

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
ONKOLOJİ BİLİM DALI

**GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
(U-87 MG ve T98G) VEGF SENTEZİNİN (-/-)
GOSSİPOL (AT-101) İLE İNHİBİSYONU**

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. BÜLENT KARABULUT

UZM. DR. BURCU ÇAKAR
ONKOLOJİ UZMANLIK TEZİ
İzmir - 2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ŞEKİL LİSTESİ	IV
TABLO LİSTESİ	V
KISALTMALAR LİSTESİ	VI
TEŞEKKÜR	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Glioblastome Multiforme	1
1.1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.2. Adjuvan Tedavi Yaklaşımı	4
1.1.3. Rekürren Hastalıkta Tedavi Yaklaşımı	6
1.2. Glioblastome Multiforme Gelişiminde Olası Moleküler Mekanizmalar	8
1.2.1. Gen Mutasyonları	8
1.2.2. Sağkalım Sinyalleri	9
1.2.3. Apoptoz Regülasyonu	12
1.2.3.1. Apoptoz Genel Özellikleri	12
1.2.3.2. Glioblastomada apoptotik moleküller	15
1.2.4. Glioblastomada Anjiyogenez	16
1.3. AT-101:(-)/- Gossipol Enantiyomeri	17
1.3.1. Gossipol Genel Bilgiler	17
1.3.2. Gossipolün Etki Mekanizması	19
1.4. Glioblastome Multiformenin Hüresel Modeli, T98G ve U87MG hücre hatları	20
1.4.1. T98G hücre hatları özellikleri	20

	Sayfa no
1.4.2. U-87MG hücre hatları özellikleri	20
1.5. Sitotoksosite ve Ölçüm Yöntemleri	21
1.5.1. Genel Bilgi	21
1.5.2. XTT Yöntemi	22
1.5.3. xCELLigence™ sistemi	23
1.6. Amaç	25
2.MATERYAL VE METOD	26
2.1. Hücre Hatlarının Temini ve Kültüre Edilmesi	26
2.2. Hücrelerin Sayımı ve Deney Planına Göre Ekimi	27
2.3. İlaçların Hazırlanması	28
2.4. xCELLigence sisteminin hazırlanması	28
2.5. Apoptozin Belirlenmesi	28
2.5.1. Apoptozin ELISA yöntemiyle belirlenmesi	28
2.5.2. Apoptozin Kaspaz 3/7 aktivitesi ölçümüyle belirlenmesi	29
2.5.3. Anjiyogenezis Array Uygulaması	30
2.6. Verilerin Analizi	30
3. BULGULAR	31
3.1. AT-101'in U87-MG ve T98G hücre hatlarındaki anti-proliferatif etkilerinin doza ve zamana bağlı gösterilmesi ve IC ₅₀ değerlerinin hesaplanması	31
3.2. AT-101'in U87-MG ve T98G hücre hatlarındaki Apoptotik Etkileri	32
3.3. Anjiyogenez Array Sonuçları	34
4. TARTIŞMA	36
5. REFERANSLAR	39

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 1. Glial tümörlerin gelişim ve progresyonunu açıklayan model.....	9
Şekil 2. GBM de sağkalım sinyalleri	11
Şekil 3. Apoptotik Sinyal Yolağı	14
Şekil 4. Gossipol ve (-)- Gossipol (AT-101) kimyasal yapıları	18
Şekil 5. Empedans ölçüm prensibi	24
Şekil 6. AT-101'in U87-MG hücre hattındaki anti-proliferatif etkileri.....	31
Şekil 7. AT-101'in T98G hücre hattındaki anti-proliferatif etkileri	31
Şekil 8. AT-101'in U87 ve T98G hücre hatlarındaki anti-apoptotik etkisi	32
Şekil 9. AT 101 ile U87MG ve T98G hücrelerinde kaspaz enzim aktivite değişimi	33

TABLO LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 1. WHO primer beyin tümörlerinin sınıflaması.....	2
Tablo 2. U-87 MG ve T98G anjiyogenez array sonuçları	35

KISALTMALAR LİSTESİ

bcl-2	B hücre lenfoma-2
BT	Bilgisayarlı tomografi
CDK	Siklin bağımlı kinaz
EGFR	Epidermal büyüme faktörü
GBM	Glioblastome multiforme
HIF	Hipoksi ile indüklenen faktör
IDH-1	İzositrat dehidrogenaz 1
IFRT	Tutulu alan radyoterapisi
MMP	Metalloproteinaz
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
PDGFR	Trombosit kökenli büyüme faktörü
PI3K	Fosfatidil inozitol-3-kinaz
PIP2	Fosfoinozitol 3-4 fosfat
PIP3	Fosfoinozitol 3-4-5 fosfat
PTEN	Fosfataz tensin homolog
RTK	Reseptör tirozin kinaz
TNF	Tümör nekroz faktör
TRAIL	TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WBRT	Tüm beyin ışınlama
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalına bağlı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalındaki yan dal ihtisasım boyunca eğitimime katkıda bulunan, mesleki gelişimim için emek harcayan Prof. Dr. Rüçhan Uslu'ya, mesleki bilgi ve görgülerinden faydalandığım Prof. Dr. Erdem Göker ve Prof.Dr. Erhan Gökmen'e, tez hazırlık sürecim başta olmak üzere benden desteğini esirgemeyen Prof.Dr.Bülent Karabulut'a, dostluğu ve bilgisiyle ile bana yol gösteren Doç. Dr. Burçak Karaca'ya ve diğer tüm hocalarıma şükranlarımı sunarım.

Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesinin tüm personeline ve birlikte omuz omuza çalıştığımız yan dal asistanı arkadaşlarıma, tezimin hazırlık ve laboratuvar sürecindeki katkılarından dolayı Emir Bozkurt, Aslı Kısım ve Harika Atmaca'ya teşekkür ederim.

ÖZET

Giriş: Glioblastoma multiforme (GBM), beyin tümörleri arasında en yaygın görülen ve en ölümcül olan tiptir .Çoğalan hücrelere besin ve oksijen desteğinin sağlandığı fizyolojik bir süreç olan anjiyogenez, GBM tümörlerinin gelişiminde, büyümesinde ve metastazında kritik bir rol oynar. Normal dokularda ve tümör dokularında pro-anjiyojenik faktörler aracılığıyla yeni kan damarı oluşumu, birçok sinyal yolağının aktivasyonunu gerektirir.

Pro-anjiyojenik faktörlerin en önemlilerinden biri Vasküler endotelial çoğalma faktörüdür (VEGF). Bu yüzden kanser hücrelerinde VEGF sentezinin baskılanabilmesi, malignitesi düşük gliomaların yüksek malignite özelliği kazanmasının engellenmesinde ve GBM metastazının yavaşlatılmasında önemli rol oynar. Tümör canlılığının korunması kan damarlarına bağlı olduğundan anti-anjiyojenik ajanların araştırılması tedavi geliştirilmesinde önemli bir konudur.

Gossipol, pamuk bitkisinden (*Gossypium species*) elde edilen sarı renkli, hücreye nüfuz edebilen ve birçok dehidrogenaz enziminin inhibitörü gibi davranan, polifenolik bir aldehiddir AT-101, Gossypol ajanının -(-) enantiomeridir ve (+)- izomerinden daha sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir. AT-101'in çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif etkiye sahip olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur .

Bu çalışmada, AT-101'in, GBM hücre kültürlerindeki (U-87MG ve T98G) sitotoksik etkilerinin yanı sıra hücrelerdeki VEGF sentezine olan etkisi hem transkripsiyonel hem de protein düzeyinde araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem: U-87MG ve T98G hücre kültürleri AT-101'in artan konsantrasyonlarıyla (1-50 μ M) 72 saat süresince muamele edildi. Hücre canlılığı xCELLigence (Roche) sistemi ile izlendi. U-87MG ve T98G hücre kültürlerindeki apoptoz ELISA yöntemi ve kaspaz ölçümü ile değerlendirildi. Anjiyogenez array ile VEGF ve diğer proanjiyojenik faktörlerin ekspresyonları ölçüldü.

Bulgular: Hücre canlılığının sürekli olarak izlendiği deney sisteminde doza ve zamana bağlı etki gösteren AT-101'in, GBM hücre kültürlerindeki sitotoksik etkisi 24. saatte anlamlı şekilde artış gösterdi. AT-101'in U-87MG ve T98G hücre kültürlerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 2.4 ve 2.7 µM olarak hesaplandı. AT-101'in IC₅₀ dozları ile 24 saat muamele edilen hücrelerin VEGF mRNA düzeylerinde U-87MG hücre hattında kontrole kıyasla 2.7 kat, T98G hücre hattında ise kontrole kıyasla 3 kat azalış belirlendi.

Sonuç: Bu çalışmada, U-87 MG ve T98G hücrelerinde AT-101'in, GBM tümörleri için kritik öneme sahip olan VEGF sentezini baskıladığı protein düzeyinde gösterilmiştir. Bu bulgular, AT-101'in, GBM tedavisinde anjiyogenezi baskılamada hem hedefe yönelik tedavide hem de genel tedavi stratejilerinde kullanılabilecek bir ajan olduğunu destekler niteliktedir.

ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and worse prognostic glial tumor. Angiogenesis which provides nutrient and oxygen support to proliferating cells play an essential role in GBM development, proliferation and metastasis. The new vessel formation in normal and tumor cells require various signalling pathway activation by the intervention of proangiogenic factors.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the main proangiogenic factors. The suppression of VEGF synthesis in low grade gliomas prevent these cells progression to higher grade tumors and also might slow down metastasis process. The development of antiangiogenic agents is a promising treatment issue as blood vessels are essential for vitality of tumor cells.

Gossypol is extracted from cotton plant (*Gossypium* species) and a phenolic aldehyde that permeates cells and acts as an inhibitor for several dehydrogenase enzymes. It is a yellow pigment. AT-101 is (-) enantiomer of gossypol with further cytotoxicity. Various studies confirmed the antiproliferative effect of AT-101 in different cancer cell lines.

In this study, the cytotoxicity effect of AT-101 on GBM cell lines (U-87MG ve T98G) were confirmed and also the impact of this drug on VEGF synthesis on these cell lines were evaluated on. transcriptional and protein levels.

Material and Method:U-87 MG and T98 cell lines were treated with increasing concentrations(1-50 μ M) of AT-101 for 72 hours. Cytotoxicity was determined by xCELLigence (Roche). Apoptosis was detected by using ELISA and confirmed by caspase assay. VEGF and other proangogenic factors expression were evaluated by angiogenesis array.

Results: The cell vitality was constantly followed up in the experiment. The cytotoxicity of AT-101 in both cell lines increased significantly at 24 hours. The IC-50 values of U-87 MG and T98 were 2.4 and 2.7 μ M respectively. The VEGF mRNA levels decreased 2.7 fold in U-87MG and 3 fold in T98G by treating these cell lines with AT-101 IC50 dose for 24 hours.

Conclusion: This study showed that AT-101 suppress VEGF on protein levels at U-87 MG and T98G cell lines and showed AT-101 might be a promising targeted agent in GBM treatment.

GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE (U-87 MG ve T98G) VEGF SENTEZİNİN (-/-) GOSSIPOL (AT-101) İLE İNHİBİSYONU

1.GİRİŞ

1.1.Glioblastome Multiforme

1.1.1.Genel Bilgiler

Primer santral sinir sistemi tümörleri belirgin heterojeniteye sahip tümörlerdir. Glial orjinli tümörler, gliomalar, en sık izlenen primer beyin tümörleridir, normal glial hücrelere benzeyen histolojik özellikleri olan tümörleri içerir. İlk defa 1860 da Rudolf Virchow ‘glioma’ terimini tanımlamış, 1926 da Bailey ve Cushing bu tümörlerin primitif nöroektodermden kaynaklandığını öne sürmüştü ve ilk sınıflandırma sistemini oluşturmuştur.1979 dan bu yana sınıflandırma için Dünya Sağlık Örgütü(WHO) klasifikasyonu kullanılmaktadır. WHO, tümörleri histolojik klasifikasyonları ve grade’e göre sınıflandırmaktadır (Tablo 1). Tümörlerin belirgin heterojenitesi nedeniyle tümördeki en anaplastik görünümlü alana göre histolojik gradeleme yapılır. Mevcut veriler malign gliomaların matür glial hücre gibi tam differansiye bir hücre tipinden köken aldığını göstermemektedir, nöral progenitör hücrelerden veya kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir(1).

Glioblastome multiforme(GBM), malign glial tümörler içinde en sık görülen ve en kötü prognoza sahip kanser türüdür. Tüm glial tümörlerin yaklaşık %54 ünü meydana getirir (2). Yıllık insidansı 100000 de 3-4 tür (2) , pik insidansı ise 5.dekadıdır. Çocuk ve genç erişkinlerde daha nadir görülmektedir. Genellikle serebral parankime diffüz infiltrate olan tümörlerdir, sıklıkla serebral hemisfer beyaz cevherini tutmakla birlikte gri cevher ve diğer santral sinir sistemi (SSS) bölgelerinden kaynaklanabilir. Glioblastomalar makroskobik inceleme ve radyolojik tetkiklerde iyi sınırlanmış olarak değerlendirilse bile, sıklıkla birçok glial tümörde komşu beyin parankiminde mikroskobik hastalık mevcuttur.

Tablo 1:WHO primer beyin tümörlerinin sınıflaması

Tümör klasifikasyonu	Tümör grade(WHO)
Astroitik tümörler	
Pleositik astrositoma	I
Difüz astrositoma	II
Anaplastik astrositoma	III
Glioblastoma	IV
Oligodendroglial ve oligoastroitik tümörler	
Oligodendrogloma	I
Anaplastik oligodendrogloma	II
Anaplastik oligoastroitoma	III
Oligodendrogloma komponenti bulunan glioblastoma	IV
Ependimal tümörler	
Subependimom	I
Miksopapiller ependimom	II
Ependimom	III
Anaplastik ependimom	IV
Koroid pleksus tümörleri	
Koroid pleksus papillomu	I
Koroid pleksus karsinomu	III
Nöronal ve mikst nöroglial tümörler	
Ganglioglioma	I veya II
Santral nörositoma	II
Filum terminale paraganglioması	I
Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör	I
Pineal parankimal tümörler	
Pineositoma	II
Pineoblastoma	IV
Embriyonel tümörler	
Medulloblastoma	IV
Supratentoryal primitif nöroektodermal tümör	IV
Atipik teratoid/rabdoid tümör	IV
Meningeal tümörler	
Meningioma	I
atipik,berrak hücreli,kordoid	II
rabdoid,papiller veya anaplastik(malign)	III

GBM de yüksek grade glial tümörlerin ortak özelliği olan yüksek sellülarite ve artmış mitotik aktivite izlenmekle birlikte grade III tümörlerden farklı olarak vasküler proliferasyon ve eşlik eden nekroz bulunabilir(3). Patolojik olarak hiperkromatik nükle; eozinofilik, glial fibriler asidik protein(GFAP) pozitif sitoplazması mevcuttur(4).

Klinik olarak en sık karşımıza çıkan semptomlar başağrısı, nöbet, hafıza kaybı, kognitif bozukluklar ve kişilik değişiklikleri olabilir. Kitlenin oluşturduğu ödem artmış kafa içi basıncına neden olarak semptomların büyük bir kısmını oluşturur.

Tanı sıklıkla bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile konabilir. MRG, tanıda altın standart yöntemdir. Yüksek grade tümörlerde genellikle belirgin kontrast tutulumu izlenecektir. MRG kemik artefaktı oluşturmaz, her düzlemde görüntü verebilir, posterior fossayı BT den daha iyi değerlendirebilir, hemoraji ve ödemin saptanmasında daha sensitiftir. MRG de glioblastomalar heterojen kitleler şeklinde izlenir, heterojen görünüm nekroz ve/veya kist oluşumuna bağlıdır. T1A görüntülerde genellikle santral yerleşimli hipointens alan izlenir, bu hipointens alanı çevreleyen halka ve solid nodüller serebellar parankime göre izointens veya hafif hipointens görünümündedir. Tümör içinde kanama ve kalsifikasyon odaklarının olması tümör heterojenitesini arttıracaktır. T2A incelemelerde değişik sinyalli heterojen hiperintens görünüm mevcuttur, tümörü çevreleyen ödem belirgindir. İntravenöz gadolinyum sonrası yapılan incelemelerde kontrast tutulumu hemen her zaman saptanır (5). MR spektroskopisi, normal beyin ve tümör dokusundaki çeşitli metabolitleri değerlendirir, GBM de kolin/kreatin oranı artmakta, n-asetil aspartat piki azalmaktadır. Kolin artışı artmış membran ve hücre senteziyle, kreatin azalması metabolik değişikliklerle ve n-asetil aspartat azalması tümöre bağlı nöron kaybı ile ilişkilendirilmektedir. Tümörlerde kolin sinyali ve laktat düzeyleri değerlendirilerek tümörün differansiasyon düzeyi konusunda da bilgi edinilebilir (5, 6).

1.1.2.Adjuvan Tedavi Yaklaşımı

Primer tedavi yaklaşımı bu hastalarda cerrahiye içerir. Cerrahide amaç mümkünse görülebilen tüm tümör dokusunun çıkarılması, eğer bu mümkün değilse hastada nörolojik fonksiyonu koruyacak şekilde maksimum tümör rezeksiyonunun sağlanmasıdır(7, 8). Preoperatif görüntüleme yöntemleri ile fonksiyonel haritalama yapılabilir, bu da hastada bireysel olarak en optimal cerrahinin uygulanmasını kolaylaştırabilir. Konuşma alanlarına yakın lokalizasyonlu tümörlerde uyanık kraniyotomi, kortikal stimülasyonla nörolojik ve konuşma fonksiyonlarının değerlendirilmesi amaçlanır. Yine intraoperatif BT veya MRG ile başlangıç rezeksiyonu sonrası rezidüel tümör tanımlanabilir. İntraoperatif MRG kullanılan hasta gruplarında rezidüel tümör olasılığının daha az olduğu gösterilmiştir (9). Hastalarda tümör tam olarak rezeksiyon edilemeyecek olsa bile maksimal rezeksiyon uygulanmasının bu hastalarda tanı doğruluğunu arttırdığı, daha hızlı semptomatik iyileşme sağladığı ve debulkingle cerrahi sonrası uygulanacak radyoterapi (RT) ve kemoterapi (KT) etkinliğinin artırılabilirdiği; bu nedenle hastalarda daha iyi sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir(10, 11).Hastalar eğer komplet veya debulking cerrahiye uygun değilse bu durumda hastada doku tanısı koymak için stereotaktik biyopsi uygulanabilir.

Cerrahi sonrası standart yaklaşım bu hastalara RT uygulanması şeklindedir. Glial tümörlerde gros total rezeksiyon uygulanan hastalarda bile rekürrens riski yüksektir. Optimal doz şeması net olmamakla birlikte genellikle grade 4 tümörlerde yaklaşım 60 Gy, 2 Gy fraksiyonda RT vermek şeklindedir (12-14). Tüm beyin ışınlanması(WBRT) ile RT ile ilişkili nekroz, küçük damar hastalıkları, vasküler oklüzyon ve demyelinizasyon, sekonder neoplaziler gibi çeşitli major komplikasyonlar izlenebilir (15). Bu yan etkileri minimuma indirmek için şu an RTde standart yaklaşım tutulu alan RT(IFRT) uygulanması şeklindedir. Burada RT, tümör yatağı ile birlikte 2-3 cm lik marjine uygulanmaktadır(16). GBM hastalarında rekürrens genellikle

orijinal tümör alanında 2 cm lik marjinde geliştiği için IFRT ile multifokal tümör insidansında veya rekürrens riskinde artış gösterilememiştir(16, 17).

GBM de adjuvan KT, karmustin gibi nitrozürelere kombine veya tek ajan şeklinde kullanımıyla gündeme gelmiş, sonraki çalışmalarda temozolamidin etkinliği kanıtlanınca standart tedavide ilk seçenek temozolamid olarak belirlenmiştir. Temozolamide adjuvan RT ile birlikte başlanır, RT tamamlandıktan sonra adjuvan temozolamid olarak genellikle 6 kür devam edilir. Faz III, 576 yeni tanı GBM vakasını içeren bir çalışmada hastalar IFRT ya da IFRT ye ek olarak temozolamid 75 mg/m²/gün po D1-49, takiben temozolamid 150-200 mg/m²/gün D1-5, 28 günde bir altı kür olarak iki kola randomize edilmiştir. Kombinasyon kolunda toplam sağkalım süresi istatistiksel olarak daha iyi saptanmış, ölüm riski HR:0.63 bulunmuştur(18, 19). Kombinasyon kemoterapisinin faydasının tüm alt gruplarda sebat ettiği izlenmiştir. Sonraki çalışmalarda temozolamid farklı kullanım şemalarında değerlendirilmiş, doz modifikasyonu ve tedavi süre değişikliği ile sağkalımda herhangi bir avantaj sağlanamamıştır (20).

Kemoradyoterapide temozolamidi nitrozüre bazlı KT ile kıyaslayan randomize çalışma mevcut değildir. Başlangıçta sadece RT alıp nüks eden 447 malign gliomalı hastada temozolamidin farklı iki kullanım şeması (200 mg/m²/gün D1-5 veya 100 mg/m²/gün D1-21, 28 günde bir) PCV KT (prokarbazin 100 mg/m²/gün D1-10, lomustin 100 mg/m²/gün D1 , vinkristin 1.5 mg/m²/gün) ile karşılaştırılmış, iki farklı KT seçeneği arasında PFS ve OS farkı saptanmamakla birlikte temozolamid şemalarında 200 mg/m²/gün D1-5 ,28 günde bir daha iyi PFS ve OS ile ilişkili bulunmuştur (21).

Mevcut verilere dayanarak National Comprehensive Cancer Network (NCCN), GBM li tüm hastalarda cerrahi ardından RT, adjuvan ve konkürren temozolamid tedavisini önermektedir (kategori 1). İleri yaş hastalıkta (>70 yaş), daha az dataya sahip olduğundan hastanın

performansı da gözönüne alınarak değerlendirme yapılması, konkürren tedaviye uygun değilse sadece RT uygulanması önerilmektedir (kategori 2a).

1.1.3.Rekürren Hastalıkta Tedavi Yaklaşımı

Standart adjuvan tedavilere rağmen GBM de medyan sağkalım 12.1-14.6 ay (22) ve 5 yıldan uzun sağkalım yaklaşık %5 den azdır (2). Hastaların büyük bir kısmı rekürrens gösterir, rekürrens adjuvan tedavi altında olabildiği gibi tedavi tamamlandıktan sonra da gelişebilir. Adjuvan tedavi altında erken dönem progresyonun, psödoprogresyondan ayrılması gereklidir. RT ve eş zamanlı temozolamid tedavisi tamamlandıktan yaklaşık 4 hafta sonra çekilen kontrol MR larda progresyon lehine görünüm, hastada klinik bozulma olmadıkça direkt progresyon olarak değerlendirilmeyerek, tedaviye devam edilmeli, takipte altı aylık adjuvan temozolamid altında kontrast alanı genişlemedikçe de progresyon tanısı doğrulanmamalıdır (23, 24).

Bu hastalarda RT ile geç dönemde radyasyon nekrozu gelişebilmektedir, genellikle RT den 1-3 yıl sonra beyinde nekrozun lokalize olduğu alana göre hastada semptomlar görülebilir. Vasküler endotelyal hasara bağlı küçük damarlarda fibrinoid nekroz gelişir, bu da fokal koagülatif nekroza ve beyin parankiminde demyelinizasyona neden olur (25). Genellikle 60 Gy ve altında RT uygulamalarında sık görülmez (26). Bununla birlikte radyasyon nekrozu şüphesi varsa perfüzyon MR veya MR spektroskopisi ile daha ileri inceleme yapılabilir, fakat sıklıkla tanıyı doğrulamak için biyopsi gerekecektir.

Progresyon doğrulandığında hasta reoperasyon açısından değerlendirilmelidir; genç yaş, uzun hastaliksız sağkalım ve iyi performans durumu olan hastalarda operasyon daha iyi sağkalım ve yaşam kalitesiyle ilişkilidir (27, 28). Reoperasyon uygulanan hastalara intraoperatif karmustin polimer wafer uygulanması, lokal rekürren hastalıkta sağkalımı uzatır (29). Rekürren hastalıkta RT nin rolü kısıtlıdır, fokal RT seçilmiş hastalarda uygulanabilir (30).

Sistemik tedavide hasta eğer klinik çalışmaya dahil edilemiyorsa bevasizumabın tek ajan veya sitotoksik ajanla kullanımı genellikle ilk tercihi oluşturmaktadır. Önceki çalışmalar temozolamidin ikinci hat tedavide etkinliğini göstermiş olsa da genellikle ilk hatta hastalar bu ajanı kullandıkları için bevasizumab daha ön planda rol oynar. Bevasizumab dolaşımdaki vasküler endotelyal büyüme faktörü(VEGF) reseptörlerine bağlanan bir monoklonal antikordur, tümör vaskülaritesini düzenlediği düşünülmektedir. Daha önce temozolamid almış rekürren GBM li 167 hastayı içeren Faz II bir çalışmada tek ajan ve sitotoksik KT ajanları ile kombinasyonunun etkinliği kanıtlanmıştır(31). Altı aylık PFS oranları her 2 grupta sırasıyla %43 ve %50; 6 aylık OS süreleri sırasıyla 9.2 ay ve 8.7 ay bulunmuştur. Her iki kolda güvenilirlik ve etkinlik benzer gibi görünmekle birlikte; çalışma planı gereği karşılaştırma yapılmamıştır. Bevasizumabın etki mekanizması net olarak bilinmemektedir, damar normalizasyonunu sağlayarak tümörün oksijenlenmesini arttırdığı, KT ilacının tümöre ulaşmasını kolaylaştırdığı, tümörle ilişkili ödemi azalttığı düşünülmektedir(32, 33). Bevasizumab altında progrese olan hastada genel olarak prognoz kötüdür ve farklı ajanlarla da iyi yanıt oranları gösterilememiştir. Herhangi bir kontrollü çalışma olmamakla birlikte progresyonda genel yaklaşım hasta tek ajan bevasizumab alıyorsa yanına irinotekan eklenmesi, eğer irinotekan/bevasizumab kombinasyonunda progrese olduysa irinotekan yerine başka bir sitotoksik ajan eklenmesi şeklinde olmaktadır, mevcut çalışmalar 2.hat farklı bir bevasizumab kombinasyonu ile yüz güldürücü sonuçlar göstermemiştir (34). Mevcut çalışmalarda bevasizumabın progrese GBM hastalarında genel sağkalımı arttırdığına dair veri yoktur.

Başlangıçta temozolamid kullanmış, bevasizumab için uygun olmayan hastalarda nitrozüre bazlı KTler kullanılabilir, faz II çalışmalarda tek ajan ve kombinasyon rejimi olarak etkinliği görülmektedir(35-37). Bu hasta grubunda bir diğer seçenek, metronomik temozolamid tedavisi olabilir. Malign gliomalı, standart tedavi almış hastalarda metronomik temozolamid

kullanımı, 50 mg/m²/gün, faz II çalışmada değerlendirilmiş; hastalar adjuvan tedavi erken nüks (3-6 ay), uzamış adjuvan tedavide (>6 ay) nüks, adjuvan tedavi tamamlandıktan en az 2 ay sonra nüks gelişenler şeklinde 3 gruba sınıflandırılmış; metronomik temozolamidin adjuvan tedavi tamamlandıktan sonra nüks gelişen grupta en iyi yanıtı oluşturduğu görülmüştür (38).

Şu an için rekürren hastalıkta standart yaklaşım bevasizumab içeren rejimleri içermektedir. Bevasizumab altında progresyonda herhangi bir ajanın üstünlüğü mevcut çalışmalarla gösterilememiştir.

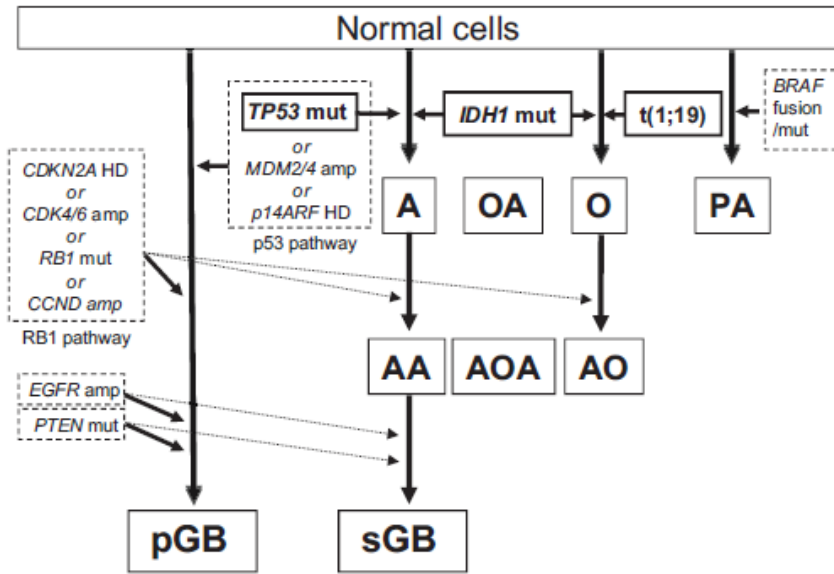
1.2. Glioblastome Multiforme Gelişiminde Olası Moleküler Mekanizmalar

1.2.1.Gen Mutasyonları

GBM yüksek intertümoral morfolojik heterojenite gösteren tümörlerdir, bu 'multiforme' şeklinde tanımlanmasının da esas nedenini oluşturur. Klinik ve sitogenetik olarak primer (denovo) ve sekonder olarak iki major gruba ayrılır. Glial tümörlerin moleküler gelişim basamakları değerlendirildiğinde farklı mutasyonların tümörlerin farklı gradedeki tümörlere differansiasyonunda ve tedaviye yanıtla ilişkili olduğunu göstermiştir (39).

Sitrik asit siklusunda rol oynayan bir enzim olan izositrat dehidrogenaz 1(IDH-1) in gen mutasyonu sıklıkla onkolojik gelişim sürecinin erken basamaklarından birini oluşturmakta ve 1p/19 q kaybı ile birlikte oligodendrogliomlarda izlenmektedir. Moleküler gelişim modellerinde IDH 1 mutasyonu sonrası hücrelerin TP53 mutasyonu ya da 1p19 q kaybı geliştirerek sırasıyla astrositoma ya da oligodendroglioma şeklinde differansiye olabildiğini düşündürmektedir (39). Bu tümörlerdeki onkojenik progresyonun sekonder GBMleri oluşturduğu, dolayısıyla sekonder GBM lerin sıklıkla IDH1 gen mutasyonu içerdiği ve daha iyi tedavi yanıtı ve sağkalımla ilişkili olduğu görülmüştür (40, 41). Primer GBM lerde ise farklı olarak epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve siklin bağımlı kinaz reseptör

2A(CDKN2A) mutasyonları; fosfataz ve tensin homolog (PTEN) genini taşıyan kromozom 10 da heterozigosite kaybı izlenmektedir (42).



Şekil 1: Gliyal tümörlerin gelişim ve progresyonunu açıklayan model

Kısaltmalar: CDKN2A,siklin bağımlı kinaz 2A; HD,homozigot delesyon; CDK 4/6,siklin bağımlı kinaz 4/6; RB1,retinoblastoma 1; CCND,siklin D1/D2/D3; EGFR,epidermal büyüme faktör reseptörü; PTEN,fosfataz ve tensin homologu; pGB, primer glioblastoma; sGB,sekonder glioblastoma; A,difüz astrositom; AA,anaplastik astrositom; OA,oligoastrositom; AOA,anaplastik oligoastrositom; O,oligodendrogliom grade II; AO,anaplastik oligodendrogliom; PA,pleositik astrositoma (Ichimura ve ark. *Neuro-oncology* 2009 dan derlenmiştir) (39)

1.2.2. Sağkalım Sinyalleri

Sağkalım sinyalleri, hücrelerin çeşitli stres ve çevresel faktörlerin etkisi altında canlılığını sürdürmesini sağlayan faktörlerdir. Reseptör tirozin kinazlar (RTKs), klas 1a fosfatidilinozitol-3-kinazı (PI3Ks) aktive ederek hücre içi sinyallerin idamesini sağlamaktadır.

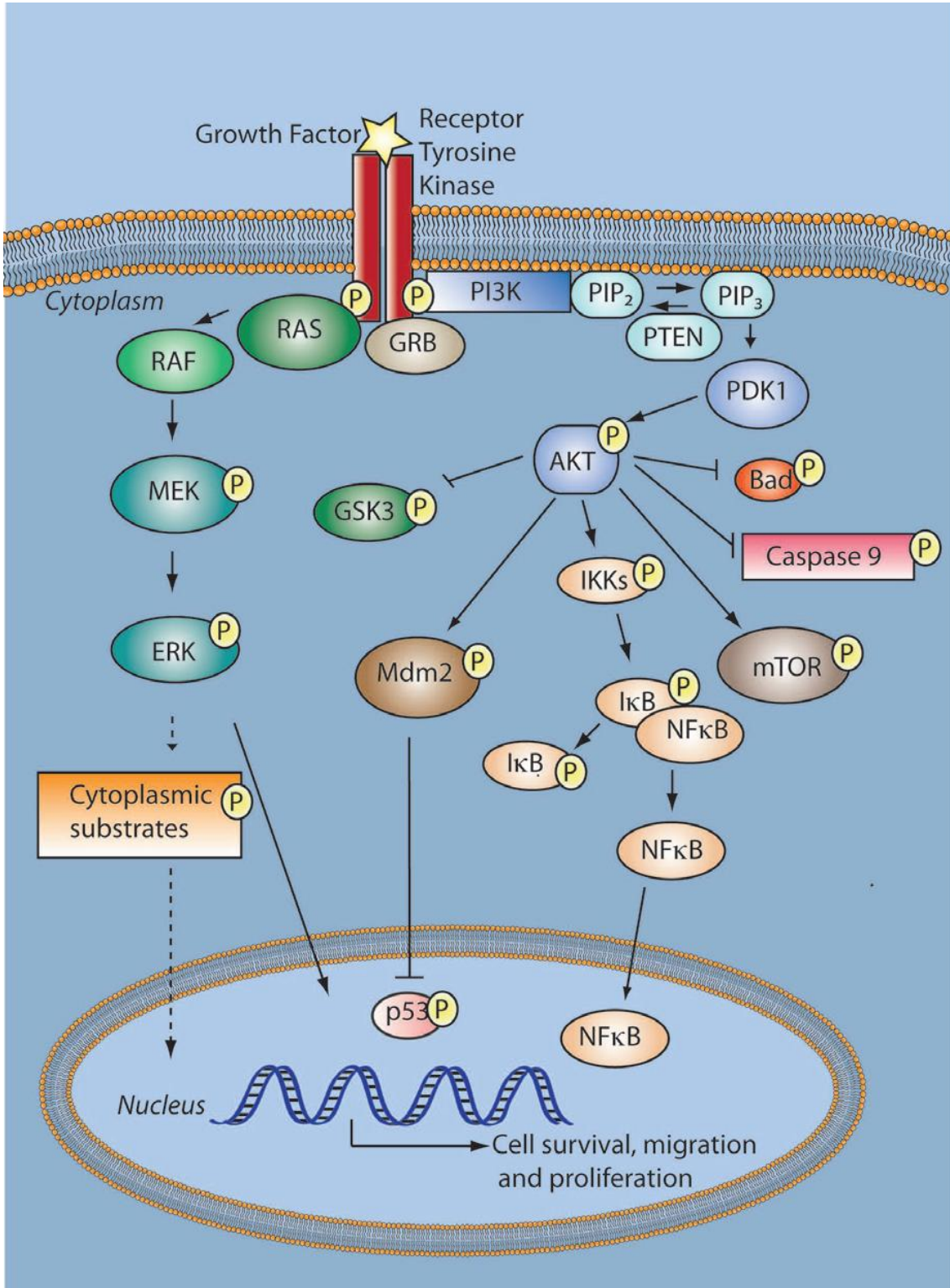
EGFR ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGFR), GBM de en sık eksprese edilen RTK lardır. PI3K, RTK fosfotirozin rezidülerine bağlanarak aktive olur ve fosfoinozitol 3-4 fosfatı (PIP2), fosfoinozitol 3-4-5 fosfata (PIP3) çevirir. PIP3, PDK1 ve AKT ın plazma membranına gelmesini sağlar, çeşitli sağkalımla ilişkili faktörler salınır, NFκB nin nükleer translokasyonunu sağlar (43). PTEN, tümör supresör gen olarak rol oynar, PIP3 yi PIP2 ya defosforile ederek PI3K sinyalinin durdurur. PTEN gen mutasyonu olan GBM de PIP3 artarak, PDK1/AKT fosforilasyonunu artırır (44). Aktive PI3K/AKT olan hastalarda sağkalım daha kötü saptanmıştır (45).

Aktive AKT, tuberosleroz 2 (TSC2) yi fosforile ederek inaktive eder ,mTORC 1 aktive olur, S6K1(p70S6 kinaz 1) ve 4E-BP1(ökaryotik inisyasyon faktörü) 'i fosforile ederek çeşitli hücre siklus regülatörlerini kodlayan mRNA translasyonuna neden olur; hücre proliferasyonu ve anjiyogenezde rol oynar. P70S6 kinaz 1 düzeyinin, GBM li hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir(45).

Reseptör ile ilişkili ras aktivasyonu da GBM de sık görülen özelliklerden biridir(46). EGFR veya PDGF tirozin kinaz reseptörlerine bağlanınca 2 EGFR molekülü dimerize olur, reseptörlerin sitoplazmik kısmındaki tirozin rezidüleri fosforillenir, RAS ve ardından RAF, MEK ve ERK aktivasyonu gerçekleşir, p90 gibi sitoplazmik hedefler aktive olur. Bu serin-treonin kinaz, nükleusa transloke olarak glioma hücrelerinde sağkalım ve proliferasyonda etkili transkripsiyon faktörlerini aktive eder (47).

GBM de hücre sağkalım sinyallerinin aktivitesi gösterilmekle birlikte, bu sinyalleri hedefleyen ajanlarla ilişkili mevcut çalışmalar henüz yüz güldürücü sonuçlar ortaya koymamıştır. EGFR inhibitörleri gefitinib ve erlotinibin tek ajan etkinliği gösterilememiş (48, 49), mTOR inhibitörü everolimusta %10-15 yanıt oranıyla sağkalımda standart tedavilere bir üstünlük sağlayamamıştır (50). Kombinasyon rejimlerinden gefitinib/sirolimus, tek ajan

temozolamid veya gefitinibe üstün bulunmamış, temozolamid/erlotinib kombinasyonlarında ise pozitif ve negatif sonuçlar elde edilmiştir (51-53).



Şekil 2: GBM de sağkalım sinyalleri

.EGFR ve PDGFR gibi reseptör tirozin kinazlar liganda bağlanarak Ras-MEK-ERK aktivasyonu, PI3K/AKT aktivasyonu sağlar. Çeşitli sağkalım faktörleri salınır, hücre proliferasyonu ve anjiyogenez düzenlenir. PDK1, fosfoinozitol bağımlı kinaz

1; fosfoinozitol 3-4-5 trifosfat(PIP3); fosfoinozitol 4-5 bifosfat(PIP2); proapoptotik bcl-2 ilişkili hücre ölüm agonisit(BAD); nükleer faktör kb(NFkb) **Krakstad and Chekenya Molecular Cancer 2010;9:135(54)**

1.2.3. Apoptoz Regülasyonu

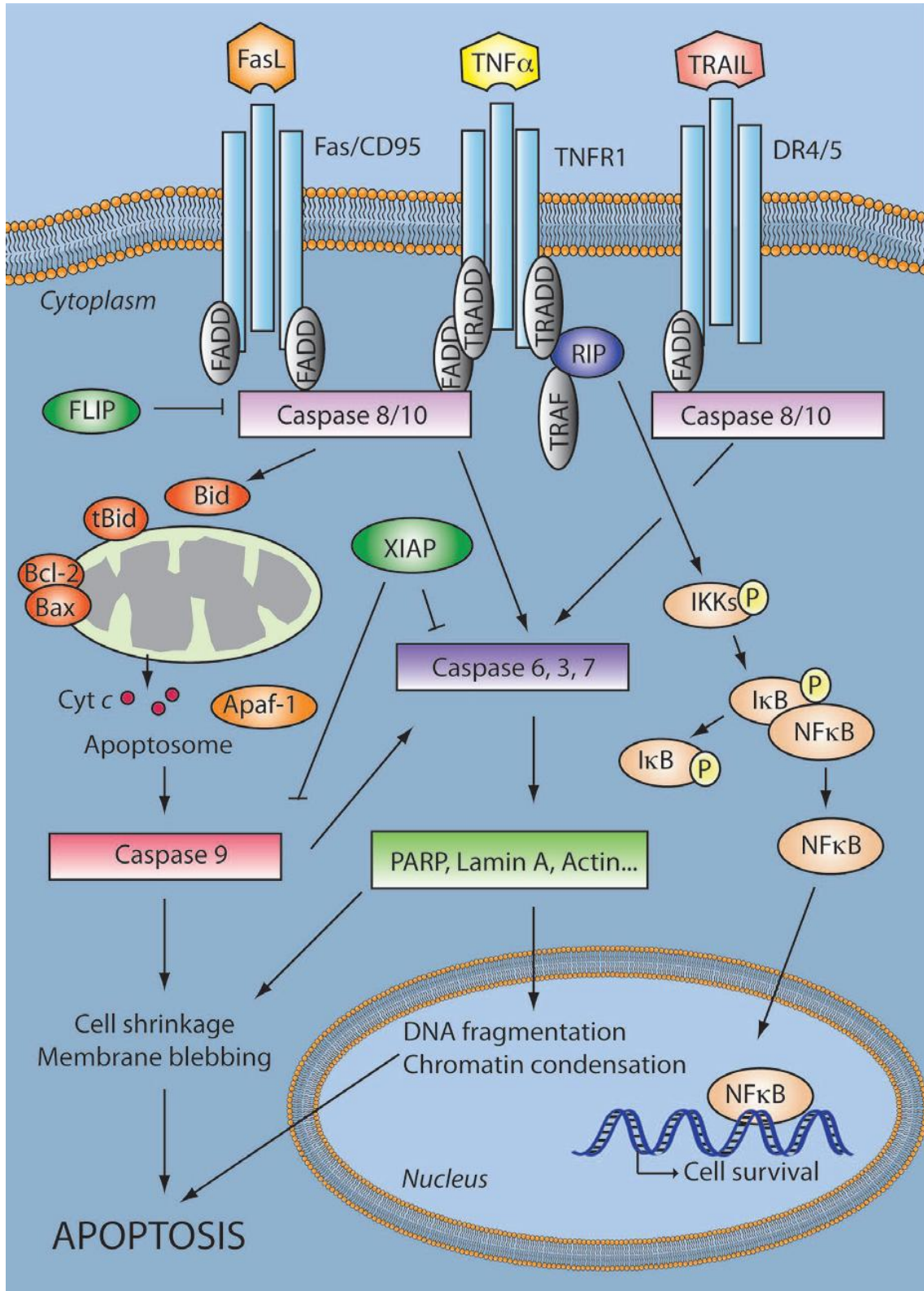
1.2.3.1. Apoptoz Genel Özellikleri

Apoptoz, programlı hücre ölümüdür, nükleus ve hücre sellüler membranı yırtılmadan büzülerek fragmante olur, bu da etraf dokuda inflamasyon oluşumunu engeller. Apoptozda kritik öneme kaspazlar sahiptir, bunlar intraselüler proteinleri aspartat rezidülerinden kesen moleküler makas olarak rol oynarlar. Apoptoz iki farklı yolak üzerinden gerçekleşir.

Ekstrinsik yolak: Tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesi, 29 transmembran reseptöründen meydana gelir, homotrimer şeklinde organize olur ve kendi ligandına bağlanır. TNF ligand ailesinin 19 üyesi mevcuttur, adaptör protein ile aktive edilen reseptörün hangisi olduğu proliferasyon, apoptoz veya inflamasyon gibi hücrede hangi yanıtın oluşacağını belirler (55). Apoptozu düzenleyen reseptörler TNF-R1, FAS ve DR4/DR5 dir ve ekstraselüler sinyaller sonucunda sırasıyla TNF α , CD95 ve tümör nekroz faktörle ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) e bağlanır (Şekil 3). Ligandlar reseptöre bağlanınca konformasyonel değişikliğe uğrayarak dimerize olur, sinyal hücre içine iletilir, FADD (FAS ilişkili ölüm domain proteini) ve TRADD (TNF reseptör ilişkili ölüm domain proteini) gibi intraselüler adaptör proteinler bu dimerize reseptöre bağlanır. Prokaspazlar bir araya gelir, self cleavage ile kaspaz 8 ve ardından kaspaz 3, 6, 7 aktive olur, çeşitli protein hedefler parçalanır, NF- κ B aktive olur, apoptoz gelişir.

İntrinsik Yolak: DNA hasarı ya da oksidatif stres apoptozun intrinsik yollarını proapoptotik B-hücre lenfoma 2 (bcl-2) protein ailesi üzerinden indükler. bcl-2 protein ailesi, pro- ve antiapoptotik etkileri ve bcl-2 homoloji domainine (BH domain) göre üç subgruba ayrılır. Antiapoptotik bcl-2 proteinler; 4 BH domaini ortak olan bcl-2, bcl-XL ve Mcl-1'i içeren tek bir subgruptan oluşur. Proapoptotik özellikler gösteren proteinler ise 4BH domaini

(Bax, Bak) ve tek BH domaini (Bad, Bim, Bid) ortak olan iki farklı gruba ayrılır. Mitokondriden salınan apoptotik mediyatörlerden hangisinin daha fazla salındığına bağlı olarak pro ya da anti-apoptotik etki oluşabilir. Apoptotik yolak aktivasyonu için öncelikle DNA hasarı gibi bir uyarı ile tek BH3 domaini taşıyan proteinler Bid ve Bim, Bax ve Bad'a bağlanır, Bax da oluşan konformasyonel değişiklik, membran permeabilitesini arttırarak sit C nin sitoplazmaya salınımını arttırır (56). sit C, prokaspaz 9 aktivasyonu için gerekli olan protein kofaktör, APAF1 e bağlanır. Kaspaz 9 otoaktivasyonu, kaspaz 3 ve diğer downstream yolakların aktive olmasını sağlar ve apoptoz gerçekleşir (Şekil 3). Hücre sel sağ kalımın gerekli olduğu koşullarda ise antiapoptotik bcl-2 ailesi üyeleri, proapoptotik Bax ve Bak'a bağlanır ve intrinsik apoptotik yolağı inhibe eder.



Şekil 3: Apoptotik Sinyal Yolağı. TNFR, tümör nekroz faktör reseptör; TRAIL, tümör nekroz ilişkili apoptozi indükleyen ligand; TRADD, TNF reseptör 1 ilişkili ölüm domain proteini; DR,ölüm reseptörü;FADD, FAS ilişkili ölüm domain proteini;NFκB,nükleer faktör kappa B;APAF1,apoptotik proteaz aktive edici faktör 1. **Krakstad and Chekenya Molecular Cancer 2010;9:135(54)**

1.2.3.2 Glioblastomada apoptotik moleküller

Apoptozla ilişkili moleküllerin GBM de oynadığı rol prelinik ve klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. bcl-2 nin insan glioma hücrelerinde migrasyon ve invazivliği arttırdığı gösterilmiştir(57). Glioblastomalı 37 vakayı içeren bir çalışmada hastaların parafin blokları ilk rezeksiyon ve rekürrenste apoptotik moleküller açısından IHC ile değerlendirilmiş; bcl-2 ve bcl-XL upregülasyonu, Bax downregülasyonu saptanmış ve bunun rekürrensel hastalarda daha yüksek düzeylerde olduğu belirlenmiştir (58). Fakat glial tümörler birlikte değerlendirildiğinde aslında beklenenin aksine, düşük grade tümörlerde antiapoptotik moleküllerin daha yüksek düzeyde olduğu ve daha iyi prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (59, 60). Bcl-2 nin antiapoptotik özelliklerinin yanı sıra CDK inhibitörleri ile p27 upregülasyonu ve retinoblastoma ile E2F proteinlerinin downregülasyonu hücre siklus progresyonunu geciktirdiği; G0-S faz geçişini etkileyerek antiproliferatif etki gösterdiği düşünülmektedir (61). Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar, anti-apoptotik bcl-2 nin çeşitli proteinlere bağlanarak konformasyonel değişikliğe uğrayabildiğini ve proapoptotik etkilerde meydana getirebileceğini göstermiştir (62). Bcl-2 nin aynı zamanda proinvaziv ve promigratuar aktivitesi olduğu, bcl-2 eksprese eden GBM de furin proprotein konvertaz ekspresyon ve aktivitesini arttırdığı ve bunun da proteolitik olarak proinvaziv metalloproteinazları (MMP) ve TGF- β yı aktive ettiği düşünülmektedir (63). Mevcut veriler, bcl-2 nin bimodal aktivite gösterdiğini, yüksek grade glial tümörlerde invaziv paternden sorumlu olabileceğini öngörmektedir.

Anti-apoptotik protein Bcl-2L12, multifonksiyonel bir proteindir, neredeyse GBM li hastaların tamamında eksprese edilir, tümörü çevreleyen normal beyin dokusunda ve düşük grade glial tümörlerde genellikle düşük ya da saptanamayacak düzeyde bulunur (64). Bu proteinin aşırı ekspresyonu, postmitokondriyel düzeyde kaspaz aktivasyon inhibisyonuyla apoptozi inhibe etmektedir (64, 65). Postmitokondriyel kaspaz hücre aktivasyonu, apoptotik

ve nekrotik hücre ölümünde moleküler switch rolü oynar, hücrenin nekroza gitmesi kolaylaşır.

bcl-2L12, aynı zamanda p53 ün hedef gen bölgelerine bağlanmasını engelleyerek p53 aktivitesini engeller, p53 proapoptotik üyeleri eksprese eden genleri indükleyemez. Apoptoz ve p53 sinyalinin inhibisyonu, hücre ölümünün nekroza yönlendirilmesi GBM deki tipik moleküler özellikleri bcl-2L12 nin belirlediğini düşündürmektedir.

1.2.4.Glioblastomada Anjiyogenez

Yeni damar oluşumu patolojik ve fizyolojik olarak iki sürecin gelişimiyle meydana gelir. Embriyonik gelişim esnasında, yeni kan damarları anjiyoblastların primitif mezodermden differansiasyonuyla gelişir, 'vaskülogenez' olarak adlandırılır. Oluşan damarlardaki daha ileri genişleme ve gelişme 'anjiyogenez' olarak tanımlanır. Erişkinlerde fizyolojik anjiyogenez kadında reproduktif sikluslar ve her iki cinste yara iyileşmesi ile meydana gelirken, patolojik anjiyogenez dokunun daha fazla oksijen ve besine ihtiyaç duyduğu inflamatuvar durumlar, malignansi ve diyabette izlenebilmektedir (66). İlk kez 1966 da Folkman ve arkadaşları, tümör büyümesi ve metastaz için yeni damar oluşumunun gerektiğini tanımlamıştır, yeni damar oluşumu gerçekleşmeden tümörler yaklaşık 2 mm³ kadar büyüebilmektedir (67, 68).

GBM, en fazla vaskülarizasyon gösteren glial tümörlerdir, anjiyogenezde esas role VEGF sahiptir. VEGF gen ailesi 6 glikoproteinden meydana gelir: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve PIGF. VEGF-A (VEGF olarak ta adlandırılır) iki tirozin kinaz reseptörü, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ye; VEGF-B ve PIGF, VEGFR-1' e ; VEGF-E, VEGFR-2 ye; VEGF-C ve -D, VEGFR-3 'e bağlanır (69). VEGFR-1 ve VEGFR-2 esas olarak vasküler endotelyal ve hematopoetik hücrelerden eksprese edilerek anjiyogenezde rol alırken VEGFR-3, lenfatiklerden eksprese edilerek lenfanjiyogenezde rol alır (69). Endotelyal hücre proliferasyonunu arttırmada major rol VEGFR-2 ye aittir. VEGFR-1 aktivasyon ve

ekspresyonu, VEGFR-2 ilişkili hücre büyümesini indükler (70). Nörofilinler, non-tirozin kinaz koreseptörlerdir, VEGF'in VEGFR-1 ve VEGFR-2 ye bağlanmasını arttırarak anjiyogenik proste rol oynar (71). Tümör vasküler yatağındaki VEGFR-1 ve VEGFR-2, Ras/MAPK ve PI3/Akt sinyal yolaklarını aktive ederek GBM tümörögenesinde rol oynar. VEGF düzeyi yüksek grade gliomalarda, düşük grade gliomalardan 10 kat yüksek bulunmuştur ve ekspresyon düzeyi malign progresyon ve vasküler dansite artışıyla koreledir. VEGF, aynı zamanda kemik iliğinden progenitör hücrelerin salınımına neden olur, bu hücreler tümör yatağında çeşitli proanjiyogenik faktörlerin salınımıyla tümör anjiyögenesinin devamını sağlar (72).

VEGF dışında GBM hücreleri tarafından salınan diğer proanjiyogenik faktörlerin de anjiyögeneze katkıda bulunduğı görölmüştür. Çeşitli çalışmalarda Ang-1 ve -2 (73, 74), FGF (75), PDGF (76), TGF- β (77)ve TNF- α (78) nın rolü gösterilmiştir. Stromal hücre-ilişkili faktör-1(SDF-1/CXCL12) ve reseptörü, CXC kemokin reseptör 4, lökosit ve endotelial hücre migrasyonunu , kemik iliğı myelopoez ve anjiyögenesini düzenler. İnsülin büyüme faktörü(IGF-1), integrin ve matriks metalloproteinazlar da endotelial hücre adezyon ve invazyonunda rol alır ve GBM de aşırı eksprese edilir (79-81). Bu anjiyogenik faktörler GBM de potansiyel terapötik hedefler olarak değerlendirilmektedir.

1.3. AT-101:(-)/- Gossipol Enantiyomeri

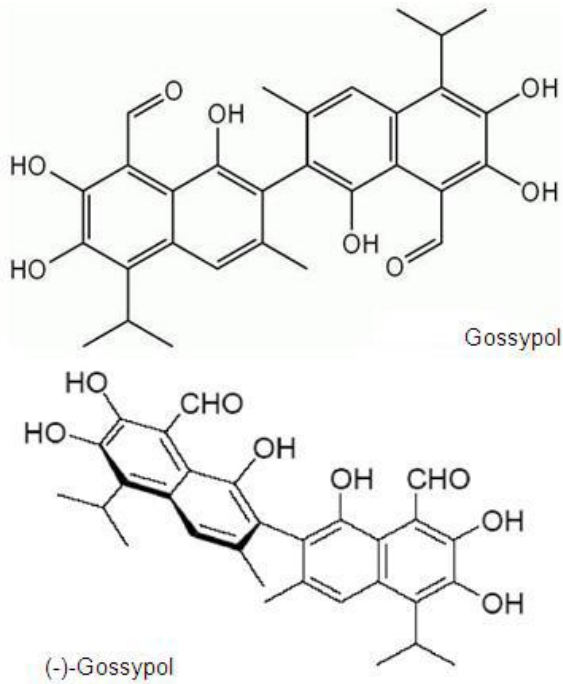
1.3.1.Gossipol Genel Bilgiler

Gossipol, her ikisi de *Malvaceae* familyasına ait olan pamuk bitkisinin tohumlarından (*Gossypium species*) ve tropik bir ağaç olan *Thespesia populnea*'dan elde edilen sarı renkli bir bileşiktir (82). Gossipol ilk kez 1886'da pamuk tohumu yağının saflaştırılması sırasında serbest yağ asitleri ve fosfolipidlerle beraber izole edilmiştir ancak 1938'e kadar fiziksel ve

kimyasal özellikleri hakkında bir sonuca varılamamıştır. “Gossipol” ismi *Gossypium* kökenini ve fenolik yapısını belirtmek amacıyla verilmiştir.

1960’lı yıllarda Çin’de kıtlık nedeniyle Çinli çiftçiler tarafından besin kaynağı olarak kullanılan pamuk tohumu yağının daha sonraları bu çiftçilerde kontrasepsiyon geliştirdiğinin yapılan araştırmalarla fark edilmesi üzerine 1978 yılında dönemin hükümeti önderliğinde büyük bir çalışma başlatılmıştır. Gossipol 10.000 sağlıklı erkeğe 75 gün boyunca 20 mg/gün ağızdan verilmiş ve sonrasında 50 mg/gün devam edilmiştir. %10 vakada, 1 yıl üzerinde kullanıldığında geriye dönüşümsüz spermatogenez inhibisyonu yaptığı saptanmıştır (83). Gossipolün erkeklerde anti-fertilite etkinliğinin ve toksikolojik profilinin saptanması ile birlikte bu maddenin biyolojik aktivitesinin araştırıldığı derin çalışmalar başlatılmıştır.

Gossipol, atropizomerizm denen bir çeşit enantiomerizm içerir. C2-C2 binaftalan bağında rotasyon ile (-)- (AT-101) ve (+)- olmak üzere iki aktif optik forma döner(84) (Şekil 4)



Şekil 4:Gossipol ve (-)- Gossipol (AT-101) kimyasal yapıları

Gossipol, fenolik hidroksil ve aldehit gruplarının varlığı nedeniyle reaktif bir bileşiktir.

1.3.2 Gossipolün Etki Mekanizması

Kanser hücre hatlarında in vitro olarak, gossipolün çoğalmayı inhibe edici etkisi difenilterazoliumbromid (MTT) ve flow sitometri yöntemleri ile gösterilmiş ve (-)- izomerinin (AT-101), (+)- ve rasemik (sol ve sağ elli enantiyomerlerinin eşit oranda karışımı) izomerinden daha sitotoksik etkili olduğu gözlenmiştir (85). Özellikle adriamisin, vinblastin ve cisplatine dirençli hücre hatlarında da (-)- izomerinin (AT-101) daha etkin olduğu saptanmıştır (86).

Gossipolün apoptotik etkilerinin, antiapoptotik Bcl-2 ailesinin inhibisyonu ve mitokondriyal kaspaz yolları ile etkileşmesiyle ortaya çıktığı gözlenmiştir. Gossipol, pan-bcl 2- inhibitörüdür; Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ve Bcl-w proteinlerinin BH3 (Bcl-2 homoloji 3 bölgesi) kısmına bağlanarak, bu proteinlerin etkilerini antagonize etmektedir (87). Tümör hücrelerinin kemoterapötik ajanlara direnci Bcl-2 ve Bcl-xL nin aşırı ekspresyonuyla ilişkilidir. Bu nedenle gossipol gibi BH3 mimetik kimyasalların kanser tedavisinde umut verici ajanlar olduğu söylenebilir. Cisplatine dirençli baş boyun kanseri hücre hattında ve Bcl-xL ekspresyonu yüksek tümör hücrelerinde apoptozun gossipol ile seçici olarak uyarıldığı gösterilmiştir (88). İnsan lenfoma hücrelerinde tek başına veya standart KT ile birlikte uygulanan gossipol, apoptozu uyararak KTnin etkinliğini arttırmaktadır (89). Gossipol, Bcl-2 molekülünün inhibisyonunun dışında başlıca kaspazlardan olan kaspaz 8'i aktive eder, kaspaz 8 aktivasyonu sit C nin mitokondriden sitozole salınımı gerçekleşir, kaspaz 3 ve 9 aktive olur, apoptoz uyarılır.

Gossipolde BH3 mimetik etkinin yanı sıra, plazma ve mitokondriyal membranda interkalasyon, lipid kondensasyonu, mitokondriyel şişme ve mitokondri iç membran hasarı da görülmektedir (90). Klinik çalışmalarda kullanılan bcl-2 yi hedefleyen tek ajan gossipoldür (54), erken çalışmalarda grade III-IV tümörlerde düşük toksisite ve ılımlı yanıt oranları elde

edilmiştir (91, 92). İki çalışmada ise temozolamid/RT ile yanıt oranları, doz ve toksisitesi değerlendirilmektedir (NCT00540722, NCT00390403).

1.4.Glioblastome Multiformenin Hücresel Modeli, T98G ve U87MG hücre hatları

1.4.1. T98G hücre hatları özellikleri

T98G, 61 yaşında Kafkasya kökenli GBM beyin tümörlü bir erkek hastadan 1979 yılında elde edilmiştir. T98G, yine kendisi gibi kökenini GBM'den almış T98 hücre hattının poliploid varyantıdır. Morfolojileri fibroblast hücrelerine benzemektedir. Hyperpentaploid hücreler olup, karakteristik olarak kromozom sayıları 128-132 arasındadır.

T98 hücreleri bütün transforme hücrelerde olduğu gibi in vitro sınırsız olarak popülasyonunu iki katına çıkarabilme, yüzeye tutunmadan çoğalma ve durağan dönemlerde hücre döngüsünde interfaz aşamasının G1 döneminde tutuklu kalmayarak çoğalma yeteneğine sahiptir.

T98G hücre soyu, kontrolsüz çoğalma ve yüzeye tutunmadan bağımsız çoğalmayı, normal hücrelerde görülen durağan dönemlerde hücrenin kendini korumak amacıyla hayata geçirdiği hücre döngüsü denetleme mekanizması (G1 fazında tutuklu kalma) özelliğini yitirmeden de gerçekleştirebilir. T98G hücrelerinde görülen bu üç farklı özellik hücre çoğalmasının kontrolünün birbirinden bağımsız bir şekilde değiştirilebileceğinin bir göstergesidir. Bu özellikleri ile T98G hücreleri kısmi değişikliğe uğramış hücreler olarak kabul edilmektedir (93).

1.4.2.U-87MG hücre hatları özellikleri

U87, 44 yaşında Kafkasya kökenli glioblastomalı bir hastadan 1966 yılında elde edilmiştir. Hücreler epitelyal özellikte olup adherent hücrelerdir. Karakteristik olarak 44 kromozoma sahiptir, hipodiploid hücrelerdir. Mutasyon analizleri sonucunda, 154 gende tek nükleotid

varyasyonu, 178 gende küçük insersiyon/delesyonlar, 145 gende büyük mikrodelsyonlar ve 35 gende interkromozomal translokasyonlar olmak üzere 512 genin homozigot mutant olduğu belirlenmiştir (94). İmmünkompetan farelerde tümör oluşturabilirler.

1.5. Sitotoksisite ve Ölçüm Yöntemleri

1.5.1.Genel Bilgi

Sitotoksisite, bir kimyasal bileşiğin veya ajanın hücreleri öldürme özelliğidir. Nekroz veya apoptozun aksine, sitotoksisite spesifik bir hücre öldürme mekanizmasını göstermez. Sitotoksisiteyi ölçmede en çok kullanılan yöntemlerde membran bütünlüğü ya da metabolik aktivite ölçümüyle değerlendirilme yapılmaktadır.

Membran bütünlüğüne dayalı yöntemlerden ilki, hücrelerin tripan mavisi, naftalin siyahı gibi boya ile boyanarak, mikroskopta hemositometre ile sayımına dayanan, boya atılım yöntemidir. Yukarıda sözü edilen boyalar, membran bütünlükleri korunduğu için canlı hücrelere giremez, dolayısıyla canlı hücreler mikroskopta boyanmamış parlak hücreler olarak görünürler. Ancak ölü hücrelerin membran bütünlükleri kaybolduğundan boyalar bu hücrelerin membranlarından geçerek onların boyanmasını sağlar.

Bu yöntemle hücre süspansiyonunun ml' sindeki hücre miktarı, dolayısıyla total hücre miktarı belirlenebilir, böylelikle hücre kültüründeki hücrelerin optimal yoğunluğa ulaşmış oldukları, pasajlama yapıp yapılmayacağına karar verilir (95). Hücre sayısının hemositometre ile belirlenmesi en çok kullanılan yöntemlerden biridir ve oldukça pratiktir. Ucuz olması ve örneğin çok az bir bölümünün kullanılması açısından tercih edilmektedir.

Laktat Dehidrogenaz (LDH) salınım yöntemi; membran bütünlüğüne dayanan diğer bir test LDH salınımı testidir. LDH canlı hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzimdir ve hücre membran bütünlüğü bozulması sonucunda ortama salınırlar. İlaçla muamele edilen hücrelerin süpernatantı toplanarak salgıladıkları LDH enzim miktarı ölçülür. Membran bütünlüğü

bozulmuş hücrelerin miktarıyla orantılı olarak ortamdaki LDH enzim seviyesinin miktarı da fazla olur.

Metabolik aktiviteye dayalı yöntemler ise, canlı hücrelerin metabolik aktivitelerinin ölü hücrelerden daha fazla olduğu prensibine dayanır. Kültür ortamına tetrazolyum tuzları (MTT, XTT, WST-1) eklenerek metabolik aktivite ölçümü yapılabilmektedir. Tetrazolyum tuzları canlı hücreler (metabolizmaları aktif hücreler) tarafından sarı-turuncu renkli formazan boyasına çevrilirler(96). Oluşan renk değişimi spektrofotometrede uygun dalga boyunda ölçülür. Canlı hücrelerin aksine ölü hücreler tetrazolyum tuzlarını formazan boyasına çeviremezler. En çok kullanılan metabolik aktivite ölçüm yöntemleri; MTT ve XTT'dir.

1.5.2.XTT Yöntemi

XTT testi; metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından yine bir tetrazolyum tuzu olan XTT'nin suda çözünebilen turuncu renkli formazan tuzuna çevrilmesine dayanmaktadır. Oluşan formazan tuzu suda çözünebilir özellikte olup, ek bir çözündürme basamağına gerek yoktur. Boya yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır ve spektrofotometre kullanılarak uygun dalga boylarında ölçülür. Ancak XTT muamelesi kültür ortamındaki hücrelere toksik etki yapar ve hücreler bir sonraki deney aşamalarında kullanılamaz (97).

Sitotoksosite, bir kimyasal bileşiğin veya ajanın, hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini negatif yönde etkilemesine ve/veya çoğalmasına toksik etkide bulunma parametresidir. Örneğin hücrelere bağlı gelişen sitotoksosite (sitotoksik T hücreleri, NK hücreleri), bazı yönlerden hem nekroz ve hem de apoptozun bir kombinasyonu olabilir (98, 99).

XTT yöntemi ile sitotoksosite doğrudan ölçülemez. Hücre popülasyonunun canlılık yüzdesi ölçümlendikten sonra dolaylı olarak hesaplanır.

Sitotoksitenin yüzde canlılık üzerinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır;

% Sitotoksosite = 1 - [(İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması / Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması) x100]

1.5.3. xCELLigence™ sistemi

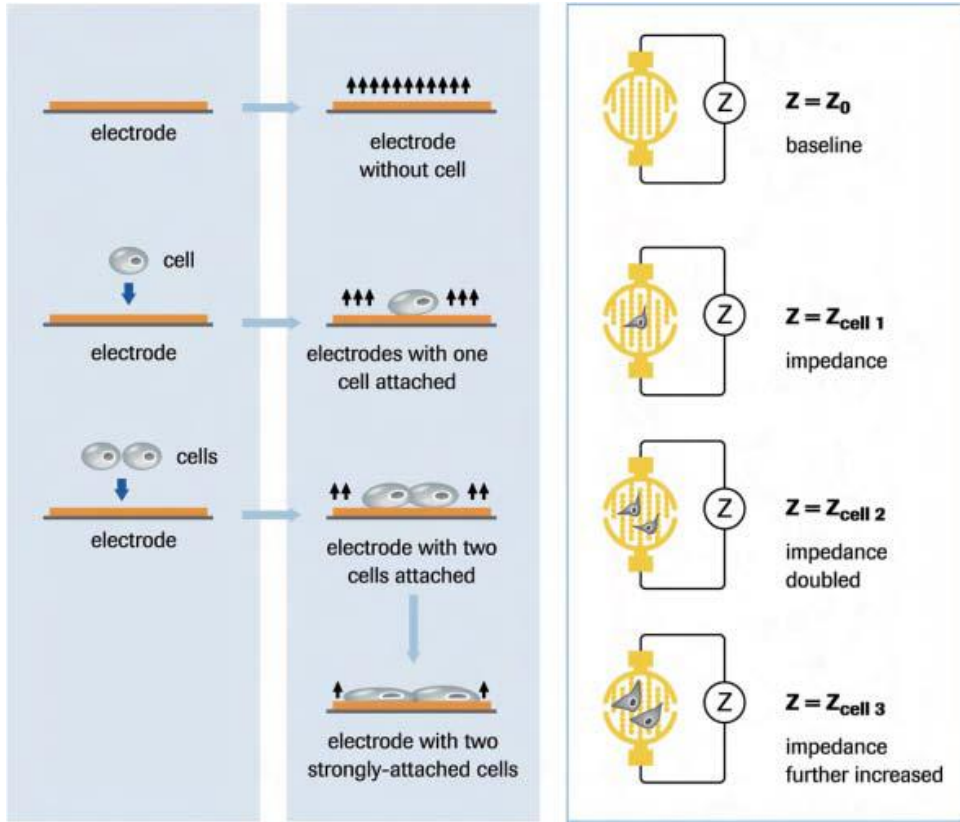
Roche uygulamalı bilimler ve ACEA Biosciences tarafından ortaklaşa geliştirilmiş RTCA (Real-Time Cell Analyzer) SP (Single Plate); adherent hücreleri incelemek için geliştirilmiş mikro elektronik sensor teknolojisidir.

Hüresel olaylar xCELLigence sistemi ile hiçbir işaretleme yapmadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilir. Sistem hücre kültürü E-Plate'lerinin zeminine yerleştirilmiş mikroelektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçümü yapar. Empedans ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil olmak üzere hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi verir. xCELLigence sistemiyle son nokta metotlarıyla elde edilmesi mümkün olmayan veriler elde edilebilmektedir.

xCELLigence sistemi, RTCA analiz cihazı, plaka bölgesi, RTCA yazılımını içeren bilgisayar ve 96 kuyucuklu E-plakalar olmak üzere dört ana parçaya sahiptir. E-plakalar, hücre kültüründe yaygın olarak kullanılan standart 96 kuyucuklu plakalara benzerdir. Her kuyucuğun taban çapı 5 ± 0.05 mm ve toplam hacmi 243 ± 5 μ l'dir. Kuyucukların tabanları, 15-40 °C arasındaki sıcaklıklarda ve % 98 nem içeren ortamlarda dahi yoğunlaşma olmadan kullanılmak üzere tasarlanmış mikroelektrotlar ile kaplanmıştır. Mikroelektrotların tabanları iyi bir iletken olan altın ile kaplıdır. Elektrik iletimi ile kuyucuklardaki hücrelerin gerçek zamanlı izlenebilmesi ve analizi sağlanır. E-plakaların kapakları ise standart hücre kültürü plakalarında gözlenen buharlaşma olayını da engelleyecek şekilde tasarlanmıştır.

Uygulanan düşük voltaj (20 mV) mikroelektrotlar arasında küçük bir elektrik alan üretir. Bu alandaki akım, zemine tutunan hücreler nedeniyle engellenir ve ölçülen empedansta değişikliklere yol açar (100). Empedans basitçe, alternatif akımla çalışan devrelerde bulunan

direnç olarak tanımlanabilir. Kuyucuklarda ölçülen empedans elektrot geometrisine, kuyucuktaki iyon konsantrasyonuna ve hücrelerin tutunma miktarına bağlı olarak değişir. Hücre yokluğunda empedans, hem elektrot/çözelti etkileşimine hem de çözeltinin iyon içeriğine bağlıdır. Hücrelerin varlığında ise elektrot yüzeyine tutunan hücreler yalıtkan bir davranış gösterecek ve böylece elektrot/çözelti etkileşimi empedansta artışa neden olacaktır. Bu değişim miktarı kuyucuktaki hücre sayısı, hücrelerin morfolojileri ve tutunma özellikleriyle ilişkilidir. Elektrotlar üzerindeki hücre sayısının artışı empedans değerinin artışına neden olur. Hücre indeksi (CI), elektriksel empedans değişiminin ölçülmesi ile elde edilen değerdir. CI değeri, $CI = (Z_i - Z_0) / Z_0$ formülü ile hesaplanır. Formüldeki Z_i , deney sırasında her hangi bir noktada ölçülen empedans, Z_0 ise başlangıçtaki empedans değerini temsil eder.



Şekil 5. Empedans ölçüm prensibi (101)

Empedans temel olarak 2 faktöre bağlıdır (100).

1) Elektroda tutunan hücre sayısı: Elektrot yüzeyine hücre tutunmamışsa, sensörün elektronik alanı etkilenmeyecek ve empedans değişimi olmayacaktır ($Z=0$). Elektrotlara tek hücrenin tutunması halinde bu değer 1 olacaktır ($Z=1$). Daha çok hücrenin tutunması halinde ise empedans daha çok artacaktır.

2) Elektroda tutunan hücrelerin yüzey alanı: Elektrotlara aynı sayıda hücre tutunmasına karşın tutunan hücrelerin yüzey alanları da CI değerinde farklılıklara neden olacaktır. Hücrenin elektroda tutunduğu yüzey arttıkça CI değeri artacak, elektroda tutunduğu yüzey azaldıkça CI değeri azalacaktır. Sağlıklı hücrelerde elektroda tutunan hücrelerin yüzey alanları büyüktür ve bu durum hücre ile elektrot sensörü etkileşimini arttıracığından CI değeri artar. Fakat toksik bileşikler, hücrelerin tutunduğu yüzeyden ayrılmasına ve böylece CI değerinin düşmesine neden olur.

xCELLigence yazılımı ortalama değer, en yüksek ve en düşük değerler, standart sapma, kuyucuktaki hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyon (IC_{50}), kuyucuktaki hücrelerin %50'sine maksimal etki gösteren konsantrasyon (EC_{50}), hücre indeksi (CI) gibi parametreler hakkında veri sağlar. Bunun yanında bu verilere ait grafikler sunar. Tüm bu veriler istatistiksel analizlerde kullanılmak üzere Excel dosyası halinde elde edilebilir.

1.6.Amaç

Gossipolün anti-bcl-2 inhibisyonuyla apoptozu indüklediği prelinik çalışmalarda gösterilmekle birlikte, GBM deki potansiyel terapötik rolü net olarak ortaya konmamıştır. Mevcut veriler şu an için GBM de en ideal ajanların tümörün yüksek vaskülaritesi nedeniyle VEGF hedeflemesi gerektiğini düşündürmektedir. Biz çalışmamızda AT-101 in GBM hücre

kültürlerindeki (U-87 MG ve T98G) sitotoksik etkilerini ve yanı sıra VEGF sentezi üzerine etkisini protein düzeyinde araştırmayı amaçladık.

2.MATERYAL VE METOD

2.1.Hücre Hatlarının Temini ve Kültüre Edilmesi

*Hücre Hatların'ın İdamesinde Kullanılan Besiyeri:*U-87 MG ve T98 G hücre hatları %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 (Kibutz Beith Maemeh 25115, Israel) besiyerine %10 inaktif fetal bovin serumu (Life Tecnologist), %1 (10 mg/ml) streptomisin ve 10.000 U/ml penisilin eklenerek çoğaltıldı.

*Hücre kültür İşlemlerinin Yapıldığı Ortamlar:*Besiyerine eklenen hücreler 37 C'de %95 nem ve %5 CO2 içeren inkübatörde (NuAire, USA) çoğaltılıp inkübe edildi. Hücre kültür çalışmaları ise ultraviyole ile sterilize edilen Laminar Hood (NuAire, USA) içerisinde yapıldı.

Dondurulmuş hücre hattının çözülmesi: -80 derecede kriyotüpler içinde %10 dimetil sulfoksit (DMSO) ile dondurulmuş olan U-87 MG ve T98 G hücre hatları, -80 dereceden çıkarılıp 37°C' de çözüldü. İşlem öncesi Hood 30 dk boyunca ultraviyole ile sterilize edildi ve çalışmaya başlamadan önce içi alkol ile temizlendi. Çözülen hücrelerin üzerine 10 -15 ml besiyeri eklendikten sonra 1000 devir/dk' da 10 dakika santrifüje edildi. 37°C ısıda DMSO'nun hücrelere olan toksik etkisi hücre canlılığını azaltacağı için seri şekilde çalışıldı. Santrifügasyondan sonra üstteki kısım atılıp, kalan hücre çökeltisine taze besiyeri eklenip homojenize edilip tekrar santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra tüpün dibindeki hücre çökeltisi tekrar 10-15 ml taze besiyeri ile homojenize edilip 50 ml' lik flaslara steril şekilde aktarıldı.

Hücre hatlarının pasajlanması: Flaslara aktarılan hücrelerin üzerine 10 ml besiyeri eklenip, inkübatöre yerleştirildi. Çoğalmaları beklenirken haftada iki kere besiyeri değiştirildi. Işık mikroskopunda flask tabanını monolayer olarak kaplayıp kaplamadıkları kontrol edildi. U-87

MG ve T98 G hücrelerinin ikilenme zamanları yaklaşık 48 saat olarak bulundu ve pasajları, ikilenme zamanına uygun olarak yapıldı. Pasajlama işlemi için öncelikle flaskların içindeki besiyeri dökülüp, hücrelerin üzerine 5 ml Tripsin-EDTA (Biological Industries Indianapolis) eklendi. İnkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletildikten sonra mikroskopta flask tabanından kalkıp kalkmadıkları kontrol edildi. Tabandan ayrılan hücrelerin üzerine yaklaşık 5-10 ml besiyeri eklenerek Tripsin-EDTA nötralize edildi ve ardından bu karışım, tüplere alınıp santrifüje edildi. Üzerindeki süpernatant atılıp tabandaki hücre çökeltisi üzerine yaklaşık 10 ml besiyeri eklenip homojenize edildi ve pasajlanmak üzere flasklara tekrar ekildi ve üzerine besiyeri eklendi. Her pasaj sırasında yaklaşık 2 milyon hücre/10 ml besiyerinde olacak şekilde pasajlama yapıldı.

2.2.Hücrelerin Sayımı ve Deney Planına Göre Ekimi

Hücre sayısı; besiyerinin mililitresi başına veya tutunulmuş yüzeyin santimetreküpü başına düşen hücre sayısı olarak belirtilebilir. Flasklar içinde inkübe edilmiş olan U-87 MG ve T98 G hücreleri yapıştıkları yüzeyden kalkması için tripsin EDTA ile muamele edildi. Hücreler kalkınca besiyeri ile nötralize edilip tüpte santrifüje edildi. Altta kalan hücre çökeltisi besiyeri ile dilüe edilip homojenize edildi.

Hücre sayımı için trypan blue dye exclusion test uygulandı. Hücre içeren süspansiyon ve trypan blue solüsyonu 1:1 oranında karıştırıldı ve otomatik hücre sayım cihazında sayımı yapıldı. Canlı hücreler trypan blue boyasına geçirgen olmadıkları için parlak gözüklümler, ölü hücreler ise bu boyayı hücre içine çekerler ve mat, mavi renkte gözüklümler. Canlı hücre sayımından sonra, deneyimizi yapacağımız 96' lık well plate' lerde her bir kuyucuk içine 10000 hücre gelecek şekilde hücrelerin ekimi yapıldı. Deneyde deney planına göre uygun sayıda kuyucuk içine hücre ekim işlemleri tamamlandı. Hücre ekilen 96'lık well plate' ler,

hücrelerin tabana yapışması için 37°C ısı, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

2.3.İlaçların Hazırlanması

(-)- Gossypol (AT -101), Ascenta (Ascenta Therapeutics, ABD) firmasından temin edildi. 5,18 mg toz AT-101 bir mililitre DMSO'da çözülerek AT-10'in 10 ml'lik stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonu 0.22 µ'lik filtrelerden geçirilerek sterilize edildi ve 100 µ'lik küçük hacimler (aliquatlar) halinde - 20°C'de saklandı.

2.4.xCELLigence sisteminin hazırlanması

E-plaka kuyucuklarına 50 µl besiyeri eklendi. U87-MG ve T98G hücreleri 75 µl içerisinde 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi ve E-plaka oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Ardından E-plaka, inkübatörde bulunan RTCA cihazının plaka bölgesine yerleştirildi. Hücrelerin logaritmik proliferasyon durumları istenilen zaman aralıklarında RTCA analiz cihazı ile gözlemlendi. 24 saat inkübasyon sonunda kuyucuklara AT-101'in farklı konsantrasyonlarını içeren 25 µl besiyeri eklendi. Kontrol kuyucuklarına ise sadece besiyeri ve besiyeri+DMSO (dimetil sülfoksit) eklendi.

AT-101 eklendikten sonra 72 saat süresince sırada CI değerlerinin ölçümü gerçekleştirildi. Hücrelerin ajana karşı geliştirdikleri kısa süreli cevabı ölçmek için, hücreler ajanın eklenmesinden sonraki bir saat boyunca her 2 dakikada bir, uzun süreli hücresel cevapları gözlemleyebilmek için ise deney süresince her 30 dakikada bir veri toplandı.

2.5.Apoptozin Belirlenmesi

2.5.1.Apoptozin ELISA yöntemiyle belirlenmesi

Bu çalışmada DNA fragmantasyonu tayini için Cell Death Detection ELISA plus kit (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) kullanıldı. AT-101 ile muamele edilen hücrelerden ve ilaç eklenmeyen kontrol hücrelerinden elde edilen hücre eriyikleri, Kit'in ihtiva ettiği streptavidin kaplı plakalara eklendi. Histon proteinleri ve DNA fragmantlarına karşı (Anti-histon biotin ve Anti-DNA-Peroksidaz) antikorları içeren reaktiften 80 µl eklenen plaka, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında anti-histon antikoruna bir taraftan nükleozomlardaki histonlara tutunurken bir taraftan da oluşan immunokompleks streptavidin kaplı plakalara tutunmaktadır. Anti-DNA-Peroksidaz antikoruna ise nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanmaktadır. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasından sonra, nükleozomların miktarının kantitatif olarak belirlenmesi immunokomplekslere tutunmuş olan peroksidazların ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Peroksidaz, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile 405 nm ve 490 nm referans dalga boyunda çok modlu plaka okuyucuda ölçüldü. Kit'in ihtiva ettiği ve %100 apoptotik hücreler, hücre eriyiklerinde meydana gelen histon ve DNA fragmentleri miktarındaki artış, apoptoz miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirildi.

2.5.2. Apoptozin Kaspaz 3/7 aktivitesi ölçümüyle belirlenmesi

AT-101 ile muamele edilmiş ve edilmemiş hücreler toplam hacim 200 µl olacak şekilde 96 kuyucuk içeren hücre kültürü plakalarına eklendi. Kit'in ihtiva ettiği 2,5 ml Caspase-Glo 3/7 Buffer, Caspase-Glo 3/7 substratı ile karıştırılarak substratın tamamen çözünmesi sağlandı. Elde edilen bu karışımdan her kuyucuğa 100 µl eklenerek hücre kültürü plakası, oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. Bir saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan lüminesans sinyalleri çok modlu plaka okuyucu ile ölçüldü. Caspase-Glo 3/7 karışımı, Kaspaz 3/7 substratı olan DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) dizisinin yanı sıra, hücrelerin erimesini sağlayan çözelti içerir. Bu karışımın hücrelere eklenmesi hücrelerin yıkımına, ardından da Kaspaz

substratının yıkımına bağı olarak lüminesans sinyal oluşumuna neden olur. Oluşan lüminesans sinyal miktarı, hücrelerdeki Kaspaz 3/7 aktivitesiyle doğru orantılı olarak değerlendirildi.

2.5.3. Anjiyogenezis Array Uygulaması

U87-MG ve T98G hücre hatlarında AT-101 uygulaması öncesi ve sonrasındaki anjiogenik sitokin profilini belirlemek amacı ile anjiyogenezle ilişkili 55 molekül içeren Proteome Profiler™ Human Angiogenesis Antibody Array (Catalog # ARY007) (R&D Systems, Abingdon, OX, UK) üretici firmanın talimatlarına uygun bir biçimde kullanıldı. İlaç eklenmeyen kontrol hücre hatları ile canlılık analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerlerine göre AT-101 eklenen hücre hatlarından toplanan supernatantların 16 saat sonrasında sitokin profilleri için araştırıldı. Bu metod, üzerinde her bir sitokine özgül antikorlar ile kaplı bir zarin bloke edilmesi sonrasında örneklerin eklenip oda sıcaklığında inkübe edilmesi prensibine dayanmaktadır. Sitokin saptaması, inkübasyon sonrasında örnek-antikor kompleksi üzerine sırası ile biyotinize antikor ve işaretli (yaban otu peroksidaz ile)-streptavidin eklenerek inkübe edilmesi ile tamamlanmaktadır.

2.6. Verilerin Analizi

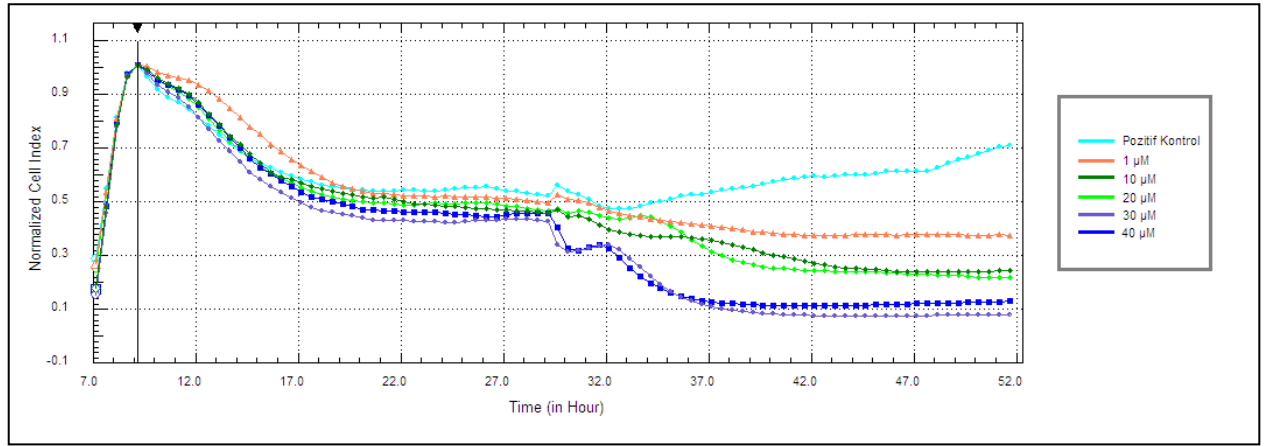
Deneylerde, her bir ilacın tekli, kombine ve ardışık konsantrasyonları dörder kuyucukta test edildi ve her bir deney üç kere tekrarlandı. xCELLigence deneylerinin analizi, sisteme entegre bilgisayardaki RTCA yazılımıyla yapıldı. RTCA yazılımı, elde edilen deney verilerine göre “sigmoidal doz-cevap” grafiği çizeri, verilerin istatistiğini yapar ve belirlenen zaman dilimleri için IC₅₀ değerlerini hesaplar. Diğer deneylerin analizinde ve şekillerin çiziminde GraphPad Prism 6 yazılımı kullanıldı.

3.BULGULAR

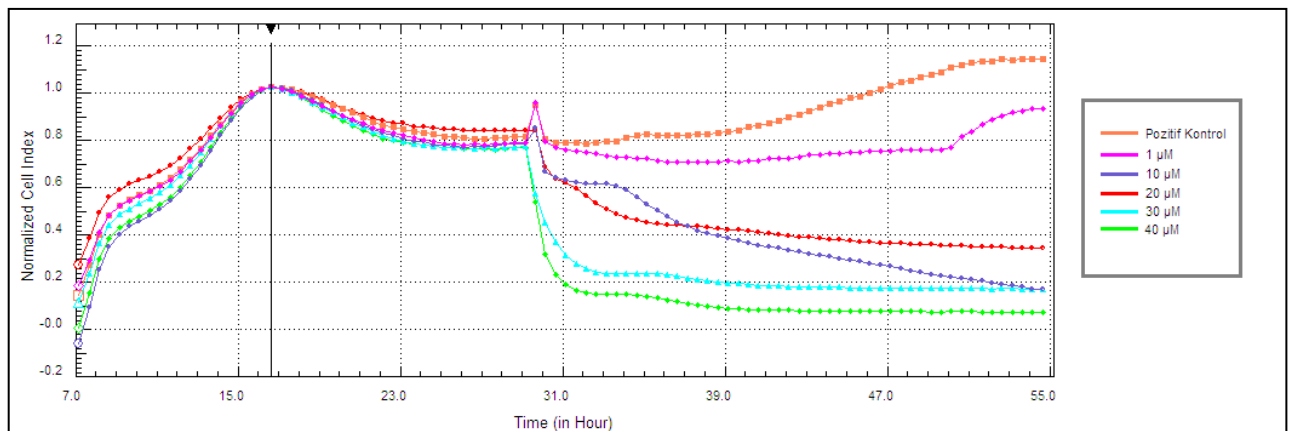
3.1.AT-101'in U87-MG ve T98G hücre hatlarındaki anti-proliferatif etkilerinin doza ve zamana bağlı gösterilmesi ve IC₅₀ değerlerinin hesaplanması

AT-101 'in U-87 MG ve T98G hücre hatlarında hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı gözlemlendi (şekil 6-7). AT-101'in U-87 MG ve T98 G hücre hatlarında 16. saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 2.4 ve 2.7 µM olarak hesaplandı.

Şekil 6: AT-101'in U87-MG hücre hattındaki anti-proliferatif etkileri



Şekil 7: AT-101'in T98G hücre hattındaki anti-proliferatif etkileri

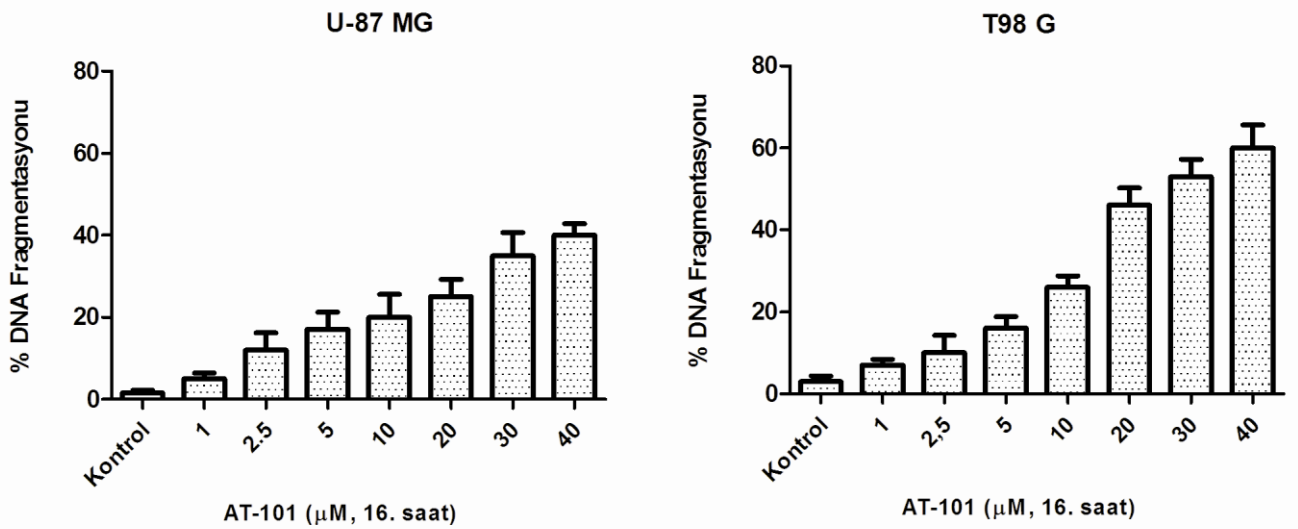


3.2.AT-101'in U87-MG ve T98G hücre hatlarındaki Apoptotik Etkileri

AT-101' in U87-MG ve T98G hücreleri üzerindeki apoptoz indükleyici etkilerinin araştırılması amacıyla Cell Death Detection ELISA yöntemiyle DNA fragmentasyonu ölçümü yapıldı. AT-101'in artan konsantrasyonlarıyla 16 saat muamele edilen U-87 MG ve T98G hücre hatlarında DNA fragmentasyonunda doza bağlı olarak artış gözlemlendi.

AT-101 uygulanmış U-87 MG hücreleri kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, DNA fragmentasyonunda 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30 ve 40 μ M konsantrasyonlarda sırasıyla %5, %12, %17, %20, %25, %35, %40 'lık artış gözlemlendi (şekil 8).

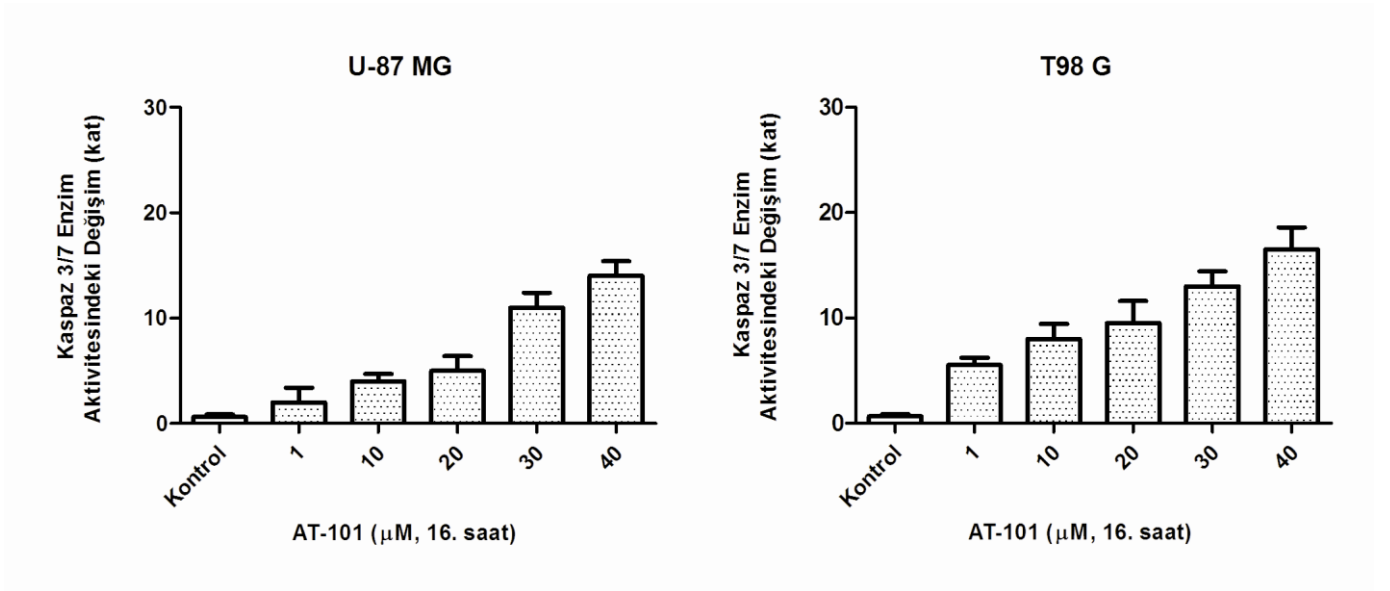
AT-101'in uygulanmış T98G hücreleri kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, DNA fragmentasyonunda 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30 ve 40 μ M konsantrasyonlarda sırasıyla %7, %10, %16, %26, %46, %53, %60 'lık artış gözlemlendi (şekil 8).



Şekil 8:AT-101'in U87 ve T98G hücre hatlarındaki anti-apoptotik etkisi

AT-101' in U87-MG ve T98G hücreleri üzerindeki apoptoz indükleyici etkilerinin doğrulanması amacıyla kaspaz 3/7 aktivitesi Caspase-Glo 3/7 Kit kullanılarak ölçüldü. AT-101'in uygulanmış U-87 MG hücreleri kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında kaspaz 3/7 aktivitesinde, 1, 10, 20, 30 ve 40 μ M konsantrasyonlarda sırasıyla 2, 4, 5, 11 ve 14 kat artış gözlemlendi (şekil 9).

AT-101'in uygulanmış T98G hücreleri kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında kaspaz 3/7 aktivitesinde, 1, 10, 20, 30 ve 40 μ M konsantrasyonlarda sırasıyla 5.5, 8, 9.5, 13 ve 16.5 kat artış gözlemlendi (şekil 9).



Şekil 9: AT 101 ile U87MG ve T98G hücrelerinde kaspaz enzim aktivite değişimi

3.3.Anjiogenez Array Sonuçları

AT-101 uygulanmayan 4×10^6 U-87 MG ve T98G hücrelerinden elde edilen supernatantlar ve tedavi uygulanan 4 milyon U-87 MG ve T98G hücrelerinin supernatantları, Proteome Profiler™ Human Angiogenesis Antibody Array (Catalog # ARY007) (R&D Systems, Abingdon, OX, UK) kullanılarak hücre hatlarından sentezlenen anjiogenik sitokin profilleri belirlendi. Elde edilen verilerde güvenilirlik aralığı $50 \pm S$ 'nin üzerinde olan sitokinlerin nokta piksel değerleri, GraphPad Prism 5.0 programı ile istatistiksel olarak anlamlılık durumu açısından değerlendirildi.

AT-101'in IC_{50} konsantrasyonu ile 16 saat muamele edilen U-87 MG hücre hattı süpernatantlarından elde edilen veriler incelendiğinde EG-VEGF, Endoglin, HGF, IGFBP-1, Pentraxin, TIMP-4, IL-1 β , Persephin, uPA ve VEGF sitokinlerinin sekresyonunun sırasıyla 2, 2, 2.6, 2.7, 2.2, 2, 2.2, 2, 2 ve 2.5 kat azaldığı belirlendi (Tablo 2).

AT-101'in IC_{50} konsantrasyonu ile 16 saat muamele edilen T98G hücre hattı süpernatantlarından elde edilen veriler incelendiğinde coagulation factor III, EGF, Endoglin, Serpin E1, VEGF, uPA, IL-8, IGFBP-3 ve Endostatin/Collagen XVIII sitokinlerinin sekresyonunun sırasıyla 8, 2.5, 3, 3.7, 3.2, 5, 3, 3 ve 2 kat azaldığı belirlendi (Tablo 2)

U-87 MG		T98 G	
Sembol	Değişim	Sembol	Değişim
EG-VEGF	2 kat ↓	Coagulation Factor III	8 kat ↓
Endoglin	2 kat ↓	EGF	2.5 kat ↓
HGF	2.6 kat ↓	Endoglin	3 kat ↓
IGFBP-1	2.7 kat ↓	Serpin E1	3.7 kat ↓
Pentraxin	2.2 kat ↓	VEGF	3.2 kat ↓
TIMP-4	2 kat ↓	uPA	5 kat ↓
IL-1beta	2.2 kat ↓	IL-8	3 kat ↓
Persephin	2 kat ↓	IGFBP-3	3 kat ↓
uPA	2 kat ↓	Endostatin/Collagen XVIII	2 kat ↓
VEGF	2.5 kat ↓		

Tablo 2:U-87 MG ve T98G anjiyogenez array sonuçları

4.TARTIŞMA

GBM, zengin vaskülaritesi ile diğer kanser tiplerinden farklı özellikler gösteren bir tümördür. Zengin vaskülarite proliferasyonu güçlendirerek, gliomalar içinde GBM'nin en agresif form olmasına neden olur. Pro-anjiyogenik faktörlerin aşırı ekspresyonu, özellikle VEGF-A, kan damarlarının oluşumunda önemli rol oynar. VEGF tümör hücrelerinde aşırı miktarda eksprese edilerek endotelial hücrelerin transmembran reseptörlerine bağlanır ve endotelial hücre çoğalmasını, hücre göçünü, hücre invazyonunu tetikler(102). VEGF-A'nın anjiyogenezdeki rolünün moleküler seviyede anlaşılması oldukça önemlidir. Çünkü her iki hücre hattında bazal ekspresyon miktarı farklı olduğu için T-98 G ve U-87 MG hücre hatlarının AT-101'e verdiği yanıtta farklıdır. Özellikle hipoksik koşullarda bu fark daha net olarak ortaya çıkmaktadır. Anjiyogenez array sonuçlarında görülen, her iki hücre hattında farklı sitokinlerin farklı oranlarda azalma göstermesi de bu hastalığın heterojen bir hastalık olduğunu ve neden iki farklı hücre hattıyla çalıştığımızı doğrulamaktadır(103)

VEGF ekspresyonu hipoksik koşullara yanıt olarak artış gösterir. VEGF'i kodlayan mRNA posttranskripsiyonel olarak düzenlenerek hipoksik koşullarda ekspresyon miktarını arttırır. VEGF ekspresyonun düzenlenmesinde önemli rol oynayan HIF (Hipoksi ile indüklenen faktör), hipoksik koşullarda transkripsiyon faktörü olarak rol oynar. Sağlıklı hücrenel bir mikroçevrede hipoksik koşullar oluşmaz ve hücre proliferasyonu kontrol altında tutulur (104). Fakat tümör hücreleri kendilerine özgü bir mikroçevre oluşturur ve bu mikroçevre tümör hücrelerinin gelişmesine izin verir. Oksijen miktarı azaldığı için hücrenin metabolik ihtiyaçları karşılanamaz, laktat gibi bazı metabolitler hücre içinde birikir ve asidik bir ortam oluşur. Oluşan asidik mikroçevre özellikle akilleyici gruptaki kemoterapötik ajanların etkisini azaltır. Tümör hücreleri oluşan mikroçevrelere adaptasyon geliştirmek zorundadır. Tümör mikroçevresi, vasküler oluşumda görev alan sinyal yolları üzerinden anjiyogenezi etkiler (105). Anjiyogenezi düzenleyen sinyal yolları, epitelyal tümör

hücreleri, stromal fibroblast ve endotel hücreler üzerinden progresyonu tetikleyerek metastaza neden olur. Bir tümör hücresinin metastatik bir çevrede çoğalması için bu bölgede anjiyogenik özellik göstermesi gerekir. Fibroblast hücreleri VEGF gibi çoğalma faktörlerini sentezleyerek, tümör stromasındaki endotel hücreleri de aktive eder. Ayrıca proteazlar sentezleyerek de hücrelerin bazal membrandan ayrılarak dolaşıma katılmasına neden olur (106).

AT-101, Bcl-2 ailesinin BH3 domainlerine sahip moleküllerine bağlanarak, anti-apoptotik özelliklerini inhibe eder. Sonuçlarımız, bu ilacın hem sitotoksik hem de apoptotik etkilerini her iki hücre hattında da ortaya koymuştur. Etkisini Bcl-2 ailesi üzerinden gösteren AT-101 aynı zamanda anti-anjiyogenik özellik de göstermiştir. Bunun nedeni Bcl-2 molekülü ile VEGF arasındaki moleküler ilişkiden kaynaklanmış olabilir. VEGF molekülünün tümör hücrelerinden ve endotel hücrelerden salınması, Bcl-2 ekspresyonunu mikrovasküler endotel hücrelerinde arttırmaktadır. Mikrovasküler endotel hücrelerde artan Bcl-2 ekspresyonu, anjiyogenezi güçlendirerek, tümör gelişimini hızlandırır. Bcl-2 molekülünün pro-anjiyogenik özellik kazanmasıyla NFkB yolu da aktive olur ve yine pro-anjiyogenik sitokinlerden IL-8'in ekspresyonu artar. Bu nedenle VEGF-Bcl-2-IL8 gibi moleküllerin hepsini etkileyen bir ajanın geliştirilmesi oldukça önemli bir stratejidir(107) .Hücrede anjiyogenezi ilişkili anti-apoptotik yolların hedeflenmesi tedavinin daha etkin olmasını sağlayabilir.

Sonuçlarda da ekspresyon miktarının azaldığını gördüğümüz uPA (Urokinasetype Plasminogen Activator) molekülü fibrolitik enzimleri aktive ederek ekstraselular matriksin ve bazal membranın degradasyonuna yol açarak anjiyogenezi ve metastazı tetikler (108). TGF- β transkripsiyon kompleksinde yer alan Endoglin gibi önemli bir molekülün her iki hücre hattında da azaldığını görmek oldukça önemli bir veridir. Çünkü Endoglin, TGF- β sinyal yolunda görev alarak, proliferasyona uygun ve hipoksik koşullarda anjiyogenik

moleküllerin eksprese edilmesini sağlar. Pro-anjiyogenik bir molekül olan Endoglinin hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonunu da arttırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir(109).

Gossipol, mevcut sonuçlarla apoptotik ve anti-anjiyogenetik sürece katkıda bulunan bir ajan gibi görülmektedir. GBM hücre hatlarında VEGF ekspresyonunu ve proanjiyogenetik moleküllerin ekspresyonunu azalttığı çalışmamızda ortaya konmuştur .Klinik çalışmalarda etkinlik değerlendirmesi henüz araştırma safhasındadır. Adjuvan tedavide RT ve temozolamid ile kombinasyonunu değerlendiren faz I çalışması halen sürmektedir (NCT0039043). Gelecekte yürüyen çalışmalar ışığında gossipolün GBM deki rolü de daha net tanımlanacaktır.

5.REFERANSLAR

1. Zhang P, Lathia JD, Flavahan WA, Rich JN, Mattson MP. Squelching glioblastoma stem cells by targeting REST for proteasomal degradation. *Trends in neurosciences*. 2009;32(11):559-65. Epub 2009/09/15.
2. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-oncology*. 2012;14 Suppl 5:v1-49. Epub 2012/11/01.
3. Preusser M, Haberler C, Hainfellner JA. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr*. 2006;156(11-12):332-7. Epub 2006/09/01.
4. Mokhtari K, Paris S, Aguirre-Cruz L, Privat N, Criniere E, Marie Y, et al. Olig2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2005;31(1):62-9. Epub 2005/01/07.
5. Demir MK, Hakan T, Akinci O, Berkman Z. Primary cerebellar glioblastoma multiforme. *Diagn Interv Radiol*. 2005;11(2):83-6. Epub 2005/06/16.
6. Clarke JL, Chang SM. Neuroimaging: diagnosis and response assessment in glioblastoma. *Cancer J*. 2012;18(1):26-31. Epub 2012/02/01.
7. Salcman M. Surgical resection of malignant brain tumors: who benefits? *Oncology (Williston Park)*. 1988;2(8):47-56, 9-60, 3. Epub 1988/08/01.
8. Quigley MR, Maroon JC. The relationship between survival and the extent of the resection in patients with supratentorial malignant gliomas. *Neurosurgery*. 1991;29(3):385-8; discussion 8-9. Epub 1991/09/01.
9. Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *The lancet oncology*. 2011;12(11):997-1003. Epub 2011/08/27.

10. Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1993;26(2):239-44. Epub 1993/05/20.
11. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery*. 2001;95(2):190-8. Epub 2002/01/10.
12. Coffey RJ, Lunsford LD, Taylor FH. Survival after stereotactic biopsy of malignant gliomas. *Neurosurgery*. 1988;22(3):465-73. Epub 1988/03/01.
13. Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Jr., Batzdorf U, Brooks WH, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *The New England journal of medicine*. 1980;303(23):1323-9. Epub 1980/12/04.
14. Andersen AP. Postoperative irradiation of glioblastomas. Results in a randomized series. *Acta radiologica: oncology, radiation, physics, biology*. 1978;17(6):475-84. Epub 1978/01/01.
15. Valk PE, Dillon WP. Radiation injury of the brain. *AJNR American journal of neuroradiology*. 1991;12(1):45-62. Epub 1991/01/01.
16. Choucair AK, Levin VA, Gutin PH, Davis RL, Silver P, Edwards MS, et al. Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas. *Journal of neurosurgery*. 1986;65(5):654-8. Epub 1986/11/01.
17. Wallner KE, Galicich JH, Krol G, Arbit E, Malkin MG. Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1989;16(6):1405-9. Epub 1989/06/01.

18. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96. Epub 2005/03/11.
19. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. 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. *The lancet oncology*. 2009;10(5):459-66. Epub 2009/03/10.
20. Gilbert MR, Wang MH, Aldape KD, Stupp R, Hegi M, Jaeckle KA, et al. RTOG 0525: A RANDOMIZED PHASE III TRIAL COMPARING STANDARD ADJUVANT TEMOZOLOMIDE (TMZ) WITH A DOSE-DENSE (DD) SCHEDULE IN NEWLY DIAGNOSED GLIOBLASTOMA (GBM). *Neuro-oncology*. 2011;13:51-.
21. Brada M, Stenning S, Gabe R, Thompson LC, Levy D, Rampling R, et al. Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(30):4601-8. Epub 2010/09/22.
22. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 10):2596-606. Epub 2007/09/06.
23. de Wit MC, de Bruin HG, Eijkenboom W, Sillevs Smitt PA, van den Bent MJ. Immediate post-radiotherapy changes in malignant glioma can mimic tumor progression. *Neurology*. 2004;63(3):535-7. Epub 2004/08/12.
24. Taal W, Brandsma D, de Bruin HG, Bromberg JE, Swaak-Kragten AT, Smitt PA, et al. Incidence of early pseudo-progression in a cohort of malignant glioma patients treated with chemoirradiation with temozolomide. *Cancer*. 2008;113(2):405-10. Epub 2008/05/20.

25. Burger PC, Mahley MS, Jr., Dudka L, Vogel FS. The morphologic effects of radiation administered therapeutically for intracranial gliomas: a postmortem study of 25 cases. *Cancer*. 1979;44(4):1256-72. Epub 1979/10/01.
26. Ruben JD, Dally M, Bailey M, Smith R, McLean CA, Fedele P. Cerebral radiation necrosis: incidence, outcomes, and risk factors with emphasis on radiation parameters and chemotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2006;65(2):499-508. Epub 2006/03/07.
27. Ammirati M, Galicich JH, Arbit E, Liao Y. Reoperation in the treatment of recurrent intracranial malignant gliomas. *Neurosurgery*. 1987;21(5):607-14. Epub 1987/11/01.
28. Young B, Oldfield EH, Markesbery WR, Haack D, Tibbs PA, McCombs P, et al. Reoperation for glioblastoma. *Journal of neurosurgery*. 1981;55(6):917-21. Epub 1981/12/01.
29. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet*. 1995;345(8956):1008-12. Epub 1995/04/22.
30. Nieder C, Astner ST, Mehta MP, Grosu AL, Molls M. Improvement, clinical course, and quality of life after palliative radiotherapy for recurrent glioblastoma. *American journal of clinical oncology*. 2008;31(3):300-5. Epub 2008/06/06.
31. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(28):4733-40. Epub 2009/09/02.
32. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005;307(5706):58-62. Epub 2005/01/08.

33. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature clinical practice Oncology*. 2006;3(1):24-40. Epub 2006/01/13.
34. Quant EC, Norden AD, Drappatz J, Muzikansky A, Doherty L, Lafrankie D, et al. Role of a second chemotherapy in recurrent malignant glioma patients who progress on bevacizumab. *Neuro-oncology*. 2009;11(5):550-5. Epub 2009/04/01.
35. Fabrini MG, Silvano G, Lolli I, Perrone F, Marsella A, Scotti V, et al. A multi-institutional phase II study on second-line Fotemustine chemotherapy in recurrent glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*. 2009;92(1):79-86. Epub 2008/11/20.
36. Schmidt F, Fischer J, Herrlinger U, Dietz K, Dichgans J, Weller M. PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. *Neurology*. 2006;66(4):587-9. Epub 2006/03/01.
37. Brandes AA, Tosoni A, Amista P, Nicolardi L, Grosso D, Berti F, et al. How effective is BCNU in recurrent glioblastoma in the modern era? A phase II trial. *Neurology*. 2004;63(7):1281-4. Epub 2004/10/13.
38. Perry JR, Belanger K, Mason WP, Fulton D, Kavan P, Easaw J, et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(12):2051-7. Epub 2010/03/24.
39. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-oncology*. 2009;11(4):341-7. Epub 2009/05/14.
40. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12. Epub 2008/09/06.

41. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*. 2009;360(8):765-73. Epub 2009/02/21.
42. Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, et al. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene*. 1995;10(11):2243-6. Epub 1995/06/01.
43. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(4):301-10. Epub 2002/05/11.
44. Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in cell biology*. 1999;9(4):125-8. Epub 1999/05/04.
45. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(10):1926-33. Epub 2004/05/15.
46. Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery*. 1999;45(6):1442-53. Epub 1999/12/22.
47. Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene*. 1997;15(23):2755-65. Epub 1998/01/07.
48. van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MC, Kros JM, Carpentier AF, et al. Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *Journal of clinical oncology :*

official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(8):1268-74. Epub 2009/02/11.

49. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *The New England journal of medicine*. 2005;353(19):2012-24. Epub 2005/11/12.

50. Chang SM, Wen P, Cloughesy T, Greenberg H, Schiff D, Conrad C, et al. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Investigational new drugs*. 2005;23(4):357-61. Epub 2005/07/14.

51. Prados MD, Lamborn KR, Chang S, Burton E, Butowski N, Malec M, et al. Phase 1 study of erlotinib HCl alone and combined with temozolomide in patients with stable or recurrent malignant glioma. *Neuro-oncology*. 2006;8(1):67-78. Epub 2006/01/31.

52. Prados MD, Chang SM, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H, et al. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(4):579-84. Epub 2008/12/17.

53. Peereboom DM, Shepard DR, Ahluwalia MS, Brewer CJ, Agarwal N, Stevens GH, et al. Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*. 2010;98(1):93-9. Epub 2009/12/05.

54. Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*. 2010;9:135. Epub 2010/06/03.

55. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501. Epub 2001/03/10.

56. Weyhenmeyer B, Murphy AC, Prehn JH, Murphy BM. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Experimental oncology*. 2012;34(3):192-9. Epub 2012/10/17.
57. Wick W, Wagner S, Kerkau S, Dichgans J, Tonn JC, Weller M. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS letters*. 1998;440(3):419-24. Epub 1999/01/01.
58. Strik H, Deininger M, Streffer J, Grote E, Wickboldt J, Dichgans J, et al. BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1999;67(6):763-8. Epub 1999/11/24.
59. Fels C, Schafer C, Huppe B, Bahn H, Heidecke V, Kramm CM, et al. Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study. *Journal of neuro-oncology*. 2000;48(3):207-16. Epub 2000/12/02.
60. McDonald FE, Ironside JW, Gregor A, Wyatt B, Stewart M, Rye R, et al. The prognostic influence of bcl-2 in malignant glioma. *British journal of cancer*. 2002;86(12):1899-904. Epub 2002/06/27.
61. Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A, Cory S. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *The EMBO journal*. 1997;16(15):4628-38. Epub 1997/08/01.
62. Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X, et al. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*. 2004;116(4):527-40. Epub 2004/02/26.
63. Krajewski S, Krajewska M, Ehrmann J, Sikorska M, Lach B, Chatten J, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and

peripheral nervous system origin. *The American journal of pathology*. 1997;150(3):805-14. Epub 1997/03/01.

64. Stegh AH, Kim H, Bachoo RM, Forloney KL, Zhang J, Schulze H, et al. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma. *Genes & development*. 2007;21(1):98-111. Epub 2007/01/11.

65. Stegh AH, Kesari S, Mahoney JE, Jenq HT, Forloney KL, Protopopov A, et al. Bcl2L12-mediated inhibition of effector caspase-3 and caspase-7 via distinct mechanisms in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(31):10703-8. Epub 2008/08/02.

66. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57. Epub 2000/09/23.

67. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Annals of surgery*. 1966;164(3):491-502. Epub 1966/09/01.

68. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(1):4-6. Epub 1990/01/03.

69. Jo J, Schiff D, Purow B. Angiogenic inhibition in high-grade gliomas: past, present and future. *Expert review of neurotherapeutics*. 2012;12(6):733-47. Epub 2012/06/02.

70. Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(22):16986-92. Epub 2000/04/05.

71. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(5):1099-107. Epub 2006/05/30.

72. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nature medicine*. 2005;11(3):261-2. Epub 2005/02/22.
73. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circulation research*. 2000;86(1):24-9. Epub 2000/03/22.
74. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277(5322):55-60. Epub 1997/07/04.
75. Mandriota SJ, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *Journal of cell science*. 1997;110 (Pt 18):2293-302. Epub 1997/10/24.
76. Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJ, et al. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *The American journal of pathology*. 2003;162(4):1083-93. Epub 2003/03/26.
77. Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer letters*. 1996;102(1-2):209-15. Epub 1996/04/19.
78. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(7):4015-23. Epub 1997/07/01.

79. Chambaut-Guerin AM, Costa SL, Lefrancois T, Fages C, Gauthereau X, Tardy M. Effects of retinoic acid and tumor necrosis factor alpha on GL-15 glioblastoma cells. *Neuroreport*. 2000;11(2):389-93. Epub 2000/02/16.
80. Bello L, Francolini M, Marthyn P, Zhang J, Carroll RS, Nikas DC, et al. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery*. 2001;49(2):380-9; discussion 90. Epub 2001/08/16.
81. Binder DK, Berger MS. Proteases and the biology of glioma invasion. *Journal of neuro-oncology*. 2002;56(2):149-58. Epub 2002/05/09.
82. Jaroszewski JW, Strom-Hansen T, Hansen SH, Thastrup O, Kofod H. On the botanical distribution of chiral forms of gossypol. *Planta medica*. 1992;58(5):454-8. Epub 1992/10/01.
83. Gossypol--a new antifertility agent for males. *Chinese medical journal*. 1978;4(6):417-28. Epub 1978/11/01.
84. Freedman TB, Cao X, Oliveira RV, Cass QB, Nafie LA. Determination of the absolute configuration and solution conformation of gossypol by vibrational circular dichroism. *Chirality*. 2003;15(2):196-200. Epub 2003/01/10.
85. Shelley MD, Hartley L, Fish RG, Groundwater P, Morgan JJ, Mort D, et al. Stereo-specific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines. *Cancer letters*. 1999;135(2):171-80. Epub 1999/03/30.
86. Jaroszewski JW, Kaplan O, Cohen JS. Action of gossypol and rhodamine 123 on wild type and multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cells: ³¹P nuclear magnetic resonance and toxicity studies. *Cancer research*. 1990;50(21):6936-43. Epub 1990/11/01.
87. Kitada S, Leone M, Sareth S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M. Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *Journal of medicinal chemistry*. 2003;46(20):4259-64. Epub 2003/09/19.

88. Bauer JA, Trask DK, Kumar B, Los G, Castro J, Lee JS, et al. Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL. *Molecular cancer therapeutics*. 2005;4(7):1096-104. Epub 2005/07/16.
89. Mohammad RM, Wang S, Aboukameel A, Chen B, Wu X, Chen J, et al. Preclinical studies of a nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-X(L) [(-)-gossypol] against diffuse large cell lymphoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2005;4(1):13-21. Epub 2005/01/20.
90. Dodou K, Anderson RJ, Small DA, Groundwater PW. Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert opinion on investigational drugs*. 2005;14(11):1419-34. Epub 2005/11/01.
91. Bushunow P, Reidenberg MM, Wasenko J, Winfield J, Lorenzo B, Lemke S, et al. Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas. *Journal of neuro-oncology*. 1999;43(1):79-86. Epub 1999/08/17.
92. Fiveash JB, Chowdhary SA, Peereboom D, Mikkelsen T, Nabors LB, Lesser GJ, et al. NABTT-0702: A phase II study of R-(-)-gossypol (AT-101) in recurrent glioblastoma multiforme (GBM). *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(15).
93. Stein GH. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *Journal of cellular physiology*. 1979;99(1):43-54. Epub 1979/04/01.
94. Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS genetics*. 2010;6(1):e1000832. Epub 2010/02/04.
95. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization,

- substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Archives of biochemistry and biophysics. 1993;303(2):474-82. Epub 1993/06/01.
96. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer communications. 1991;3(7):207-12. Epub 1991/07/01.
97. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. Journal of immunological methods. 1991;142(2):257-65. Epub 1991/09/13.
98. Berke G. T-cell-mediated cytotoxicity. Current opinion in immunology. 1991;3(3):320-5. Epub 1991/06/01.
99. Krahenbuhl O, Tschopp J. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. Immunology today. 1991;12(11):399-402; discussion 3. Epub 1991/11/01.
100. Xing JZ, Zhu L, Jackson JA, Gabos S, Sun XJ, Wang XB, et al. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. Chemical research in toxicology. 2005;18(2):154-61. Epub 2005/02/22.
101. Xing JZ, Zhu L, Gabos S, Xie L. Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA. 2006;20(6):995-1004. Epub 2006/02/17.
102. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature. 2000;407(6801):242-8. Epub 2000/09/23.
103. Liang Y, Li XY, Rebar EJ, Li P, Zhou Y, Chen B, et al. Activation of vascular endothelial growth factor A transcription in tumorigenic glioblastoma cell lines by an

enhancer with cell type-specific DNase I accessibility. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(22):20087-94. Epub 2002/03/26.

104. Ward C, Langdon SP, Mullen P, Harris AL, Harrison DJ, Supuran CT, et al. New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer. *Cancer treatment reviews*. 2013;39(2):171-9. Epub 2012/10/16.

105. Watnick RS. The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(12):a006676. Epub 2012/12/05.

106. Mbeunkui F, Johann DJ, Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2009;63(4):571-82. Epub 2008/12/17.

107. Pang X, Wu Y, Lu B, Chen J, Wang J, Yi Z, et al. (-)-Gossypol suppresses the growth of human prostate cancer xenografts via modulating VEGF signaling-mediated angiogenesis. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(5):795-805. Epub 2011/03/05.

108. Jiang JT, Zhang LF, Zhou B, Zhang SQ, Li SM, Zhang W, et al. Relationships of uPA and VEGF expression in esophageal cancer and microvascular density with tumorous invasion and metastasis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(7):3379-83. Epub 2012/09/22.

109. Masuyama H, Nakatsukasa H, Takamoto N, Hiramatsu Y. Correlation between soluble endoglin, vascular endothelial growth factor receptor-1, and adipocytokines in preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(7):2672-9. Epub 2007/04/12.