasına neden olabilir. Belirtilen bu faktörler sonuçlarımızın farklı çıkmasına neden olmuş olabilir.

Leptinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri incelendiğinde farklı dozlarda ve farklı hücre serilerinde uygulanan leptinin genel olarak S fazı geçişi tetiklediği bildirilmiştir (Saxena ve ark., 2007; Catalano ve ark., 2009; Chen ve ark., 2009; Han ve ark., 2012; Harbuzariu ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, leptinin genel olarak 72 saat inkübasyonda G0/G1'de hücre birikmesine neden olduğu saptanmıştır. Tez çalışması verilerimizin literatürle uyumlu olmamasının temel nedeni uygulanan hücre tipi ile leptin inkübasyon süresi (Catalano ve ark., 2009; Chen ve ark., 2009) ve uygulanan leptin miktarından kaynaklanabilir. Literatürde genel olarak 40-1000 ng/ml konsantrasyonda leptin kullanıldığı bildirilmektedir (Saxena ve ark., 2007; Catalano ve ark., 2009; Chen ve ark., 2009; Ptak

ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında ise leptin miktarı 35 ng/ml ve inkübasyon süresi de 72 saat olarak seçilmiştir. Akım sitometri sonucumuzdaki farklılık uygulamalardaki bu faktörlerin farklılığından kaynaklanabilir.

Yukarıda özetlenen TMZ ve leptin akım sitometri sonuçlarımızın literatürle uyumlu olmamasının temel nedeni moleküllerin inkübasyon süresinden kaynaklanabilir. Bu tez çalışmasında, TMZ ve leptin hücrelerde 72 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin iki katına çıkma zamanları (doubling time) dikkate alınarak inkübasyon süresi uzatılabilir. Çünkü, TMZ etki mekanizması açısından hücrelerin G2/M ve geç S fazı birikmesine neden olduğu ve leptinin de TMZ gibi hücrelerde S faz birikmesine neden olabileceği bildirilmektedir. Leptinin S faz birikmesine neden olması ile TMZ daha iyi bir sitotoksik etki gösterebilir. Tez çalışmamızda, leptin TMZ kombinasyonlarında saptanan DNA hasarı artışı bu etkiden kaynaklanmış olabilir. Ancak bu etkinin akım sitometride saptanması için 72 saatten daha fazla inkübasyon süresine ihtiyaç duyulabilir. Çünkü T98G ve U373 MG hücre serilerinin leptin ve SHLA varlığı S faz geçişini tetiklediği saptanmıştır.

SHLA'nın kanser hücre serilerinin hücre döngüsü üzerine olan etkilerine ilişkin literatürde herhangi bir veri bulunamamıştır. Bu tez çalışmasıyla, SHLA'nın tekli uygulamasının yanı sıra leptin ve TMZ ile olan ikili ve üçlü kombinasyonlarının kanser hücrelerinin hücre döngüsü üzerine olan etkileri ilk kez araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasıyla;

- Leptin ve SHLA'nın tek ve TMZ ile kombinasyon halinde GB TMZ kemoterapötik direncindeki etkisi ilk kez araştırılmıştır.
- TMZ'nin, leptin ve SHLA ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının yanı sıra leptin ve SHLA'nın tek başlarına MGMT, MLH1, PMS2, MSH2 ve MSH6 gen ekspresyonları üzerindeki etkisi ilk kez araştırılmıştır.
- SHLA'nın tek başına ve TMZ ve leptin ile kombinasyonlarının DNA hasarı ve hücre döngüsü üzerine etkisi ilk kez araştırılmıştır.

Bu tez çalışması, leptin ve SHLA'nın TMZ kemoterapötik direncinde rol alabileceğini gösteren ilk çalışmadır.



## KAYNAKLAR

- ABTA 2015 . Types of Brain Tumors [Internet]. [Erişim Tarihi 9 Haziran 2019]. Erişim adresi: <https://www.abta.org/wp-content/uploads/2018/03/about-brain-tumors-a-primer-1.pdf>
- Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Dı C, Lın N, Mattox AA ve ark. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(8):1061-83.
- Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegman A, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK. Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene*. 2010;29:6085–6098.
- Alexander BM, Pinnell N, Wen PY, D’Andrea A. Targeting DNA repair and the cell cycle in glioblastoma. *J Neuro oncol*. 2012;107:463-477.
- Alexiou GA, Vartholomatos E, Tsamis KI, Peponi E, Markopoulos G, Papathanasopoulou VA ve ark. Combination treatment for glioblastoma with temozolomide, DFMO and radiation. *JBUON*. 2019; 24(1): 397-404.
- Almeida KH, Sobol RW. Aunified viewof base excision repair: lesion-dependent protein complexesregulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst.)*. 2007;6:695-711.
- Annovazzi L, Caldera V, Mellai M, Riganti C, Battaglia L, Chirio D ve ark. The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. *Int J Oncol*. 2015;46:2299-308.
- ASCO 2019. Medulloblastoma - Childhood: Symptoms and Signs [Internet]. [Erişim Tarihi 9 Haziran 2019]. Erişim adresi: <https://www.cancer.net/cancer-types/medulloblastoma-childhood/symptoms-and-signs>
- Aziz K, Nowsheen S, Pantelias G,Iliakis G, Gorgoulis VG, Georgakilas AG. Targeting DNA damage and repair: embracing the pharmacological era for successful cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2012;133:334-350.
- Balcom E, Branton W, Petruk K, Wheatley M, Landeghem FV, Power C. Inflammasome Activation in Glioblastoma Multiforme. *Neurology*. 2017;88.
- Baratta M. Leptin from a signal of adiposity to a hormone mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit*. 2002;8:282-92.
- Barvaux VA, Ranson M, Brown R, McElhinney RS, McMurry TB, Margison GP. Dual repair modulation reversesTemozolomide resistancein vitro. *Mol Cancer Ther*. 2004; 3:123-7.
- Blumenthal DT, Schulman SF. Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert Rev Neurother*. 2005;5(5):683-90.
- Bouwman P, and Jonkers J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemo-therapy response and resistance.*Nat Rev Cancer*. 2012;12: 587-98.

Brown R, Morash B, Ur E, Wilkinson M. RNAi-mediated silencing of leptin gene expression increases cell death in C6 glioblastoma cells. *Mol Brain Res.* 2005;139:357-60.

Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB ve ark. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2038-45.

Candelaria PV, Rampoldi A, Harbuzariu A, Gonzalez-Perez RR. Leptin signaling and cancer chemoresistance: Perspectives. *World J Clin Oncol.* 2017, 8: 106.

Cao X, Lu Y, Liu Y, Zhou Y, Song H, Zhang W ve ark. Combination of PARP inhibitor and temozolomide to suppress chordoma progression. *J Mol Med.* 2019;1-11.

Caporali S, Falcinelli S, Starace G, Russo MT, Bonmassar E, Jir-icny J. DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol.* 2004;66:478-91.

Caporaso P, Turriziani M, Venditti A, Marchesi F, Buccisano F, Tirindelli MC ve ark. Novel Role Of Triazines In Haematological Malignancies: Pilot Study Of Temozolomide, Lomeguatrib And Il-2 In The Chemo-Immuno-therapy of acute leukaemia. *DNA Repair.* 2007;6(8):1179-86.

Castro GN, Cayado-Gutiérrez N, Zoppino FC, Fanelli MA, Cuello-Carrión FD, Sottile M ve ark. Effects of temozolomide (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20(2):253-65.

Catalano S, Giordano C, Rizza P, Gu G, Barone I, Bonofiglio D ve ark. Evidence that leptin through STAT and CREB signaling enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer proliferation. *J Cell Physiol.* 2009;218:490-500.

Chalmers AJ. Overcoming resistance of glioblastoma to conventional cytotoxic therapies by the addition of PARP inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010;10: 520–533.

Chamberlain MC. Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma. *Clin Med Insights Oncol.* 2011;5:117-129.

Chan DA, Giaccia AJ. Harnessing synthetic lethal interactions in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10:351-64.

Chen C, Chang YC, Liu CL, Chang KJ, Guo C. Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21 WAF1/CIP1. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;98:121-132.

Chen CC, Taniguchi T, and D'Andrea A. The Fanconi anemia (FA) pathway confers glioma resistance to DNA alkylating agents. *J Mol Med.* 2007;85:497-509.

Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: Lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell.* 2012;149:36-47.

Cheng CL, Johnson SP, Keir ST, Quinn JA, Ali-Osman F, Szabo C. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition reverses temozolomide resistance in a DNA mismatch repair-deficient malignant glioma xenograft. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:1364-68.

- Choi JH, Park SH, Leung PCK, Choi KC. Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:207-10.
- Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010;40:179-204
- Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in preovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:467-72.
- Clemons M, Kelly J, Watson AJ, Howell A, McElhinney RS, McMurry TB ve ark. O6-(4-bromophenyl)guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *Br J Cancer.* 2005;93:1152-6.
- Cook NJ. Effects Of Leptin On Est Ablished Gliobl Astoma Cell Lines [Yüksek Lisans Tezi]. Northern Michigan: Northern Michigan University;2014.
- Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signaling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol.* 2001;22:201-7.
- D'Andrea AD, Grompe M.. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer.* 2003;23-34.
- Damiani E, Solorio JA, Doyle AP, Wallace HM. How reliable are in vitro IC50 values? Values vary with cytotoxicity assays in human glioblastoma cells. *Toxicology letters.* 2019;302:28-34.
- Daniels DS, Mol CD, Arvai AS, Kanugula S, Pegg AE, Tainer JA Active and alkylated human AGT structures: A novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J.* 2000;19:1719-30.
- Deo DD, Rao AP, Bose SS, Ouhtit A, Baliga SB, Rao SA ve ark. Differential effects of leptin on the invasive potential of androgen-dependent and -independent prostate carcinoma cells. *Biomed Res Int.* 2008; 1-8.
- DeVos M, Schreiber V, Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol.* 2012;84:137-46.
- Ding J, Miao ZH, Meng LH, Geng MY. Emerging cancer therapeutic opportunities target DNA-repair systems. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006;27:338-44.
- Dubois V, Delort L, Billard H, Vasson MP, Caldefie-Chezet F. Breast cancer and obesity: in vitro interferences between adipokines and proangiogenic features and/or antitumor therapies? *PLoS One.* 2013;8(3):1-12
- Durmaz R, Vural M. Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği. *Türk Nöroşirürji Dergisi.* 2007;17(2):80-90.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylın SB, Herman JG. Inactivation Of The Dna Repair Gene O6-Methylguanine-Dna Methyltransferase By Promoter Hypermethylation İs A Common Event İn Primary Human Neoplasia. *Cancer Research.* 1999;59(4):793-7.



Evans SE, Judy KD, Dunphy I, Jenkins WT, Hwang WT, Nelson PT ve ark. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin. Cancer Research*. 2004;10.

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434:917-21.

Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M ve ark. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer*. 2011;129(3):659-70.

Ferla R, Haspinger E, Surmacz E. Metformin inhibits leptin-induced growth and migration of glioblastoma cells. *Oncology Letters*. 2012;4:1077-81.

Fiedor E, Gregoraszczyk EŁ. The molecular mechanism of action of superactive human leptin antagonist (SHLA) and quadruple leptin mutein Lan-2 on human ovarian epithelial cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78:611-22.

Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res*. 1998;4:1-6

Fortini P, Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short and long patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst.)*. 2007;6:398-409.

Friedman H, Liau L. *Brain Tumor Guide For The Newly Diagnosed*. Musella Foundation for Brain Tumor Research & Information, Inc. 2012;4-74.

Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE ve ark. Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(28):4733-40.

Friedman HS, Johnson SP, Dong Q, Schold S, Rasheed BKA, Bigner SH, ve ark. Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer Res*. 1997;57:2933-2936.

Fu D, Calvo JA and Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:104-20.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A ve ark. Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007;21:2683-710.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S ve ark. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64:7011-7021.

Gao J, Tian J, Lv Y, Shi F, Kong F, Shi H ve ark. Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. *Cancer Science*. 2009;100:389-95.

- Gerson, SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:296-307.
- Gerson SL. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 2388-99.
- Green ED, Maffei M, Braden VV . The human obese gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic and genetic of chromosome 7. *Genome Research*. 1995; 5: 5-12.
- Grek CL, Sheng Z, Naus CC, Sin WC, Gourdie RG, Ghatnekar GG . Novel approach to temozolomide resistance in malignant glioma: connexin43-directed therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;41:79-88.
- Guiu B, Petit JM, Bonnetain F, Ladoire S, Guiu S, Cercueil JP ve ark. Visceral fat area is an independent predictive biomarker of outcome after first-line bevacizumab-based treatment in metastatic colorectal cancer. *Gut*. 2010;59,341-347.
- Guo S, Liu M, Wang G, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *BBA*. 2012;1825:207-222.
- Guo Z, Wang H, Wei J, Han L, Li Z. Sequential treatment of phenethyl isothiocyanate increases sensitivity of Temozolomide resistant glioblastoma cells by decreasing expression of MGMT via NF- $\kappa$ B pathway. *Am J Transl Res*. 2019;11(2):696-708.
- Han G, Li Y, Cao Y, Yue Z, Zhang Y, Wang L, Liu J. Overexpression of leptin receptor in human glioblastoma: Correlation with vasculogenic mimicry and poor prognosis. *Oncotarget*. 2017; 35(8):58163-58171.
- Han G, Wang L, Zhao R, Yue Z, Zhou X, Hu X ve ark. Leptin promotes human glioblastoma growth through activating Signal Transducers and Activators of Transcription 3 signaling. *Brain Res Bull*. 2012;87(2):274-9.
- Han G, Wang L, Zhao W, Yue Z, Zhao R, Li Y, Zhou X, Hu X, Liu J. High expression of leptin receptor leads to temozolomide resistance with exhibiting stem/progenitor cell features in glioblastoma. *Cell Cycle*. 2013; 3833-40.
- Han G, Zhao W, Wang L, Yue Z, Zhao R, Li Y, ve ark. Leptin enhances the invasive ability of glioma stem-like cells depending on leptin receptor expression. *Brain Research*. 2014;1543:1-8.
- Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU . Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(1):3-9.
- Harbuzariu A, Rampoldi A, Daley-Brown DS, Candelaria P, Harmon TL, Lipsey CC ve ark. Leptin-Notch signaling axis is involved in pancreatic cancer progression. *Oncotarget*. 2017;8:7740.
- Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 2007;28: 739-745.
- He Y, Zhu Q, Chen M, Huang Q, Wang W, Li Q, Huang Y, Di W. The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT

assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016;7:70803.

Hegi ME, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, De Tribolet N, Weller M, ve ark. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:997-1003.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M ve ark. Correlation Of O6-Methylguanine Methyltransferase (Mgmt) Promoter Methylation With Clinical Outcomes In Glioblastoma And Clinical Strategies to Modulate Mgmt Activity. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4189-99.

Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli, L Ostermann ve ark. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 1871-1874.

Heitz F, Harter P, Ewald-Riegler N, Papsdorf M, Du Bois A. Poly(ADP-ribose)ation polymerases: mechanism and new target of anticancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10:1125-1136.

Helleday T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*. 2010;31,955-960.

Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8: 193-204.

Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W ve ark. M.O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem*. 2006; 96: 766-776.

Hui L, Desen W, Zhizhong P, Lijing C, Xiaojun W, Zhenhai L ve ark. Expression and biological significance of leptin, leptin receptor, VEGF, and CD34 in colorectal carcinoma. *Cell Biochem Biophys*. 2011;60(3):241-244.

Hunter C, Smith R, Cahill DP, Stephens P, Stevens C, Teague J ve ark. A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy. *Cancer Res*. 2006;66: 3987-3991.

Iwaniec UT, Heaney RP, Cullen DM, Yee JA . Leptin increases the number of mineralized bone nodules in vitro. *J Bone Miner Res*. 1998;13:2-12.

Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461:1071-78.

Jacobs AL , Schar P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*. 2012;121: 1-20.

Kaina B, Margison GP, Christmann M. Targeting O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cmls*. 2010;67(21):3663-81.

- Kardosh A, Golden EB, Pyrko P, Uddin J, Hofman FM, Chen TC ve ark. Aggravated Endoplasmic Reticulum Stress as a Basis for Enhanced Glioblastoma Cell Killing by Bortezomib in Combination with Celecoxib or Its Non-Coxib Analogue, 2,5-Dimethyl-Celecoxib. *CanRes*. 2008;68(3):843-51.
- Kato T, Natsume A, Toda H, Iwamizu H, Sugita T, Hachisu R ve ark. Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells. *Gene Ther*. 2010; 17: 1363-1371.
- Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev*. 2010;24,1680-94.
- Khabaz MN, Abdelrahman A, Butt N, Damnhory L, Elshal M, Aldahlawi AM ve ark. Immunohistochemical staining of leptin is associated with grade, stage, lymph node involvement, recurrence, and hormone receptor phenotypes in breast cancer. *BMC Women's Health*. 2017;17:105-113.
- Kim L, Glantz M. Chemotherapeutic options for primary brain tumors. *Curr Treat Options Oncol*. 2006;7(6):467-78.
- Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal. *Genes Dev*. 2005;19: 1951-1967.
- Kim YW, Kim JY, Park YH, Park SY, Won KC, Choi KH ve ark. Metformin restores leptin sensitivity in high-fat-fed obese rats with leptin resistance. *Diabetes*. 2006;55:716-724.
- Kinsella TJ. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin Cancer Res*. 2009;15: 1853-59.
- Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA ve ark. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro-Oncology*. 2009;11(3):281-91.
- Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Surmacz E, Sulkowski S. Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2007;60:902-906.
- Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J NucleicAcids*.2010;543531.
- Krakstad C, Chekenya M. Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*. 2010; 9: 135.
- Krex D, Klink B, Hartmann C, Von Deimling A, Pietsch T, Simon M, ve ark. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain, Lond*. 2007;130:2596-606.
- Lalezari S, Chou AP, Tran A, Solis OE, Khanlou N, Chen W ve ark. Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neurooncology*. 2013;15:370-81.

Lan F, Yang Y, Han J, Wu Q, Yu H, Yue X. Sulforaphane reverses chemoresistance to temozolomide in glioblastoma cells by NF- $\kappa$ B-dependent pathway downregulating MGMT expression. *Int J Oncol.* 2016;48(2):559-68

Lawrence JE, Cook NJ, Rovin RA, Winn RJ. Leptin Promotes Glioblastoma. *Neurol Res Int.* 2012;1-6.

Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases.* 2016;3:198-210

Leonetti C, Biroccio A, Graziani G, Tentori L. Targeted therapy for brain tumours: role of PARP inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; 12: 218-236.

Li Q, Chang Y, Mu L, Song Y. MicroRNA-9 enhances chemotherapy sensitivity of glioma TMZ by suppressing TOPO II via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oncology Letters.* 2019;17:4819-26.

Li S, Zeng A, Hu Q, Yan W, Liu Y, You Y. miR-423-5p contributes to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastomas. *Neuro-Oncology.* 2017;19(1):55-65.

Ligon, K.L.; Louis, D.N.; Brennan, C.; et al. Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007; 21: 2683–2710.

Lin TC, Huang KW, Liu CW, Chang YC, Lin WM, Yang TY et al. Leptin signaling axis specifically associates with clinical prognosis and is multifunctional in regulating cancer progression. *Oncotarget.* 2018;24(9):17210-9.

Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481:287-94.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling AV, Figarella DB, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131:803-20.

Lu Y, Liu Y, Yang C. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *J Vis Exp.* 2017;128:1-6.

Luo X, Kraus WL. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* 2012;26:417-432.

Ma J, Murphy M, O'Dwyer PJ, Berman E, Reed K, Gallo JM. Biochemical changes associated with a multidrug-resistant phenotype of a human glioma cell line with temozolomide-acquired resistance. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(7):1219-28.

Madhusudan S, Hickson ID. DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *Trends Mol Med.* 2005;11:503-11.

Malanga M, Althaus FR. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem. Cell Biol.* 2005;83:354-64.

Mangerich A, Burkle A. How to kill tumor cells with inhibitors of poly(ADP-ribosylation). *Int J Cancer.* 2011;128:251-65.

- Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res.* 2007;56(4):275-87.
- MAYFIELD 2018. Brain tumors: an introduction. [Internet]. [Erişim Tarihi 9 Haziran 2019]. Erişim adresi: <https://mayfieldclinic.com/pe-braintumor.htm>
- McCormack AI, McDonald KL, Gill AJ, Clark SJ, Burt MG, Campbell KA ve ark. Low O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression and response to temozolomide in aggressive pituitary tumours. *Clinical Endocrinology.* 2009;71(2):226-33.
- Meleń-Mucha G, Ławnicka H. Leptin promotes the growth of Colon 38 cancer cells and interferes with the cytotoxic effect of fluorouracil in vitro. *Endokrynologia Polska.* 2007;58:2-6.
- Mirzoeva OK, Kawaguchi T, Pieper RO. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex interacts with the mismatch repair system and contributes to temozolomide-induced G2 arrest and cytotoxicity. *Mol Cancer Ther.* 2006;(11):2757-66.
- Miyauchi JT, Tsirka SE. Advances in immunotherapeutic research for glioma therapy. *J Neurol.* 2018;265:741-56.
- Moeller BJ, Pasqualini R, Arap W. Targeting cancer-specific synthetic lethality in double-strand DNA break repair. *Cell Cycle.* 2009;8:1872-6.
- Murphy SF, Varghese RT, Lamouille S, Guo S, Pridham KJ, Kanabur P ve ark. Connexin 43 Inhibition Sensitizes Chemoresistant Glioblastoma Cells to Temozolomide. *Cancer Res.* 2016;76(1):139-49.
- NIH 2015 . What Is Cancer? [Internet]. [Erişim Tarihi 9 Haziran 2019]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- NIH 2016 . Why Global Cancer Research Is Critical to Progress against the Disease [Internet]. [Erişim Tarihi 9 Haziran 2019]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/research/areas/global-health>
- NIH 2018 . Why Genomics Research Is Critical to Progress against Cancer [Internet]. [Erişim Tarihi 9 Haziran 2019]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/research/areas/genomics>
- Omay SB, Vogelbaum MA. Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas. *Indian J Cancer.* 2009;46(2):88-95.
- O'Brien SN, Welter BH, Price TM. Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;259:695-8.
- Park CK, Kim JE, Kim JY, Song SW, Kim JW, Choi SH ve ark. The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. *Transl Oncol.* 2012;5:393-7.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P. An integrated genomic analysis of human glioblastomamultiforme. *Science.* 2008;21:1807-12.

- Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L ve ark. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 2004;10(15):4933-8.
- Pegg AE. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* 1990;50:6119-29.
- Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res.* 2000;462:83-100.
- Pei C, Chen H, Jia X, Yan L, Zou Y, Jiang C ve ark. High frequency of MSH6 G268A polymorphism and survival association in glioblastoma. *Int J Neurosci.* 2013;123(2):114-20.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T ve ark. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995;269:540-3.
- Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M . Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, PGlycoprotein and CD133 Expression. *PLoS One.* 2015;10(10):1-23.
- Pérez-Pérez A, Maymó J, Dueñas JL, Goberna R, Calvo JC, Varone C ve ark. Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2008;477:390-5.
- Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgraduate Medicine.* 2009;121:21-33.
- Preul MC. History of brain tumor surgery. *Neurosurg Focus.* 2005;18(4):1
- Ptak A, Kolaczowska E, Gregoraszcuk EL. Leptin stimulation of cell cycle and inhibition of apoptosis gene and protein expression in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Endocrine.* 2013;43:394-403.
- Quinn JA, Desjardins A, Weingart J, Brem H, Dolan ME, Delaney SM ve ark. Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol.* 2005;23:7178-87.
- Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN ve ark. Phase II trial of temozolomide plus O6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol.* 2009;27:1262-7.
- Ramirez YP, Weatherbee JL, Richard TW, Ross AH. Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. *Pharmaceuticals.* 2013;6:1475-506.
- Ratke J, Entschladen F, Niggemann B, Zänker KS, Lang K. Leptin stimulates the migration of colon carcinoma cells by multiple signaling pathways. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17:179-89.
- Reinhardt HC, Jiang H, Hemann MT, Yaffe MB. Exploiting synthetic lethal interactions for targeted cancer therapy. *Cell Cycle.* 2009;8:3112-9.
- Renehan AG. Body fatness and bevacizumab-based therapy in metastatic colorectal cancer. *Gut.* 2010;59:289-90.

- Ribatti D, Belloni AS, Nico B, Di Comite M, Crivellato E, Vacca A. Leptin-leptin receptor are involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Peptides*. 2008;29(9):1596-602.
- Riolfi M, Ferla R, Del Valle L, Piña-Oviedo S, Scolaro L, Micciolo R ve ark. Leptin and its receptor are overexpressed in brain tumors and correlate with the degree of malignancy. *Brain Pathol*. 2010;20(2):481-9.
- Rosell R, De Las Penas R, Balana C, Santarpia M, Salazar F, De Aguirre I ve ark. Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection. *Future Oncology*. 2008; 4(2):219-228.
- Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:68-78.
- Russo VC, Metaxas S, Kobayashi K, Harris M, Werther GA. Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. *Endocrinology*. 2004;145:4103-12.
- Sander P, Mostafa H, Soboh A, Schneider JM, Pala A, Baron AK ve ark. Vacuolin-1 inducible cell death in glioblastoma multiforme is counter regulated by TRPM7 activity induced by exogenous ATP. *Oncotarget*. 2017;8(21):35124-37.
- Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M ve ark. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):2900-8.
- Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E ve ark. MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. *Stem Cells* 2011;29:1942-51.
- Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. Leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J Biochem Physiol*. 2007;282:13316-25.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, DeMurcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:517-28.
- Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med*. 1996;2:589-93.
- Scolaro L, Cassone M, Kolaczynski JW, Otvos LJr, Surmacz E. Leptin-based therapeutics. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2010;5(6):875-89.
- Shah V, Kochar P. Brain Cancer: Implication to Disease, Therapeutic Strategies and Tumor Targeted Drug Delivery Approaches. *Anti-Cancer DrugDiscovery*. 2018;13:70-85
- Shahpar S, Mhatre PV, Huang ME. Update on brain tumors: New developments in neuro-oncologic diagnosis and treatment, and impact on rehabilitation strategies. *PM&R* 2016; 8(7): 678-89.
- Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH. STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells*. 2009;27:2383-92.



- Shinsato Y, Furukawa T, Yunoue S, Yonezawa H, Minami K, Nishizawa Y ve ark. Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma. *Oncotarget*. 2013;4(12):2261-70.
- Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *Int J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:1810-3.
- Soritau O, Tomuleasa C, Aldea M, Petrushev B, Susman S, Gheban D ve ark. Metformin plus temozolomide-based chemotherapy as adjuvant treatment for WHO grade III and IV malignant gliomas. *J BUON*. 2011;16:282-9.
- Spiro TP, Liu L, Majka S, Haaga J, Willson JK, Gerson SL. Temozolomide: The effect of once- and twice-a-day dosing on tumor tissue levels of the DNA repair protein O(6)-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2309-17.
- Stark AM, Doukas A, Hugo HH, Mehdorn HM. The expression of mismatch repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma. *Neurological Research*. 2010;(32)8:816-820.
- Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair*. 2004;3:1091-101.
- Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R ve ark. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*. 2007;318:287-90.
- Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK ve ark. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1100-8.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, Van Den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer R ve ark. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10:459-66.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ ve ark. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:987-96.
- Sun Q, Pei C, Li Q, Dong T, Dong Y, Xing W ve ark. Up-regulation of MSH6 is associated with temozolomide resistance in human glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;496(4):1040-46.
- Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:2491-507.
- T Kanzawa, IM Germano, Y Kondo, H Ito, S Kyo, S Kondo. Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *BJC*. 2003;89:922-9.
- Tartaglia LA . The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:6093 - 6.

- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper C, Devos R. Identification and expression cloning of a leptin receptor. *Cell* . 1995;83:1263-71.
- Taspınar M, İlğaz S, Özdemir M, Özkan T, Öztuna D, Canpınar H ve ark. Effect of lomeguatrib–temozolomide combination on MGMT promoter methylation and expression in primary glioblastoma tumor cells. *Tumor Biol*. 2013; 34:1935-47.
- Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, D’Amati G, Vergati M, Portarena I. Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5370-9.
- Topal ÇA. Meme kanserli hastalarda serum Leptin Düzeyleri ve Histopatolojik Parametrelerle İlişkisi [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği; 2004.
- Torres S, Lorente M, Rodríguez-Fornes F, Hernandez-Tiedra S, Salazar M, García-Taboada E ve ark. A Combined Preclinical Therapy of Cannabinoids and Temozolomide against Glioma . *Mol Cancer Ther*. 2011;10(1):90-103
- Trivedi RN, Almeida KH, Fornasaglio JL, Schamus S, Sobol RW . The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Res*. 2005;65:6394-400.
- Turriziani M, Caporaso P, Bonmassar L, Buccisano F, Amadori S, Venditti A ve ark. O6-(4-bromophenyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O6-alkylguanine DNA alkyl-transferase, increases the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro. *Pharmacol Res*. 2006;53:317-23.
- Urdiciain A, Meléndez B, Rey JA , Idoate MA, Castresana JS. Panobinostat Potentiates Temozolomide Effects and Reverses Epithelial–Mesenchymal Transition in Glioblastoma Cells. *Epigenomes*. 2018;2(1):5.
- Van Niftherik KA, van den Berg J, van der Meide WF, Ameziane N, Wedekind LE, Steenbergen RDM ve ark. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *Br J Cancer*. 2010;103:29-35.
- Viel T, Monfared P, Schelhaas S, Fricke IB, Kuhlmann MT, Fraefel C ve ark. Optimizing glioblastoma temozolomide chemotherapy employing lentiviral-based anti-MGMT shRNA technology. *Mol Ther* 2013; 21: 570-9.
- Villalva C, Cortes U, Wager M, Tourani JM, Rivet P, Marquant C ve ark. O6-Methylguanine-methyltransferase (MGMT) promoter methylation status in glioma stem-like cells is correlated to Temozolomide sensitivity under differentiation-promoting conditions. *Int J Mol Sci*. 2012;13:6983-94.
- Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, Stathakis NE, Koukoulis GK, Papandreou CN. Bortezomib downregulates MGMT expression in T98G glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2013;33:313-8.
- Wang HH, Chang TY, Lin WC, Wei KC, Shin JW. GADD45A plays a protective role against temozolomide treatment in glioblastoma cells. *Sci Rep*. 2017;7:2-15.

- Wang JY, Edelmann W. Mismatch repair proteins as sensors of alkylation DNA damage. *Cancer Cell*. 2006;9:417-8.
- Wedge SR, Newlands ES. O6-benzylguanine enhances the sensitivity of a glioma xenograft with low O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity to temozolomide and BCNU. *Br J Cancer*. 1996;73:1049-52.
- Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359:492-507.
- Wheelhouse RT, Stevens MFG. Decomposition of the antitumour drug Temozolomide in deuterated phosphate buffer: Methyl group transfer is accompanied by deuterium exchange. *J Chem Soc Chem Commun*. 1993;1177.
- WHO 2019 . Cancer [Internet]. [Erişim Tarihi 9 Haziran 2019]. Erişim adresi: <https://www.who.int/cancer/en/>
- Würth R, Pattarozzi A, Gatti M, Bajetto A, Corsaro A, Parodi A ve ark. Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt. *Cell Cycle*. 2013;12:145-56.
- Xi G, Hayes E, Lewis R, Ichi S, Mania-Farnell B, Shim K ve ark. CD133 and DNA-PK regulate MDR1 via the PI3K- or Akt-NF- $\kappa$ B pathway in multidrug-resistant glioblastoma cells in vitro. *Oncogene*. 2015;1-10.
- Yip S, Miao J, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL ve ark. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4622-9.
- Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T ve ark. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Frontiers in Oncology*. 2012;2:186.
- Zacharia BE, DiStefano N, Mader MM, Chohan MO, Ogilvie S, Brennan C ve ark. Prior malignancies in patients harboring glioblastoma:an institutional case-study of 2164 patients. *J Neurooncol*. 2017;134:245-51.
- Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R. Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm*. 2005;71:345-72.
- Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: Mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5:102-14.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-32.
- Zheng Q, Dunlap SM, Zhu J, Downs-Kelly E, Rich J, Hursting SD ve ark. Leptin deficiency suppresses MMTV-Wnt-1 mammary tumor growth in obese mice and abrogates tumor initiating cell survival. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18:491-503.

## ÖZGEÇMİŞ


06.08.1993 tarihinde Sheffield’de doğan Farika Nur DENİZLER EBİRİ, ilk öğrenimini 1999-2007 yılları arasında Van İki Nisan İlköğretim okulunda okuyarak mezun olmuştur. Lise öğrenimini 2007-2011 yılları arasında Van Milli Piyango Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. Lisans Öğrenimini ise 2012-2016 yılları arası Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde tamamlamıştır. 2016 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.



## EKLER

**EK 1.** Etik Kurul Raporu veya Etik Kurula gerek olmadığına dair Anabilim Dalı Kurul Kararı.

EK-1			KARAR DEFTERİ		Sayfa No.: .....
Kararın					
No'su	Tarihi	Konusu			
30	07.06.2018	Müksek Lisans Öğrencisi Farika Nur Denizler'in Tez önerisi ve H.ALHAMMUD Etik belgesi			
Toplantıya Katılan Üyelerin Adı ve Soyadı					
Başkan	:	Prof. Dr. Yasın TULUCE	[Signature]		
Üyeler	:	Doç. Dr. Halil ÖZKOC	[Signature]		
	:	Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR	[Signature]		
	:	Dr. Öğr. Üyesi Zehra KAYA	[Signature]		
	:	Dr. Öğr. Üyesi Gökhan GÖRGEŞEN	[Signature]		
KARARIN METNİ					
<p>Anabilim Dalımız Müksek Lisans öğrencisi Farika Nur Denizler'in Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR Danışmanlığında sunmuş olduğu Tez önerisi Anabilim Dalımızca uygun bulunmuştur.</p> <p>Ayrıca Tez çalışmasında hücre kültürü kullanılacağı için Etik Kurul karar belgesine gerek olmadığına karar verilmiştir.</p> <p>Ayrıca Jaha önce Tez önerisi kabul edilen Huda Alhammud'un tez çalışmasında hücre kültürü kullanılacağı için Etik kurul Belgesine gerek olmadığına karar verilmiştir.</p>					

  
8 699394 771164

## EK 2. Tez Orjinallik Raporu

	<p style="text-align: center;"><b>T.C.</b> <b>VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ</b> <b>Sağlık Bilimleri Enstitüsü</b></p>	
<b>LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU</b>		

**Tarih: 25/06/2019**

Tez Başlığı / Konusu: Leptin Ve Leptin Reseptör Antagonistinin Glioblastoma Temozolomid Direncindeki Rolü

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 57 sayfalık kısmına ilişkin, 21/06/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİTİN intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %8 (sekiz) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayımlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Farika Nur DENİZLER EBİRİ  
Öğrencinin Adı Soyadı  
İmza

Öğrencinin Adı Soyadı	Farika Nur DENİZLER EBİRİ
Anabilim Dalı	: Tıbbi Biyoloji
Öğrenci No	169302011
Programı	: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
<b>DANIŞMAN ONAYI</b> UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza) Doç. Dr. Mehmet TAŞINAR	<b>ENSTİTÜ ONAYI</b> UYGUNDUR Doç. Dr. Hamit Hakan ALP