

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

**GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE  
APOPTOZ VE OTOFAJİ ARASINDAKİ İLİŞKİDE  
NARİNGİNİN ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Meryem Ayşenur TURHAN**

**Referans no: 10173983**

EDİRNE – 2017

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

**GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE  
APOPTOZ VE OTOFAJİ ARASINDAKİ İLİŞKİDE  
NARİNGİNİN ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Meryem Ayşenur TURHAN**

**Destekleyen Kurum : TÜBAP 2016/02**

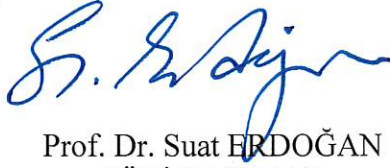
EDİRNE – 2017

**Tez No:**

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Meryem Ayşenur TURHAN tarafından tez başlığı “**Glioblastoma Tedavisinde Apoptoz ve Otofaji Arasındaki İlişkide Naringinin Rolünün Belirlenmesi**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 21/12/2017 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “Yüksek Lisans Tezi” olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Suat ERDOĞAN  
JÜRİ BAŞKANI



Yrd. Doç. Dr. Berna ERDAL YILDIRIM  
ÜYE



Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR  
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim yüksek lisans eğitimim süresince bana emek veren ve yönlendiren danışman hocam sayın Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR başta olmak üzere benden yardımlarını esirgemeyen, bilimsel katkıları ile bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Suat ERDOĞAN'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP 2016/02) ve başta sevgili eşim Gökhan TURHAN olmak üzere tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
GLİOBLASTOMA .....	3
TEMOZOLOMİD .....	11
NARİNGİN .....	16
APOPTOZ .....	18
OTOFAJİ .....	24
GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	33
BULGULAR .....	50
TARTIŞMA .....	94
SONUÇLAR .....	103
ÖZET .....	105
SUMMARY .....	107
KAYNAKLAR .....	109
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ .....	128
ÖZGEÇMİŞ .....	135

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>AMBRA1</b>	: Autophagy and beclin 1 regulator 1
<b>ATP</b>	: Adenozin 3'-trifosfat
<b>BAK</b>	: BCL2 antagonist/killer
<b>BAX</b>	: BCL2 associated X
<b>BCL2</b>	: B cell lymphoma 2
<b>BH</b>	: BCL-2 homology
<b>BID</b>	: BH3 interacting domain death agonist
<b>CARD</b>	: Caspase activation and recruitment domain
<b>DD</b>	: Death domain
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>ECM</b>	: Extra cellular matrix
<b>EGFR</b>	: Epidermal growth factor receptor
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>F</b>	: Varyans analizi
<b>FADD</b>	: Fas associated via death domain
<b>GAPDH</b>	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>GBM</b>	: Glioblastoma multiform
<b>HSP70</b>	: Heat shock protein 70
<b>IAP</b>	: Inhibitor of apoptosis
<b>JNK</b>	: c-Jun N-terminal kinase

<b>LD50</b>	: Letal doz %50
<b>LMP</b>	: Lisosomal membrane permeabilization
<b>MG</b>	: Malign glioma
<b>MGMT</b>	: O6-metilguanin DNA metiltransferaz
<b>MMR</b>	: Mismatch repair
<b>MOMP</b>	: Mitochondria outer membrane permeabilization
<b>mTOR</b>	: Mammalian target of rapamycin
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
<b>NAR</b>	: Naringin
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Nuclear factor kappa B
<b>O6-MeG</b>	: O6-metilguanin
<b>PCR</b>	: Polymerase chain reaction
<b>PI</b>	: Propidyum iyodür
<b>PI3P</b>	: Fosfotidilinositol-3-fosfat
<b>RT-qPCR</b>	: Quantitative real time polymerase chain reaction
<b>RIP1</b>	: Reseptor interacting protein 1
<b>sd</b>	: Standart deviation
<b>TMZ</b>	: Temozolomid
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TP53</b>	: Tumor supressor protein 53
<b>TRADD</b>	: TNFRSF1A associated via death domain
<b>ULK</b>	: Unc-51 like autophagy activating kinase

## GİRİŞ VE AMAÇ

Glioblastoma, beyin tümörlerinin en yaygın ve sağkalım süresi en kısa olan türüdür (1). Dünya genelinde her 100.000 bireyin 7'sinde bu kanser türüne rastlanmaktadır (2,3). Hastalığın teşhisinden sonra ortalama sağ kalım süresi 12-15 aydır (4). Günümüzde klasik tedavi yöntemleri olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Ancak glioblastoma hücrelerinin sağlıklı beyin dokusu hücrelerinin aralarına girmesi, kemoterapiye ve apoptoza direnç göstermesi bu klasik tedavi yöntemlerinin uygulamasını kısıtlamakta ve hasta sağkalım süresini azaltmaktadır (2,3,5).

Temozolomid, glioblastoma tedavisinde rutin olarak kullanılan, kan-beyin bariyerini geçebilen bir kemoterapötiktir (6-9). DNA'yı alkilleyerek DNA replikasyonu sırasında nükleotid bazlarının yanlış eşleşmesine neden olur ve bu durum tümör hücre bölünmesini durdurarak hücre ölüm yollarının uyarılmasını sağlar (10,11).

Programlanmış hücre ölümü birçok hücrede çok sıkı kontrol edilen bir süreç olup hücrenin çeşitli stres koşullarına nasıl yanıt vereceğini ve hücrenin kaderini belirler. Günümüze kadar başlıca tip 1 (apoptoz), tip 2 (otofajik hücre ölümü) ve tip 3 (nekroz) olmak üzere üç çeşit hücre ölümü tanımlanmıştır. Otofaji; hücrenin içinde organelleri ve molekülleri sindiren hücre içi geri dönüştürme mekanizması ve stres yanıtıdır (12). Otofajik mekanizma genel olarak hücreyi koruyucu etki gösterse de aşırı uyarılması durumunda hücreyi ölüme götürdüğü saptanmıştır (13,14).



Son yıllarda yapılan çalışmalar, otofaji mekanizmalarının, diğer hücre içi yolaklarla, apoptoz ve nekroz gibi diğer ölüm mekanizmalarıyla da yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuş, ancak bu ilişkinin nasıl olduğu ve nasıl düzenlendiği tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (15-17).

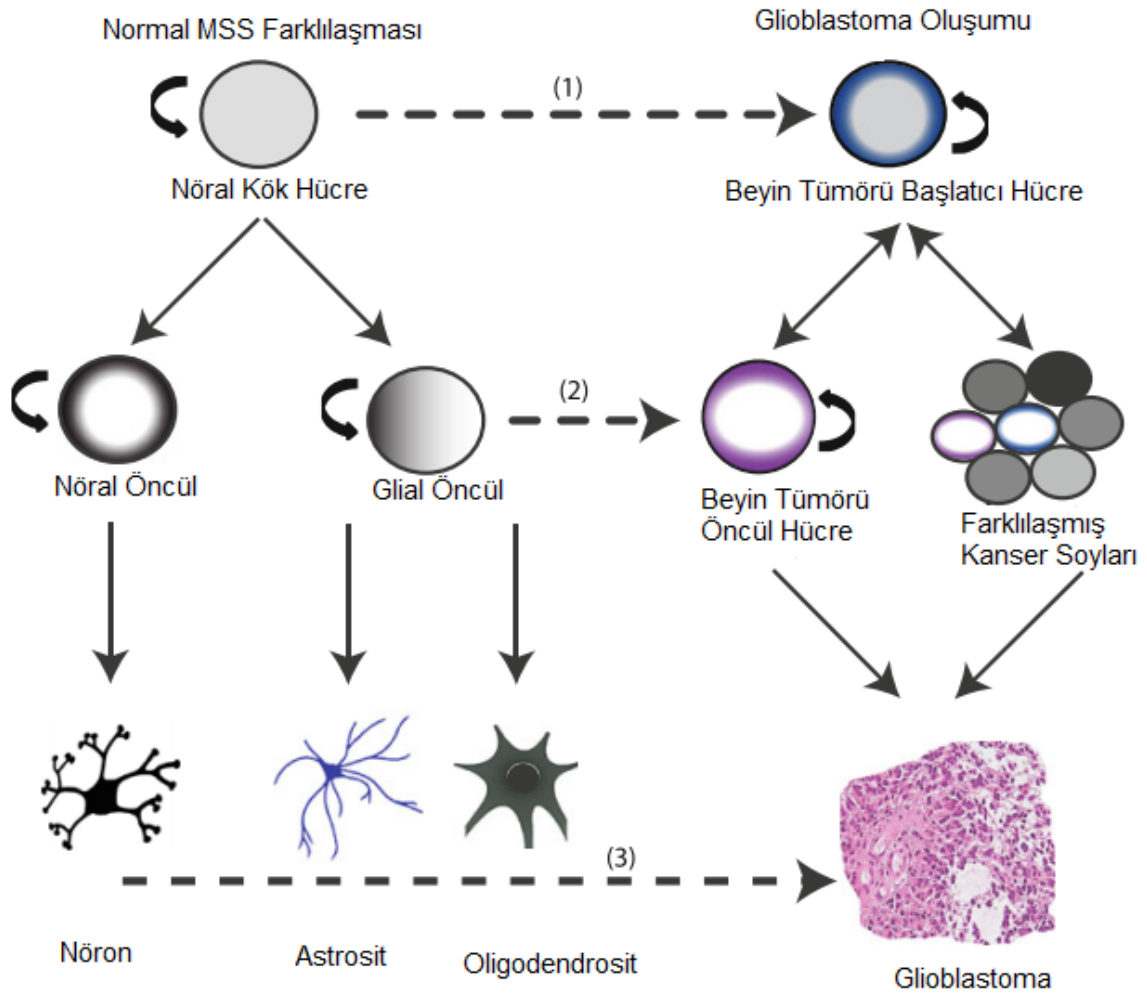
Günlük beslenmenin bir parçası olan flavonoidler, esas diyet faktörü olmasalar bile hastalıklarla özellikle de kanserle olan ilişkileri nedeni ile günümüzde diyetle önemli bir yere sahiptirler (18). Daha çok meyve ve sebzelerde bulunan flavonoidlerin farmokinetik özellikleri ve diğer ilaçlarla olan etkileşimlerinin bilinmesi farklı tedaviler esnasında ilaçlarla birlikte flavonoid içeren besinlerin tüketiminin olası sinerjistik ve antagonistik etkilerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Naringin özellikle turunçgillerde bulunan bir biyoflavonoiddir (19). Naringinin anti-apoptotik ve anti-karsinojenik aktivitesini hücre döngüsü modülasyonu, antianjiyonenik etki veya apoptozun indüklenmesi ile gerçekleştirdiği bildirilmiştir (20,21).

Sonuç olarak, yapılan bu yüksek lisans tezi kapsamında, glioblastoma hücrelerine uygulanan naringinin glioblastoma rutin tedavisinde kullanılan temozolomid ile birlikte ve tek kullanımının hücrelerdeki otofaji ve apoptoz yolaklarını nasıl etkilediği araştırıldı. Yapılan bu çalışma hücre kültürü temelli olmakla birlikte kanser hastalarında naringinin temozolomide duyarlılığı artırmadaki etkisinin ve glioblastomalarda apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkiyi nasıl etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### GLİOBLASTOMA

Glioblastoma multiform (GBM) ilk olarak 1863'te Dr. Rudolf Virchow tarafından makroskopik ve mikroskopik yöntemler kullanılarak glial hücre kökenli tümör olarak tanımlandı (22,23) (Şekil 1). Günümüzde tüm merkezi sinir sistemi (MSS) ve primer beyin tümörlerinin görülme sıklığı 100.000 yetişkinde 18.71 yetişkindir (24). En çok görülen primer beyin tümörü olan gliomalar, 2007 Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organisation) sınıflandırmasına göre hücre kökenine ve beyin dokusuna yayılımına bağlı olarak astrositoma, oligodendroglioma ve ependimoma olarak sınıflandırılmakla birlikte en yaygın olan glioma türü astrositomalardır. GBM astrositik tümörlerin yaklaşık %54'ünü oluşturan en malign glioma ve en yaygın astrositomadır. Erkeklerde kadınlara göre 1.58/1 oranla daha fazla görülen GBM'de ortalama tanı yaşı 64'tür (24). Malign gliomaların birçoğunun altında yatan sebep henüz bilinmemektedir. Cep telefonu kullanımının artmasıyla glioma oluşması arasında bir ilişki olduğu düşünülse de bu düşünce henüz kapsamlı çalışmalarla kanıtlanmamıştır (25,26). Malign glioma hastalarının yaklaşık %5'i bazıları nörofibromatosis tip 1 ve tip 2, Li-Fraumeni gibi nadir genetik sendromlarla ilişkili glioma aile hikayesine sahiptir (27).



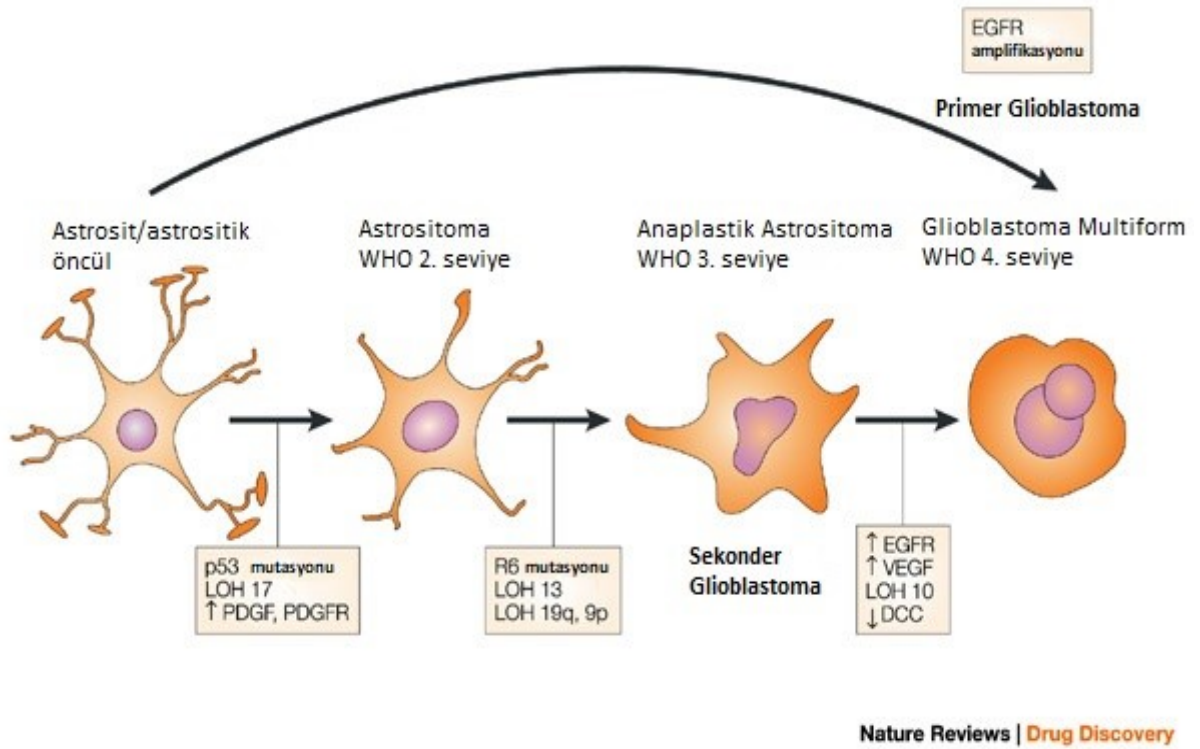
**Şekil 1. Beyin hücrelerinin ve glioblastomanın oluşumu (28)**

Buldukları ortamda heterojen olan komşu veya uzak beyin bölgelerine yayılım gösterebilen astrositomalar histolojileri dikkate alınarak tanı düzeylerine göre dört farklı seviye olarak sınıflandırılmaktadır (29,30). Sınırları belli ve benign olan astrositomalar birinci seviye, histolojik olarak aşırı derece olmayan hücre boyutu, hafif nükleer atipi ve aşırı derece olmayan yayılcılık ve çoğalma ile karakterize düşük seviye yayılcı astrositomalar ikinci seviye olarak tanımlanmıştır. Üçüncü seviye astrositomalar ya da anaplastik astrositomalar ise hücre boyutunda, nükleer atipide ve mitotik aktivitede artma ile karakterizedir. İkinci seviye gliomalarla karşılaştırıldığında üçüncü seviye gliomalar daha yayılcı ve çoğalıcı tümörlerdir. Dördüncü seviye olarak tanımlanan GBM, anaplastik astrositomalarla benzer özellik göstermekle birlikte glomeruloid mikrodamar

çoğalması ve nekroz da gözlenir. GBM'ler, ikinci ve üçüncü seviye gliomalarla karşılaştırıldığında aşırı derece çoğalmacı, yayılımcı ve anjiyogenik özellik gösterir (29). Malign gliomalar tipik olarak histolojik heterojenliklerine ve hayatta kalma heterojenitelerine katkı sağlayan neoplastik ve stromal dokuyu içerirler (28).

Morfolojik özelliklerine göre çok ayırt edilemese de GBM vakaları özelliklerine bağlı olarak primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır (Şekil 2). GBM'lerin yaklaşık %95'i yaşlı hastalarda görülen ve kendiliğinden oluşan primer tümörler iken, düşük seviye astrositomalardan türeyen ve gelişen, nadir görülen ve daha çok 45 yaşın altında gelişen tümörler ise sekonder GBM'dir (31). Primer ve sekonder GBM'ler spesifik genetik farklılıklar içeren hastalıklar olarak ayrılmışlardır. Primer GBM, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, epidermal growth factor receptor) geninin mutasyona uğraması ve anlatımının artması, fosfataz ve tensin homologu (PTEN) içeren 10q kromozomunda heterozigotluk kaybı (LOH, loss of heterogeneity), MDM2 (mouse double minute 2) geninin aşırı anlatımı ve p16'nın silinmesiyle karakterizedir. Sekonder GBM'ler ise p53 (TP53) ve retinoblastoma (RB) genlerinde mutasyonlar, platelet kökenli büyüme faktörü A (PDGF-A, platelet-derived growth factor A) ve platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü alfa (PDGFR $\alpha$ , platelet-derived growth factor receptor alfa) genlerinin aşırı anlatımı, 19q'da heterozigotluk kaybı ile karakterizedir (32,33).

Tüm GBM'lerde olmasa bile çoğunda (%74) reseptör tirozin kinaz sinyal yolağı, TP53 ve RB tümör süpresör yolakları olmak üzere üç ana yolda deregölasyon olduğu saptanmıştır (34).



**Şekil 2. Primer ve sekonder glioblastomanın oluşumu (35)**

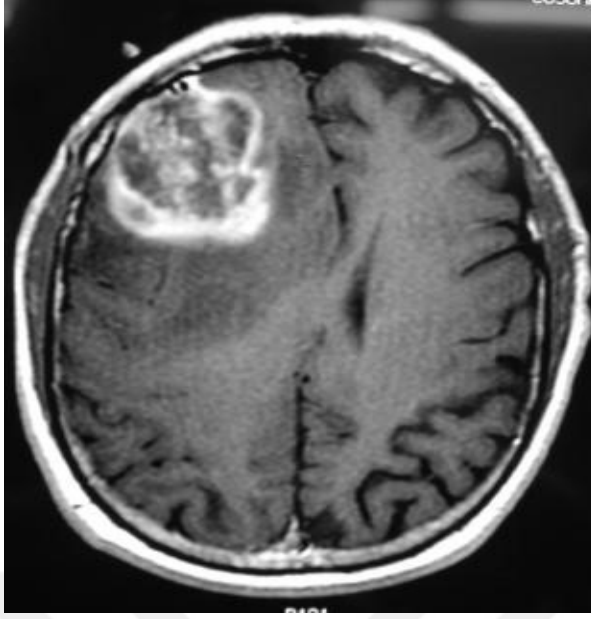
Son yıllarda yapılan genetik analizler sonucunda GBM'lerin gen ekspresyonuna göre moleküler olarak da sınıflandırılması gündeme gelmiş ve buna göre;

- EGFR geninde bozukluk içeren alt tür: klasik,
- NF1 (Nörofibromin 1) geninde bozukluk içeren alt tür: mezenşimal,
- PDGFR $\alpha$  geninde bozukluk içeren alt tür: pronöral,
- ERBB2 (erb-b2 reseptör tirozin kinaz 2) geninde bozukluk içeren alt tür: nöral GBM olarak adlandırılmıştır.

Ayrıca alt türler arasında agresif kemoterapi ve radyasyona cevabın farklılaştığı da saptanmış ve bütün alt türlerde farklı genomik, transkript ve mutasyon bozukluklarının olduğu rapor edilmiştir (36). Örneğin pronöral grubun IDH1/2 (izositrat dehidrojenaz (NADP(+)) 1,2) ve TP53 genlerinde mutasyonlar, PDGFRA, CDK6 (cyclin dependent kinase 6), CDK4 (cyclin dependent kinase 4) ve MET (MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase) genlerinde de aşırı anlatım içerdiği ve bu grubun IDH1 genindeki mutasyonların genç yaşla ilişkilendirilmesi göz

önünde bulundurulduğunda en yüksek genç hasta oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Klasik grubun ise EGFR geninin aşırı anlatımı ve PTEN geninin kaybıyla karakterize olmakla birlikte EGFRvIII mutasyonu da içerdiği rapor edilmiştir. NF1 geni mutasyonu, TP53 ve CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A) genlerinin kaybının görüldüğü mezenşimal alt tür ise en az sağkalım süresine sahip alt türdür. Nöral alt türde NEFL (neurofilament light) gibi nöral markırların seviyelerinde artış görülmekle birlikte diğer alt türlerden ERBB2 geninin mutasyon oranında artış haricinde ayırt edici belirgin bir farklılık göstermediği bildirilmiştir (36).

Günümüzde yeni tanı konulmuş malign gliomalarda standart tedavi prosedürü olarak cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi (TMZ, temozolomid) kullanılmakla birlikte bu tedavi prosedürlerinin tanı konulduktan sonra ortalama 12–15 ay olan sağkalım süresini artırma oranının düşük olduğu bilinmektedir (37). Yayılımcılık gösteren GBM'lerin sınırlarının belli olmaması ve diğer beyin hücrelerinin arasına sızması nedeniyle cerrahi operasyon genellikle zor olmakta ve tüm kanser hücreleri temizlenememektedir. Cerrahi operasyonu takiben görüntü rehberliğinde yoğunluğu ayarlanmış radyoterapi uygulanmakta ve hastanın ortalama sağkalımını 3 ile 12 ay arasında uzatmaktadır. Ancak cerrahi operasyondan kaçan ve letal radyasyona maruziyeti bir şekilde atlatan hücreler operasyon bölgesinde %90 oranında tekrar oluşmakta ve hastanın ölümüne yol açmaktadır (38). Bir GBM hastasının cerrahi operasyon öncesi beyin manyetik rezonans görüntüsü (MRI, magnetic resonance imaging) Şekil 3'te verilmiştir (39).



**Şekil 3. Glioblastoma multiform MRI görüntüsü (39)**

Tanı koymak zor ve tanıdan sonra hayatta kalım süresi düşük olsa da 2005 yılında yapılan bir klinik araştırma, glioblastoma vakalarının tedavisinde radyasyonla birlikte alkilleyici ajan temozolomid kullanımının hasta sağkalımını birkaç ay daha uzatabildiğini saptamıştır (40). Cerrahi operasyondan sonra sadece radyasyon alan hastalarda yaşam süresi iki yıl olan hastaların oranı %10.4 iken TMZ de alan hastalarda ise %26.5'e çıkmıştır. DNA tamir enzimi O6-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT) geninin promotör metilasyonu ile sessizleştirildiği hastalarda temozolomid tedavisine yanıt daha da artmıştır. MGMT promotör metilasyonu içermeyen ve aynı tedavi prosedürü uygulanan hastalarda yaşam süresi ortalama 12.7 ay iken bu hastalarda yaşam süresinin ortalama 21.7 aya çıktığı bildirilmiştir (41). Ortalama iki yıl yaşam süresi MGMT promotör metilasyonu içermeyen ve rutin tedavi prosedürü uygulanan hastalarda %13.8 iken MGMT promotör metilasyonu içeren hastalarda %46'dır. Ancak hastaların büyük bir bölümü TMZ'den faydalanamamakta veya MGMT promotör metilasyonu içerse bile TMZ'ye beklenen yanıtı vermemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar DNA'da yanlış eşleşme tamir ve baz çıkarma tamir mekanizmalarının da hücrelerin TMZ'ye direnç geliştirmelerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. N7 guanin ve N3 adeninden alkilenmiş bazları direkt olarak tamir eden alkil pürin DNA glikosilaz (APNG)

enziminin TMZ'ye karşı direnç gelişmesine neden olduğu in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (42,43). Bu nedenle TMZ kullanan aşırı APNG anlatımı yapan hastalarda ortalama yaşam süresinin APNG negatif hastalara göre daha kısa olduğu bildirilmiştir (44). Tablo 1'de glioblastoma olgularına ait bazı özellikler ve bunların hasta sağkalımına olan etkileri verilmiştir (45).

**Tablo 1. Glioblastoma olgularına ait özellikler ve sağkalıma etkileri (45)**

Değişkenler	N	1-Yıllık	3-Yıllık	5-Yıllık	p
<b>Yaş</b>					
≤50	71	57.3	19.7	16.9	0.002
>50	57	28.6	10.4	5.2	
<b>Cinsiyet</b>					
Erkek	81	48.2	16.7	11.7	0.322
Kadın	47	38.3	11.5	11.5	
<b>Cerrahi şekli</b>					
Total eksizyon	58	55.2	19.9	9.9	<0.001
Subtotal eksizyon	43	40	14	14	
Biyopsi	18	16	0	0	
<b>Tümör çapı</b>					
<3 cm	6	33	0	0	0.614
3-5 cm	51	51	15.5	10.3	
>5 cm	56	45.7	18.3	13.7	
<b>KPS</b>					
≤70	52	25.8	2	–	<0.001
>70	69	60.9	26.8	19.6	
<b>TMZ (eş zamanlı)</b>					
Kullanan	16	66.7	–	–	0.022
Kullanmayan	70	32.9	4.3	4.3	
<b>TMZ (adjuvan)</b>					
Kullanan	14	91.7	27.8	27.8	<0.001
Kullanmayan	72	30.6	2.9	–	

Histolojik olarak birbirine çok yakın GBM gruplarının belirlenmesi ve hastaya tanı konması, tanı konduktan sonra diğer beyin hücrelerinin arasına da sızan ve genellikle belirgin bir çerçevesi olmayan tümör hücrelerinin tamamen temizlenmesi çok sıkıntılı bir süreçtir. Bu süreçte hastaya en faydalı olan tedavi aşamalarını



belirlemek ve mümkünse yeni tedavi yolları bulabilmek için yapılan yeni çalışmalarda hastalığın patogenezinde rol alan spesifik molekülleri ya da hücreyel yolakları hedefleyen veya tedaviye yanıt veren hücrelerin karakteristiklerini belirleyip ona göre tedavi uygulanmasını sağlayan yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunun için tümör fonksiyonlarını, yaşamsal yollarını, çoğalmasını, apoptozu, invazyonu, damarlanmasını hedefleyen araştırmalar günümüzde hala devam etmektedir. Hedefli moleküler terapilerin etkisini artırmak için birçok protein kinazı hedefleyen tek ajan, birbirini tamamlayan hedefleri (EGFR ve mTOR gibi) inhibe eden ajanların birlikte kullanımı, radyoterapi ve kemoterapiye ek olarak hedefli ajanların kullanımı gibi stratejiler izlenmektedir (32).

Tümör hücreleri, tek başlarına ya da grup olarak primer tümörden ayrılıp beyin yapısı ve hücre dışı matris (ECM, extra cellular matrix) ile ilişkili olarak belirledikleri migrasyon rotalarında hareket edebilirler. İnvazyon ve migrasyon için en çok izledikleri yollar arasında beyaz madde parçaları boyunca yayılım, kan beyin damarlarının bazal laminası, glia sınırlayıcılarıyla beyin omurilik iç zarı arası (pia mater) yayılım görülmektedir (46). Temel olarak lektikan ailesinden hiyaluronik aside bağlanan kondroitin sülfat proteoglikanlarını içeren polisakkarit hiyaluronan ve proteoglikan bazlı matriksten oluşan beyindeki ECM diğer organların ECM'lerinde bulunan kollajen, fibronektin, tip 1 laminin ve destekleyici stromal doku gibi birçok elementten yoksun olması nedeni ile diğer organlarda oluşan tümörlerin beyine metastaz olmasını büyük oranda engeller (46). Normal beyin hücrelerinin arasına sızan ve cerrahi operasyonda tamamen temizlenemeyen bu hücreler, geniş cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi sonrası tümörün tekrar nüksetmesine yol açmaktadır. GBM'nin invazyonu sırasıyla ECM'ye yapışma, ECM'nin degradasyonu ve hücre hareketliliğinde artış aşamalarını içermektedir (47,48).

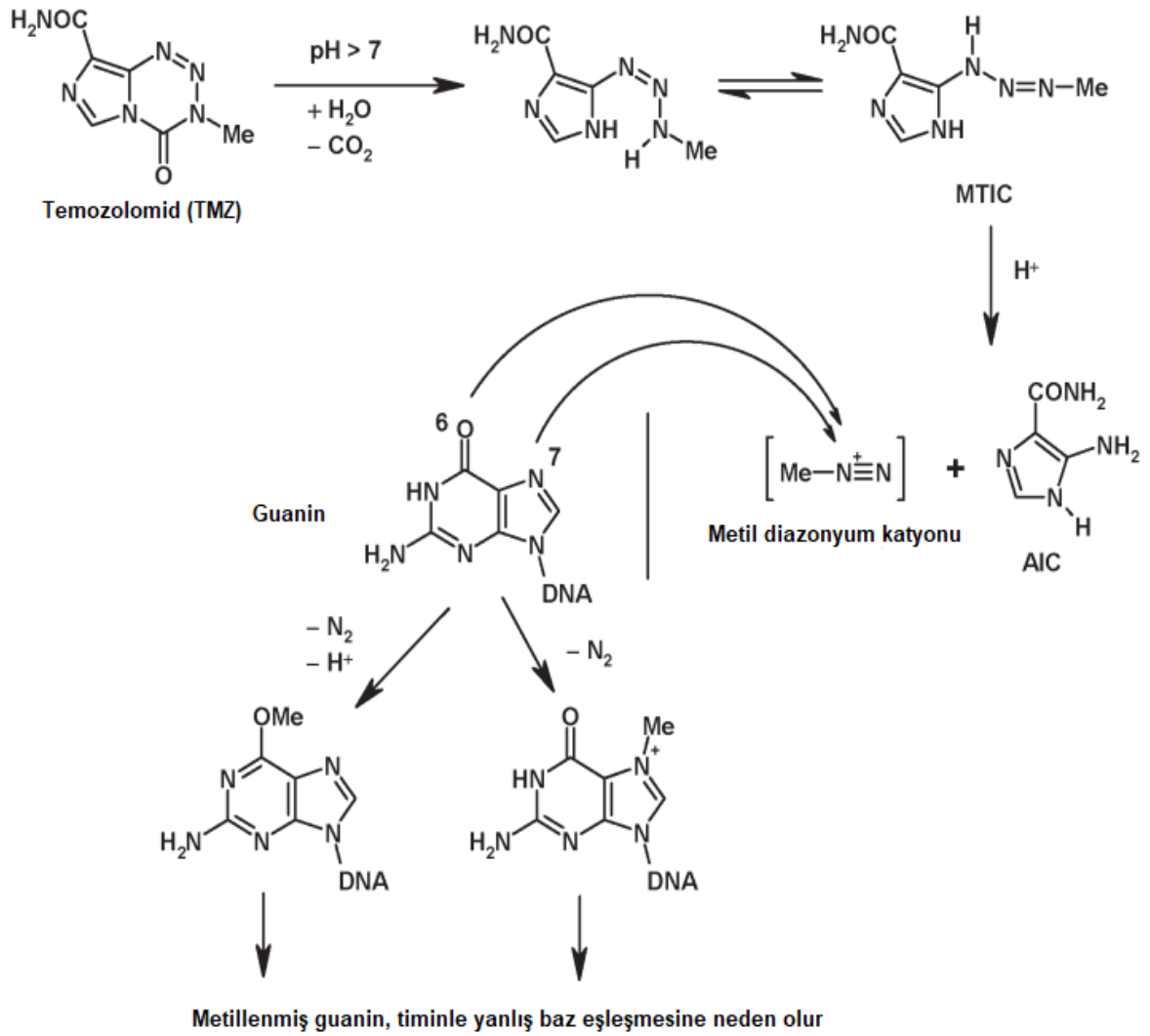
Glikolitik metabolizmanın bozulması, solid tümörlerde yaygın olarak görülen bozuk metabolizmalardan biridir. Kansere hücreleri, kendileri için zorlu olan mikroçevreye uyum sağlayabilmek, hücre ölümünden kaçmak, yaşamak ve çoğalabilmek için belirli mekanizmalarında birçok bozukluk içerirler (49). Tümör hücrelerinin başlıca adaptasyonu 'Warburg etkisi' olarak adlandırılan ve ATP kaynağı olarak oksijenli glikolizi (oksijenin varlığından bağımsız olarak) oksidatif fosforilasyona tercih etmeleridir (50). Bu etkinin, kanser hücrelerinin apoptoza

direncini, çoğalmayı uyarıcı faktörlerin öncüllerinin biyosentetik olarak üretilmesini ve invazyon kabiliyetinin artmasını tetikliyor olabileceği düşünülmektedir (49,51-53). Anahtar rol oynayan enzimlerdeki genetik ve epigenetik bozukluklar; primer mutasyonlar, izoform ekspresyon profilinin bozulması, onkogenik sinyal yollarının ve/veya tümör mikroçevresinin düzenlenmesinin ve fonksiyonlarının bozulması gibi birçok metabolik bozukluğa ve metabolizmanın değişimine yol açar (49).

## TEMOZOLOMİD

İmidatetrazin sınıfına ait, monofonksiyonel DNA alkilleyici ajan olarak bilinen küçük (194 Da) lipofilik bir molekül olan temozolomid (TMZ) ilaç öncülü olarak görev yapar ve asidik pH'larda daha stabil olması nedeni ile ağızdan alımı kolaydır. Ancak pH 7'nin üzerinde stabilitesi bozulur. pH 7.4'te plazma yarılanma ömrü 1.8 saat olması nedeni ile ağızdan alımında hızlıca emilir ancak hemen sonra kendiliğinden yıkıma uğrar ve monometil triazen 5-(3-metiltriazen-1-yl)-imidazol-4-carboksamid (MTIC) oluşturur. MTIC daha sonra suyla reaksiyona girerek 5-aminoimidazol-4-carboksamid (AIC) ve yüksek derecede reaktif metildiazonyum katyonu oluşturur. Metildiazonyum katyonunun aktif türleri DNA'nın guanince zengin bölgelerindeki guaninleri N7 pozisyonlarından metiller (N7-MeG; %70). Ayrıca adeninleri N3 pozisyonlarından (N3-MeA; %9) ve guaninleri O6 pozisyonlarından (O6-MeG; %6) metiller (54,55) (Şekil 4).

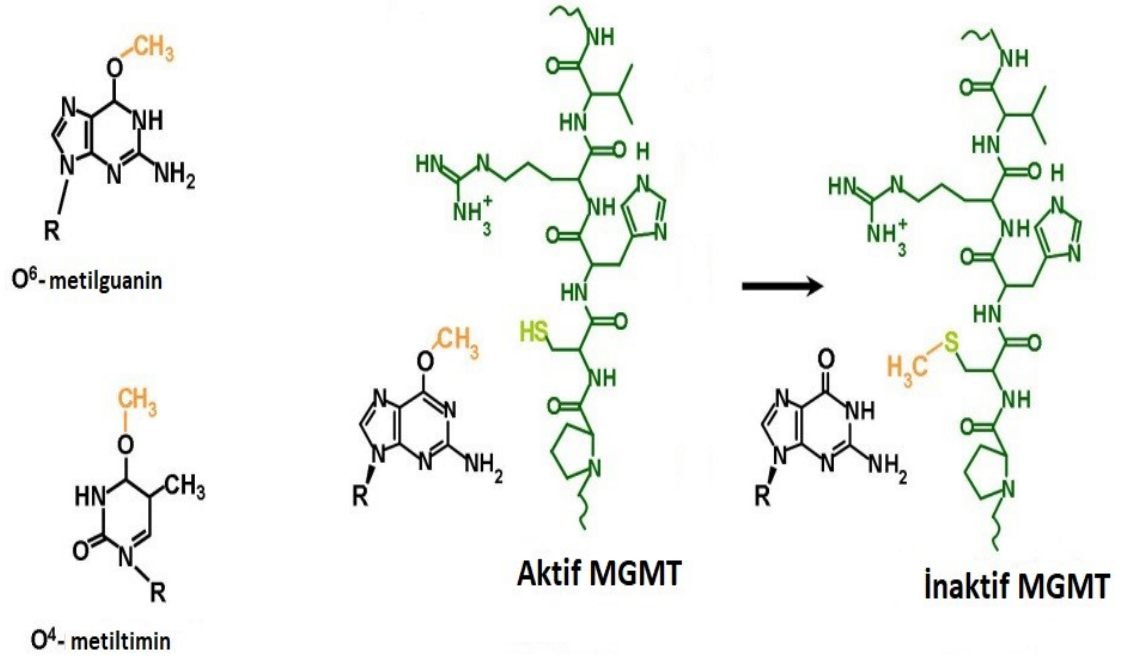
Temozolomidin öncül ilaçtan metil grup transferi yapan forma dönüşmesi fizyolojik pH'a yakın bir pH aralığında meydana gelmektedir. Beyin tümörleri kendilerini çevreleyen sağlıklı dokuya göre daha alkali pH değerlerine sahiplerdir. Bu özellikleri sayesinde TMZ'nin öncül ilaçtan aktif forma dönüşmesi daha çok tümör dokusu içerisinde gerçekleşir (56). Böylelikle TMZ beyin tümörlerinin tedavisinde GBM hastalarına önemli fayda sağlar (57).



**Şekil 4. Temozolomid ve etki mekanizması (58)**

Temozolomid sitotoksitesini daha çok karsinojen, mutajen ve toksik lezyon O6-MeG (O6-metilguanin) aracılığı ile gösterir (59,60). O6-MeG'nin direk tamiri DNA tamir enzimi metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) enziminin metil eklentisini kaldırıp guanini eski haline döndürmesiyle olur (Şekil 5). Tamir edilmemiş O6-MeG DNA replikasyonu sırasında sitozin yerine timinle eşleşir ve bu da DNA yanlış eşleşme tamir sinyal yolağını (MMR, mismatch repair) başlatır (61,62). MMR genellikle yanlış eşleşen timini tanır ve zincirden çıkarır ancak O6-MeG kalıp zincirde durur. Böylece O6-MeG tekrar timinle eşleşir. MMR'ın sürekli yanlış eşleşen timini çıkarması ve timinin tekrar bağlanması ve DNA'nın birçok yerinde bunun olması kalıcı DNA zinciri kopukluklarına sebep olur ve replikasyon çatalı

çöker (63). TMZ uygulamasını takiben ikinci hücre döngüsünde ATR/CHK1- aracılı G2/M hücre döngüsü durması tetiklenir ve sonunda apoptoz gelişir (64-66). Sonuç olarak TMZ tedavisine iyi yanıt alabilmek için fonksiyonel MMR ve düşük seviyede MGMT'ye ihtiyaç olduğu düşünülmektedir (67).



**Şekil 5. O6-MeG-DNA metiltransferaz (MGMT) enzimi ve etki mekanizması (68)**

Temozolomid uygulamasında sayıca daha fazla bulunan N7-MeG ve N3-MeA lezyonları DNA baz çıkarma tamiri (BER, base excision repair) ile hızlıca tamir edilir. N7-MeG belirgin bir şekilde sitotoksiste oluşturmamakla birlikte N3-MeA eğer tamir edilmezse ölümcül olabilir (69).

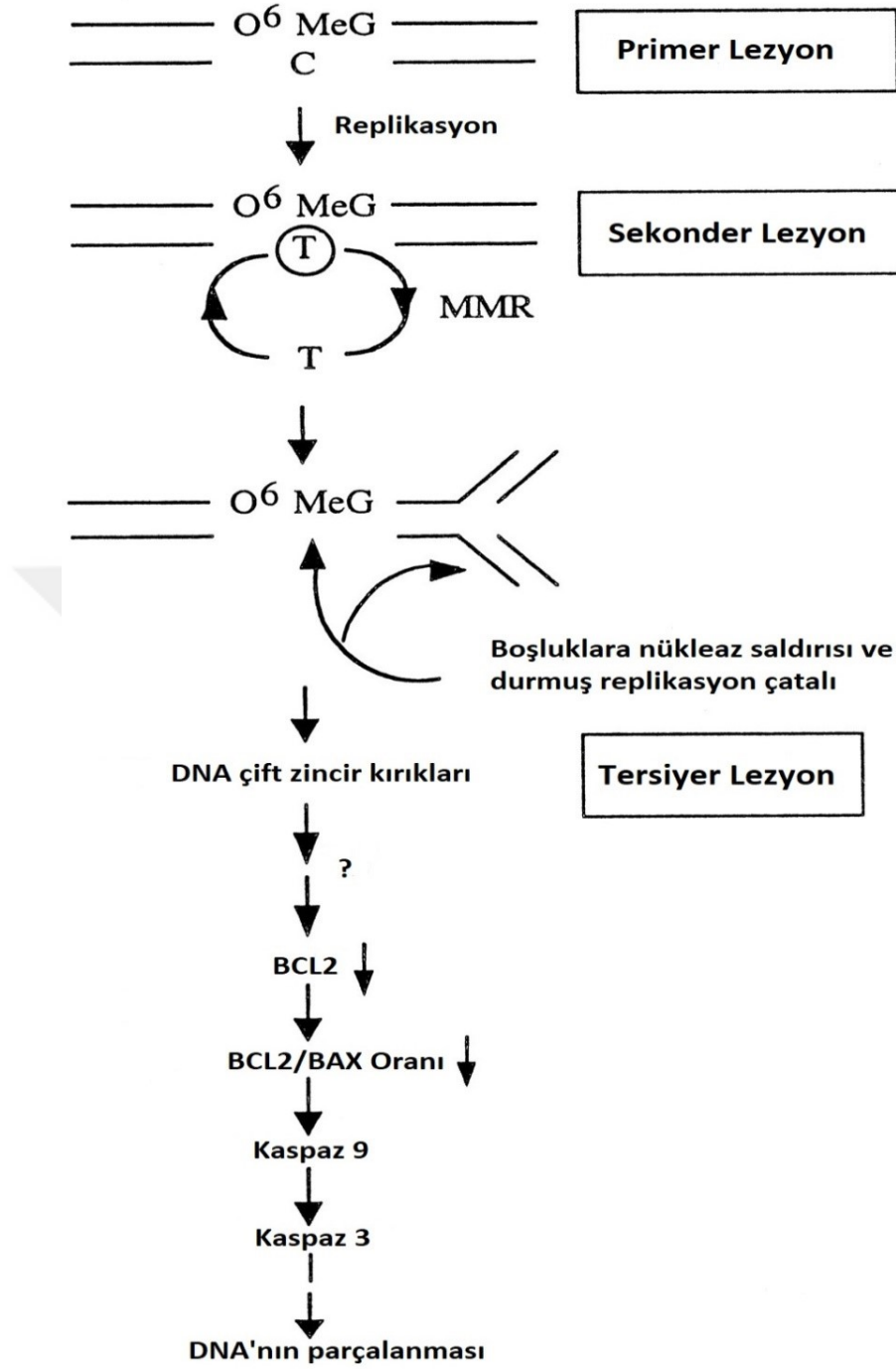
O6-metilguanin DNA metiltransferaz sağlıklı hücreleri karsinogenezden korur ancak bu koruyucu özelliği ile kanser hücrelerini de TMZ gibi alkilleyici ajanlardan koruyabilir. Karaciğer dokularında hematopoyetik dokular ve beyine göre daha fazla anlatımı olan MGMT'nin tümör dokularındaki anlatımı da farklılık göstermektedir (70,71). Nitekim göğüs, over ve akciğer kanserlerinde aşırı anlatımının olduğu ancak glioma, pankreatik kanserler ve malign melanomalarda daha az aktivite

gösterdiği bildirilmiştir (72). MGMT aktivitesinin kaybolmasına neden olan promotor metilasyonları tümörleşmede sıklıkla görülen epigenetik bir değişimdir (73,74).

Hücrelerin genotoksik ajanlara cevabının belirlenmesinde MMR'ın rolü önemli olmakla birlikte TMZ'nin metilleyici ajan sitotoksitesini gösterebilmesi için fonksiyonel MMR'a ihtiyaç vardır (Şekil 6). MMR sistemi bozuk olan hücrelerin fonksiyonel olarak çalışanlara kıyasla metilleyici ajanlara 100 kat daha az hassasiyet gösterdiği ve yine MMR sistemi bozuk olan kolon kanseri hücrelerinin TMZ uygulamasına direnç gösterdiği saptanmıştır (75). MMR sisteminin bozuk olması nedeni ile bu hücrelerde O6-MeG ve timin eşleşmelerinin tanınmadığı ve O6-MeG lezyonlarının tolere edilerek hücrenin daha çok mutasyonla hayatta kalmaya ve çoğalmaya devam ettiği bildirilmiştir (75).

Kemoterapi uygulaması sırasında başlangıçta kemoterapiye cevap veren hücrelerin daha sonraları direnç geliştirebildiği bilinmektedir. Kemoterapi ajanı varlığında hücrelere uygulanan seçici baskı sonucu hücrelerin ilaç direnci kazanması neoplastik hücrelerde ilacın indüklediği bir takım genetik ve epigenetik değişimlerle olabileceği gibi (yaşamsal avantaj sağlayan genleri indüklemek ve seçmek) daha önceden var olan dirençli hücre popülasyonunun seçilip çoğalmasıyla da olabilir (76).

Yapılan çalışmalarda malign gliomalarda düşük dozda temozolomidin apoptoz yerine otofajiyi indüklediği ve otofagozomal zarlarda LC3 proteini biriktiği bildirilmiştir (77). Ancak yapılan tüm çalışmalar değerlendirildiğinde otofaji ve ilaç etkileşiminin çok kompleks bir süreç olduğu düşünülmektedir. Otofagozom oluşumunu inhibe etmek TMZ ile oluşan otofajik hücre ölümünü de ortadan kaldırmaktadır. Bunun yanında TMZ ile indüklenen ancak geç evre otofaji inhibitörleriyle inhibe edilen otofaji sebebiyle hücrede fonksiyonel olmayan otofagozom birikimi oluşur ve hücre apoptoza gider. Apoptoza dirençli glioma hücrelerinde mTOR gibi otofaji baskılayıcı ajanların kullanılması TMZ ile indüklenen otofajik hücre ölümünü artırabilir (78).



**Şekil 6. O<sup>6</sup>-MeG-DNA ve MMR tamir mekanizması (79)**

Temozolomid ile indüklenen hücre ölümünün hücre metabolizması ile ilişkili olduğu ve TMZ'nin otofajiyi ATP (Adenozin 3'-trifosfat) üretimine paralel olarak indüklediği bildirilmiştir (80). Meydana gelen ATP artışının metil adenin (MA) ve Beklin 1 siRNA gibi erken otofaji inhibitörleriyle bloke edilmesi sonucunda

mikronükleus oluşumuna neden olduğu ve bu durumun TMZ ile indüklenen hücre ölümüyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (81). Yine aynı çalışmada pirüvat takviyesinin erken faz otofaji inhibitörlerinin etkisini ortadan kaldırdığı ve glioma hücrelerinin yaşamasını indüklediği bildirilmiştir (82).

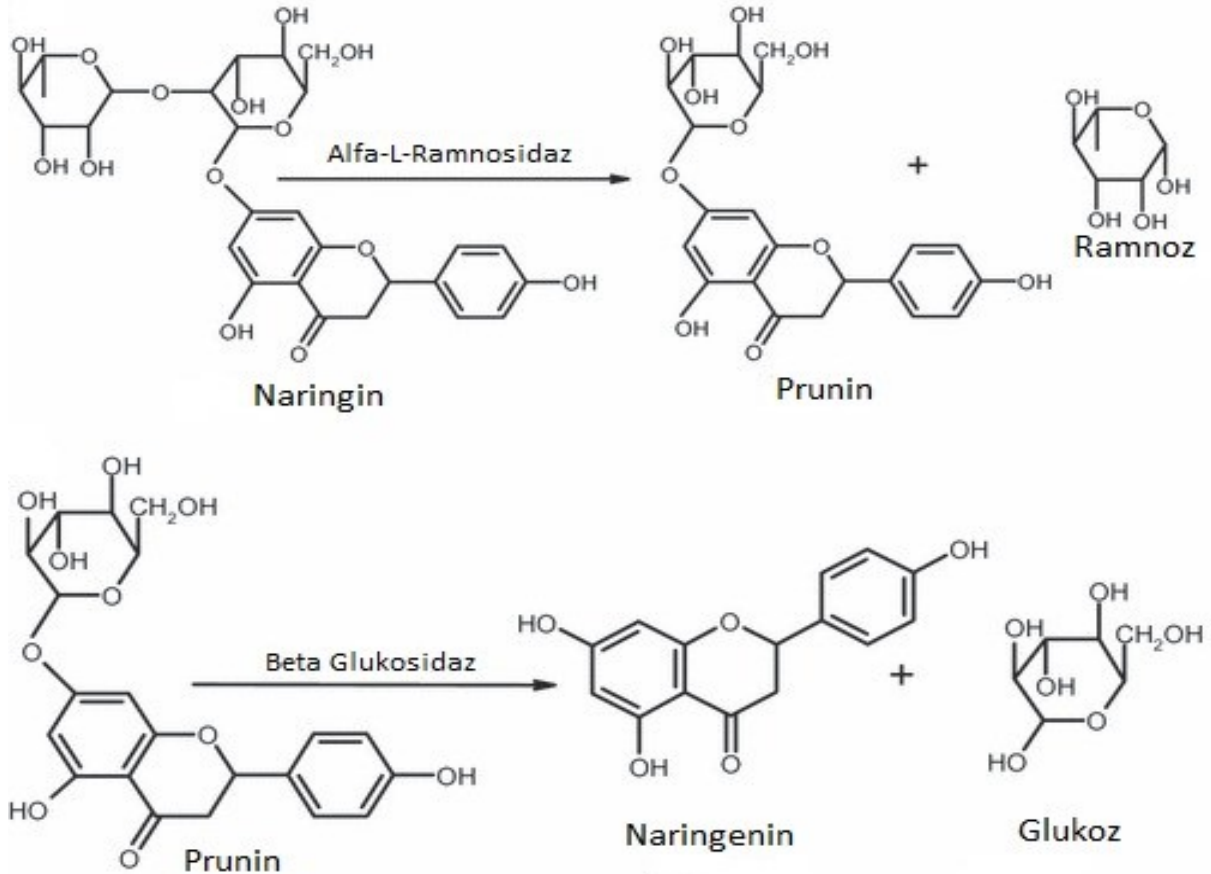
Glioblastoma vakalarının çoğunda tanı esnasında yapılan patolojik çalışmalarda LC3, Beklin 1 ve ULK (unc-51 like autophagy activating kinase) proteinlerinde artışla birlikte artan bir otofajik mekanizma saptanmıştır (83). Klinikopatolojik çalışmalarda LC3 ve Beklin 1 seviyesi düşük olan glioblastomalarda tanının zor ve tümörün TMZ'ye dirençli olduğu bildirilmiştir (84).

## **NARINGİN**

Dünyada özellikle son otuz yılda bitkisel ilaçların veya takviyelerin kullanımı ve bunların sağlığa faydalarını gösteren çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (85). Flavonoidler meyvelerde, sebzelerde, çayda, kabuklu yemişlerde bol miktarda bulunan polifenolik metabolitlerdir (18). Bitkinin tüm kısımlarında bulunmakla birlikte yaprak ve çiçek kısmında daha yoğundurlar (86). Günlük beslenmenin bir parçası olan flavonoidler, esas diyet faktörü olmasalar bile hastalıklarla özellikle kanserle olan ilişkileri nedeni ile günümüzde diyetle önemli bir yere sahiptirler (18). Flavonoidler, potansiyel antikarsinojen ve antitümör aktivite gösteren heterojen polifenollerin büyük bir grubudur (87,88). Flavonoidlerin doğal maddeler olmaları nedeni ile hücre zarına kolayca bağlanarak hücre içerisine girebildikleri ve hücre metabolik aktiviteleri değiştirebildikleri bildirilmiştir (89).

Naringin (NAR) ilk olarak 1857'de De Vry tarafından greyfurt çiçeklerinde keşfedilmesine rağmen bu flavonoid hakkında daha sonra yapılan kapsamlı araştırmalar bileşiğin turunçgiller, greyfurt, tahıllar, kiraz, vişne, kakao, keklikotu ve domates gibi meyve ve sebzelerde de olduğunu göstermiştir (90-92). Kimyasal yapısı 1928'de ortaya çıkarılan naringinin isminin Sanskritçe portakal anlamına gelen 'narangi' isminden köken aldığı düşünülmektedir (93,94). Naringin, naringenine glukoz ve ramnoz bağlanmasıyla oluşmuş flavanon glikozittir (Şekil 7). C-7 pozisyonundaki hidroksil grubuna bağlanan aglikon ve neohesperidoz kısmı sayesinde hafif acı tadı vardır (94). Greyfurt suyunda 800 mg/L konsantrasyonlara

kadar bulunabilen naringin, greyfurtta hafif acı tat veren moleküldür (95). Naringinin demir iyonlarını bağlaması ve peroksil radikallerini süpürmesi ile antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (96,97).



**Şekil 7. Naringin ve Naringenine dönüşme mekanizması (98)**

Naringinin farklı kanser hücrelerinde antitümör, antioksidan, kolesterol düşürücü ve antiaterojenik, antiinflamatuvar, antiviral ve apoptozun başlamasını takiben inhibe edici aktiviteler gösteren bir flavonoid olduğu, mide kanseri hücrelerinde MAPK (Mitogen-activated protein kinase) yolağının aktivasyonu ile PI3K/Akt/mTOR kaskadını downregüle ederek otofaji aracılı büyüme inhibisyonunu tetiklediği bildirilmiştir (99-102).

Naringinin servikal kanser hücrelerinde büyümeyi engellediği ve apoptozu tetiklediği, insan glioblastoma hücrelerinde ise p38 sinyal yolağını inaktive ederek ve



MMP2 (matrix metallopeptidase 2) ve MMP9 (matrix metallopeptidase 9) ifadesini azaltarak yayılmayı ve migrasyonu engellediği bildirilmiştir (101,103). Ayrıca naringinin, glioblastoma hücrelerinde FAK (protein tyrosine kinase) aktivitesini baskılayarak hücre büyümesini baskıladığı ve meme kanseri hücrelerinin büyüme potansiyelini inhibe ettiği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (104,105). Günümüzde polifenolik bileşenlerle otofajinin düzenlenmesi kanser tedavisi için potansiyel strateji olarak görülmektedir. Günlük diyetimizde bulunan doğal polifenolik bileşenlerin otofaji ile indüklenen hücre ölümünü standart (canonical) veya standart olmayan (non-canonical) mekanizmalarla tetiklediği gösterilmiştir (106).

Naringinin farmokokinetik özellikleri ve diğer ilaçlarla olan etkileşimlerinin bilinmesi farklı tedaviler esnasında ilaçlarla birlikte naringin içeren besinlerin tüketiminin miktarlarının belirlenmesi ya da olası sinerjistik ve antagonistik etkilerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

## **APOPTOZ**

Apoptoz, hücre büyümesinin kontrolünde rol alan, özel bir sinyal sonucu hücrenin programlı bir şekilde ölmesini sağlayan bir hücre ölüm yolağıdır (107). Apoptoz; kromatin yoğunlaşması, nükleus parçalanması ve hücre hacminin azalması (piknosis) gibi morfolojik değişimlerle ve kaspazların aktivasyonu, DNA ve proteinlerin parçalanması ve hücrenin fagositler tarafından yutulmasını sağlayan zar yüzey modifikasyonları gibi kimyasal değişimlerle karakterize, genlerle regüle edilen bir mekanizmadır. Apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar hücrenin yaşam ve ölümü arasındaki dengeyi bozup kanserleşmeye neden olabilmektedir (108).

Apoptoz, ölüm sinyallerinin ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla gerçekleşen dışsal ve hücre içi toksisitenin neden olduğu içsel (mitokondriyal) yolak olmak üzere başlıca iki yolakla tetiklenmektedir. Hücrede bazı proteinleri parçalayan ve hücre içi önemli proteinleri keserek çalışamaz hale getiren sistein aspartile özel proteazları (kaspazlar) aktive eden her iki yolakta da aktif olan kaspazlar, kaspaz kaskadına neden olarak hücreyi sindirmeye başlarlar. Bu nedenle her iki yolağın da sıkı bir şekilde kontrol edilmesi hücre için bir gerekliliktir (109).



Tümör nekroz faktörü ailesinden benzer ligandlar, CD95 (ilk apoptotik sinyal, Fas/Apo1) ve TNF ilişkili apoptoz uyarıcı ligand (TRAIL, TNF related apoptosis inducing ligand) hücre yüzeyinde büyük ölüm reseptörlerinden birine bağlanarak DD içeren moleküllerle, Fas ilişkili ölüm bölgesi (FADD, Fas associated death domain protein) ve/veya TNF reseptörü ilişkili ölüm bölgesi (TRADD, TNF receptor associated death domain) etkileşime girer. FADD'ın aktifleşmesi proapoptotik yolları başlatırken TRADD'ın aktifleşmesi antiapoptotik sinyalleri indükler. FADD daha sonra ölüm indükleyici kompleksin (DISC, death inducing complex) sitoplazmada oluşması için prokaspaz 8 ve kaspaz 10 gibi diğer DD-DED içeren proteinleri etkiler. TRADD ise reseptörle etkileşen protein 1 (RIP1, receptor interacting protein 1), TNF reseptör ilişkili faktör 2 (TRAF2, TNF receptor associated factor 2), TNF reseptör ilişkili faktör 5 (TRAF5, TNF receptor associated factor 5) ve apoptoz protein 1 ve 2 inhibitörü (cIAP1/2, inhibitor of apoptosis protein 1 and 2) ile birleşerek kompleks 1'i oluşturur. Bu kompleks, NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), JNK (c-Jun N-terminal kinase) ve p38 aracılığıyla ölümden korunma sinyallerinin dengesini ayarlar. Ancak bazı durumlarda RIP1'in silindromatosis (CYLD, cylindromatosis) enzimiyle ubiquitini alınır ve bu da RIP1 ve TRADD'ın kompleks 1'den ayrılmasına neden olur. Kompleks 1'den ayrılan RIP1 ve TRADD daha sonra FADD, kaspaz 8 ve kaspaz 10'a bağlanarak kompleks 2'yi oluşturur (112-114). Aktive olan kaspaz 8 ve 10 ölüm sinyalini genelde lenfosit gibi tip 1 hücrelerde görülen kaspaz 3, 6 ve 7'nin doğrudan aktivasyonu şeklinde ya da genelde hepatosit gibi tip 2 hücrelerde görülen BID'in (BH3 interacting domain death agonist) BAX (BCL2 associated X) ve BAK'a (BCL2 antagonist/killer) bağlanmasını engelleyerek içsel apoptotik yolağı tetikleyerek aktarır ve çoğaltır (115).

### **Dışsal Yolağın Kontrolü**

Sinyallerin büyük bir bölümü kaspaz 8'in inhibe edilmesiyle DISC kompleksine girmesini engelleyerek dışsal yolağı kontrol eder. Örneğin; cFLIP-long (cFLIPL) kaspaz 8 ve kaspaz 10 ile belirgin yapısal benzerlikler gösterir. Bu durum kaspaz 8, 10 ve cFLIPL arasında rekabete yol açar, cFLIPL kaspaz 8 ve 10'un bağlanacağı

bağlanma bölgelerine bağlanarak DISC kompleksine bağlanmalarına engel olur. Benzer olarak, A20 bağlayan NF- $\kappa$ B1 inhibitörü (ABIN1, A20 binding and inhibitor of NF- $\kappa$ B1) RIP1 ve FADD'ın kaspaz 8 ile etkileşimini etkileyerek antiapoptotik özelliğini gösterir (116).

Kaspaz 8'in diğer negatif kontrol mekanizmaları hücrenin yaşam sinyallerinin indüklenmesiyle ve bu sinyallerin daha sonra kaspaz 8'in aktivasyonunu engellemesiyle gerçekleşir. cIAP1/2; TRAF1 ve 2'nin görevlendirilmesine yardım eden ve TNF $\alpha$  apoptotik sinyalini inhibe eden baculovirus IAP tekrarı (BIRD, baculovirus IAP repeat), kaspaz görevlendirici domen (CARD, caspase recruitment domain) ve RING E3 ligazlarını içerir. Ancak cIAP1/2 kaspaz 8 inaktivasyonu görevini doğrudan kaspaz 8'i inaktive ederek değil, NF- $\kappa$ B yolağı gibi hücre içi yaşam yollarını indükleyerek yerine getirir (117).

Kaspaz 8'in pozitif düzenleyicileri ise etkilerini ubiquitinasyon gibi posttranslasyonel değişimleri indükleyerek gösterirler. Örneğin; TRAIL CUL3'ü (cullin 3) indükleyerek kaspaz 8'in p10 alt bölümünün poliubikitinasyonuna neden olur. Poliubikitine kaspaz 8 p62 proteininin stabilizasyonunu sağlar ve potansiyelini artırır (115).

### **İçsel Yolak**

Hücrede DNA hasarı ya da büyüme faktörü eksikliği gibi sitotoksik bir iç sinyal algılandığında B hücre lenfoma (BCL2, B cell lymphoma) ailesinden iki proapoptotik protein, BAX ve BAK aktive olmak için yapısal değişikliklere giderler. Bu iki protein, kapalı olan dimer-dimer bağlanma bölgelerini açığa çıkarmak ve mitokondriyal zarın yüzeyinde porlar oluşturmak için mitokondriye göç ederek mitokondriyal zarı homodimerize olurlar. Mitokondriyal zarı porları oluşmasıyla mitokondri dışı zar geçirgenliği (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization) artar ve mitokondriyal zarlar arası bölgeden (IMS, mitochondrial intermembrane space) sitoplazmaya proteinlerin salınmasına neden olur (118-121) (Şekil 9).

Sitokrom c membran geçirgenliği arttığı zaman zarlar arası bölgeden sitoplazmaya salınan ve apoptozom oluşumunu başlatan en önemli proteindir. ATP



## İçsel Yolağın Kontrolü

İçsel ya da mitokondriyal yolak, BCL-2 ailesi üyelerinin birbirine zıt etkileriyle düzenlenir. Farklı aktif bölgeler içerebilmekle beraber her birinde BCL-2 homoloji bölgesi (BH) mutlaka bulunur. Bu proteinler fonksiyonel olarak aşağıda verilen üç ayrı gruba ayrılır:

- pro-apoptotik proteinleri inhibe eden apoptoz inhibitörleri: BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BCL-B ve A1,
- apoptoz promotörleri: BAX, BAK ve BOK
- korunmuş BH3 bölgeleri: Antiapoptotik proteinleri inhibe edip proapoptotik proteinleri aktive eden düzenleyici sadece BH3 proteinleri BAD, BID, BIK, HrK, BIM, BMF, PUMA ve NOXA (125).

Antiapoptotik BCL-2 proteinleri BAX ve BAK'ı inhibe ederek sitokrom c salınımını ve dolayısıyla içsel apoptozu inhibe ederler. Ancak oluşan sitotoksik etkiye bağlı olarak sadece BH3 proteinleri antiapoptotik proteinlerin BH3 karşılığı olan domenlerine bağlanarak proapoptotik proteinlerin serbest kalmasına yol açabilir. Böylece proapoptotik proteinler serbest kalır ve mitokondriyal dış membran geçirgenliğini artırır ve içsel apoptozu başlatır (115).

Apoptoz inhibitörleri (IAPs, Inhibitors of apoptosis) protein ailesi, içsel apoptoz yolağının negatif düzenleyicilerindendir. IAP'lar kaspazları farklı mekanizmalarla inhibe ederler (126). XIAP, survivin ve cIAP 1 ve 2'nin BIR bölgeleri kaspaz 3 ve kaspaz 7'nin aktif bölgelerine bağlanarak proteolitik aktivitelerini inhibe eder (127). XIAP direkt prokaspaz 9'un aktivasyonunu engeller. Bazı IAP'lar da kaspazları hedefleyerek ubiquitinlenmesini ve parçalanmasını hedefleyerek kaspazların etkisini sınırlar. Bazı dolaylı yollarla cIAP'lar, NK-kB ve JUNK1 gibi antiapoptotik sinyallerin aktivasyonuna yardım eder. Böylelikle cIAP 1 ve 2 TNF sinyal yolağında NF-kB aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar (128).

Bazı mitokondri zarlar arası proteinleri MOMP sonrası IAP ailesi üyelerini hedefleyerek kaspazların aktivasyonuna yardım eder. İçsel apoptoz yolağının aktivasyonu mitokondri dış membranının geçirgenliğini artırarak sitozole Smac

salınımına yol açar. Smac, farklı IAP proteinlerine bağlanarak (özellikle de XIAP) proteazomlar tarafından parçalanmasına yol açar ve IAP'ların antiapoptotik etkilerini nötralize eder (129).

### **Lizozomal Mitokondriyal Yolak**

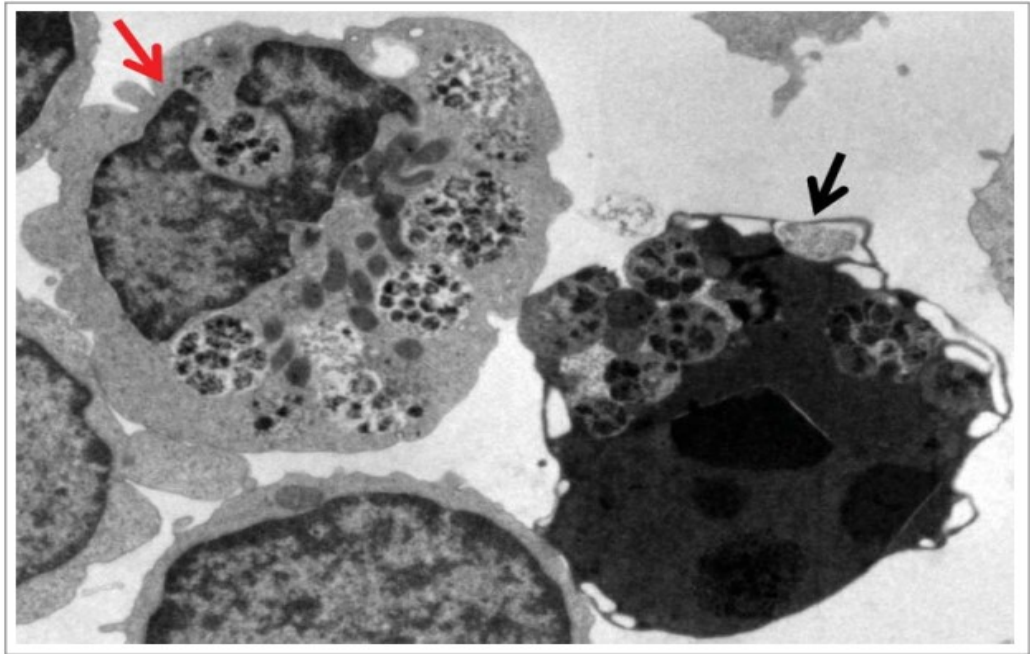
Lizozomal membran geçirgenliği (LMP, lisosomal membrane permeabilization) apoptozu pozitif düzenleyen bir diğer süreçtir (130). Ölüm reseptörleri, reaktif oksijen türleri (ROS, reactive oxygen species), ultraviyole radyasyon, proteazom inhibisyonu, büyüme ihtiyacı ve p53 aktivasyonu gibi farklı sinyallerle LMP oluşabilir (131-133). Başlangıç sinyaline bağlı olarak ölüm sinyalleri lizozoma farklı şekillerde iletir. Örneğin ölüm reseptörü aktivasyonundan sonra BAX, BIM, BID veya kaspaz 8 ile veya p53 aktivasyonunda lizozom ilişkili apoptoz indükleyici proteinlerle ölüm sinyalleri lizozoma iletilir (130,131,134). Kısmi ya da seçici geçirgenlikte lizozomlar katepsin gibi hidrolazları sitosole salarlar. Bu katepsinler hücre türüne, ölüm sinyalinin şekline, lizozomdan salınan katepsin miktarına ve katepsin inhibitörlerinin miktarına bağlı olarak kaspaz bağımlı ya da kaspaz bağımsız apoptozu tetikleyebilir. Ayrıca katepsinler kaspaz 3'ü direk aktive edebilir ya da mitokondriyal dış membran geçirgenliğini çabuklaştırabilir (130). LMP ve MOMP arasındaki ilişki dolaylı olarak katepsinin BID ve kaspaz 2 üzerindeki etkisiyle sağlandığı düşünülmektedir. Diğer yandan kaspaz bağımsız mekanizma ise mitokondriden apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımına dayanmaktadır. Sitoplazmaya geçen AIF nükleusa geçmekte ve kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (134). Kanser hücrelerinde lizozomlar LMP'ye daha çok duyarlılık göstermektedir. Bu duyarlılık kısmen ROS'ların diğer hücrelere göre daha fazla olmasından veya demir içeren proteinlerin birikiminden kaynaklanmaktadır (131).

### **OTOFAJİ**

Hücre içinde uzun süre kalmış olan sitoplazmik proteinleri ve organelleri yıkımlamak, enerji üretmek ve hücre içi yapı maddelerinin geri dönüştürülmesinde otofaji olarak isimlendirilen evrimsel olarak korunmuş bir mekanizma kullanılmaktadır.

Açlık, hipoksi, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve hücrenin ölüm yollarından kaçmasını tetikleyen oksidatif stres gibi farklı stres türlerine karşı bir adaptasyon mekanizması olan otofajinin birçok kanser hücresinde hücre yaşamını tetikleyen bir mekanizma olarak işlev gördüğü de bildirilmiştir. Otofajik yanıt hücrelerde en çok ATP yoksunluğunda ortaya çıkmakta ve hücre bütünlüğünü korumak ve nekroptozdan kaçmak için meydana gelmekle birlikte eşik değerini aşan stres uyarılarında aşırı otofagozomal vakül birikimi görüldüğü ve otofajik hücre ölümünün tetiklendiği rapor edilmiştir (135,136) (Şekil 10).

Otofaji apoptoza dirençli hücrelerde alternatif bir hücre ölüm yolağı olarak görülmektedir. Ancak ölen hücrelerde aşırı otofajik vaküllerin birikimi, otofajik hücre ölümünü düşündürse de otofajik mekanizmanın hücre ölümünü hangi mekanizmayla ve etkileşimlerle sağladığı bilinmemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda aşırı otofajinin son anda apoptoz ve nekroptozu indükleyerek hücreyi öldürdüğü bildirilmiştir (137-139).



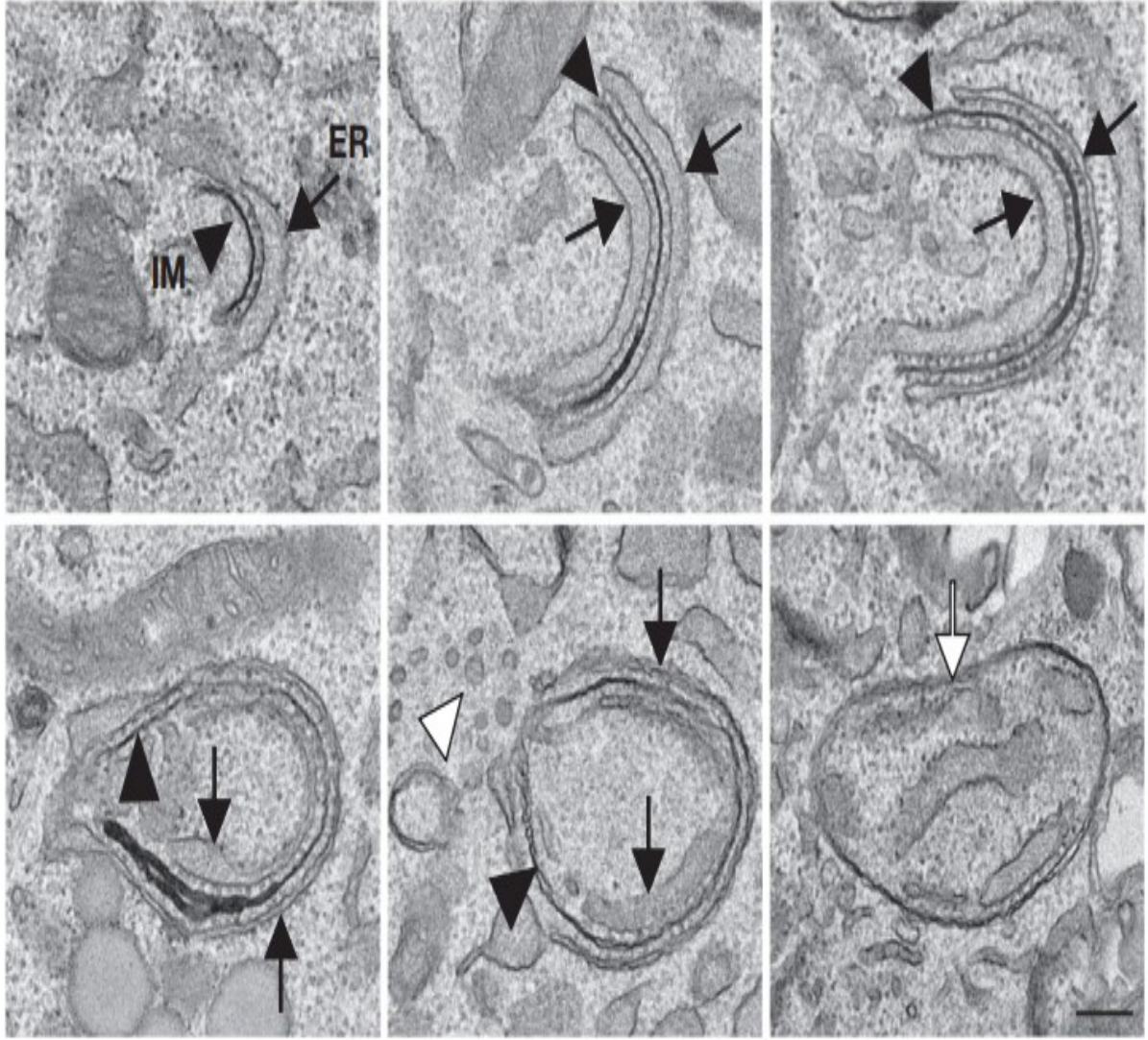
**Şekil 10.** Otofaji gerçekleşmekte olan iki hücrede otofagolizozomların yapısı (kırmızı ok canlı olan hücreyi, siyah ok ölmekte olan hücreyi göstermektedir) (140)



Otofaji, hücrenel bileşenlerden enerji kaynakları ve ham madde üreten ve hücrenel açlığa karşı tampon gibi işlevi olan hücrenel bir mekanizmadır. Ayrıca embriyonik gelişimde, apoptotik hücrelerin ve organellerin sindirilmesinde, antijen işlenmesinde, toksinlere karşı korunmada ve çökmeye meyilli proteinlerin ve bulaşıcı ajanların yıkılmasında da rol oynadığı bilinmektedir (140). Crohn's hastalığı, nörodejenerasyon ve kanser gibi birçok hastalıkta otofajinin düzenleme mekanizmalarında bozukluklar olduğu bildirilmiştir (141).

Otofaji gerçekleşirken öncelikle fagofor ya da izolasyon zarı adı verilen çift zarlı fincan şeklindeki yapılar sitoplazmanın bir kısmını içine alır. Zarlar otofagozomu oluşturmak için birleşir. Memelilerde, otofagozomlar sitoplazmanın her tarafında oluşabilir ve oluşan bu otofagozomlar mikrotübül düzenleyici merkeze doğru mikrotübüllerin üzerinde taşınarak götürülürler. Bu taşıma, mikrotübüllerin ve dinein motor proteininin varlığına bağlıdır. Mikrotübüllerin depolimerizasyonu (kutuplaşmasının bozulması) veya dinein bağımlı taşımının engellenmesi otofajinin engellenmesine yol açmaktadır (142,143). Otofagozomlar daha sonra lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturmaktadır ve oluşan bu otolizozomların içeriği lizozomal hidrolazlarla parçalanmaktadır (144).

Endoplazmik retikulum, mitokondri, mitokondri ilişkili endoplazmik retikulum zarları, golgi, plazma zarı ve endozomların hepsinin otofagozom izolasyon zarının başlamasında, uzamasında ve büyümesinde ilişkilerinin olduğu belirtilmiştir (145). Son zamanlarda izolasyon zarlarının üç boyutlu (3D) tomografik görüntülemeleri, fincan şeklindeki zarların endoplazmik retikulumun iki tabakasının arasına belirgin bir şekilde sıkıştırıldığını ve dar/ince bir zar yoluyla ER'ye fiziksel olarak bağlı olduğunu ortaya koymuştur (146,147). Bu bilgiler, izolasyon zarının oluşumunun ve uzamasının yakınındaki ER tabakaları tarafından yönlendirildiğini düşündürmekte ve şimdilerde yaygın olarak öne sürülen, izolasyon zarının ER'den kaynaklandığını belirten 'ER-beşiği' modelini desteklemektedir (147,148) (Şekil 11).



**Şekil 11. Otofagozom oluşumunda izolasyon membranlarının (IM) endoplasmik retikulum (ER) ile yakından ilişkili olduğunu gösteren elektron mikroskopu görüntüsü (147)**

Açlığa cevap olarak otofajinin indüklenmesinin bir kısmının, memeli rapamisin hedefinin (mTOR) inaktivasyonu ve Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonu ile düzenlendiği, ancak enerji kaybına cevap olarak otofajinin indüklenmesinde AMP kinaz (AMPK) aktivasyonunun olduğu gösterilmiştir (149). Otofajinin düzenlenmesinde diğer yollar, kalsiyum, siklik AMP (cAMP), kalpainler ve inozitol trifosfat (IP3) reseptörleriyle düzenlenmektedir (150).

Memelilerde, iki kompleks birbiriyle işbirliği içinde izolasyon zarını üretir. Bunlar;

- ULK kompleksi; ULK1/2 (unc-51 like autophagy activating kinase 1,2), ATG13 (autophagy related 13), RB1CC1 (RB1 inducible coiled-coil 1) ve ATG101 (autophagy related 101)'den oluşurken,
- PIK3C3 (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3) içeren Beklin-1 kompleksi; PIK3C3 (Vps34), BECN1 (Beklin 1, Atg6), PIK3R4 (p150, Vps15) ve ATG14 (Barkor)'den oluşur (151-153).

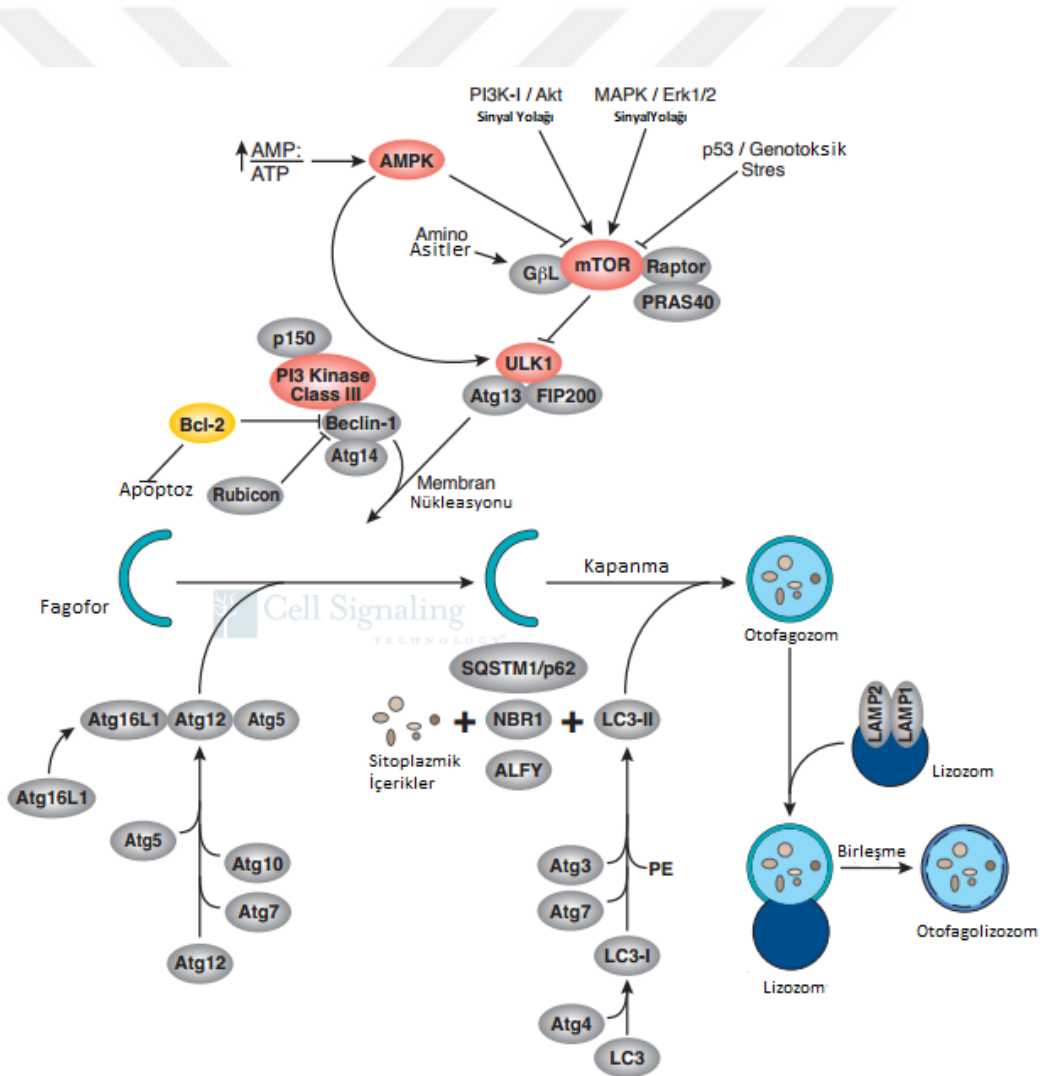
UVRAG'nin (UV radiation resistance associated) ATG14'ün yerine geçtiği benzer bir kompleks, daha sonra otofagozom olgunlaşması ve endositik iletimde rol almaktadır (154,155). KIAA0226'nın (RUN and cysteine rich domain containing beclin 1 interacting protein) bu komplekse bağlanması olgunlaşma sürecini negatif yönde düzenlemektedir (152). ULK ve Beklin 1 kompleksleri, belirli otofagozom çekirdeklenme bölgelerinde fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) üretiminin uyarılmasına, fagofor zarının uzamasına ve başlangıç bükülmesinin oluşmasına olanak sağlamak üzere görevlendirilmektedir (156) (Şekil 12).

Otofagozom oluşumunda rol alan ULK kompleksi memeli otofaji yolağının ana ögesi olarak kabul edilmektedir (157). Çevresel uyaranlara cevap olarak ULK1'in düzenlenmesinde fosforilasyonun önemli rol oynadığı bilinmekle birlikte henüz tam olarak anlaşılammıştır (141,158). ULK1 kinaz aktivitesi otofaji için gerekli olmakla birlikte ULK1'in otofajik fonksiyonu için gerekli olan substrat(lar)ının gerekliliği kesin değildir. Ayrıca ULK1'in otofajide kinaz-bağımsız fonksiyonlarının olabileceği düşünülmektedir (159).

Otofajide görev alan PIK3C3 (Vps34), PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) üreten üçüncü sınıf fosfatidilinositol 3-kinazdır, erken otofaji markırlarıyla güçlü birlikte yer alır ve otofajinin erken evreleri için gereklidir (160). Beklin 1 otofagozom oluşumunu etkileyen bazı proteinlere bağlanır bunun yanında ona otofajiyi indükleyen AMBRA1 (autophagy and beclin 1 regulator 1), UVRAG ve SH3GLB1 (SH3 domain containing GRB2 like, endophilin B1) eşlik eder (161-163). BCL2 veya BCL2L1'e bağlanma otofajiyi inhibe eder (164,165). BCL2'ye bağlanan inositol 1,4,5-trifosfat reseptör kompleksi BECN1 ile etkileşir ve otofajiyi inhibe eder (166). CISD2 (Besin

yokluğu otofaji faktör-1, NAF1), IP3R kompleksinde yer alan bir bileşendir ve ER'de BCL2 ile etkileşerek BCL2-BECN1 etkileşimini stabilize eder (167). Açlık, BCL2 ve BCL2L1'in fosforilasyonuna ve BECN1'den ayrılmalarına ve böylece otofajinin indülenmesine neden olan c-Jun NH2-terminal kinaz-1'in aktivasyonunu sağlar (168).

Hücrede bulunan AMBRA1 aynı anda hem dineine hem de Beklin-1 kompleksine bağlanabilir. Besin yokluğu oluştuğunda, AMBRA1 ULK1-bağımlı biçimde fosforillenir (169). Bu fosforilasyon, AMBRA1 ilişkili Beklin 1 komplekslerinin dineinden ve mikrotübül ağından serbestleşerek otofaji başlangıç bölgelerine gitmelerine olanak sağlar (169).



Şekil 12. Otofaji mekanizması ve rol alan bazı proteinler (170)

Erken faz otofagozom oluşumunun karakteristik özelliği, omegazomlar ya da beşikler diye adlandırılan PI3P ile zenginleştirilmiş ER ilişkili yapıların oluşumudur (147,160). Omegazomlar mitokondri ilişkili ER zarının üzerinde ya da kenarında yoğunlaşmaya başlar (171). Ancak fagofor; ER çıkış bölgeleri (ERES), ER-Golgi ara bölgesi (ERGIC), golgi, plazma zarı ve geri dönüştürülen endozomlar gibi diğer zar kaynaklarından da kendine materyal toplayabilir (156). Omegazomlar, daha önceleri kendiliğinden ve bilinmeyen bir mekanizmayla oluştuğu düşünülen izolasyon zarı ya da fagoforun oluşmasına öncülük eder (172,173). Fagofor genişlemesi muhtemelen endomembranlardan ve yarı otonom organellerden zar alımıyla gerçekleşmektedir (145,148).

Otofagozom başlangıç bölgesinde üretilen PI3P, Atg18'in memeli homoloğu olan WIPI2b tarafından algılanır ve daha sonra WIPI2b Atg16L1'i teşvik eder (174,175). Memeli hücrelerinde dört adet WIPI proteini bulunmaktadır (176). Bu proteinlerin hemen hepsi benzer şekilde PI3P'ye bağlanır ve zar oluşumunda yer alır ancak WIPI1, 3 ve 4'ün otofajideki tam olarak görevleri hala kesinlik kazanmamıştır. WIPI4'ün (WDR45) yağ damlacığı oluşumunda yer alması için Atg2'ye bağlandığı ve WIPI4'de meydana gelen mutasyonların nörodejeneratif hastalıklara neden olabileceği gösterilmiştir (177,178).

Otofagozom meydana getirecek olan zarın uzaması iki ubikitinasyon benzeri reaksiyonla düzenlenir. Öncelikle ubikitin benzeri molekül olan ATG12; ATG7 aracılığıyla, E1 benzeri aktiveleştirici enzim gibi işlev gösteren ATG5'le birleşir ve E2 ubikitin konjugasyon enzimine benzer rolü olan ATG10'la birleşir. Daha sonra bu ATG5:ATG12 kompleksi kovalent olmayan bir etkileşimle ATG16L1 ile etkileşir. Bu kompleks, oluşan otofagozomlarla ilişkili olmasına karşın tamamlanmış otofagozomlarla ilişkisi yoktur (179). İkinci ubikitin benzeri reaksiyon, LC3 ailesinden ubikitin benzeri moleküllerin konjugasyonunu içerir (180).

Otofajide ATG12:ATG5:ATG16L1 kompleksi, memeli hücrelerinde maya Atg8'in homoloğu olan LC3 ailesi proteinlerinin fosfotidil etanolamine (PE) konjugasyonunu sağlayan E3 benzeri enzim gibi görev alır (181,182). LC3-PE bir proteaz olan ATG4 ile ayrılabilir (183,184). Ayrıca ATG4, LC3 proteinlerini, glisin kalıntılarını ortaya çıkarmak için C-terminal uçlarından keserek konjugasyona hazırlar (185,186). LC3 proteinleri, otofagozomlar lizozomlarla birleşene kadar

otofagozomlarla ilişkili halde kalırlar. Otofagozom-lizozom birleşmesinden ortaya çıkan otolizozomların içinde kalan LC3 benzeri proteinler yıkılırken sitoplazmik alanda kalanlar lipidlerinden ayrılır ve geri dönüştürülür. Oluşan yapılardan ATG5:ATG12:ATG16L1 pozitif, LC3 negatif vesiküller öncül otofagozomal yapıları (öncül fagoforlar veya erken fagoforlar) temsil ederken; ATG5:ATG12:ATG16L1 pozitif LC3 pozitif yapılar fagofor olarak; ATG5:ATG12:ATG16L1 negatif LC3 pozitif vesiküller ise olgun otofagozomlar olarak değerlendirilir (187).

Fagofor zarının kapanma mekanizmaları tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte zarların kapanmasının, dar bir açıklığın birleşmesine dayandığı bildirilmiştir (156). Fagoforun oluşumu; sitokinez, viral tomurcuklanma veya multivesiküler cisim oluşumuyla benzerdir.

Apoptoz ve otofaji arasındaki etkileşimin belirlenmesi günümüzde kanserde ilaç direnci ile ilişkili olarak önemli bir yer tutmaktadır. İki sistemin de proteinlerinden bazıları iki yolak arasındaki bağlantılarda rol almaktadır. İçsel yolağın düzenleyici üyeleri MOMP'un yanında otofajiyi de etkilemektedir. Proapoptotik BCL2 proteinleri sadece mitokondri zar geçirgenliğini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda otofajiyi de uyarır. Antiapoptotik BCL2 proteinleri ise MOMP'u ve otofajiyi inhibe etmektedir. Buna en önemli örnek BCL2 veya BCL-XL'in önemli otofaji başlangıç proteinlerinden olan Beklin 1'e bağlanması sonucu otofajiyi inhibe etmesidir (188). Buna karşılık otofaji sistem proteinleri de içsel apoptoz yolağını etkileyebilmektedir. Örneğin hücreye DNA hasarı ajanları verildiğinde ATG5 hücrenin MOMP'a olan duyarlılığını artırmaktadır. DNA hasarı kalpain aracılı ATG5'in kesilmesini indükler. Kesilmiş olan ATG5 antiapoptotik BCL-XL'a bağlanmaya eğilimli olur ve böylece onu inhibe ederek sitokrom c salımını teşvik eder (189). Otofaji ailesinden bazı proteinlerin BH3 benzeri bölgelere sahip oldukları ve bu bölgelerle antiapoptotik BCL2 ailesi proteinleriyle etkileşime girerek onları inhibe ettikleri bilinmektedir. Ancak bu bağlanma proapoptotik BCL2 ailesi proteinleriyle kompetitif şekilde gerçekleşmektedir. Bu bağlanma aynı zamanda otofaji proteinlerini de inhibe etmektedir. Ancak proapoptotik BCL2 ailesi üyelerinin ortamda artmasıyla kompetitif olarak antiapoptotik BCL2 ailesi üyelerine bağlanarak otofaji ailesi proteinlerinin serbest kalmasına yol açar (190).

Değişmiş glikolitik mekanizmaları ve hızlıca bölünmeleri sonucu metabolik gereksinimleri normal hücrelerden daha fazla olan ve hücrel strese daha fazla maruz kalan tümör hücrelerinin otofajiyi antikanser tedavilere direnç geliştirmek için kullanılabildiği bildirilmiştir (191-193). Yapılan birçok çalışmada, otofaji inhibisyonunun çeşitli kanser terapilerini olumlu yönde etkilediği gösterilmiş olmakla birlikte otofajik hücre ölümünü tetiklemenin apoptoza dirençli bazı kanser hücrelerini öldürmek için bir yol olabileceği de gösterilmiştir (191,194,195). Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda apoptozla otofaji arasındaki etkileşim ve bu etkileşimin kanser hücrelerinde olan etkisi ayrıntılı olarak araştırılmaktadır. Bizim çalışmamızda kullandığımız, beyin tümörlerinin tedavisinde GBM hastalarına büyük fayda sağlayan temozolomidin de kanser hücrelerinde apoptozu ve otofajiyi indüklediği ve hücreleri apoptotik hücre ölümüne götürdüğü rapor edilmiştir (64-66,77). Günümüzde kemoterapi ilaçlarının kanser hücrelerine sitotoksik etkilerinin yanı sıra hücrelerde ilaç direncini de tetikleyebileceği bilinmektedir. Ancak bazı flavonoidlerin kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanımlarının kanser hücrelerinin çeşitli mekanizmalarını etkilediği, bu nedenle kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanıldığında hücrelerde meydana gelen değişikliklerin mekanizmalarının aydınlatılması gerektiği de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle çalışmamızda farklı kanser türlerinde antitümör, antioksidan ve kolesterol düşürücü etkiler gösteren doğal bir flavonoid olan naringinin rutin GBM tedavisinde kullanılan temozolomid ile birlikte ve tek kullanımının GBM kanser hücrelerindeki apoptoz ve otofaji yollarındaki bazı genleri nasıl etkilediği ve hücre ölümü üzerine olan etkileri araştırıldı.

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Çalışma süresince kullanılan cihazlar, markaları ve menşei Tablo 2'de ve kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve menşei Tablo 3'de verildi.



**Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve menşei**

<b>Kullanılan Cihazlar</b>		
<b>Malzeme</b>	<b>Marka</b>	<b>Ülke</b>
Biyogüvenlik Kabini	Heraeus	Almanya
Karbondioksitli İnkübatör	Heraeus	Almanya
Santrifüj	Centurion Scientific	İngiltere
İnvert Mikroskop	Nikon	Japonya
Otomatik Pipet Seti	Gilson	Fransa
Dijital Pipetör	Thermo Fisher Scientific	ABD
Mikroplate Okuyucu	Thermo Fisher Scientific	ABD
Soğutmalı santrifüj	Hettich	Almanya
Santrifüj	Hettich	Almanya
Nanodrop	Optizen	Güney Kore
PCR Cihazı	Applied Biosystems	ABD
Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	Applied Biosystems	ABD
Gelişmiş Vorteks Karıştırıcı	WiseMix	Güney Kore
Karıştırıcı Blok	Bioer	Çin
Elektronik tartı	A&D Company	Japonya
4°C Buzdolabı	Vestel	Türkiye
-20°C Derin Dondurucu	Vestel	Türkiye
-80°C Derin Dondurucu	Wisd	Güney Kore
Ultra Saf Su Cihazı	Tka	ABD
Distile Su Cihazı	Tka	ABD
pH metre	Mettler Toledo	ABD
Tali® Sitometre	İnvitrogen	ABD
Tissue Lyser LT	Qiagen	Almanya
Blotlama cihazı	İnvitrogen	ABD
Güç kaynağı	Cleaver	İngiltere
Görüntüleme sistemi	Dnr Bioimaging Systems	İsrail

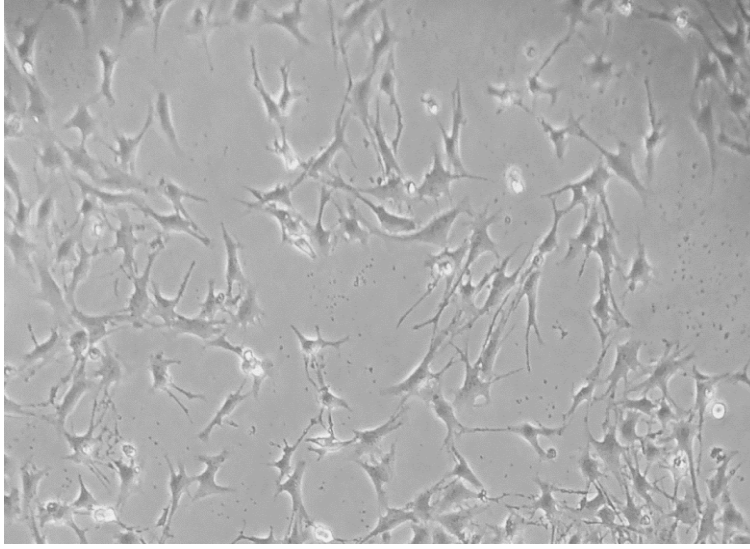
**Tablo 3. Çalışmada kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve menşei**

<b>Kullanılan Sarf ve Diğer Malzemeler</b>		
<b>Malzeme</b>	<b>Marka</b>	<b>Ülke</b>
DMEM, Dulbecco's Modification of Eagle's Medium	Gibco	ABD
%0.25 Trypsin EDTA	Gibco	ABD
Penisilin/Streptomisin	Gibco	ABD
Fetal Sığır Serumumu	Gibco	ABD
Etanol	Merck	ABD
Dimetil Sülfoksit	Merck	ABD
Dimetil Sülfoksit	Santa Cruz Biotechnology	ABD
Dnaz/Rnaz İçermeyen Su	Life Technologies	ABD
25 cm <sup>2</sup> Hücre Kültür Kabı	Nest	ABD
75 cm <sup>2</sup> Hücre Kültür Kabı	Nest	ABD
96 Kuyucuklu Hücre Kültür Kabı	Nest	ABD
6 kuyucuklu Hücre Kültür Kabı	Ultra Cruz	ABD
96 Kuyucuklu PCR Reaksiyon Plakası	Life Technologies	ABD
Kriyojenik Vial	Nest	ABD
5 ml'lik Serolojik Pipet	Nest	ABD
10 ml'lik Serolojik Pipet	Nest	ABD
Temozolomid	Enzo Life Sciences	ABD
Naringin	Sigma	Almanya
MTT, 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid	Biomatik	Kanada
PBS Tablet	Life Technologies	ABD
0,2 ml PCR Strip Tüpleri	Axygen	ABD
cDNA Revers Transkripsiyon Kiti	Life Technologies	ABD
RNA İzolasyon Kiti	Life Technologies	ABD
Cyber Green Master Mix	Life Technologies	ABD
15 ml Flakon Tüpler	Nest	ABD
50 ml Flakon Tüpler	Nest	ABD
1.5 ve 2 ml'lik Tüpler	Eppendorf	Almanya
Tali® Apoptozis Kiti	Life Technologies	ABD
Western Blot Kiti	Life Technologies	ABD
Steril Eldiven	Broche	Türkiye
Cam malzemeler, deney tüpleri, balon jojeler, beherler vs.	Lamtek	Türkiye

## GEREÇLER

### Hücre Hattı

Çalışmada Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen insan glioblastoma U87 (ATCC® HTB-14™) hücre hattı kullanıldı (Şekil 13). Malign glioma (MG) olan bir erkek bireyin beyin epiteli dokusundan alınan bu hücreler tümörjeniktir ve immün sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşturma potansiyeli vardır.



**Şekil 13. U87 insan glioblastoma hücrelerinin invert ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (40X büyütme ile)**

### Hücre Hattı Besiyeri

U87 hücreleri için uygun besiyeri modifiye edilmiş Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (Tablo 3), içerisinde 56°C'de 30 dk bekletilerek sıcaklıkla inaktive edilmiş Fetal Sığır Serum (FBS) %5 ve Penisilin/Streptomisin antibiyotik karışımından %1 olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri kontaminasyon riskini en aza indirmek için 50 ml hacminde falkon tüplere bölündü ve 4°C sıcaklıkta dolapta saklandı.

**Tablo 4. Modifiye edilmiş Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) içeriği**

<b>İçeriği</b>	<b>Moleküler Ağırlığı</b>	<b>Konsantrasyon (mg/L)</b>	<b>mM</b>
<b>Amino Asitler</b>			
Glisin	75.0	30.0	0.4
L-Arginin hidroklorid	211.0	84.0	0.398104
L-Sistin 2HCl	313.0	63.0	0.201277
L-Glutamin	146.0	580.0	3.972602
L-Histidin hidroklorid-H <sub>2</sub> O	210.0	42.0	0.2
L-Izolösin	131.0	105.0	0.801526
L-Lösin	131.0	105.0	0.801526
L-Lisin hidroklorid	183.0	146.0	0.797814
L-Metionin	149.0	30.0	0.201342
L-Fenilalanin	165.0	66.0	0.4
L-Serin	105.0	42.0	0.4
L-Treonin	119.0	95.0	0.798319
L-Triptofan	204.0	16.0	0.07843
L-Tirosin	181.0	72.0	0.39779
L-Valin	117.0	94.0	0.80341
<b>Vitaminler</b>			
Kolin klorid	140.0	4.0	0.028571
D-Kalsiyum pantotenat	477.0	4.0	0.008385
Folik Asit	441.0	4.0	0.009070
Niasinamid	122.0	4.0	0.032786
Piridoksin hidroklorid	206.0	4.0	0.019417
Riboflavin	376.0	0.4	0.001063
Tiamin hidroklorid	337.0	4.0	0.011869
i-Inositol	180.0	7.2	0.04
<b>İnorganik Tuzlar</b>			
Kalsiyum Klorid (CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O)	147.0	264.0	1.795918
Ferrik Nitrat (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -9H <sub>2</sub> O)	404.0	0.1	2.47524
Magnezyum Sülfat (MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	246.0	200.0	0.81300
Potasyum Klorid (KCl)	75.0	400.0	5.33333
Sodyum Bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	84.0	3700.0	44.0476
Sodyum Klorid (NaCl)	58.0	6400.0	110.344
Sodyum Fosfat monobazik (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O)	154.0	141.0	0.91558
<b>Diğer Bileşikler</b>			
D-Glukoz (Dekstroz)	180.0	1000.0	5.55555
Fenol Kırmızısı	376.4	15.0	0.03985
Sodyum Pirüvat	110.0	110.0	1.0

## YÖNTEMLER

### Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması

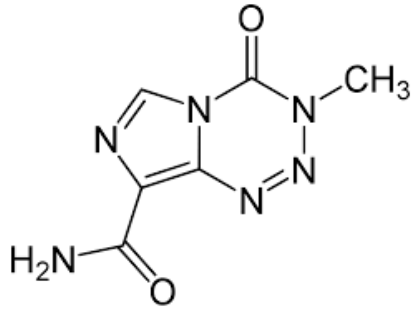
Donmuş olarak temin edilen hücreler çözündürülüp üzerine besiyeri eklendi ve 1.500 rpm'de (rotor per minute) 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu dimetil sülfoksit (DMSO) içeren besiyeri çöken hücrelerden dikkatli bir şekilde ayrılıp atıldı, hücre peletinin üzerine besiyeri eklenip iyice karışmaları sağlandı ve 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara ekildi. Hücre ekimi yapılan flasklar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren steril inkübatörde kültüre alındı.

Yeterli yoğunluğa ulaşmış olan hücrelerin pasajlanması için flaskta bulunan besiyeri dökülüp uzaklaştırılarak 37°C sıcaklığa getirilmiş olan tripsin-EDTA eklendi ve etüvde 10 dakika hücrelerin tabandan kalkması için bekletildi. Hücre tripsin karışımı 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 1.500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti besiyerinde karıştırılıp flasklara ekildi ve invert ışık mikroskopunda yoğunluğu kontrol edildi.

Hücrelerin dondurulması işleminde tripsinize edilerek kalkan hücreler santrifüj edilerek çöktürüldü ve üzerine %5 DMSO içeren besiyeri eklenip iyice karışması sağlandı ve 2 ml'lik kriyojenik viallere bölündü. Kriyojenik vialler 24 saat -80°C derin dondurucuda bekletildi ve sıvı azota alındı.

### Temozolomid Stok ve Uygulama Dozlarının Hazırlanması

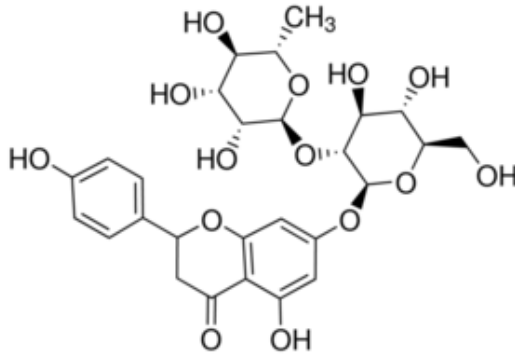
Temozolomid (Enzo Life Sciences, 85622-93-1) (Şekil 14) toz halinde dondurulmuş olarak temin edilip -20°C dondurucuda saklandı. Stok solüsyonları hazırlamak için çözücü olarak 1,5 ml DMSO, 5 µL hidroklorik asit (HCl) ve 13,5 ml H<sub>2</sub>O karışımı kullanıldı. Son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde temozolomid stok solüsyonu hazırlandı. Hücrelere 1 mM, 800 µM, 600 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM ve 50 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde temozolomid uygulandı.



**Şekil 14. Temozolomidin kimyasal yapısı**

### **Naringin Stok ve Uygulama Dozlarının Hazırlanması**

Naringin (Sigma, 10236-47-2) (Şekil 15) toz halinde temin edilip +4°C buzdolabında saklandı. Stok solüsyonları hazırlamak için çözücü olarak 2,5 ml etanol ve 7,5 ml H<sub>2</sub>O karışımı kullanıldı. Son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde naringin stok solüsyonu hazırlandı. Hücrelere 1 mM, 800 µM, 600 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM ve 50 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde naringin uygulandı.



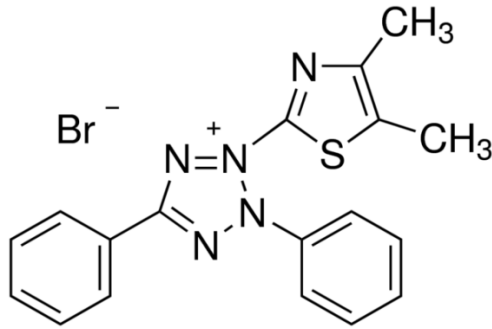
**Şekil 15. Naringinin kimyasal yapısı**

### **Hücre Canlılık Testi**

Hücrelerin pasajlanması bölümünde anlatıldığı şekilde tripsinize edilen hücreler besiyeri ile karıştırılarak 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğunda ~10.000 hücre olacak şekilde 180 µL hücre karışımı ekildi. Hücrelerin

plakalara yapışması için 24 saat beklendi ardından temozolomid ve naringin uygulamaları her uygulama dozu altı kuyucuk olmak üzere her bir kuyucuğa 20 µL olacak şekilde yapıldı. Kontrol grubuna sadece çözücü madde uygulaması yapıldı. Uygulamadan sonra 24 ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakılan hücrelerin canlılık oranları belirlendi.

MTT hücre canlılık testi için kimyasal yapısı Şekil 16' da verilen MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) maddesinden 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna çok kanallı pipet yardımıyla 20 µl MTT solüsyonu pipetlendi. MTT solüsyonunun canlı hücrelerin mitokondrilerinde metabolize olması için plakalar temel hücre kültürü koşullarında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki besiyeri dökülerek uzaklaştırıldı ve metabolize olarak ortaya çıkan mor renkli boyanın çözünerek görünür hale gelmesi için kuyucuklara 200 µl ultra saf DMSO pipetlendi. Enzimatik boyanın DMSO tarafından çözünmesi için 10 dakika beklendi ve 492 nm dalga boyunda absorbanlar mikropilaka okuyucu (Multiskan GO) ile belirlendi.



**Şekil 16. MTT'nin kimyasal yapısı**

### **RNA İzolasyonu**

MTT hücre canlılığı testi bölümünde anlatıldığı şekilde belirlenen dozlarda madde uygulaması yapılan hücrelerden uygulamanın 48. saatinde RNA izole edildi. RNA izolasyonunda Ambion® RNA Kiti (Life Technologies) kullanıldı ve izolasyon kit protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

- 1) Lizis solüsyonu, her 1 ml lizis tamponu içinde 20 µl (%2) 2-merkaptoetanol olacak şekilde hazırlandı.
- 2) 96 kuyucuklu plakalardaki hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı, kuyucukların herbirine 125 µl lizis solüsyonu eklendi ve 20 dakika inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin lizis olması beklendi.
- 3) Lizis olan hücreler 8 kuyucuk/tekrar olacak şekilde toplandı ve üzerine 1:1 oranında %70' lik etanol eklendi, hemen vortekslendi.
- 4) Bu karışım spin kolonlara aktarıldı ve 12.000 g'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edildi ve altta biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- 5) Kolon üzerine 700 µl birinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası spin kolonların alt tüpleri içindeki sıvıyla birlikte uzaklaştırıldı.
- 6) Kolon üzerine 500 µl ikinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası altta kalan sıvı uzaklaştırıldı (Bu işlem 2 kez tekrarlandı).
- 7) Kolon üzerindeki membranın kuruması için 2 dakika 12.000 g'de 25°C'de santrifüj edildi ve alttaki tüp atıldı, kuruyan kolon 1,5 ml hacminde steril toplama tüplerinin içine alındı.
- 8) Kolonun tam merkezine 30 µl RNaz içermeyen su pipetlenerek oda ısısında bir dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 12.000 g'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanan RNA miktarları Nanodrop cihazında (Optizen, Nano Q) ölçüldü ve -80°C derin dondurucuda saklandı.

### **cDNA Eldesi**

Madde uygulaması yapılmış U87 insan glioblastoma hücrelerinden elde edilen RNA'ların, komplementer DNA'sının elde edilebilmesi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanıldı. PCR reaksiyonu kit protokolüne göre aşağıdaki gibi yapıldı.

- 1) -80°C'de saklanan RNA'ların +4°C' de erimesi sağlandı.
- 2) cDNA ana karışımı hazırlandı (Tablo 5).



- 3) 200 µl'lik PCR striplerine, 10 µl RNA, 10 µl cDNA ana karışımından pipetlendi.
- 4) Reaksiyon karışımı PCR cihazında (Applied Biosystems) 25°C'de 10 dk; 37°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk tutularak cDNA sentezlendi.
- 6) Elde edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20°C dondurucuda saklandı.

**Tablo 5. Bir reaksiyonluk cDNA ana karışım içerisindeki içerikler**

<b>Malzeme</b>	<b>Miktar</b>
10X Ters transkripsiyon tamponu	2 µl
25X dNTP karışımı (100 mM)	0,8 µl
10X Ters transkripsiyon rastgele primerleri	2 µl
Multi Scribe™ Ters transkriptaz	1 µl
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	4,2 µl
<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>

### **Kantitatif Real Time-PCR (RT-qPCR) Analizleri**

Glioblastoma U87 hücrelerinde, temozolomid ve naringin uygulamaları sonucunda apoptoz yolağı proteinlerinden Kaspaz 3, BAX, BCL2, hücre tamir mekanizması proteinlerinden p53, şaperon protein ailesinden HSP70, otofaji ailesi proteinlerinden ise Beklin 1, ATG7 ve ATG12 sentezinden sorumlu gen ifadelerindeki değişimler RT-qPCR yöntemi ile Tablo 6'da dizileri verilen primerler ile analiz edildi. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak ise GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) geninin anlatımı kullanıldı.

**Tablo 6. qRT PCR için kullanılan primer çiftleri, dizileri ve uzunlukları**

Gen Adı		Primer Dizilimi	Primer Uzunluğu (bç)
<i>GAPDH</i>	İleri	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	24
	Ters	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	24
<i>BCL2</i>	İleri	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	20
	Ters	ACAGTTCCACAAAGGCATCC	20
<i>BAX</i>	İleri	ATGGACGGGTCCGGGGAG	18
	Ters	TCAGCCCATCTTCTTCCA	18
<i>Kaspaz 3</i>	İleri	GTGGAATTGATGCGTGATGT	20
	Ters	ACAGGTCCATTTGTTCCAAAA	21
<i>p53</i>	İleri	CACGAGCGCTGCTCAGATAGC	21
	Ters	ACAGGCACAAACACGCACAAA	21
<i>HSP70</i>	İleri	CGAGETCGACGCATTGTTTG	20
	Ters	GAGTGGATCCGCCGACGAGTA	21
<i>Beklin 1</i>	İleri	GGCTGAGAGACTGGATCAGG	20
	Ters	CTGCGTCTGGGCATAACG	18
<i>ATG7</i>	İleri	ATGATCCCTGTAACCTTAGCCCA	22
	Ters	CACGGAAGCAAACAACCTTCAAC	22
<i>ATG12</i>	İleri	GAGACCAGCCTGGTTAGCAA	20
	Ters	CTGAACCCTCAGTGGCAAAC	20

RT-qPCR analizinde daha önce cDNA eldesi bölümünde anlatılan şekilde elde edilen cDNA'lar kullanıldı. 96 kuyucuklu reaksiyon plakasında, her bir kuyucuğa toplam hacim 12 µl olacak şekilde primer, su, SYBR green ve cDNA pipetlendi. RT-qPCR cihazında (Şekil 17) reaksiyon; 1 döngü 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, bunu takiben, 40 döngü denatürasyon (95°C 15 sn) ve annelling (primer eşleşmesi) ve elongasyon (primer uzaması) (60°C 'de 1 dakika) olacak şekilde başlatıldı.



**Şekil 17. Kantitatif gerçək zamanlı PCR cihazı (qRT PCR)**

### **Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi**

Tali görüntü tabanlı sitometre ile apoptoz analiz çalışmaları Tali® Apoptosis Kit-Anneksin V (AlexaFluor® 488) ve Propidyum iyodid (Life Technologies) kiti kullanılarak kit prosedürüne göre yapıldı. Anneksin V yalnızca apoptotik hücelere bağlanan ve Tali sitometre cihazında (Şekil 18) yeşil floresanda ışımaya yapan bir moleküldür. Propidyum iyodid ise yalnızca ölü hücelerin zarlarından geçer ve Tali sitometre cihazında kırmızı ve (veya) sarı ışımaya veren bir moleküldür.

Tali sitometre ile apoptoz analizi için 6 kuyucuklu hücre kültürü plağına 3 ml besiyeri ile birlikte yaklaşık 400.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Ekimi yapılan hücelere belirlenen dozlarda madde uygulaması yapıldı. 48 saat inkübasyona bırakılan hüceler bu süre sonunda TALI® Apoptoz Kit protokolüne göre aşağıdaki şekilde işleme tabi tutuldu;

- 1) Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp tripsinize edilen hüceler 1.000 g'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.
- 2) Çöken hücelerin üzerine 100 µl 1X Annexin bağlanma tamponu eklendi.
- 3) Bu karışımın her 100 µl'si için 5 µl Annexin V ilave edilerek vortekslendi.

- 4) 20 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edildi.
- 5) İnkübasyon süresi sonunda hücre karışımı 1.500 g'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 6) Peletin üzerine 100 µl 1X Annexin bağlanma tamponu eklenerek vortekslendi.
- 7) Bu karışıma 1 µl Propidyum iyodid solüsyonu eklenerek karanlık ortamda 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 8) İnkübasyon sonrasında tüpler içerisindeki hücre karışımından 25 µl alınarak TALİ® kiti ile alınan özel lamlara pipetlendi ve Tali sitometre cihazı (Invitrogen, TALİ® Image Based Cytometer) ile analizi yapıldı.



**Şekil 18. Tali sitometre cihazı**

### **Western Blot Protein Analizi**

Otofaji oluşumunda görev alan ve oluşan otofaji miktarını gösteren LC3 I ve LC3 II proteinlerinin ifade seviyeleri western blot yöntemi ile analiz edildi. Bunun için işlemler aşağıdaki şekilde sırasıyla yapıldı.

### **a) Protein İzolasyonu:**

Hücrelerden protein izole edilmesi için 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kaplarında MTT çalışmaları sonucunda belirlenen konsantrasyonlarda madde uygulaması yapılan hücreler tripsin ile kaldırılıp santrifüj ile toplandı. Tripsin hücre pelletinden tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pellet protein izolasyonu yapılmaya kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

Protein izolasyonu için aşağıdaki basamaklar izlendi:

- 1) Dondurulmuş hücre pelletinin üzerine 400 µl 0,1 M soğuk sodyum fosfat tamponu eklenerek pipetajla hücre pelleti çözdürüldü ve hücreler 2 ml hacminde santrifüj tüplerine alındı.
- 2) Her bir tüpün içine 3.2 mm çapında 1 adet paslanmaz çelik bilye (Next Advance SSB32 Stainless Steel Beads) ilave edilerek doku parçalayıcı cihazında (Tissue Lyser LT, Qiagen) 50 devirde 1 dk parçalandı.
- 3) Hücre homojenatını içeren tüpler +4 °C karıştırıcı blokta 1.500 çalkalama hızında 1 dk çalkalandı ve yeniden doku parçalayıcıya alınarak parçalama işlemi tekrarlandı.
- 4) Tamamen parçalanmış hücreleri içeren tüpler +4 °C'de ,14.000 g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrı bir tüpte toplandı ve protein miktarları Nanodrop (Optizen, Nano Q) cihazında ölçüldü.

### **b) Denatürasyon:**

- 1) Proteinlerin miktarları eşitlenmiş proteinlerden 0,2 ml hacimli strip tüplere 6,5 µl pipetlendi.
- 2) Protein karışımının üzerine 2,5 µl LDS Örnek tamponu (4x) NuPAGE ve 1 µl Örnek indirgeme ajanı (10x) Bolt™ pipetlendi.
- 3) Hazırlanan numuneler PCR cihazında 80 °C 'de 12 dakika denatüre edildi.
- 4) Denatürasyon işleminden sonra örnekler soğuk blok üzerine alındı ve soğumaları için beklendi.

**c) Jele Yükleme ve Elektroforez:**

- 1) Koşturma tamponu (1x) çözeltisi için 950 ml deiyonize su ve 50 ml koşturma tamponu (20x) karıştırılarak 1x koşturma tamponu elde edildi.
- 2) Elektroforez tankının içine 1x koşturma tamponu dolduruldu.
- 3) Jel paketten çıkarıldı ve taraklar her iki taraftan tutularak dikkatlice çıkarılarak jel tank içerisine yerleştirildi.
- 4) Marker olarak Magic Marker XP'den 7 µl ve See Blue Plus 2'den 5 µl olacak şekilde standartlar ilk kuyucuğa yüklendi.
- 5) Daha sonra denatüre edilmiş olan protein örneklerinden 10 µl diğer kuyucuklara sırayla yüklendi.
- 6) 80 V'da yaklaşık 100 dakika yürütüldü.

**d) Jelden Membrana Aktarma:**

- 1) Yürütme işleminden sonra jel kasetleri tanktan alınarak spatula ile yanlarından kaldırılarak açıldı. Jelin üst ve alt kısmı düzgün bir şekilde kesilerek atıldı.
- 2) Jelin kurumaması için kasetin alt kısmıyla beraber jel saf su içerisine alındı.
- 3) Blotlama cihazı açılarak kapak kısmına sünger metal kısmı sağ üst köşeye gelecek şekilde yerleştirildi.
- 4) Cihaza yerleştirilecek olan alt anod tabakanın üstü açıldı ve cihaza tablasıyla yerleştirildi.
- 5) Jel kasedi jelle beraber su içinde hafifçe çalkalanarak jel ve kaset arasında hava girmesi sağlanarak kolay ayırım gerçekleştirilmesi sağlandı.
- 6) Ayrılan jel yavaşça alınarak anod tabakanın üzerine yerleştirildi ve rulo ile tek yönlü rulo yapılarak hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
- 7) Filtre kağıdı suda ıslatılarak jelin üzerine serildi ve rulo ile kabarcıklar uzaklaştırıldı.
- 8) Üst katod tabakası filtre kağıdının üzerine yerleştirilerek kapatıldı. Cihaz başlatıldı ve 13 dakika sonra işlem tamamlandı.
- 9) Bu süreç sonunda proteinler membrana geçmiş oldu. Alt plaka alınarak jel atıldı.

- 10) Membran belirlenen yerlerden bistüri ile kesilerek ayrıldı ve kurumaması için suyun içinde bekletildi.

**e) Bloklama Aşaması ve Birincil Antikor Bağlanması:**

- 1) Bloklama solüsyonu 14 ml ultra saf su, 4 ml Blocking Diluent Past A ve 2 ml Blocking Diluent Past B karıştırılarak hazırlandı.
- 2) Membran içerisindeki su boşaltılarak bloklama solüsyonu eklendi ve çalkalayıcı inkübatörde 20 devirde 1 saat çalkalandı.
- 3) Birkaç kez ultra saf su ile yıkama yapıldı.
- 4) LC3 antikor 1:250 oranında  $\beta$ -aktin antikor ise 1:2000 oranında bloklama solüsyonu ile seyreltilerek 10 ml birincil antikorlar hazırlandı.
- 5) Membran üzerine birincil antikor dökülerek bir gece +4 °C'de en düşük devirde çalkalandı.

**f) Yıkama ve İkincil Antikor Bağlanması:**

- 1) Yıkama solüsyonu 150 ml ultra saf su ve 10 ml Antibody Wash Solution (16x) karıştırılarak hazırlandı.
- 2) Bir gece birincil antikorda bekleyen membranlar 3 kere 5 dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama solüsyonuyla yıkandıktan sonra bir kere 5 dakika ultra saf su ile yıkandı.
- 3) İkincil antikor çözeltisi membran üzerine döküldükten sonra oda sıcaklığında 1 saat 300 devirde çalkalamalı etüvde inkübe edildi. İşlem sonrası ikincil antikor falkona toplandı.
- 4) Membranlar 3 kere 5 dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama solüsyonuyla yıkandıktan sonra bir kere 5 dakika ultra saf su ile yıkandı.

**g) Kemilüminesans Bağlanması ve Görüntüleme:**

- 1) Bir membran için 2,375 ml kemilüminesans substratı ve 0,125 ml sinyal artırıcı karıştırılarak hazırlandı ve alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu.

- 2) Membran karanlık bir yere alındıktan sonra kemilüminesan çözeltisi tüm yüzeye yayılarak uygulandı.
- 3) 4 dakika beklendikten sonra görüntüleme gerçekleştirildi.

## **İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizi, Trakya Üniversitesi lisanslı SPSS 20 (IBM, ABD) programı ile yapıldı.

Tali analizinde yazılım ile elde edilen canlı hücre, ölü hücre ve apoptotik hücre değerleri ve qRT-PCR gerçek zamanlı gen ifadesi çalışmalarında  $\Delta\Delta C_t$  metodu ile elde edilen ekspresyon değerlerinin arasındaki farklar tek yönlü ANOVA analizi ile karşılaştırıldı. Elde edilen "*p*" değerleri 0.05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## BULGULAR

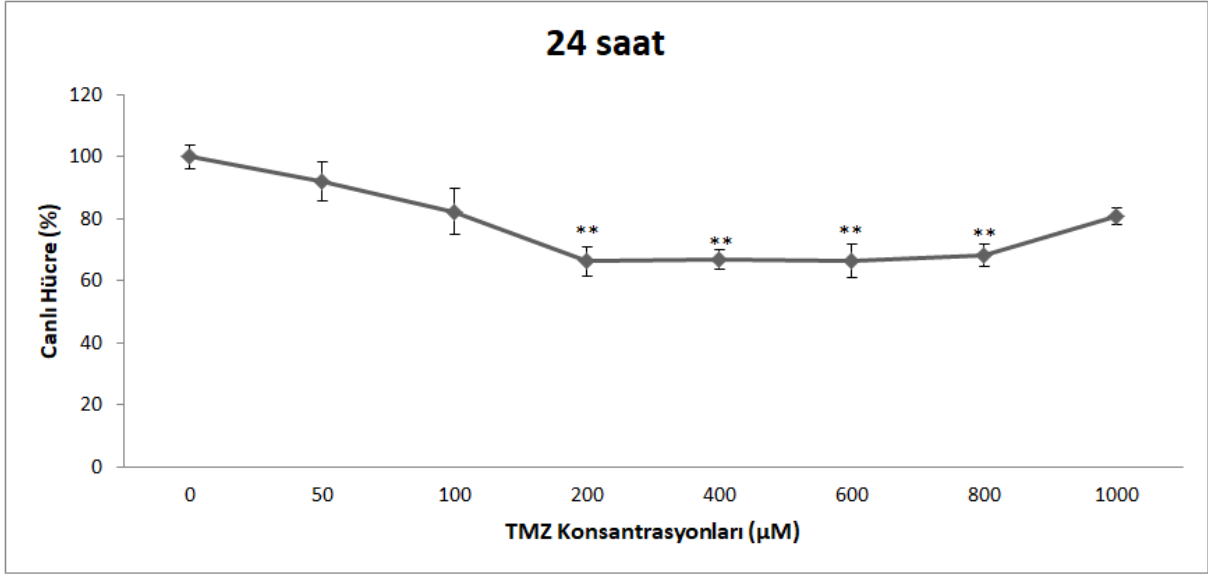
### HÜCRE CANLILIK ANALİZLERİ

Çalışma kapsamında U87 glioblastoma hücrelerine temozolomid (TMZ) ve naringin (NAR) uygulamaları hem tek hem de kombine halde yapıldı. Temozolomid ve naringin için hücrelerin %50'sini öldüren letal doz (LD<sub>50</sub>) belirleme çalışmaları aşağıdaki şekilde yapıldı.

#### Temozolomid (TMZ)

U87 glioblastoma hücrelerinde 50-1000 µM doz aralıklarında uygulanan temozolomidin 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 19'da verildi.

Temozolomid uygulamasından 24 saat sonra U87 hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (F=7,192; sd=7-32; p<0,01) (F; varyans analizi, sd; standart sapma). Yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonunda hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 200 µM dozunda olduğu ve bu dozda hücre canlılığının %66,20±4,71 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığı ise 50 µM TMZ dozunda %92,08±6,32 olarak belirlendi (Tablo 7).

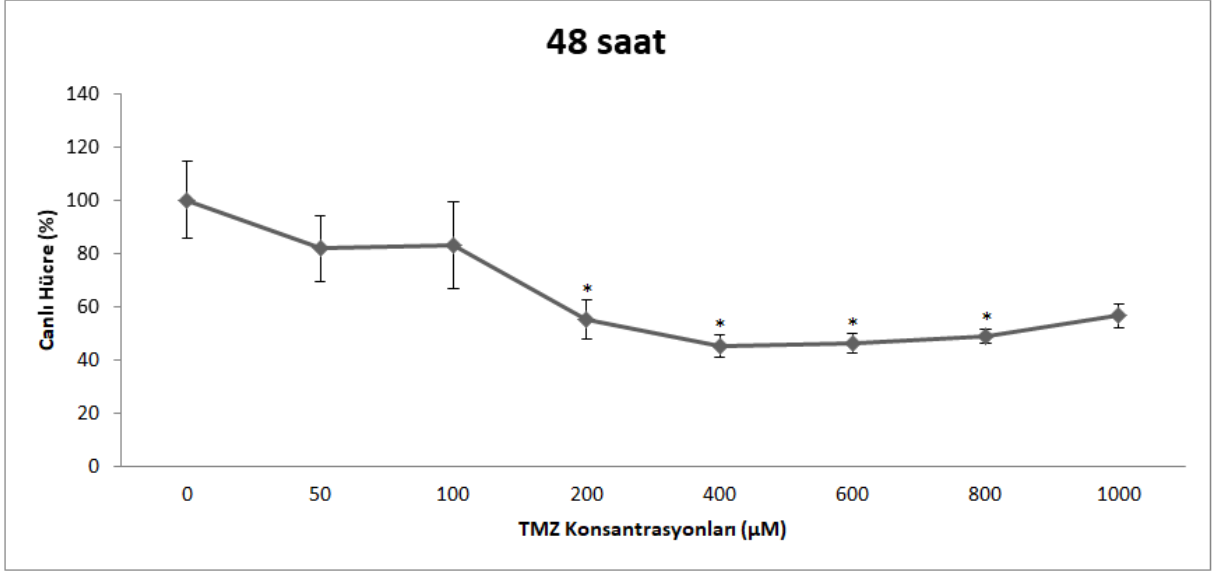


**Şekil 19. U87 hücre serisinde 24 saatlik TMZ dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=5, ortalama±standart hata. \*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) \*\*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.01$ )**

U87 glioblastoma hücrelerinde 50-1000 µM doz aralıklarında uygulanan Temozolomidin 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 20’de verildi.

Temozolomid uygulamasından 48 saat sonra U87 hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $F=4,567$ ;  $sd=7-32$ ;  $p < 0,01$ ). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonunda kontrole göre en yüksek hücre canlılığının 100 µM (%83,11±16,37), en düşük hücre canlılığının ise 400 µM dozunda (%45,25±4,13) olduğu belirlendi (Tablo 7).

U87 hücre serisinde 48 saatlik TMZ uygulaması sonucu kontrole göre belirlenen ölüm oranları analiz edilerek 48 saat için TMZ’nin %50 canlılık oranını gösteren LD<sub>50</sub> değeri 330 µM olarak belirlendi.



**Şekil 20. U87 hücre serisinde 48 saatlik TMZ dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=5, ortalama±standart hata. \*Ortalamlar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) \*\*Ortalamlar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.01$ )**

### **İnsan Glioblastoma U87 Hücre Serisinde TMZ Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi**

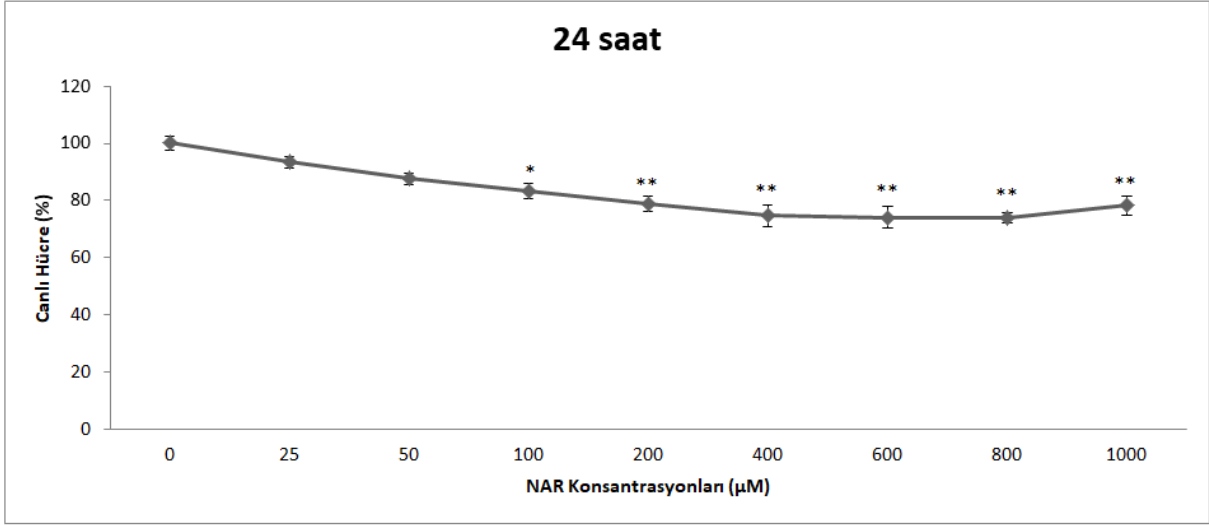
Farklı konsantrasyon ve sürelerde TMZ uygulaması yapılan U87 hücre serilerinde belirlenen % canlılık oranları Tablo 7’de verildi. Tablo 7 incelendiğinde en yüksek canlılık oranının 24 saatlik TMZ uygulamasında en düşük canlılık oranının ise 48 saatlik TMZ uygulamasında olduğu belirlendi. Buna ilaveten artan TMZ konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu saptandı. Elde edilen bulgulara göre çalışmada hücrelere uygulanacak TMZ konsantrasyonları 330 µM ( $LD_{50}$ ) ve 660 µM ( $2LD_{50}$ ) olarak belirlendi.

**Tablo 7. U87 hücre serisinde 50-1000 µM doz aralıklarında TMZ uygulamasının hücre canlılığına etkisi. N=5, ortalama±standart hata. \*Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05)**

%Canlı Hücre Tablosu			
Doz	N	24 Saat	48 Saat
Kontrol	5	99,90±3,89 <sup>d</sup>	100,07±14,55 <sup>c</sup>
50 µM TMZ	5	92,08±6,32 <sup>cd</sup>	81,67±12,57 <sup>bc</sup>
100 µM TMZ	5	82,22±7,51 <sup>bc</sup>	83,11±16,37 <sup>bc</sup>
200 µM TMZ	5	66,20±4,71 <sup>a</sup>	55,01±7,50 <sup>ab</sup>
400 µM TMZ	5	66,77±3,19 <sup>a</sup>	45,25±4,13 <sup>a</sup>
600 µM TMZ	5	66,44±5,28 <sup>a</sup>	46,07±3,82 <sup>a</sup>
800 µM TMZ	5	68,05±3,52 <sup>ab</sup>	48,87±2,71 <sup>a</sup>
1000 µM TMZ	5	80,75±2,51 <sup>abc</sup>	56,45±4,62 <sup>ab</sup>

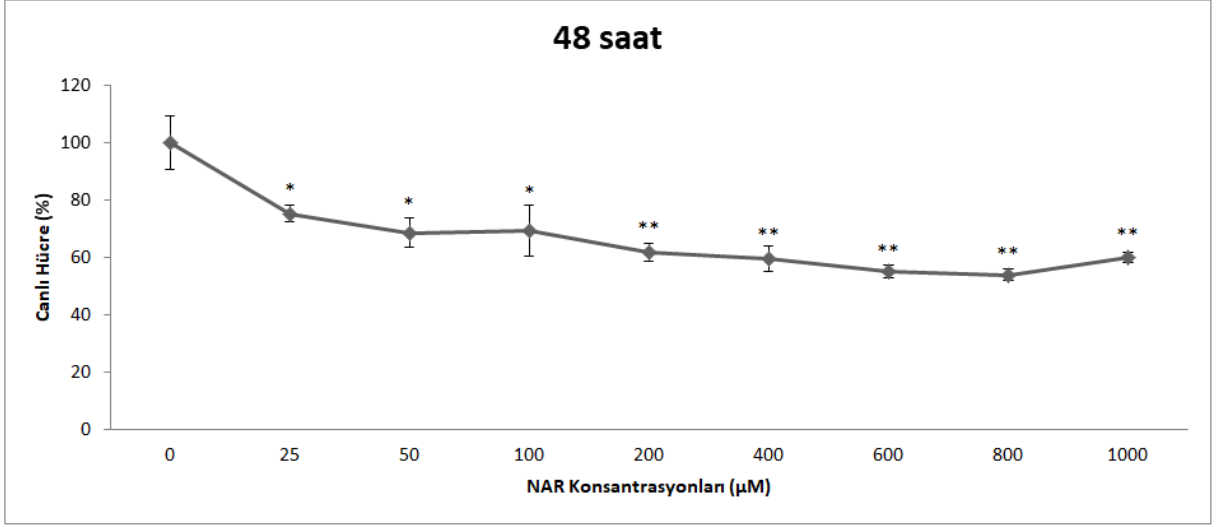
### **Naringin (NAR)**

U87 glioblastoma hücrelerinde 25-1000 µM doz aralıklarında uygulaması yapılan Naringinin 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 21’de verildi. Naringin uygulamasından 24 saat sonra U87 hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı (F=10,989; sd=8-36; p<0,01). Yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonunda hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 800 µM dozunda olduğu ve bu dozda hücre canlılığının %73,81±1,72 olduğu, en yüksek hücre canlılığının ise 25 µM dozunda %93,45±2,04 olduğu belirlendi (Tablo 8).



**Şekil 21. U87 hücre serisinde 24 saatlik NAR dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=5, ortalama±standart hata. \*Ortalamlar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) \*\*Ortalamlar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.01$ )**

U87 glioblastoma hücrelerinde 25-1000 µM doz aralıklarında uygulaması yapılan Naringinin 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 22'de verildi. Naringin uygulamasından 48 saat sonra U87 hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı ( $F=7,420$ ;  $sd=8-36$ ;  $p < 0,01$ ). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonunda kontrole göre en yüksek hücre canlılığının 25 µM (%75,12±2,74), en düşük hücre canlılığının ise 800 µM dozunda (%53,79±2,07) olduğu belirlendi (Tablo 8).



**Şekil 22.** U87 hücre serisinde 48 saatlik NAR dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=5, ortalama±standart hata. \*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) \*\*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.01$ )

### İnsan Glioblastoma U87 Hücre Serisinde NAR Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde NAR uygulaması yapılan U87 hücre serilerinde belirlenen % canlılık oranları Tablo 8'de verildi. Tablo 8 incelendiğinde en yüksek canlılık oranının 24 saatlik NAR uygulamasında, en düşük canlılık oranının ise 48 saatlik NAR uygulamasında olduğu belirlendi. Buna ilaveten artan NAR konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu saptandı. Elde edilen bulgulara göre NAR için 100 µM ve 200 µM dozlarının uygulanmasına karar verildi.

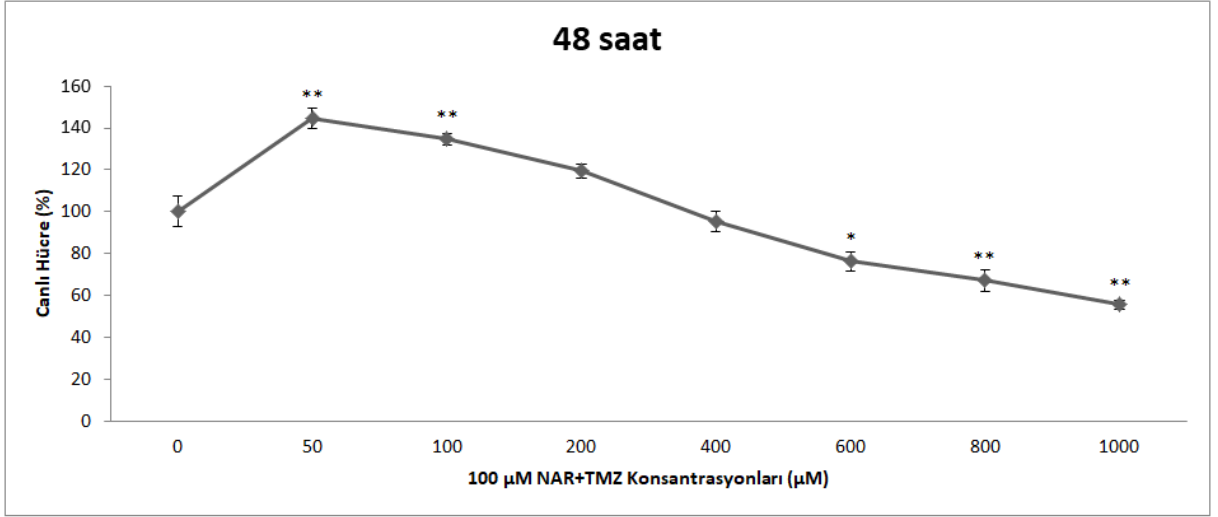
**Tablo 8. U87 hücre serisinde 25-1000 µM doz aralıklarında NAR uygulamasının hücre canlılığına etkisi. N=5, ortalama±standart hata. \*Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05)**

%Canlı Hücre Tablosu			
Doz	N	24 Saat	48 Saat
Kontrol	5	100,08±2,37 <sup>e</sup>	99,98±9,41 <sup>c</sup>
25 µM NAR	5	93,45±2,04 <sup>de</sup>	75,12±2,74 <sup>b</sup>
50 µM NAR	5	87,55±2,15 <sup>cd</sup>	68,49±5,05 <sup>ab</sup>
100 µM NAR	5	83,31±2,64 <sup>bc</sup>	69,12±8,86 <sup>ab</sup>
200 µM NAR	5	78,94±2,69 <sup>ab</sup>	61,66±3,25 <sup>ab</sup>
400 µM NAR	5	74,66±3,81 <sup>ab</sup>	59,47±4,52 <sup>ab</sup>
600 µM NAR	5	74,06±3,71 <sup>a</sup>	54,93±2,39 <sup>a</sup>
800 µM NAR	5	73,81±1,72 <sup>a</sup>	53,79±2,07 <sup>a</sup>
1000 µM NAR	5	78,22±3,31 <sup>ab</sup>	59,98±1,85 <sup>ab</sup>

Naringin ve TMZ'nin tek olarak uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılığı verilerine göre maddelerin tek olarak uygulamalarında doz-zaman ilişkisinde en etkili zamanın 48. saat olduğu belirlendiğinden NAR ve TMZ uygulamalarının belirlenen dozlarda 48 saat süre ile uygulanmasına karar verildi.

### **Naringin ile Temozolomidin Birlikte Uygulanması**

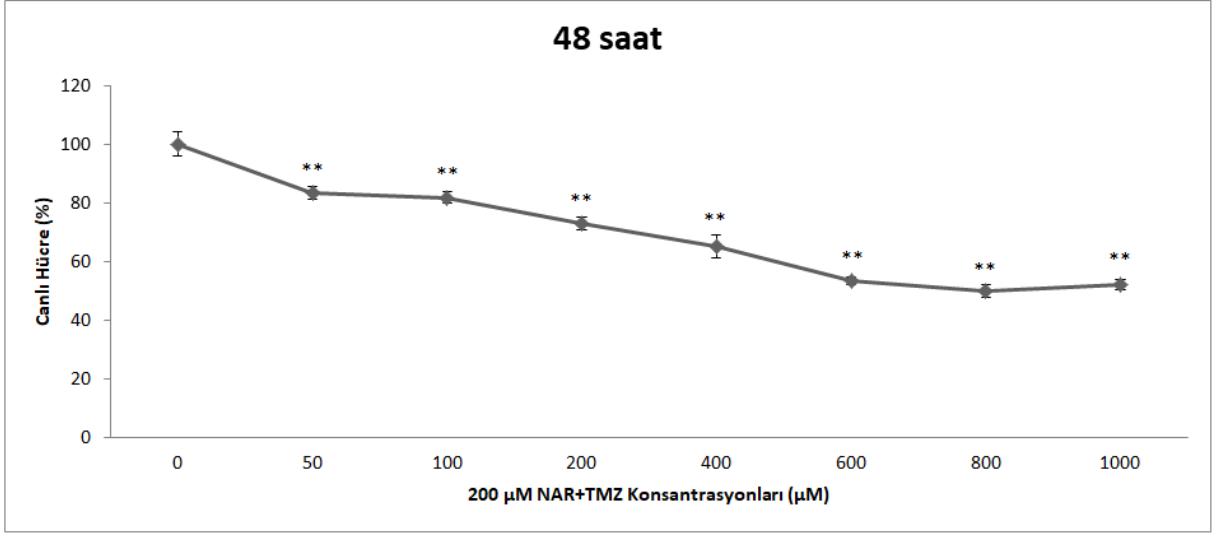
Naringin (100 µM) ve 50-1000 µM TMZ uygulaması yapılan U87 glioblastoma hücrelerinde uygulamadan 48 saat sonra % hücre canlılık oranları Şekil 23'te verildi. 100 µM NAR ve farklı TMZ dozlarının uygulamasından 48 saat sonra U87 hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (F=49,189; sd=7-40; p<0,01). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonunda kontrole göre en düşük hücre canlılığının 100 µM Naringin ile birlikte 1000 µM TMZ uygulaması yapılan grupta (%55,57±2,23), en yüksek hücre canlılığının ise 100 µM Naringin ile birlikte ve 50 µM TMZ uygulaması yapılan grupta (%144,39±4,82) olduğu belirlendi (Tablo 9).



**Şekil 23.** U87 hücre serisinde 48 saatlik 100 µM NAR ve TMZ dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=5, ortalama±standart hata. \*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) \*\*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.01$ )

Naringin (200 µM) ve 50-1000 µM doz aralıklarında TMZ uygulaması yapılan U87 glioblastoma hücrelerinde uygulamadan 48 saat sonra % hücre canlılık oranları Şekil 24'de verildi. 200 µM Naringin ve farklı TMZ dozlarının uygulamasından 48 saat sonra U87 hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ( $F=46,799$ ;  $sd=7-40$ ;  $p < 0,01$ ). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonunda kontrole göre en düşük hücre canlılığının 200 µM Naringin ile birlikte 800 µM TMZ uygulaması yapılan grupta ( $\%49,75 \pm 2,17$ ), en yüksek hücre canlılığının ise 200 µM Naringin ile birlikte 50 µM TMZ uygulaması yapılan grupta ( $\%83,39 \pm 2,12$ ) olduğu belirlendi (Tablo 9).





**Şekil 24. U87 hücre serisinde 48 saatlik 200 µM NAR ve TMZ dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=5, ortalama±standart hata. \*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05) \*\*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.01)**

### **İnsan Glioblastoma U87 Hücre Serisinde NAR ve TMZ Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi**

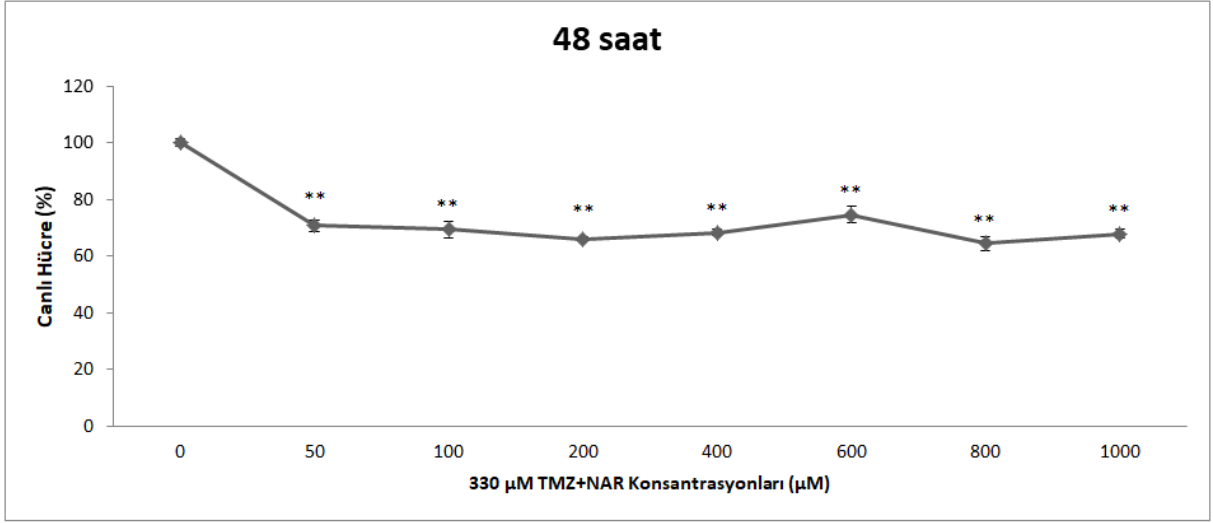
Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde Naringin (100 ve 200 µM) ve 50-1000 µM TMZ uygulaması yapılan U87 hücre serilerinde belirlenen % canlılık oranları Tablo 9’da verildi. Tablo 9 incelendiğinde en yüksek canlılık oranının 100 µM NAR ile birlikte 50 µM TMZ uygulaması yapılan grupta, en düşük canlılık oranının ise 200 µM NAR ile birlikte 800 µM TMZ uygulaması yapılan grupta olduğu, buna ilaveten artan TMZ-NAR konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu belirlendi.

**Tablo 9. U87 hücre serisinde 48 saatlik 100 ve 200 µM NAR ile 50-1000 µM doz aralıklarında TMZ uygulamasının hücre canlılığına etkisi. N=5, ortalama±standart hata. \*Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05)**

<b>NAR ve TMZ Doz ve %Canlı Hücre Tablosu</b>			
<b>Doz</b>	<b>N</b>	<b>100 µM NAR</b>	<b>200 µM NAR</b>
Kontrol	5	99,99±7,30 <sup>c</sup>	100,00±4,21 <sup>e</sup>
50 µM TMZ	5	144,39±4,82 <sup>e</sup>	83,39±2,12 <sup>d</sup>
100 µM TMZ	5	134,68±2,56 <sup>e</sup>	81,74±1,99 <sup>d</sup>
200 µM TMZ	5	119,37±3,14 <sup>d</sup>	72,83±2,07 <sup>c</sup>
400 µM TMZ	5	95,25±4,65 <sup>c</sup>	64,88±3,93 <sup>b</sup>
600 µM TMZ	5	76,20±4,33 <sup>b</sup>	53,23±1,19 <sup>a</sup>
800 µM TMZ	5	67,10±5,32 <sup>ab</sup>	49,75±2,17 <sup>a</sup>
1000 µM TMZ	5	55,57±2,23 <sup>a</sup>	52,14±1,73 <sup>a</sup>

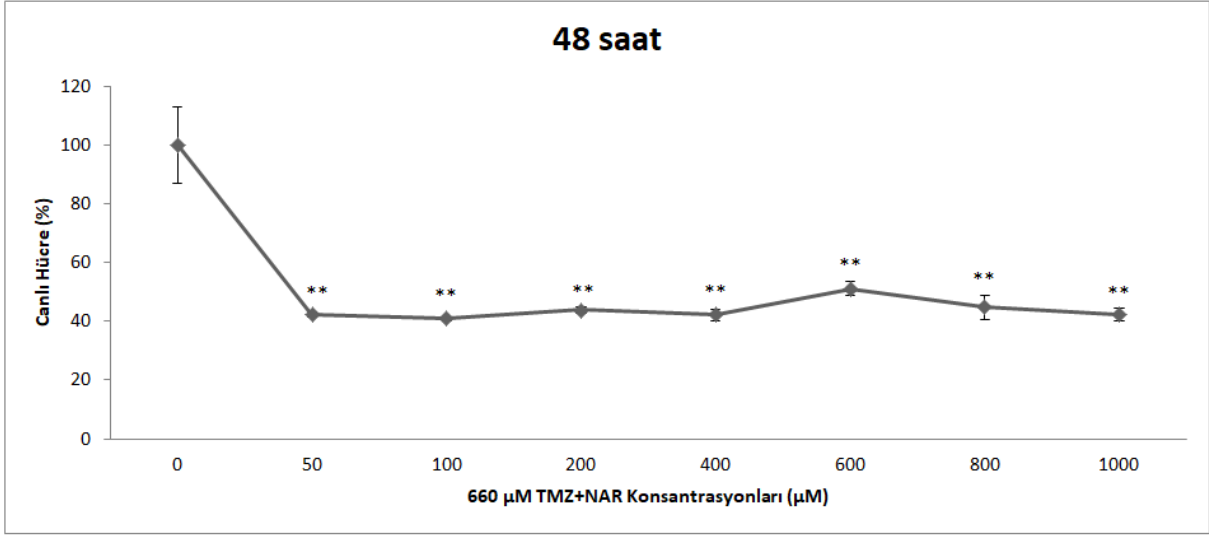
### **Temozolomid ile Naringinin Birlikte Uygulanması**

Temozolomid LD<sub>50</sub> dozu olan 330 µM ile birlikte 50-1000 µM NAR uygulaması yapılan U87 glioblastoma hücrelerinde uygulamadan 48 saat sonra belirlenen hücre canlılığı oranları Şekil 25’de verildi. 330 µM Temozolomid ve farklı NAR dozlarının uygulamasından 48 saat sonra U87 hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (F=30,942; sd=7-40; p<0,01). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonunda kontrole göre en düşük hücre canlılığının 330 µM TMZ ile birlikte 800 µM NAR uygulaması yapılan grupta (%64,55±2,46), en yüksek hücre canlılığının ise 330 µM TMZ ile birlikte 600 µM NAR uygulaması yapılan grupta (%74,61±2,97) olduğu belirlendi (Tablo 10).



**Şekil 25. U87 hücre serisinde 48 saatlik 330 µM TMZ (LD50) ve NAR dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=5, ortalama±standart hata. \*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) \*\*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.01$ )**

Temozolomid (660 µM) ve 50-1000 µM NAR dozlarının uygulandığı U87 glioblastoma hücrelerinde uygulamadan 48 saat sonra belirlenen hücre canlılıkları Şekil 26'da verildi. 660 µM Temozolomid ve NAR dozlarının uygulamasından 48 saat sonra U87 hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ( $F=16,126$ ;  $sd=7-40$ ;  $p < 0,01$ ). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonunda kontrole göre en düşük hücre canlılığının 660 µM TMZ ve 100 µM NAR uygulaması yapılan grupta ( $\%40,84 \pm 0,76$ ), en yüksek hücre canlılığının ise 660 µM TMZ ve 600 µM NAR uygulaması yapılan grupta ( $\%51,17 \pm 2,39$ ) olduğu saptandı (Tablo 10).



**Şekil 26. U87 hücre serisinde 48 saatlik 660 µM TMZ (2LD50) ve NAR dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi. N=5, ortalama±standart hata. \*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) \*\*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.01$ )**

### **İnsan Glioblastoma U87 Hücre Serisinde TMZ ve NAR Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi**

Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde TMZ (330 ve 660 µM) ve NAR (50-1000 µM) uygulaması yapılan U87 hücre serilerinde belirlenen % canlılık oranları Tablo 10'da verildi. Tablo 10 incelendiğinde en yüksek canlılık oranının 330 µM TMZ ve 50 µM NAR uygulamalarında, en düşük canlılık oranının ise 660 µM TMZ ve 100 µM NAR uygulamalarında olduğu belirlendi. Buna ilaveten artan TMZ/NAR konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu saptandı.

**Tablo 10. U87 hücre serisinde 48 saatlik 330 µM ve 660 µM TMZ ile 50-1000 µM doz aralıklarında NAR uygulamasının hücre canlılığına etkisi. N=5, ortalama±standart hata. \*Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05)**

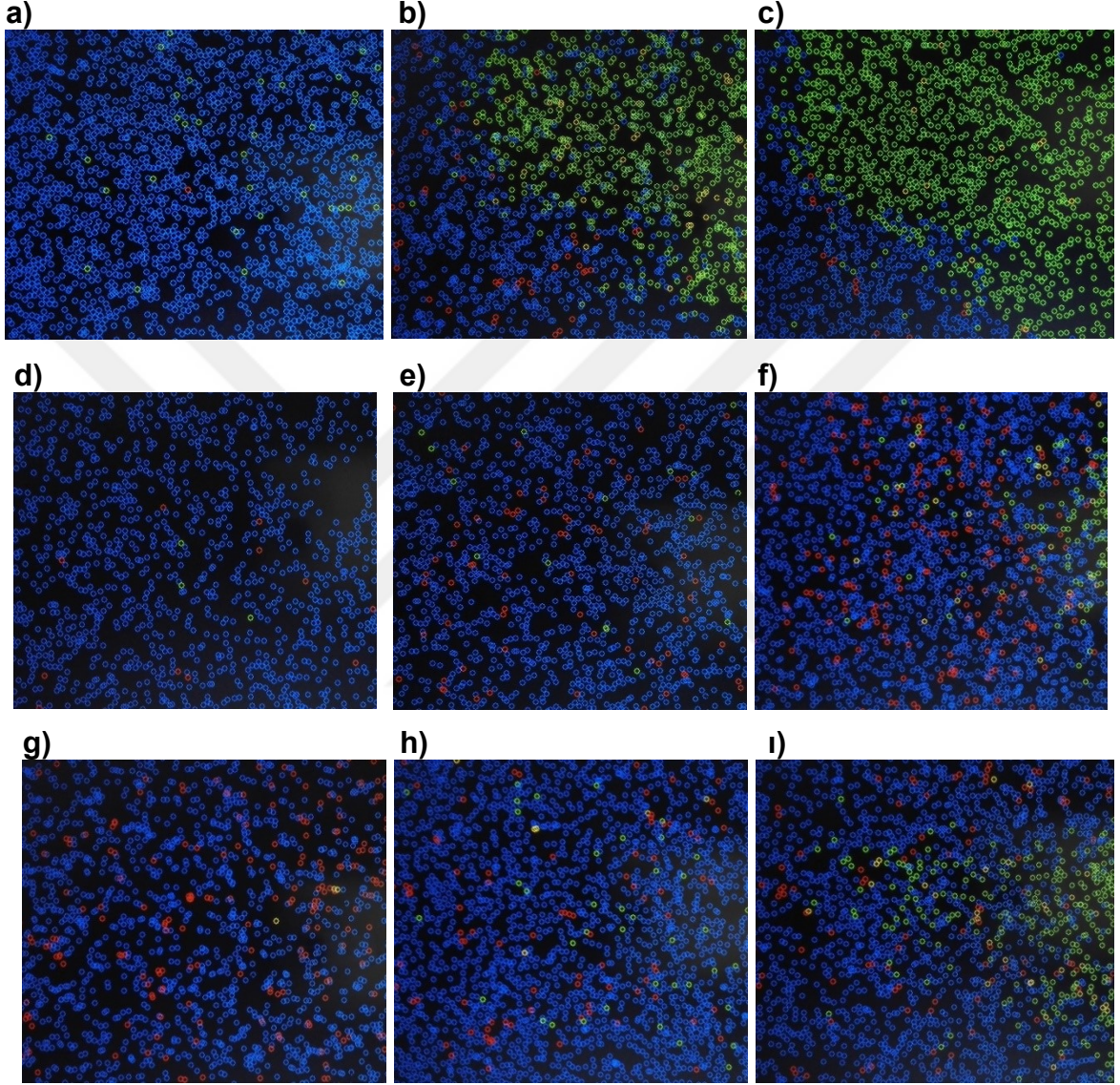
<b>NAR ve TMZ Doz ve %Canlı Hücre Tablosu</b>			
<b>Doz</b>	<b>N</b>	<b>330 µM TMZ</b>	<b>660 µM TMZ</b>
Kontrol	5	100,00±1,41 <sup>c</sup>	100,00±12,87 <sup>b</sup>
50 µM NAR	5	70,71±2,09 <sup>ab</sup>	42,38±0,84 <sup>a</sup>
100 µM NAR	5	69,33±2,78 <sup>ab</sup>	40,84±0,76 <sup>a</sup>
200 µM NAR	5	65,99±0,69 <sup>a</sup>	43,82±1,29 <sup>a</sup>
400 µM NAR	5	68,29±1,17 <sup>ab</sup>	42,19±1,88 <sup>a</sup>
600 µM NAR	5	74,61±2,97 <sup>b</sup>	51,17±2,39 <sup>a</sup>
800 µM NAR	5	64,55±2,46 <sup>a</sup>	44,74±4,20 <sup>a</sup>
1000 µM NAR	5	67,92±1,71 <sup>a</sup>	42,36±2,04 <sup>a</sup>

### **TALI GÖRÜNTÜ TABANLI SİTOMETRE ANALİZİ**

Çalışma kapsamında Naringin flavonoidinin glioblastoma tedavisinde kullanılan Temozolomid ile etkileşimlerinin belirlenmesi için madde uygulamalarının canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdelere etkisi Tali Görüntü Tabanlı Sitometre ile analiz edildi. Bu yöntemle göre Anneksin V ve Propidyum iyodid ile muamele edilen kontrol ve uygulama gruplarındaki hücreler canlı, ölü ya da apoptotik olma durumlarına göre boyanmaktadır. Canlı hücreler bu boyaları içine almazken, ölü hücreler Anneksin V ve Propidyum iyodid ile boyanarak kırmızı (Anneksin V-/PI+) veya sarı (Anneksin V+/PI+) sinyal vermektedir. Apoptotik hücreler ise yeşil sinyal (Anneksin V+/PI-) vermektedir.

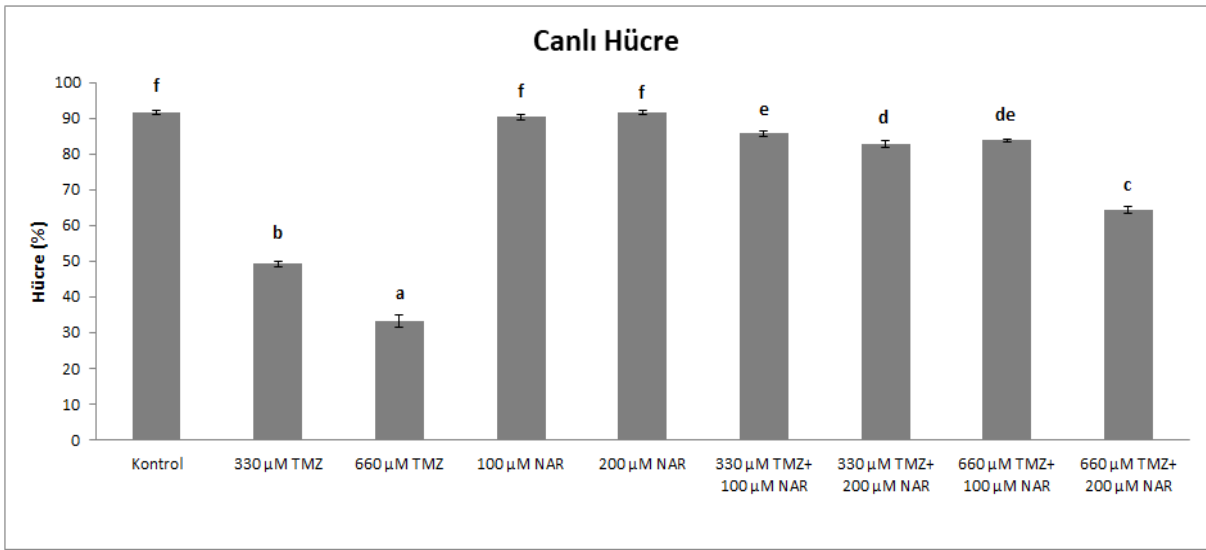
Temozolomid ve Naringinin tek başına ve kombinasyonlarının uygulandığı U87 glioblastoma hücrelerinde uygulama dozlarının 48 saat sonra canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdelere etkisi Şekil 27’de verildi. Tali görüntü tabanlı sitometre analizi ile yapılan çalışma sonucu boyanan hücreler daire şeklinde gösterildi. Şekilde

canlı hücreler mavi daire, ölü hücreler kırmızı veya sarı daire ve apoptotik hücreler yeşil daire ile gösterildi.



**Şekil 27. U87 hücre serisinde a) Kontrol b) 330 µM TMZ ve c) 660 µM TMZ d) 100 µM NAR e) 200 µM NAR f) 330 µM TMZ+100 µM NAR g) 330 µM TMZ+200 µM NAR h) 660 µM TMZ+100 µM NAR ı) 660 µM TMZ+200 µM NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda Annexin V ve Propidyum iyodür (PI) boyaması sonucu boyanan hücrelerin gösterimi**

Yapılan analiz sonunda 330  $\mu$ M ve 660  $\mu$ M TMZ ve kombinasyon gruplarında 48 saat sonra canlı hücre oranlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı (F=619,994; sd=8-35; p<0,01). Buna göre kontrole kıyasla en yüksek hücre canlılık oranının 200  $\mu$ M NAR uygulaması yapılan grupta (%91,50), en düşük canlılık oranının ise 660  $\mu$ M TMZ uygulaması yapılan grupta (%33,25) olduğu belirlendi (Şekil 28). Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p $\leq$ 0.05)

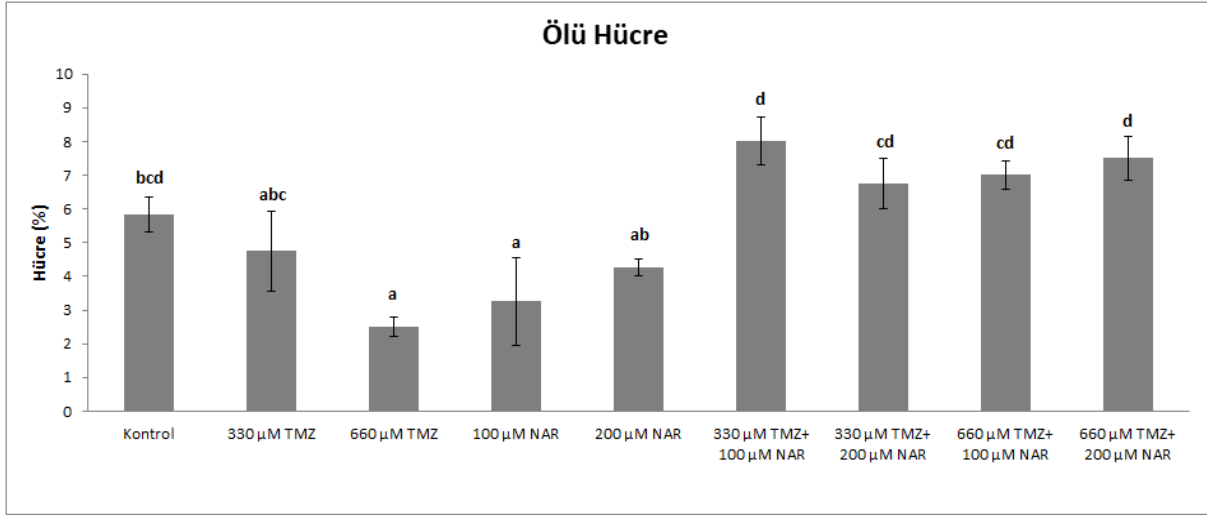


**Şekil 28. U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu ışına vermeyen canlı hücrelerin yüzdesi. N=4, ortalama $\pm$ standart hata**

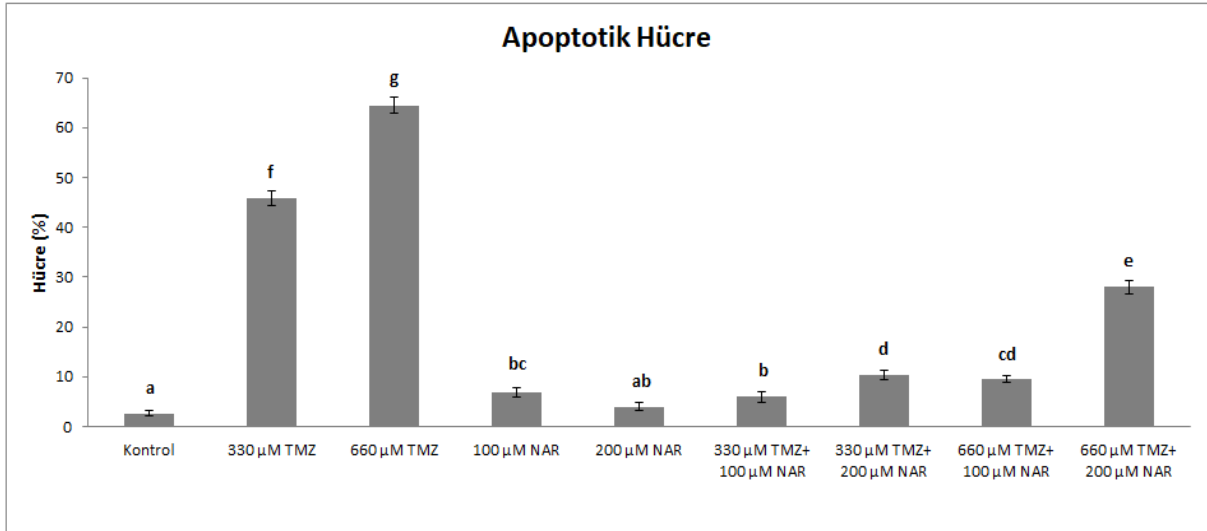
Yapılan analiz sonunda sadece 660  $\mu$ M TMZ grubunda ölü hücre oranında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (F=5,637; sd=8-35; p<0,01). Buna göre kontrole kıyasla en yüksek ölü hücre oranının 330  $\mu$ M TMZ+100  $\mu$ M NAR uygulaması yapılan grupta (%8,00), en düşük ölü hücre oranının ise 660  $\mu$ M TMZ uygulaması yapılan grupta (%2,50) olduğu belirlendi (Şekil 29).

Yapılan analiz sonunda tek ve kombine olarak TMZ ve NAR uygulama gruplarında apoptotik hücre oranlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (F=481,269; sd=8-35; p<0,01). Buna göre kontrole kıyasla en yüksek apoptotik hücre oranının 660  $\mu$ M TMZ uygulaması yapılan grupta (%64,50),

en düşük apoptotik hücre oranının ise 200  $\mu$ M NAR uygulaması yapılan grupta (%4,00) olduğu saptandı (Şekil 30).



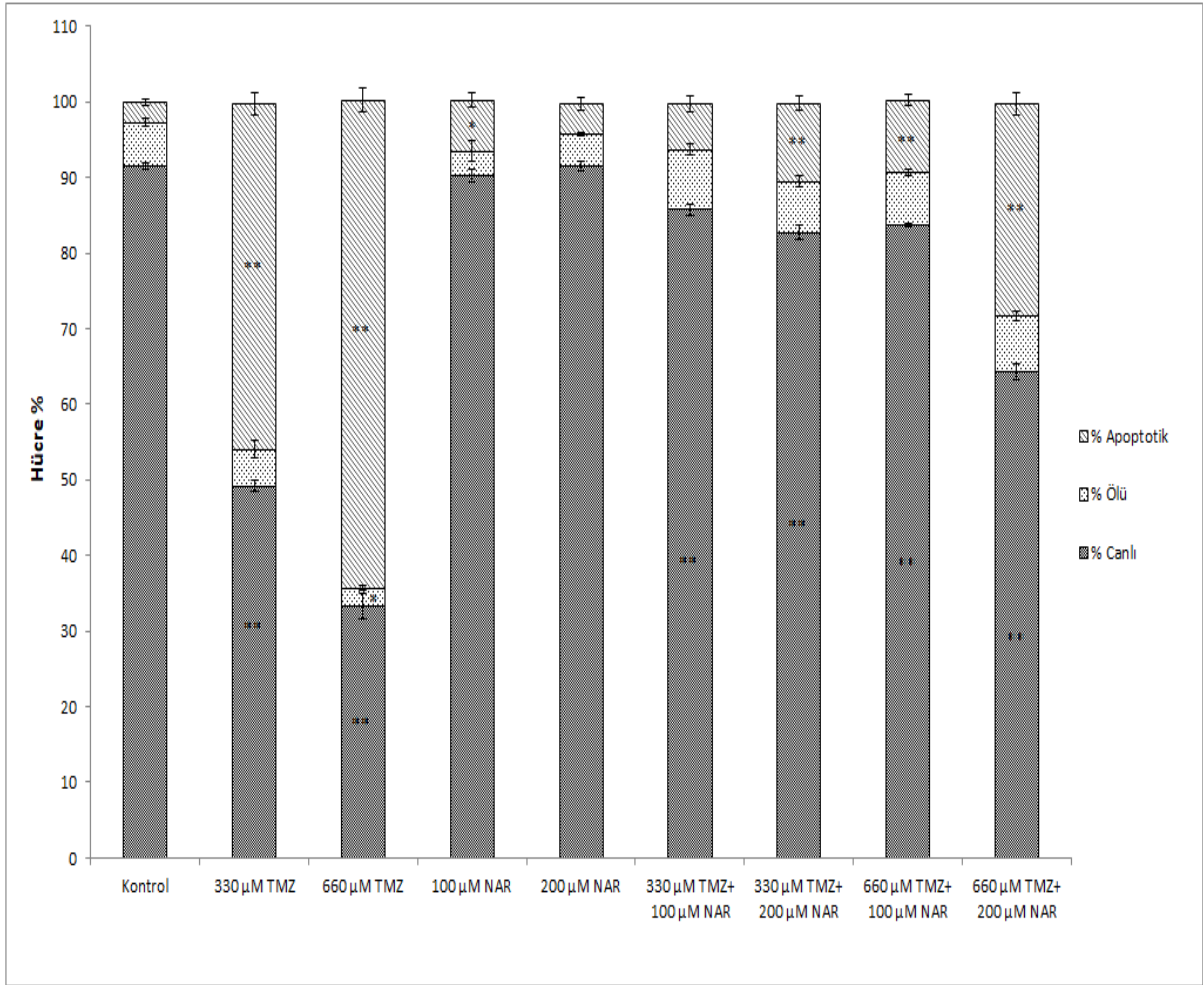
Şekil 29. U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu boyanan ölü hücrelerin yüzdesi. N=4, ortalama $\pm$ standart hata



Şekil 30. U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu boyanan apoptotik hücrelerin yüzdesi. N=4, ortalama $\pm$ standart hata



Tali görüntü tabanlı sitometre analizi ile yapılan çalışma sonucu TMZ, NAR ve kombinasyon uygulaması yapılan U87 glioblastoma hücrelerinde 48 saat sonra uygulama sonucu boyanan hücrelerin toplam sayılan hücrelere oranla canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdelerinin eklemeli grafik olarak gösterimi Şekil 31’de, tablo olarak gösterimi ise Tablo 11’de verildi.



**Şekil 31. U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu boyanan hücrelerin yüzdesi. N=4, ortalama±standart hata. \*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) \*\*Ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.01$ )**

**Tablo 11. U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Tali sitometri ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdeleri**

Uygulama Grupları	% Canlı	% Ölü	% Apoptotik	Toplam Sayılan Hücre Sayısı
Kontrol	91,50	5,83	2,66	96975
330 µM TMZ	49,25	4,75	45,75	94654
660 µM TMZ	33,25	2,50	64,50	81767
100 µM NAR	90,25	3,25	6,75	70978
200 µM NAR	91,50	4,25	4,00	80461
330 µM TMZ+100 µM NAR	85,75	8,00	6,00	114252
330 µM TMZ+200 µM NAR	82,75	6,75	10,25	78529
660 µM TMZ+100 µM NAR	83,75	7,00	9,50	136771
660 µM TMZ+200 µM NAR	64,25	7,50	28,00	87518

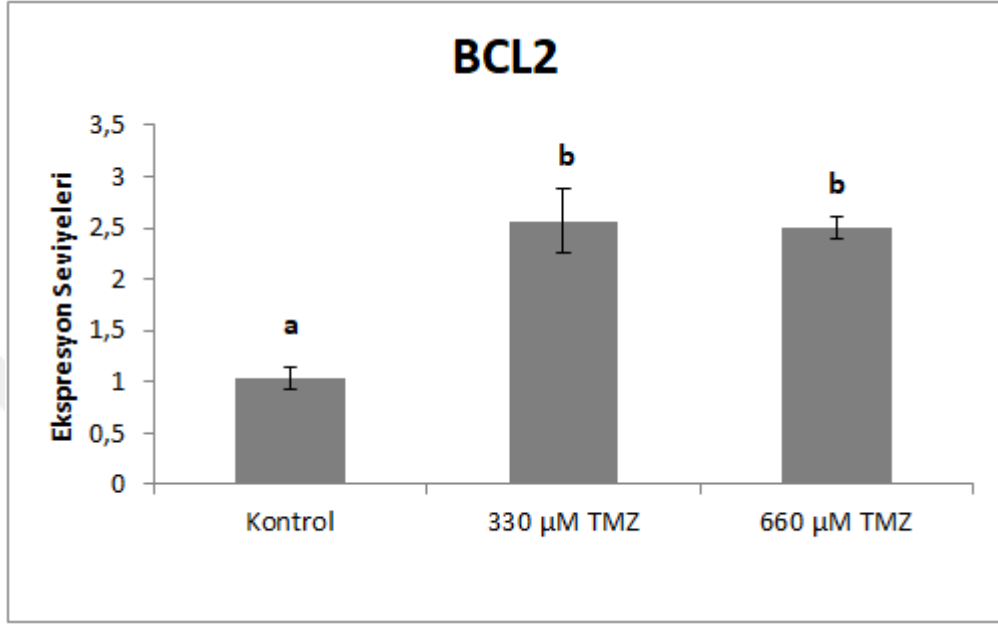
## GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

Yapılan çalışmada U87 insan glioblastoma hücre serisine Temozolomid ve Naringinin tek başına ve kombinasyonlarının uygulaması yapılan gruplarda 48 saat sonra BCL2, BAX, Kaspaz 3, p53, HSP70, Beklin 1, ATG7 ve ATG12 gen ifadelerinde meydana gelen değişimler kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) metodu ile belirlendi. Madde uygulaması yapılan grupların gen ifadelerinde kontrol grubuna kıyasla belirlenen değişiklikler 3 tekrar olmak üzere çalışmaya alındı ve istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı. Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatistiksel olarak farklı olarak ifade edildi (ANOVA-Duncan test,  $p \leq 0.05$ ) Endojen kontrol geni olarak GAPDH geni kullanıldı.

### BCL2 Gen İfadesi

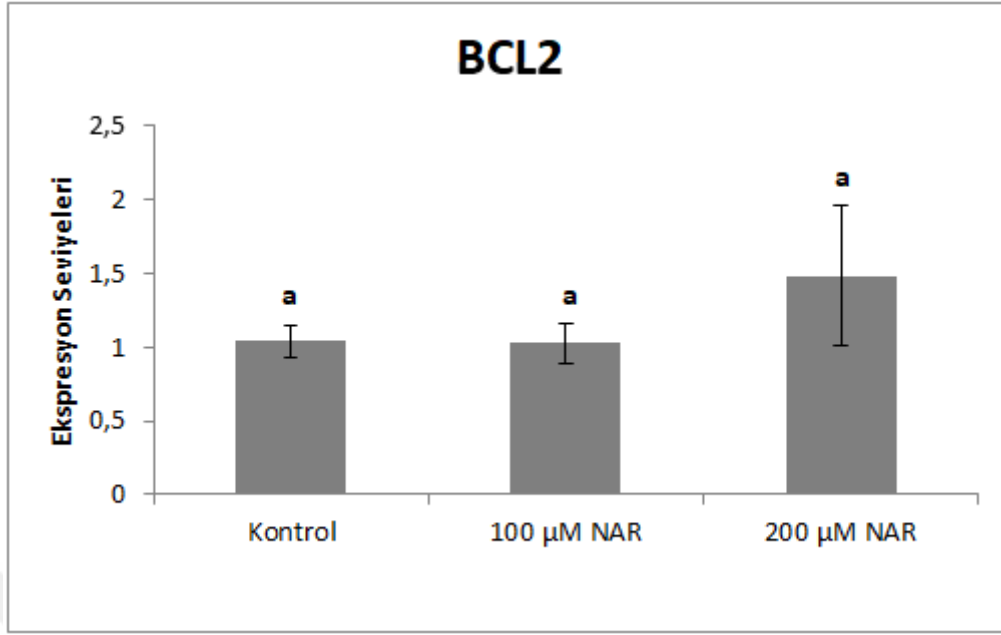
U87 insan glioblastoma hücre serisinde 48 saat TMZ uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinde meydana gelen değişim Şekil 32'de verildi. Buna göre her iki grupta da BCL2 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir

artışın olduğu ve 330  $\mu$ M TMZ uygulaması yapılan hücrelerde bu artışın 2,56 kat, 660  $\mu$ M TMZ uygulamasında ise 2,50 kat olduğu saptandı (F=32,013; sd=2-12; p<0,01).



**Şekil 32. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

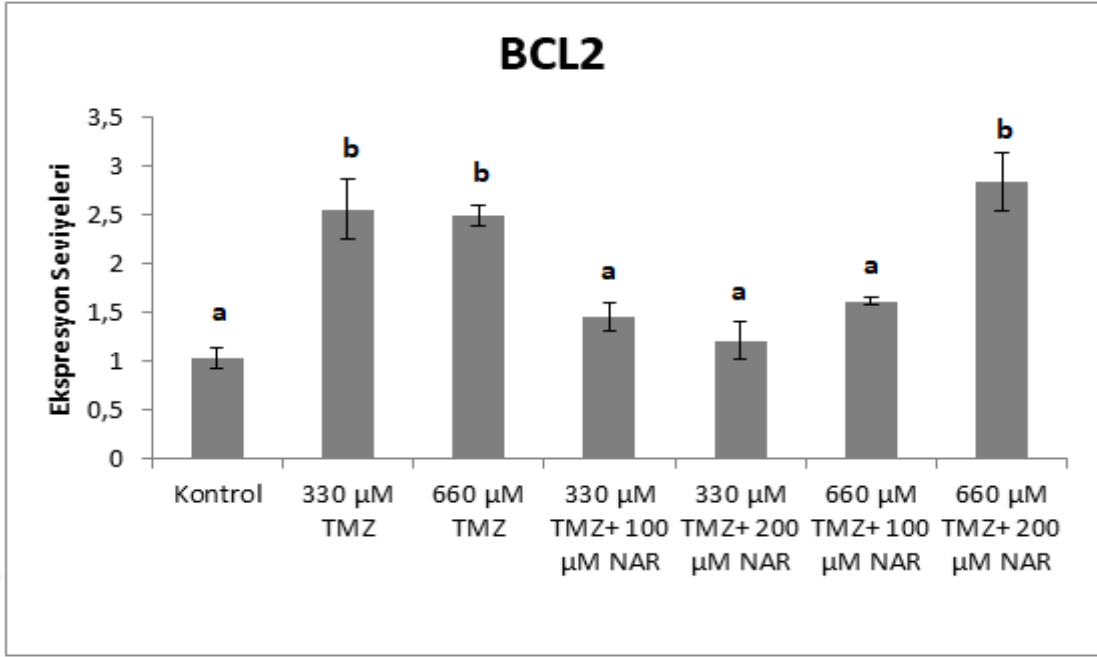
Analiz sonuçlarına göre U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat NAR uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi Şekil 33'de verildi. Buna göre 100  $\mu$ M NAR uygulaması yapılan grupta kontrole göre 1.02 kat, 200  $\mu$ M NAR uygulaması yapılan grupta ise 1,48 kat olarak saptandı ancak bu değişimlerin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi (F=1,257; sd=2-12; p>0,05).



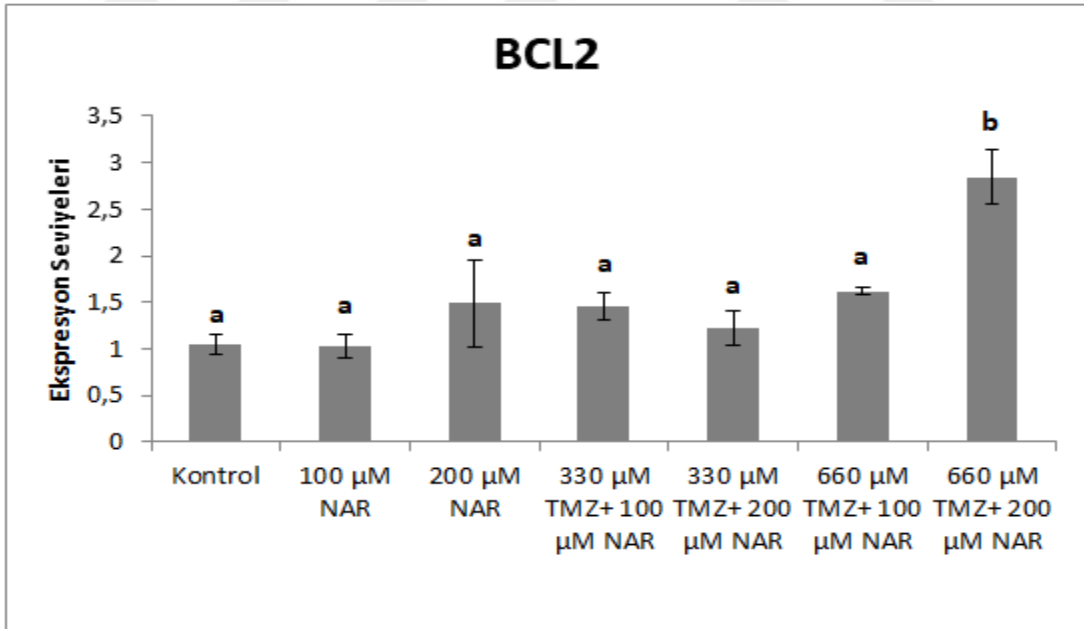
**Şekil 33. U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Temozolomidin tek başına ve naringin ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra BCL2 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 34'de verildi. Buna göre sadece TMZ uygulaması yapılan gruplar ve 660 µM TMZ+200 µM NAR kombinasyon dozunda BCL2 gen ifadesinde kontrole göre 2,84 kat artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ). Ancak diğer kombinasyon gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi ( $p > 0,05$ ).

Naringinin tek başına ve temozolomid ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra BCL2 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 35'de verildi. Buna göre 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan grupta BCL2 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış belirlendi ( $p < 0,05$ ). Ancak diğer NAR ve kombinasyon gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi ( $p > 0,05$ ).



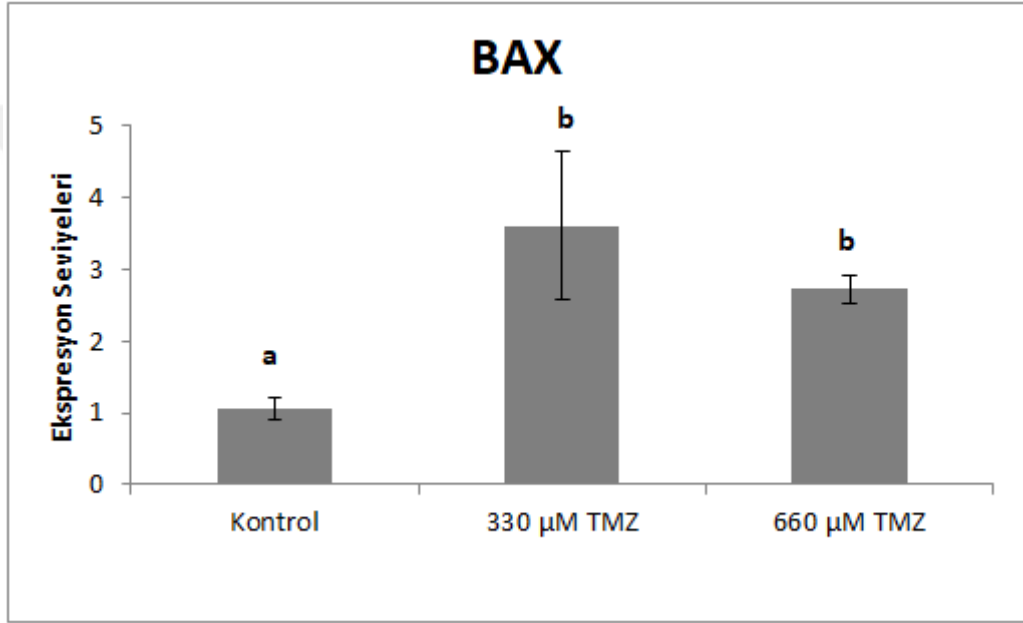
Şekil 34. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata



Şekil 35. U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata

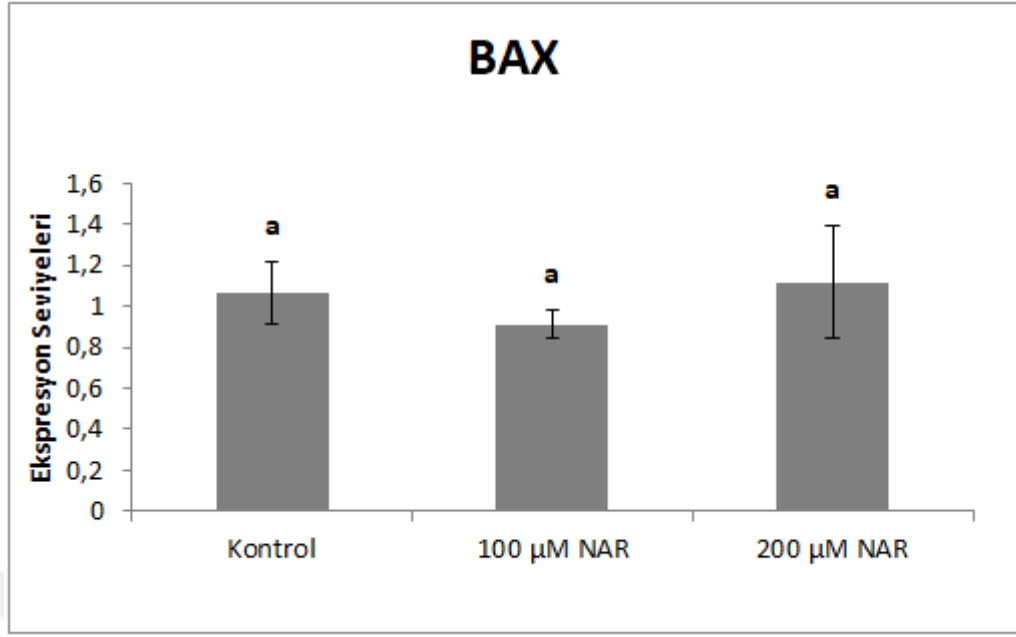
## BAX Gen İfadesi

U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat TMZ uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre BAX gen ifadesinin değişimi Şekil 36'da verildi. Buna göre her iki grupta da BAX gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu ve 330  $\mu$ M TMZ konsantrasyonunda 3,61 kat, 660  $\mu$ M konsantrasyonda ise 2,72 kat olduğu saptandı (F=12,302; sd=2-12; p<0,01).



**Şekil 36. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama $\pm$ standart hata**

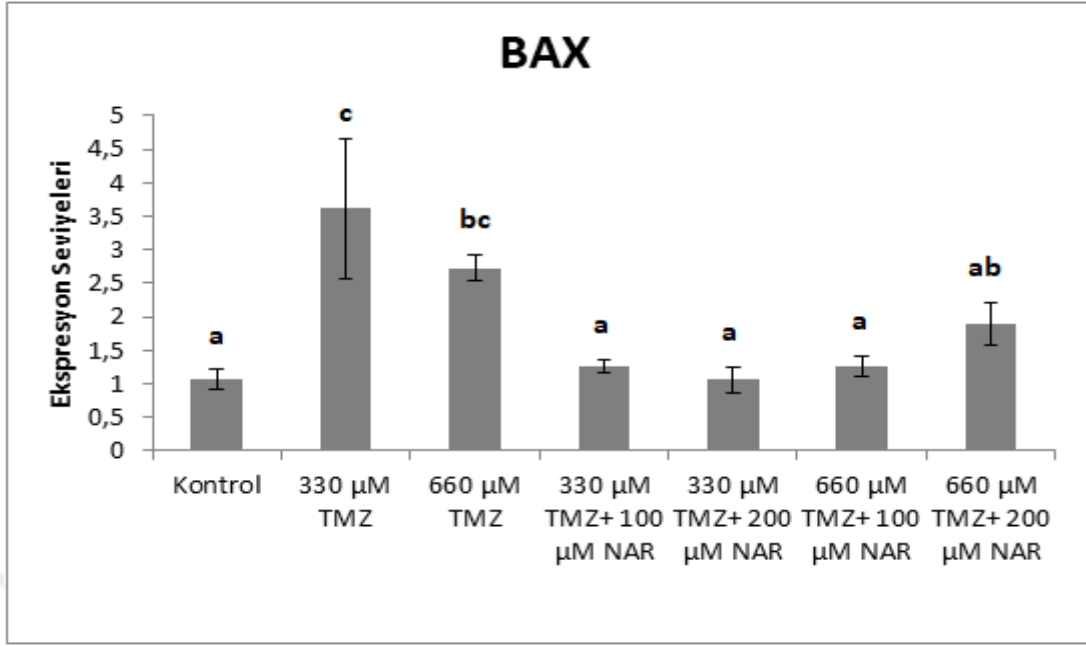
Analiz sonuçlarına göre U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat NAR uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre BAX gen ifadesinin değişimi Şekil 37'de verildi. Buna göre her iki grupta da BAX gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı saptandı (F=0,213; sd=2-12; p>0,05).



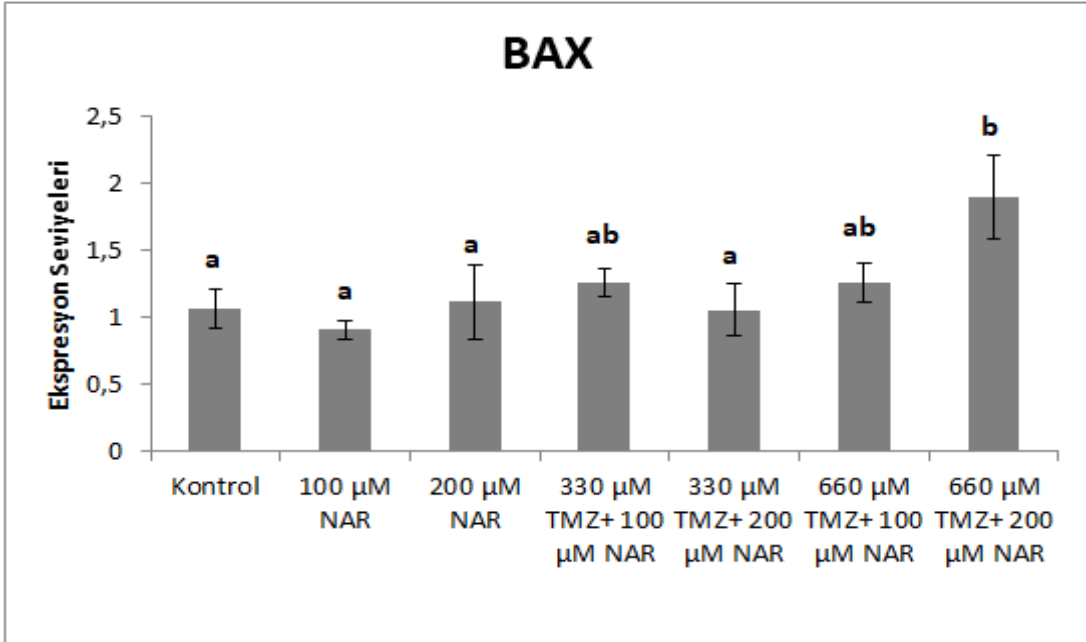
**Şekil 37. U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Temozolomidin tek başına ve naringin ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra BAX gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 38'de verildi. Buna göre sadece TMZ uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinde kontrole göre 330 µM TMZ konsantrasyonunda 3,61 kat, 660 µM konsantrasyonda ise 2,72 kat istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı ( $p < 0,05$ ). Ancak diğer kombinasyon gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi ( $p > 0,05$ ).

Naringinin tek başına ve temozolomid ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra BAX gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 39'da verildi. Buna göre 660 µM TMZ+ 200 µM NAR uygulaması yapılan grupta BAX gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ve bu değer 1,90 kat olarak saptandı ( $p < 0,05$ ). Ancak diğer NAR ve kombinasyon gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi.



**Şekil 38.** U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata

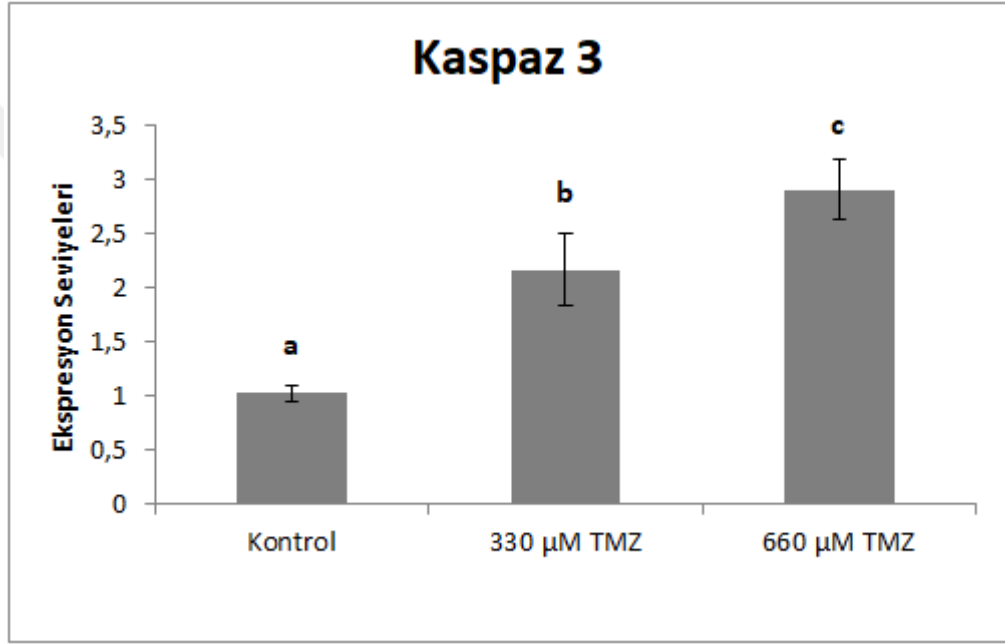


**Şekil 39.** U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata



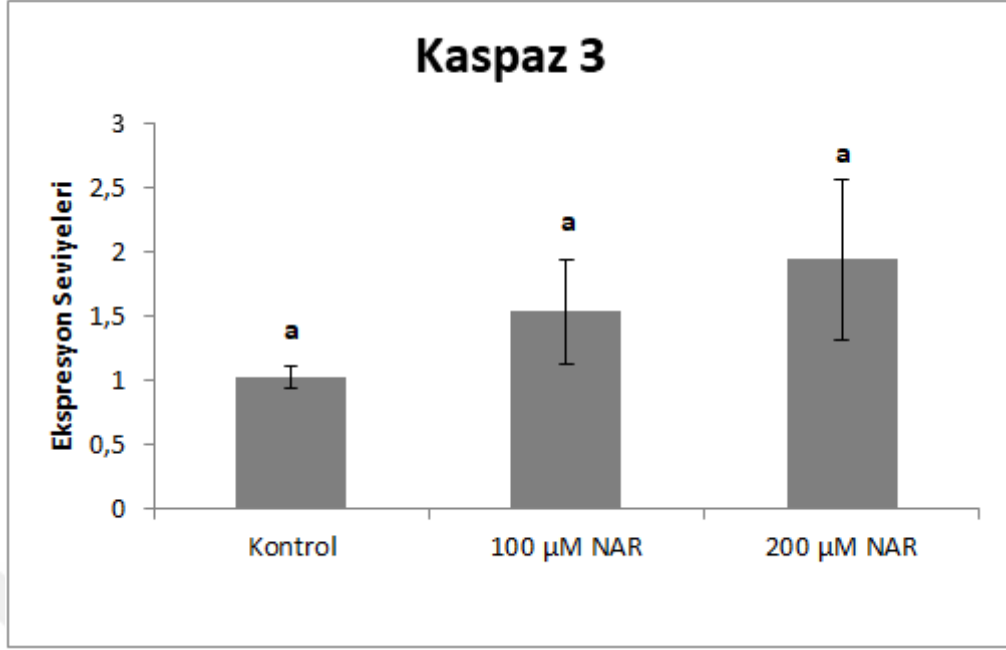
### Kaspaz 3 Gen İfadesi

U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat TMZ uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi Şekil 40'da verildi. Buna göre her iki grupta da Kaspaz 3 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış belirlendi ( $F=33,748$ ;  $sd=2-12$ ;  $p<0,01$ ). TMZ LD<sub>50</sub> (330 µM) de bu artış 2,17 kat olarak belirlenirken TMZ 2LD<sub>50</sub> (660 µM) de 2,91 kat olarak saptandı.



**Şekil 40. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

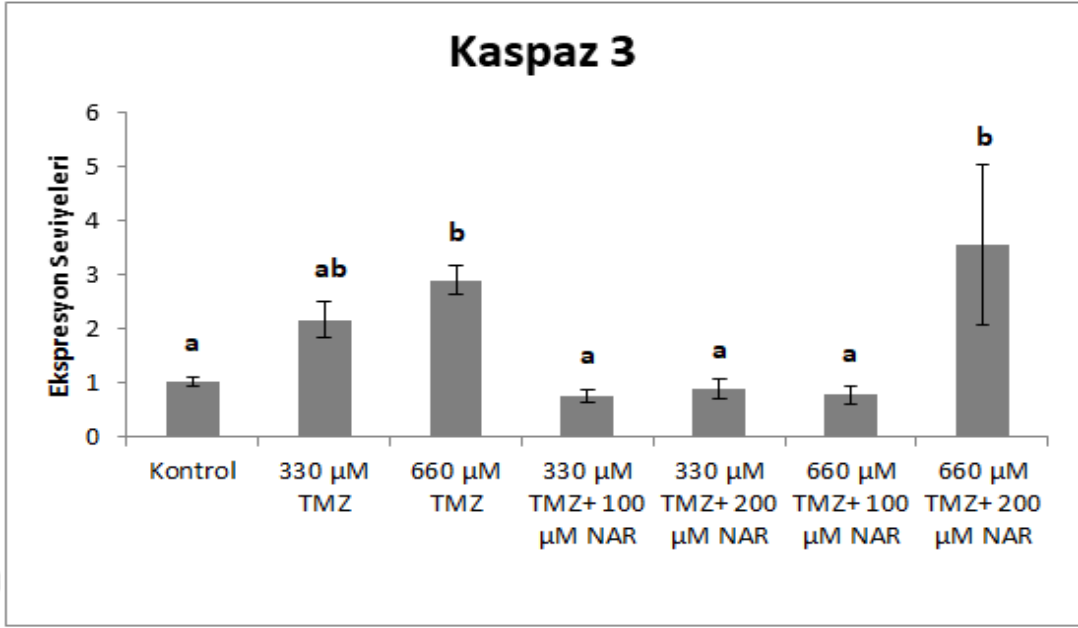
Analiz sonuçlarına göre U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat NAR uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi Şekil 41'de verildi. Buna göre 100 ve 200 µM NAR uygulamalarında Kaspaz 3 gen ifadesinin sırası ile kontrole göre 1.53 ve 1.94 kat artış gösterdiği ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ( $F=3,275$ ;  $sd=2-12$ ;  $p>0,05$ ).



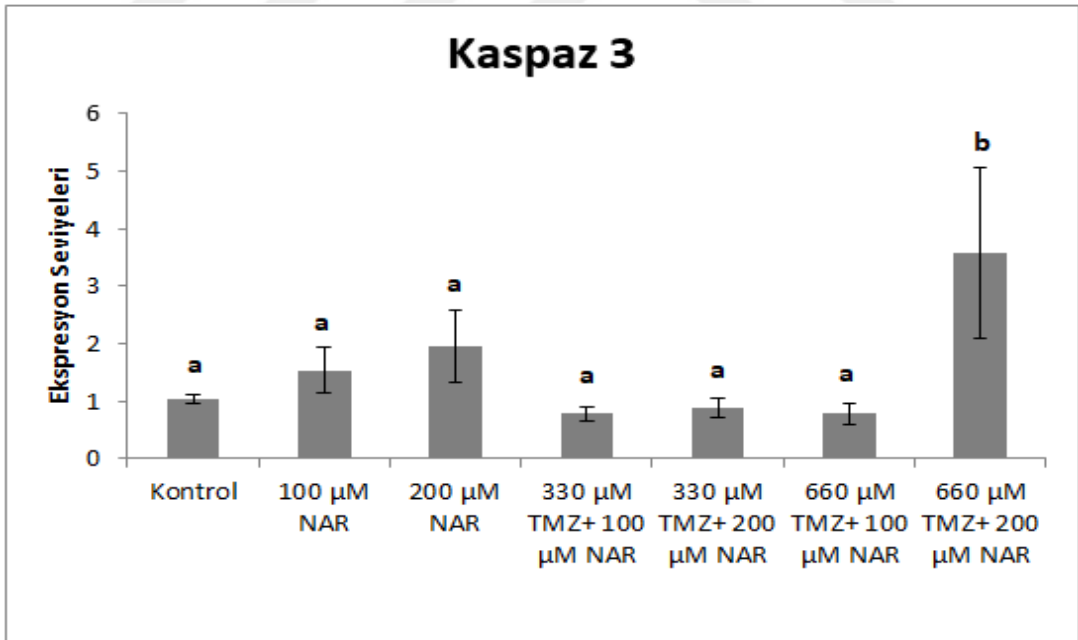
**Şekil 41. U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Temozolomidin tek başına ve naringin ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra Kaspaz 3 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 42'de verildi. Buna göre 660 µM TMZ (kontrole göre 2,91 kat) ve 660 µM TMZ+200 µM NAR (kontrole göre 3.57 kat) uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ( $p<0,05$ ).

Naringinin tek başına ve temozolomid ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra Kaspaz 3 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 43'de verildi. Buna göre 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan grupta Kaspaz 3 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0,05$ ). Ancak diğer NAR ve kombinasyon gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi ( $p>0,05$ ).



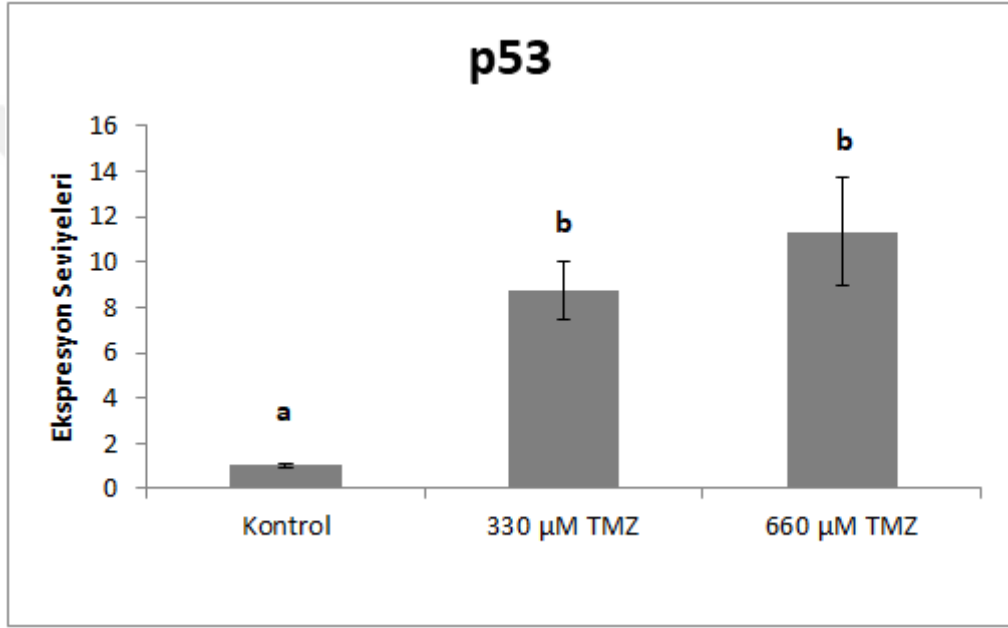
Şekil 42. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata



Şekil 43. U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata

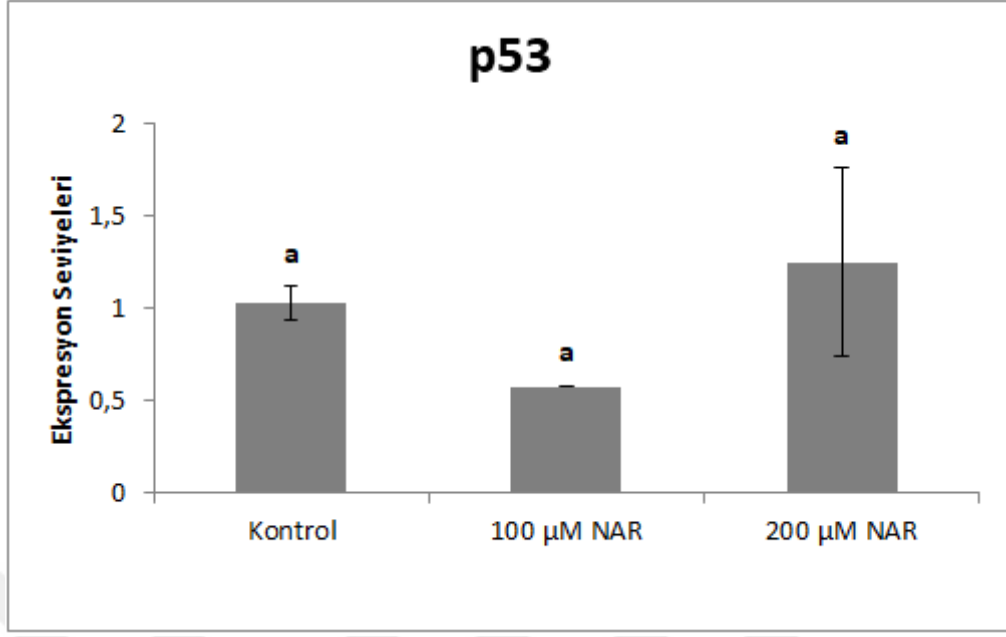
## p53 Gen İfadesi

U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat TMZ uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi Şekil 44'de verildi. Buna göre her iki grupta da p53 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış belirlendi (F=40,192; sd=2-12; p<0,01). TMZ LD<sub>50</sub> (330 µM) de bu artış 8,74 kat olarak belirlenirken TMZ 2LD<sub>50</sub> (660 µM) de 11,33 kat olarak saptandı.



**Şekil 44. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

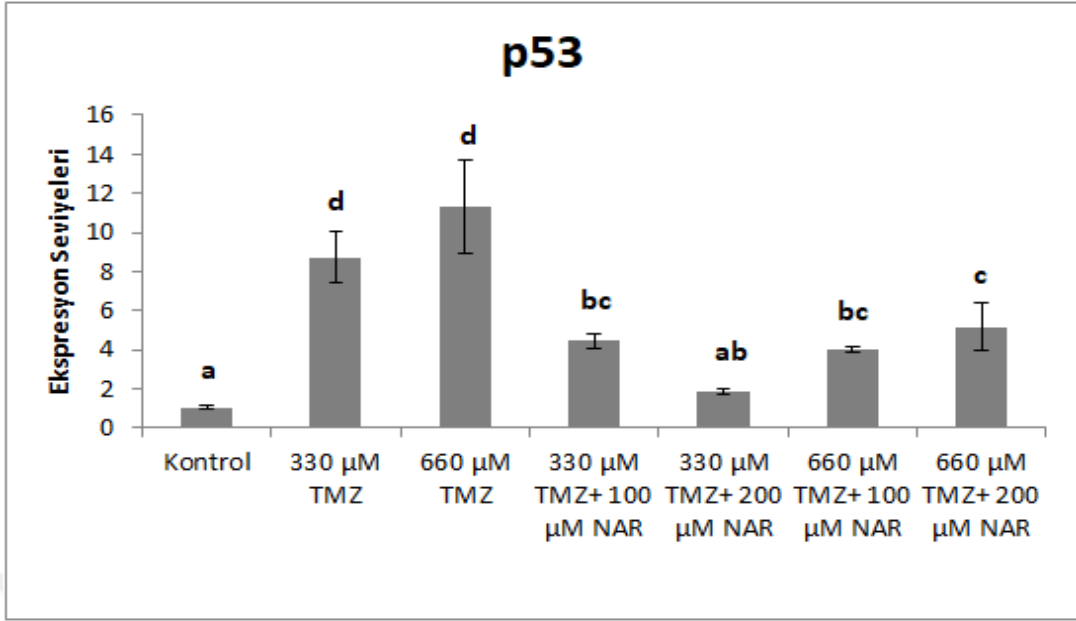
Analiz sonuçlarına göre U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat NAR uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi Şekil 45'de verildi. Buna göre her iki NAR dozunda da p53 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi (F=2,01; sd=2-12; p>0,05).



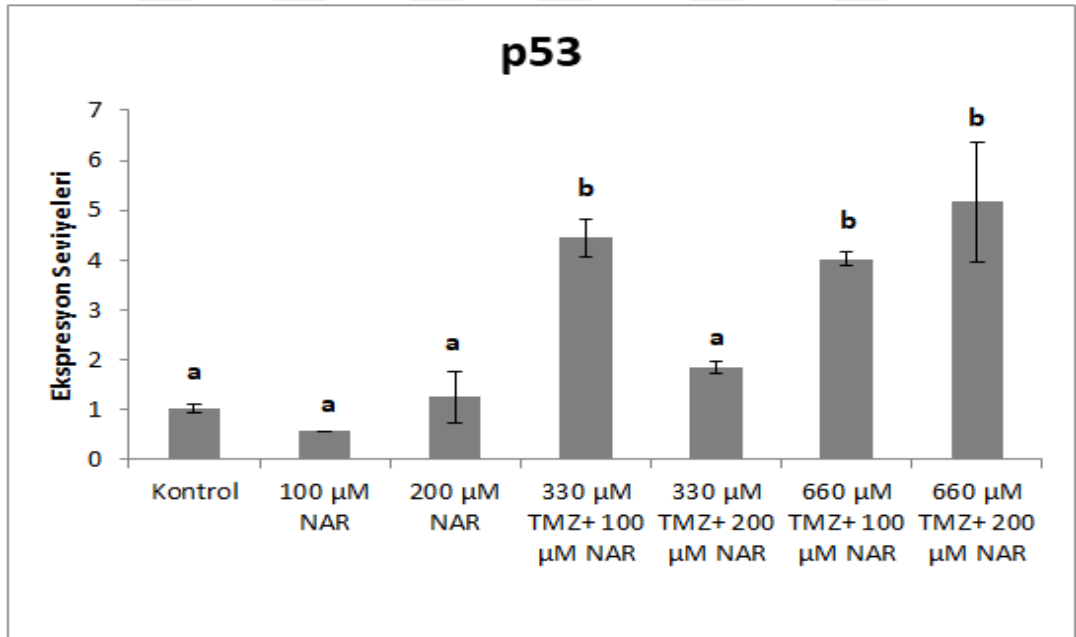
**Şekil 45. U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Temozolomidin tek başına ve naringin ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra p53 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 46'da verildi. Buna göre 330 µM ve 660 µM TMZ, 330 µM TMZ+100 µM NAR, 660 µM TMZ+100 µM NAR ve 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p < 0,05$ ). Buna göre p53 gen ifadesi kontrole göre 330 µM TMZ+ 100 µM NAR dozunda 4,44 kat, 660 µM TMZ+ 100 µM NAR dozunda 4,02 kat, 660 µM TMZ+ 200 µM NAR dozunda 5,16 kat olarak belirlendi.

Naringinin tek başına ve temozolomid ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra p53 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 47'de verildi. Buna göre 330 µM TMZ+100 µM NAR, 660 µM TMZ+100 µM NAR ve 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p < 0,05$ ).



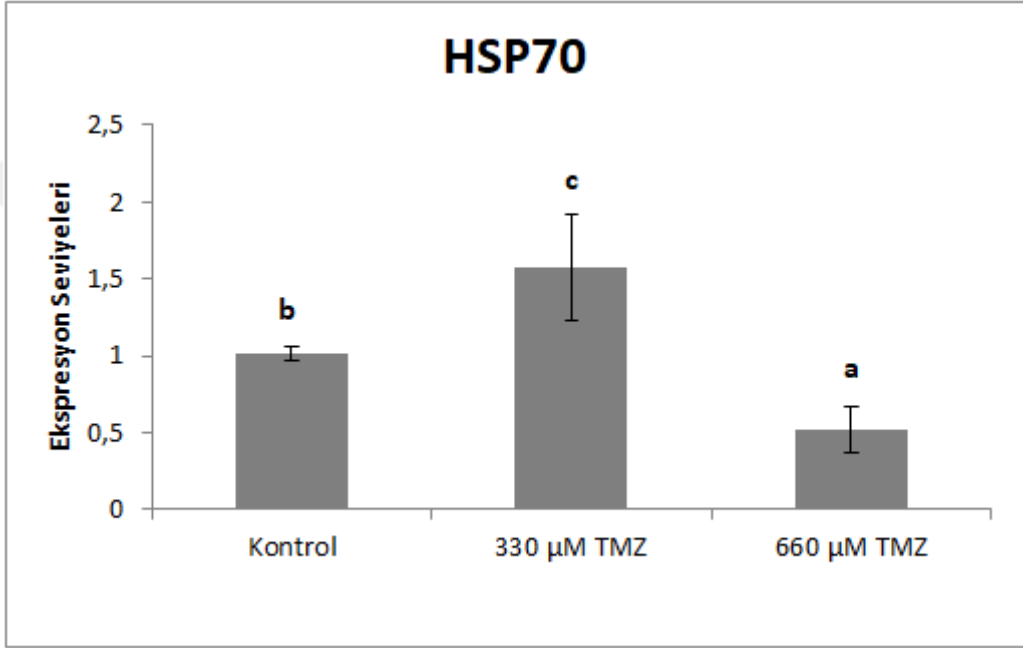
Şekil 46. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata



Şekil 47. U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata

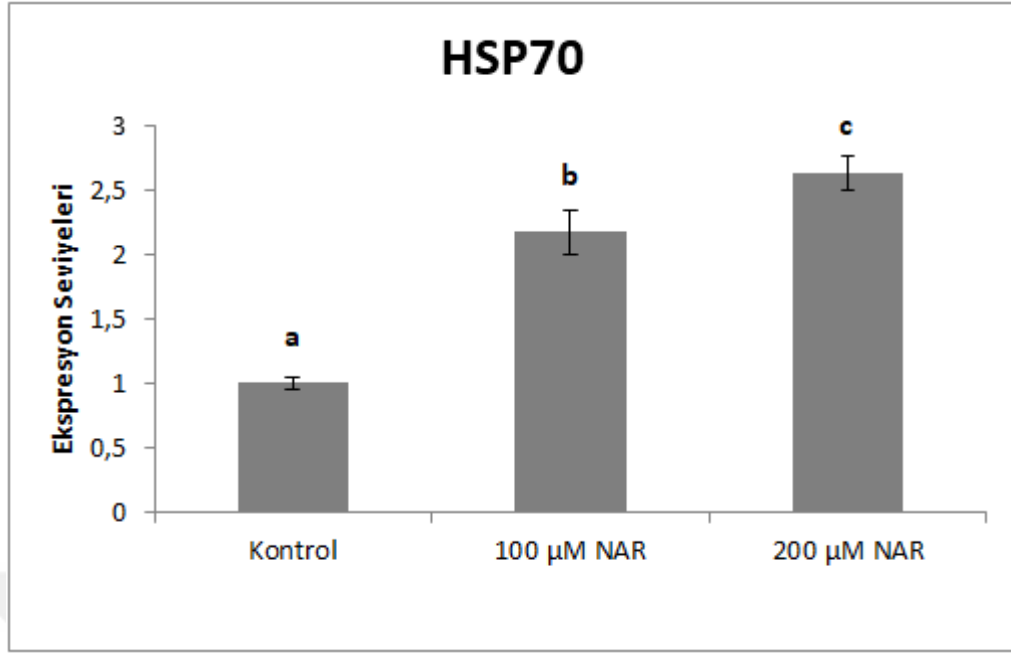
## HSP70 Gen İfadesi

U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat TMZ uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi Şekil 48’de verildi. Buna göre 330 µM TMZ uygulama grubunda kontrole göre 1,58 kat artış belirlenirken, 660 µM TMZ grubunda ise kontrole göre 0,53 kat azalma olduğu saptandı (F=10,017; sd=2-12; p<0,01).



**Şekil 48. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Analiz sonuçlarına göre U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat NAR uygulaması yapılan gruplarda kontrole göre HSP70 gen ifadesinin değişimi Şekil 49’da verildi. Buna göre her iki grupta da HSP70 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış belirlendi (F=99,289; sd=2-12; p<0,01). 100 µM NAR’de bu artış 2,18 kat olarak belirlenirken 200 µM NAR’de 2,63 kat olarak belirlendi.

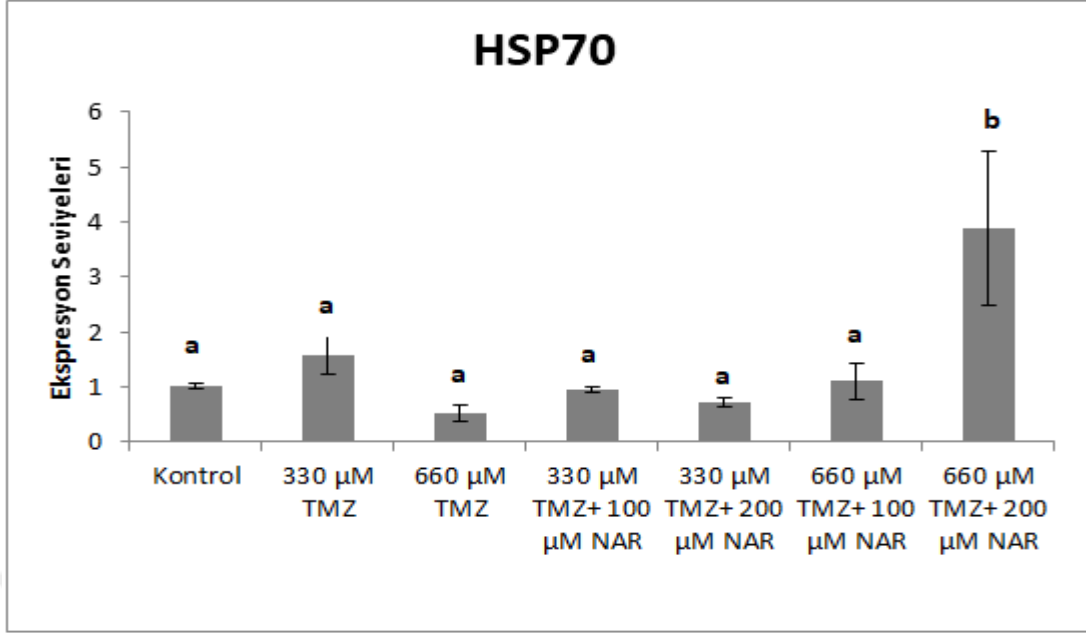


**Şekil 49. U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

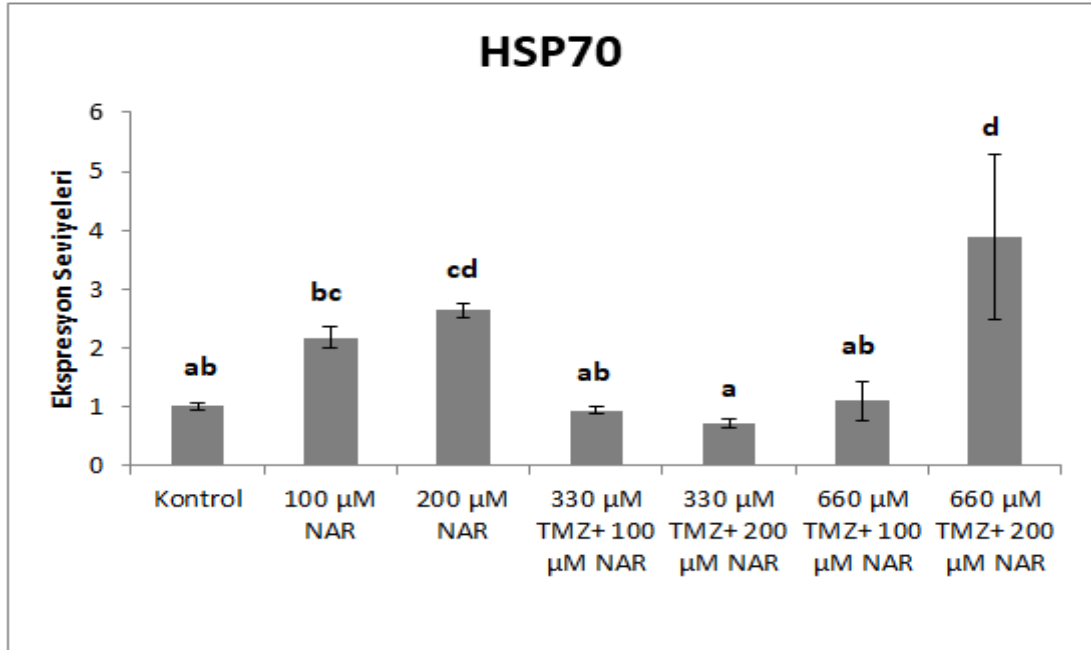
Temozolomidin tek başına ve naringin ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra HSP70 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 50'de verildi. Buna göre sadece 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan grupta HSP70 gen ifadesinde (kontrole göre 3,90 kat) istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0,05$ ).

Naringinin tek başına ve temozolomid ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra HSP70 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 51'de verildi. Buna göre 200 µM NAR (kontrole göre 2,63 kat) ve 660 µM TMZ+200 µM NAR (kontrole göre 3,9 kat) uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0,05$ ).





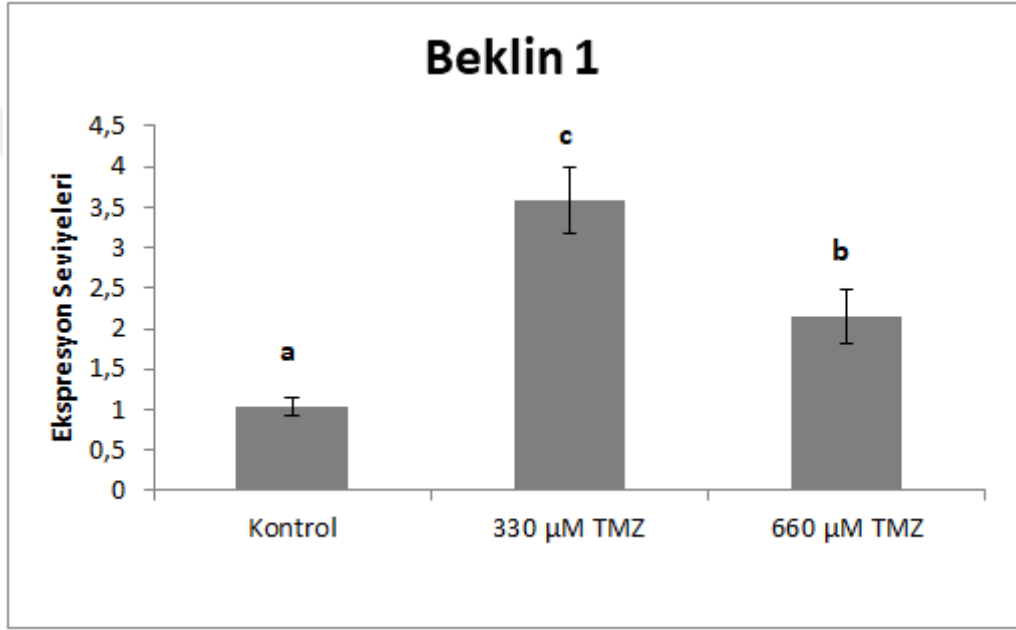
Şekil 50. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata



Şekil 51. U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata

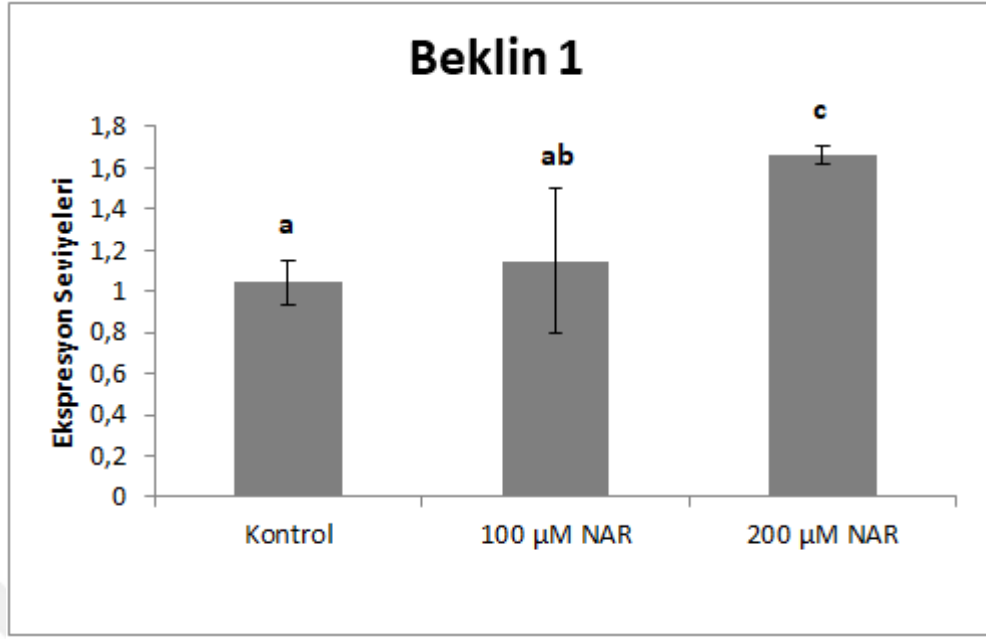
## Beklin 1 Gen İfadesi

U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat TMZ uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi Şekil 52’de verildi. Buna göre her iki grupta da Beklin 1 gen ifadesinde kontrole göre istatikselsel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu ve 330 µM TMZ konsantrasyonunda 3,58 kat, 660 µM konsantrasyonda ise 2,15 kat olduğu saptandı (F=36,385; sd=2-12; p<0,01).



**Şekil 52. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

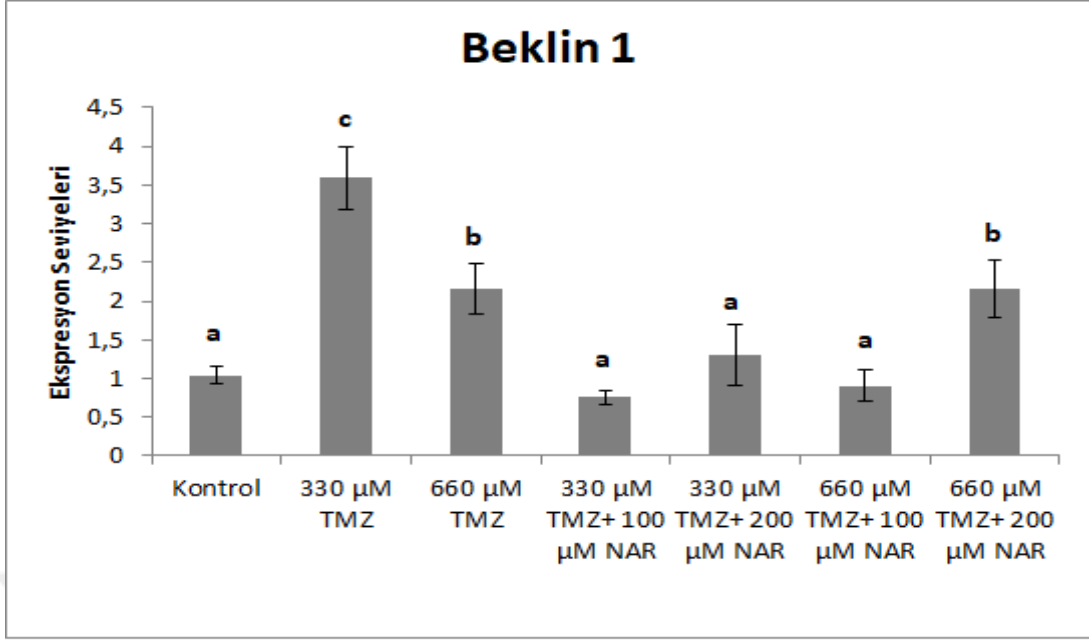
Analiz sonuçlarına göre U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat NAR uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi Şekil 53’de verildi. Buna göre sadece 200 µM NAR uygulaması yapılan grupta (kontrole göre 1,66 kat) Beklin 1 gen ifadesinde istatikselsel olarak anlamlı düzeyde artış saptandı (F=3,25; sd=2-12; p>0,05).



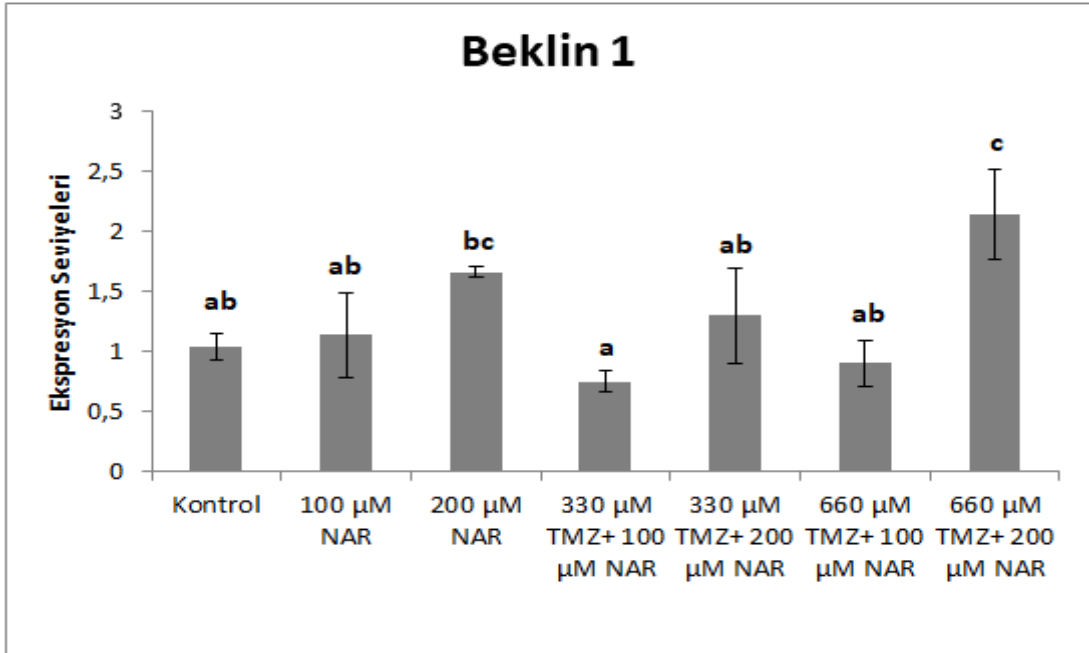
**Şekil 53. U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Temozolomidin tek başına ve naringin ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra Beklin 1 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 54'de verildi. Buna göre 330 µM ve 660 µM TMZ ve 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0,05$ ). Buna göre Beklin 1 gen ifadesi kontrole göre 660 µM TMZ+ 200 µM NAR dozunda 2,14 kat olarak belirlendi.

Naringinin tek başına ve temozolomid ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra Beklin 1 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 55'de verildi. Buna göre sadece 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan grupta (kontrole göre 2,14 kat) Beklin 1 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ( $p<0,05$ ).



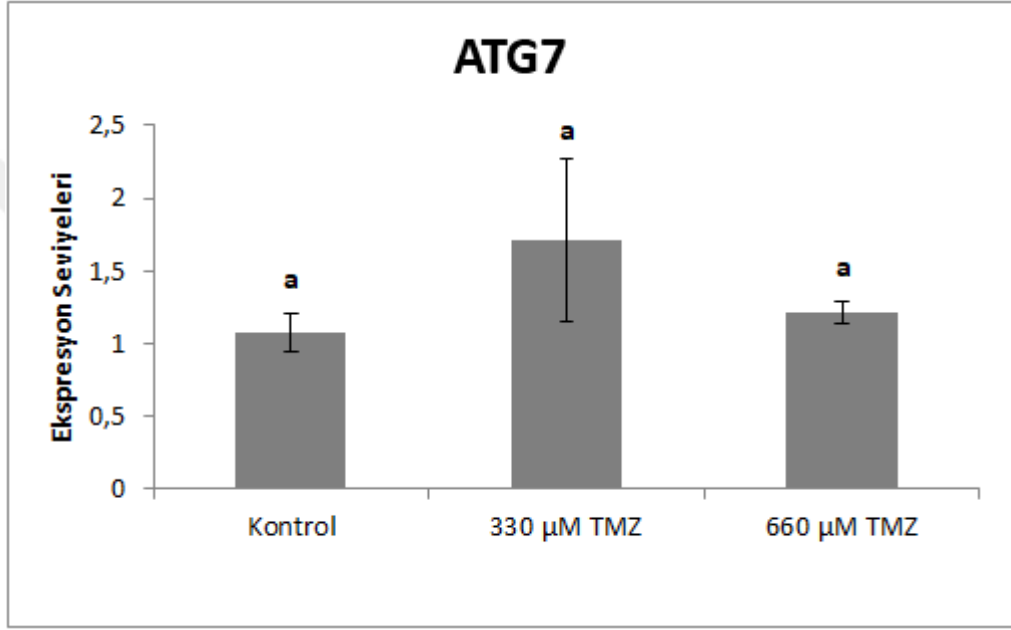
**Şekil 54.** U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata



**Şekil 55.** U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata

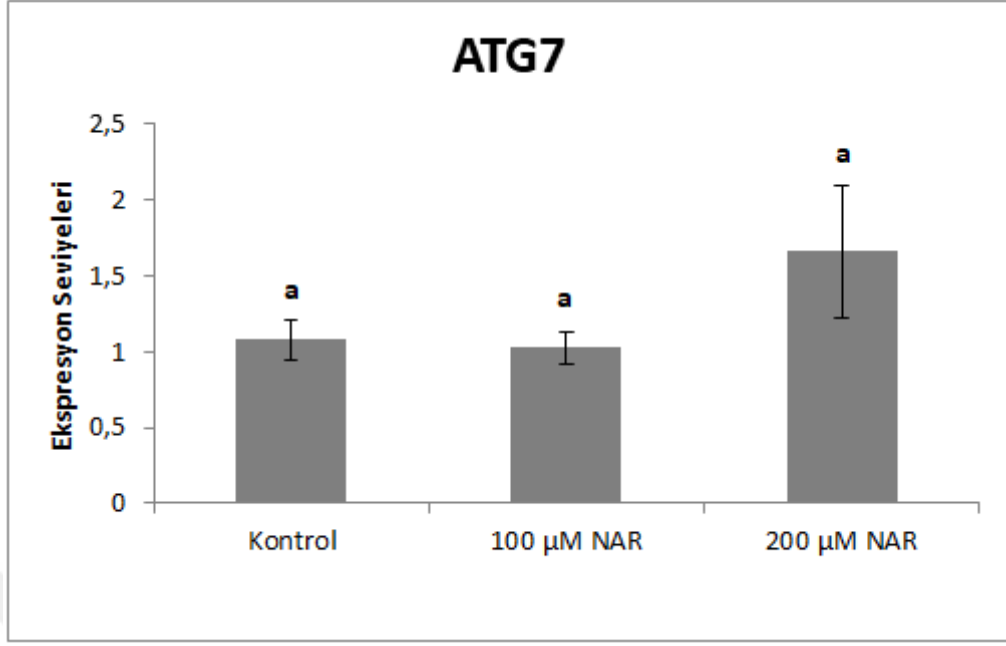
## ATG7 Gen İfadesi

U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat TMZ uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi Şekil 56'da verildi. Buna göre her iki grupta da ATG7 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim saptanmadı ( $F=1,72$ ;  $sd=2-12$ ;  $p>0,05$ ).



**Şekil 56. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış,  $n=3$ , ortalama $\pm$ standart hata**

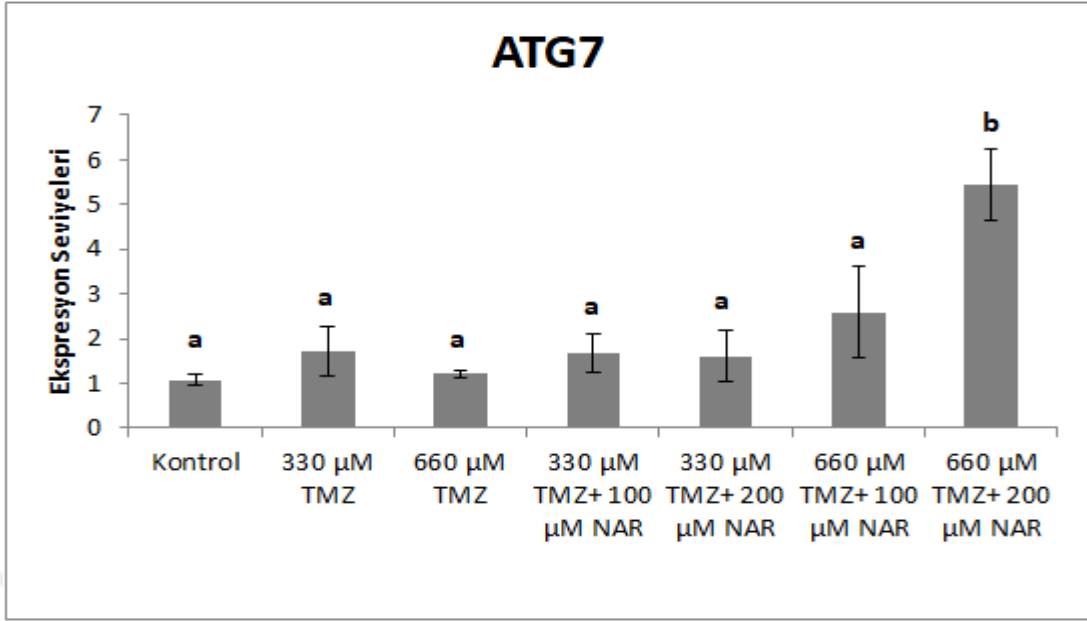
Analiz sonuçlarına göre U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat NAR uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi Şekil 57'de verildi. Buna göre her iki grupta da ATG7 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim saptanmadı ( $F=2,12$ ;  $sd=2-12$ ;  $p>0,05$ ).



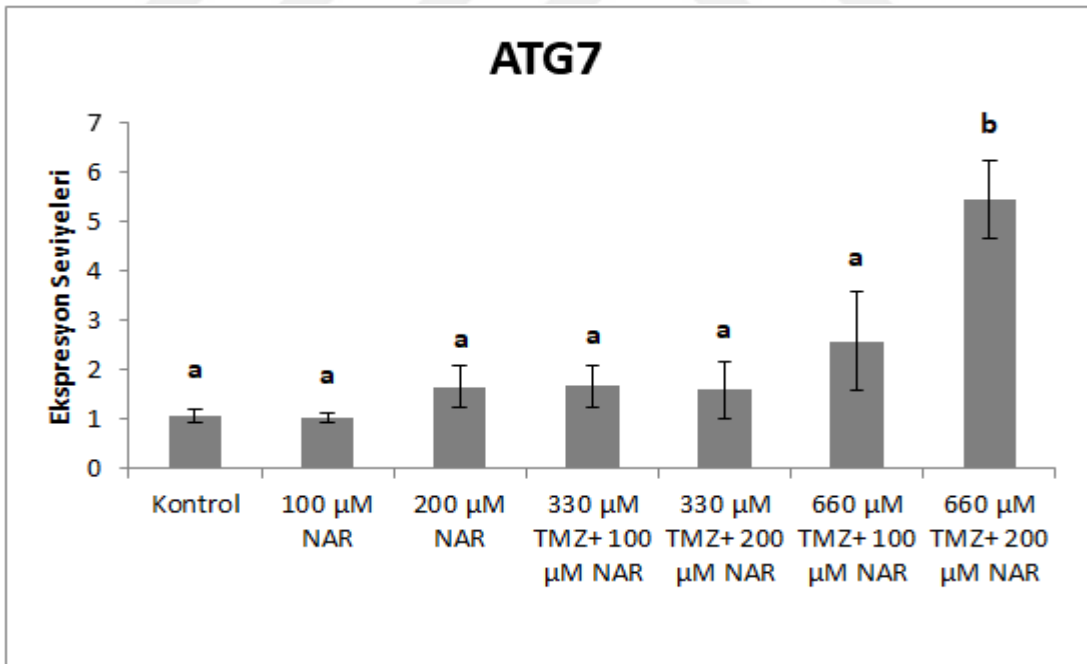
**Şekil 57. U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Temozolomidin tek başına ve naringin ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra ATG7 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 58'de verildi. Buna göre sadece 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan grupta (kontrole göre 5,45 kat) ATG7 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ( $p<0,05$ ).

Naringinin tek başına ve temozolomid ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra ATG7 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 59'da verildi. Buna göre sadece 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan grupta ATG7 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0,05$ ).



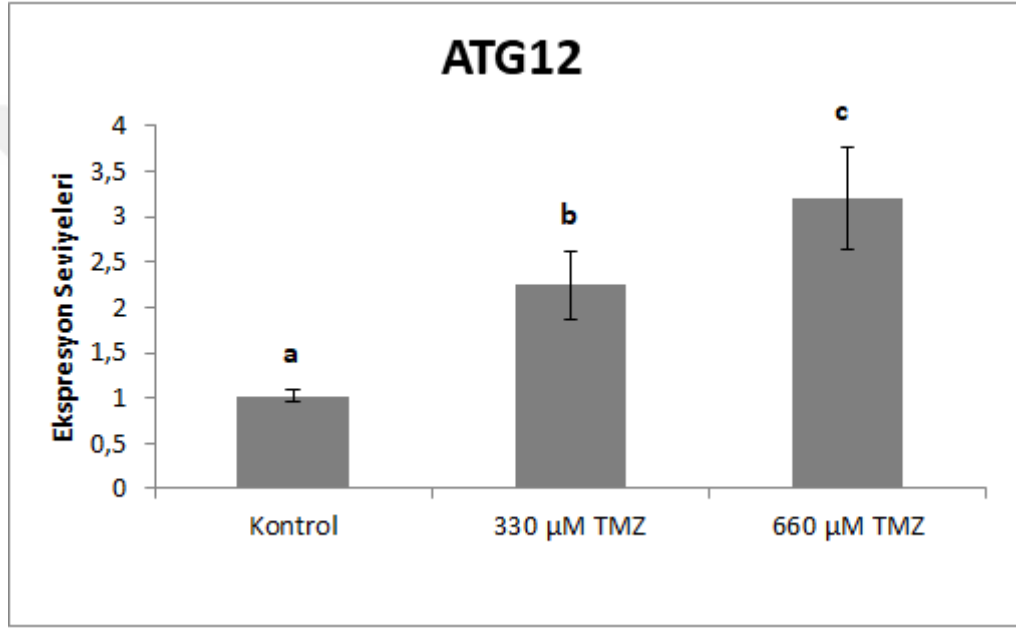
Şekil 58. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata



Şekil 59. U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata

## ATG12 Gen İfadesi

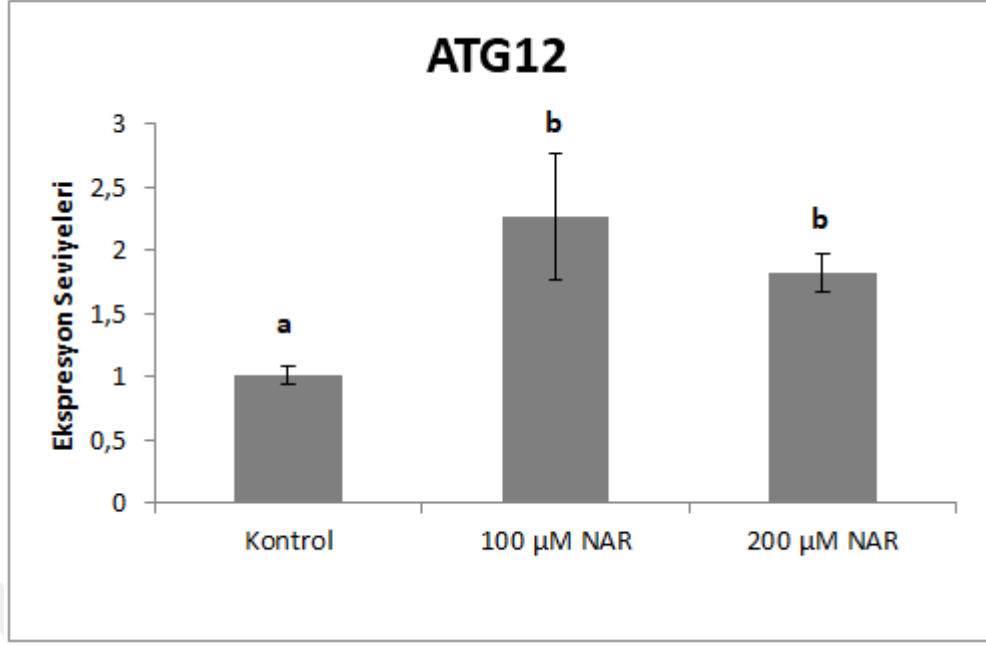
U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat TMZ uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi Şekil 60'da verildi. Buna göre her iki grupta da ATG 12 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış belirlendi (F=22,839; sd=2-12; p<0,01). TMZ LD<sub>50</sub> (330 µM) de bu değer 2,24 kat olarak belirlenirken TMZ 2LD<sub>50</sub> (660 µM) de 3,20 kat olarak saptandı.



**Şekil 60. U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Analiz sonuçlarına göre U87 insan glioblastoma hücre hattında 48 saat NAR uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi Şekil 61'de verildi. Buna göre her iki NAR dozunda da ATG12 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış belirlendi (F=12,80; sd=2-12; p>0,01). 100 µM NAR'de bu değer 2,26 kat olarak belirlenirken 200 µM NAR'de 1,82 kat olarak belirlendi.

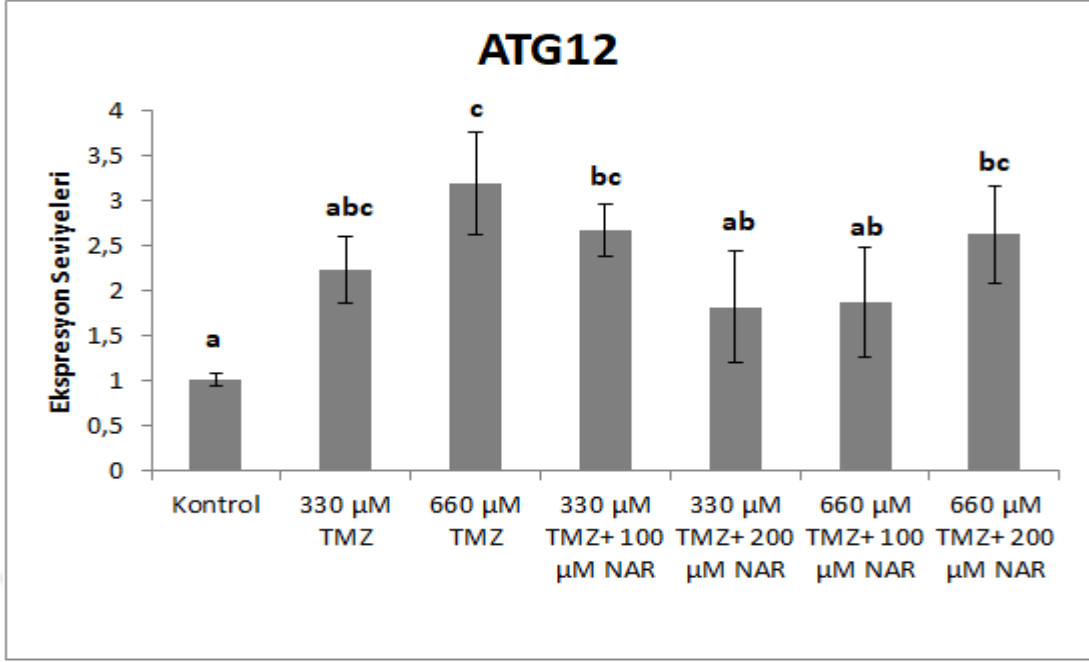




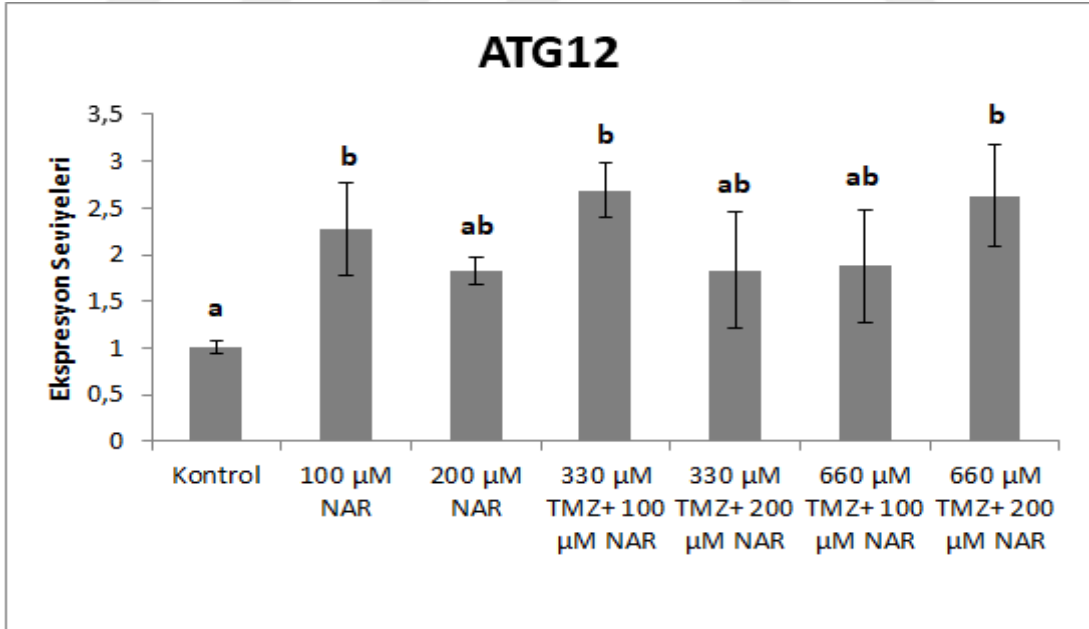
**Şekil 61. U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata**

Temozolomidin tek başına ve naringin ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra ATG12 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 62’de verildi. Buna göre 660 µM TMZ, 330 µM TMZ+100 µM NAR ve 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0,05$ ). Buna göre ATG12 gen ifadesi kontrole göre 330 µM TMZ+ 100 µM NAR dozunda 2,68 kat, 660 µM TMZ+ 200 µM NAR dozunda 2,63 kat olarak saptandı.

Naringinin tek başına ve temozolomid ile kombine olarak uygulamasının 48 saat sonra ATG12 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu Şekil 63’de verildi. Buna göre 100 µM NAR, 330 µM TMZ+100 µM NAR ve 660 µM TMZ+200 µM NAR uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0,05$ ).



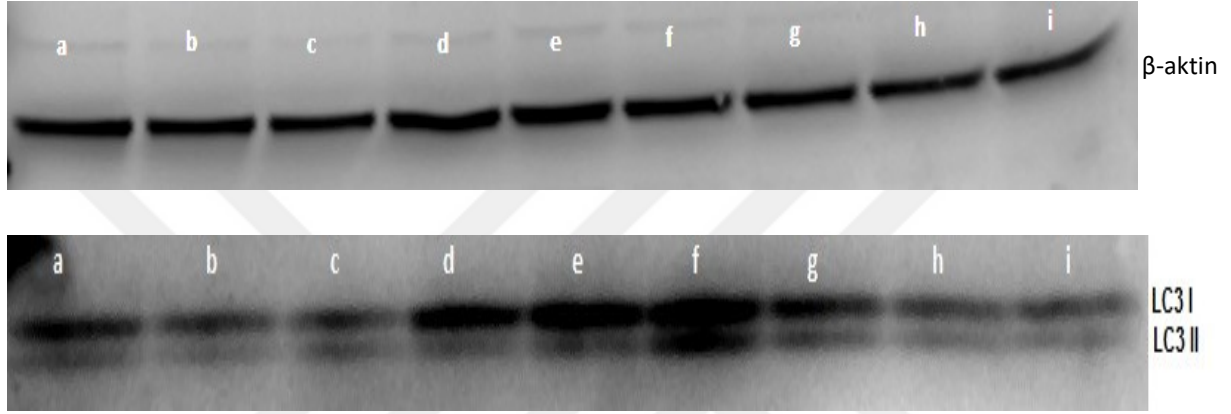
**Şekil 62.** U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata



**Şekil 63.** U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=3, ortalama±standart hata

## WESTERN BLOT PROTEİN ANALİZİ

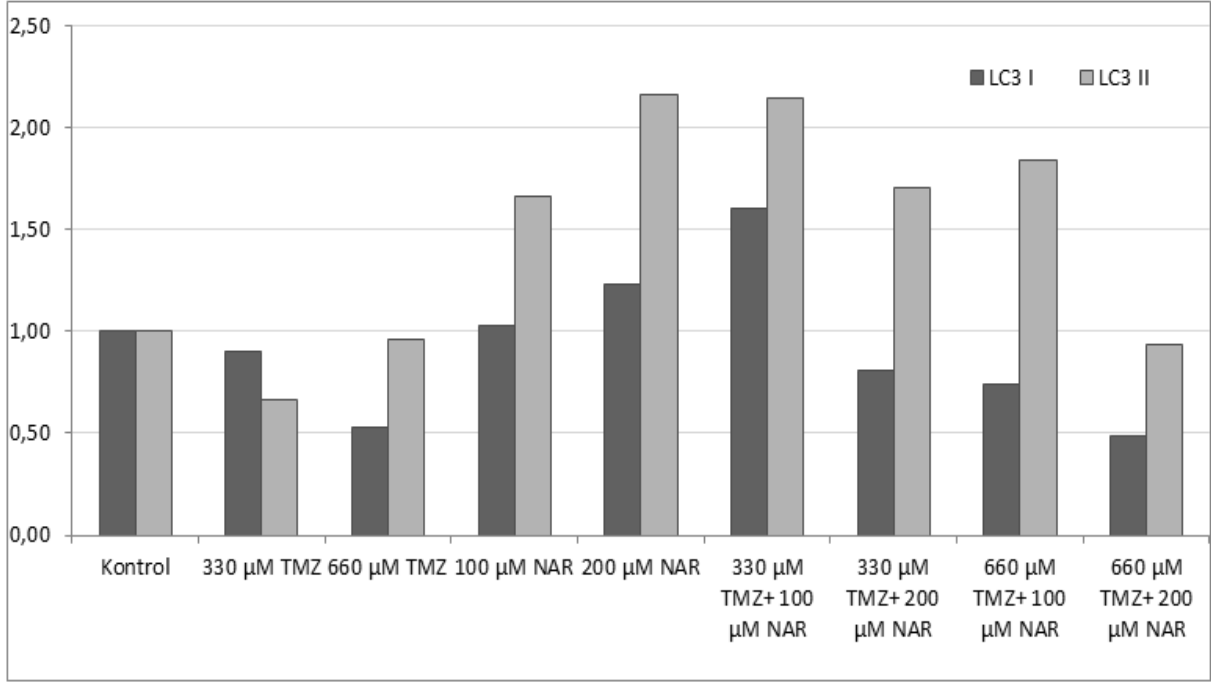
U87 insan glioblastoma hücre serisine Temozolomid ve Naringinin tek başına ve kombinasyonlarının uygulandığı gruplarda LC3 I ve LC3 II proteinlerinin ifade seviyelerini belirlemek amacı ile endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılarak yapılan western blot analizinde LC3 protein ifadesindeki değişimler Şekil 64'de gösterildi.



**Şekil 64. U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda  $\beta$ -aktin, LC3 I ve LC3 II protein bantlarının görüntüsü. a) Kontrol b) 330  $\mu$ M TMZ c) 660  $\mu$ M TMZ d) 100  $\mu$ M NAR e) 200  $\mu$ M NAR f) 330  $\mu$ M TMZ+ 100  $\mu$ M NAR g) 330  $\mu$ M TMZ+ 200  $\mu$ M NAR h) 660  $\mu$ M TMZ+ 100  $\mu$ M NAR i) 660  $\mu$ M TMZ+ 200  $\mu$ M NAR**

U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda LC3 I ve LC3 II protein seviyelerinin belirlenmesi için yapılan western blot analiz sonucu Şekil 65'de verildi. Buna göre 330  $\mu$ M TMZ, 660  $\mu$ M TMZ ve 660  $\mu$ M TMZ+200  $\mu$ M NAR uygulaması yapılan gruplarda LC3 I ve LC3 II protein seviyelerinde kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmezken 100  $\mu$ M NAR, 200  $\mu$ M NAR, 330  $\mu$ M TMZ+100  $\mu$ M NAR uygulaması yapılan gruplarda LC3 I ve LC3 II protein seviyelerinde kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu gruplarda LC3 I protein seviyeleri kontrole göre sırasıyla 1,03 kat, 1,23 kat ve 1,60 kat olarak saptanırken LC3 II protein seviyeleri kontrole göre sırasıyla 1,66 kat, 2,16 kat ve 2,14 kat olarak saptandı. 330  $\mu$ M TMZ+200  $\mu$ M NAR ve 660  $\mu$ M TMZ+100  $\mu$ M NAR uygulaması yapılan gruplarda ise LC3 I protein seviyelerinde kontrole göre artış

gözlenmezken LC3 II seviyelerinde kontrole göre sırasıyla 1,71 kat ve 1,84 kat artış saptandı.



**Şekil 65. U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda LC3 I ve LC3 II protein seviyeleri. Relatif kat artış**

## TARTIŞMA

Kanser oluşumunun ve tedavisinin kompleks ve çok aşamalı bir süreç olduğu bilinmektedir. Günümüzde glioblastoma beyin tümörlerinin en yaygın ve sağkalım süresi en kısa olan türüdür (1). Tedavisinde rutin olarak radyoterapi ile birlikte kan-beyin bariyerini geçebilen bir kemoterapötik olan temozolomid kullanılır (6-9). Tanı konulduktan sonra rutin tedavi prosedürü uygulanan hastaların ortalama sağkalım süresi 12-15 aydır (37). Ancak başlangıçta kemoterapiye cevap veren hücreler daha sonraları direnç geliştirebilirler (76). Günlük beslenmenin bir parçası olan flavonoidler, esas diyet faktörü olmasalar bile hastalıklarla özellikle de kanserle olan ilişkileri nedeni ile günümüzde diyetle önemli bir yere sahiptirler (18). Daha çok turunçgillerde bulunan naringinin farmokokinetik özellikleri ve diğer ilaçlarla olan etkileşimlerinin bilinmesi farklı tedaviler esnasında ilaçlarla birlikte naringin içeren besinlerin tüketiminin miktarlarının belirlenmesi ya da olası sinerjistik ve antagonistik etkilerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda turunçgillerde bol miktarda bulunan naringin flavonoidinin glioblastoma tedavisinde kullanılan temozolomid ile etkileşimlerinin hücre canlılığı, apoptoz, otofaji ve hücrel stres gen ifadeleri üzerine etkileri araştırıldı.

Çalışmamızda ilk olarak glioblastoma hücrelerinde temozolomid ve naringinin tek uygulamalarında uygun çalışma dozları ve uygulama süreleri belirlendi. 24 ve 48 saatlik uygulamaların sonunda istatistiksel değerlendirme sonucu en etkili uygulama

süresinin 48 saat olduğu belirlendi ve daha sonraki çalışmalara 48 saatlik uygulama yapılarak devam edildi.

Elde edilen veriler doğrultusunda 48 saatlik uygulama sonunda hücrelerin %50' sinin canlı kaldığı doz olan LD<sub>50</sub> dozu temozolomid için 330 µM, 2LD<sub>50</sub> dozu 660 µM olarak belirlendi. Farklı glioblastoma hücrelerine yapılan çalışmalarda (U87, LN229, LN308 ve U138 hücre hatlarına) 24 saat ve 48 saat uygulanan temozolomidin LD<sub>50</sub> dozunun 200 µM olduğu bildirilmiştir (196,197). Yine U251, U87 ve LN18 hücre hatları ile yapılan bir çalışmada bu hücre hatlarının 200 µM temozolomide bile dirençli olduğu rapor edilmiştir (198). Farklı uygulama sürelerinde temozolomid uygulanan U87 ve U373 glioblastoma hücre hatlarına LD<sub>50</sub> dozunun 100 µM ile 500 µM doz aralığında hücre çoğalmasını durdurduğu ve LD<sub>50</sub> dozunun 397,2 µM olduğu rapor edilmiştir (199). Başka bir çalışmada insan primer glioblastoma hücrelerine 6 gün boyunca uygulanan temozolomidin 600 µM altındaki dozlarda ciddi bir ölüm oluşturmadığı rapor edilmiştir (200). Çalışmamızda Temozolomid için 330 µM ve 660 µM olarak kullandığımız dozlar literatür verileriyle uyum göstermektedir.

Çalışmada 100 µM ve 200 µM dozlarında 48 saat uygulaması yapılan naringinin kullanılan dozlarda insan glioblastoma hücrelerinde hücre ölümü LD<sub>50</sub> düzeyinde tetiklemediği ancak farklı mekanizmaları aktive ettiği belirlendi. Bulduğumuz verilerle benzer şekilde insan primer malign kemik kanserinde naringinin 24 ve 48 saatte 30 µM dozuna kadar apoptozu ve hücre ölümünü indüklediği ancak migrasyonu ve invazyonu azalttığı belirtilmiştir (201). Fare lösemi hücrelerine 24 saat uygulanan naringinin ise 1 mM dozuna kadar hücre ölümü tetiklemediği aksine artan dozlarda hücre yaşama indüklediği gösterilmiştir (202). Diğer bir çalışmada insan mide kanseri AGS hücre hattına 24 saat uygulanan naringinin LD<sub>50</sub> dozunun 3 mM olduğu bildirilmiştir (102). Naringinin 72 saatte insan prostat kanser hücrelerindeki LD<sub>50</sub> dozunun DU145 hücresi için 150 µM, LNCaP hücresi için 260 µM ve PC3 hücresi için 101 µM olduğu ve hücre döngüsünün durdurulmasına yol açtığı rapor edilmiştir (203). İnsan mesane kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ise 24 saat uygulanan naringinin 100 µM dozunda G1 fazında hücre döngüsünün durmasına yol açtığı bildirilmiştir (204). Naringinin 24 saatte insan servikal kanser hücrelerinde (SiHa) LD<sub>50</sub> dozunun 750 µM olduğu rapor edilmiştir (205). Naringin için 100 µM ve 200 µM olarak kullandığımız dozlar farklı uygulama süreleri ve farklı hücre

tiplerinde uygulanması nedeni ile değişiklikler göstermekle birlikte literatür verileri ile uyum göstermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında naringin ile glioblastomada rutin kemoterapi ajanı olarak kullanılan temozolomidin etkileşiminin belirlenmesi için naringin ve temozolomidin kombinasyon uygulamaları yapıldı. MTT sonuçlarına göre, U87 insan glioblastoma hücrelerinde temozolomid uygulamasının naringin uygulanmasından daha etkili olduğu saptandı. Naringin ve temozolomid tek başına uygulamalarda etkiliyken aynı anda yapılan temozolomid ve naringin uygulamasında hücre ölümünün azaldığı görüldü.

Çalışmada glioblastoma hücrelerinde kontrol ve uygulama grupları arasındaki gen ifadelerindeki değişimler RT-qPCR ile belirlendi. MTT ve TALİ görüntü tabanlı sitometri analizi değerleri dikkate alındığında RT-qPCR sonuçları ile anlamlı bir ilişki olduğu saptandı.

Çalışmamızda TMZ uygulamasında apoptoz yolağı genlerinden BAX, BCL2, Kaspaz 3 ve p53 gen ifadelerinin artış göstermesi hücrelerde DNA hasarının oluştuğunu, apoptoz mekanizmasının tetiklendiğini ve hücrelerin apoptoza gittiğini düşündürmektedir. Bunu destekler nitelikte Tali görüntü temelli sitometre analizlerinde de TMZ uygulanan hücrelerde apoptotik hücre oranında artış olduğu görülmektedir (Şekil 31). Temozolomid uygulamasını takiben ikinci hücre döngüsünde ATR/CHK1- aracılı G2/M hücre döngüsünün durmasının tetiklendiği ve apoptoz geliştiği rapor edilmiştir (64-66). Temozolomidin glioblastoma hücrelerinde DNA hasarına yol açarak hücre döngüsünün durmasına ve sonuç olarak apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (67). DNA alkileyici ajanların guanini metilleyerek DNA hasarına yol açtığı ve tamir edilemeyen hasarın hücrelerde apoptoz yolağı genlerinde artışa yol açarak hücreleri apoptoza götürdüğü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (72,74). Temozolomid uygulamasında hücresel stresle indüklenen ve şaperon aracılı otofajide de rol alan HSP70 geninde, otofaji genlerinden makrotofajide yer alan Beklin 1 ve fagofor oluşumu ve uzamasında rol alan ATG12 genlerindeki artış hücrede aynı zamanda otofajik mekanizmanın da tetiklendiğini göstermektedir. Hastalarda 100 µM uygulanan TMZ'nin glioma hücrelerinde apoptozu değil otofajiyi indüklediği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (78). Temozolomidin yüksek dozlarda G<sub>2</sub>-M fazında hücre döngüsünün durmasına yol açtığı ve apoptozu tetiklediği ancak

100 µM gibi düşük dozlarda otofajiyi tetiklediği glioma hücrelerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (77). Temozolomidin kanser hücrelerinde apoptozu ve otofajiyi indüklediği ve hücreleri apoptotik hücre ölümüne götürdüğü rapor edilmiştir (64-66,77). Çalışmada elde edilen veriler literatür verileri ile uyum göstermektedir.

Stresle indüklenen apoptoz sırasında HSP70'in asetilasyonunun; kaspaz bağımlı veya kaspaz bağımsız apoptoz yollarında rol alan Apaf 1 ve AIF gibi proteinlerle etkileşime girip onları inhibe ederek apoptozu baskıladığı, otofajide rol alan genlerin anlatımını uyararak ve otofagozom oluşumunu başlatarak otofajiyi indüklediği ve hücreyi otofajik hücre ölümüne götürebildiği saptanmıştır (206). Yapılan diğer bir çalışmada akciğer kanseri (H1299), servikal kanser (HeLa) ve insan melanoma (A375) hücrelerinde HSP70 inhibitörlerinin (PES-CI, VER-155008 ve MKT-077) hücrelerde otofajiyi de inhibe ettiği gösterilmiştir (207). Ancak sıçan böbrek üstü bezi kanseri (PC12) hücrelerinde yapılan bir çalışma, otofaji inhibisyonunun ya da indüklenmesinin HSP70 üzerinde çok etkisinin olmadığını göstermiştir (208).

Naringin uygulaması yapılan insan glioblastoma hücrelerinde apoptoz genlerinde artış görülmemekle birlikte hücrel stresle yanıt olarak yanlış katlanan proteinleri düzeltmek için anlatımı indüklenen ve şaperon aracılı otofajide de rol alan HSP70 geni ve fagofor oluşumu ve uzamasında rol alan ATG12 genindeki artışla birlikte LC3 I ve LC3 II proteinlerinin artması hücrede otofajik mekanizmanın tetiklendiğini göstermektedir. HSP70 geninin hücrede var olan proteinlerin stabilizasyonunu sağladığı, hücrel stresle indüklenen yıkıma ve yanlış katlanmaya karşı proteinleri sitosolde ve organellerde koruduğu ve düzelttiği gösterilmiştir (209). Naringinin demir iyonlarını kelatlaması ve peroksil radikallerini süpürmesi ile antioksidan özellik taşıdığı bilinmektedir (97). Doğal polifenolik bileşenlerin otofaji ile indüklenen hücre ölümünü standart (canonical) veya standart olmayan (non-canonical) mekanizmalarla tetiklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (106). Pankreatik kanser, göğüs kanseri ve fibrosarkoma hücrelerinde yapılan çalışmalara göre doğal bir polifenolik bileşen olan rottlerin otofajiyi farklı mekanizmalarla indüklediği rapor edilmiştir (210-212). Yine benzer sonuçlar genistein uygulanan sıçan hepatosit hücrelerinde, over kanseri ve akciğer kanseri hücrelerinde gösterilmiştir (213-215). Eldeki bu veriler ışığında naringinin hücrelerde stres faktörünü indüklediği ve hücrede bazal olarak gerçekleşen (non-canonical) otofaji



seviyesini artırdığı saptandı. Nitekim yapılan çalışmalar, otofajinin farklı mekanizmalarla da oluşabildiğini ve açıklıkla indüklenen otofajide gerekli olan bazı proteinler olmadan da otofaji gerçekleşebildiğini ortaya koymuştur (190).

Osteosarkoma (U2OS), fare embriyonik fibroblast (MEF) ve insan böbrek (293T) hücrelerinde yapılan bir çalışmada, serbest ATG12'nin ubikitinlenmesi ve degradasyonunun, proteinin proapoptotik etkisini düzenlediğini gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre ATG12'nin ubikitin benzeri özellikleriyle otofaji, proteazom aktivitesi ve hücre ölümü arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (216). Yapılan başka bir çalışmada ATG12'nin Hepatit B virüsü (HPV) ilişkili apoptozda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (217). ATG12'nin hücrelerde artmasının, oksidatif hasar sonucu hücredeki reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin değişmemesine ve oksitlenmiş proteinlerin artmasına rağmen mitokondriyel membran potansiyelinin düzelmesine, ATP üretiminin artmasına ve antiapoptotik etki ortaya çıkmasına yol açtığı ve hücre yaşamını uzattığı insan göbek bağı damarı endotel hücreleriyle (HUVEC) yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (218). Otofaji proteinlerinden ATG12'nin antiapoptotik BCL2 ailesi üyeleriyle etkileşerek mitokondriyel apoptozu tetiklediği saptanmıştır (219).

Çalışmada RT-qPCR ve TALİ görüntü tabanlı sitometri analizi değerleri dikkate alındığında western blot sonuçları ile anlamlı bir ilişki olduğu saptandı. Buna göre ATG12, HSP70 ve p53 gen ifadelerinin artış gösterdiği uygulama gruplarında (100 µM NAR, 200 µM NAR ve 330 µM TMZ+100 µM NAR) LC3 I ve LC3 II protein seviyelerinin her ikisinde de kontrole göre artış görülürken ATG12'nin artmadığı ve apoptoz genlerinin anlatımı olmayan uygulama gruplarında (330 µM TMZ+200 µM NAR ve 660 µM TMZ+100 µM NAR) LC3 I protein seviyelerinde kontrole göre artış olmamakla birlikte LC3 II protein seviyelerinde kontrole göre artış saptandı. Apoptoz genlerinin ve otofaji genlerinin birlikte anlatımının arttığı uygulama gruplarında ise (330 µM TMZ, 660 µM TMZ ve 660 µM TMZ+200 µM NAR) LC3 I ve LC3 II protein seviyelerinin her ikisinde de kontrole göre artış olmadığı saptandı. Elde edilen verilere göre hücrede apoptozun indüklendiği ve hücrelerin apoptoza gittiği doz uygulama gruplarında otofaji gözlenmezken otofaji genlerinin arttığı ve/veya apoptoz genlerinde artış olmayan doz uygulama gruplarında otofajinin gerçekleştiği saptandı. Hücrede dinlenme halinde bazal otofaji gerçekleşirken standart otofajide olan ATG12 ve ATG5 konjugasyonu gibi bazı protein etkileşimlerinin ve proteinlerin kullanılmadığı

ve gerçekleşen bu otofajinin standart olmayan otofaji olduğu rapor edilmiştir (220). Ayrıca *Drosophila* orta bağırsağında gelişim esnasında gerçekleşen otofajide ATG7 ve ATG3 proteinlerinin kullanılmadığı da bildirilmiştir (221).

Sonuç olarak glioblastoma tedavisinde rutin olarak kullanılan temozolomidin tek başına kullanımının insan glioblastoma hücrelerinde naringin ile birlikte kullanımından daha etkili olduğu ve hücreleri daha çok ölüme götürdüğü görüldü. Naringin tek başına uygulanan gruplarda ise hücresel stresle birlikte otofajinin de arttığı gözlemlendi. Ancak naringinin otofajiyi standart otofaji yollarından bağımsız standart olmayan yollarla aktive ettiği düşünüldü. Elde edilen veriler ışığında naringinin temozolomid ile birlikte kullanımının doz ve zamana bağlı olarak temozolomidin apoptotik etkisini azalttığı ve hücreleri otofajiye götürdüğü saptandı. Bu çalışmadan elde edilen verilerin daha kapsamlı çalışmalar ile desteklendiği takdirde naringinin farklı kanser hücrelerindeki otofajik etkileri ve apoptoz-otofaji mekanizmaları arasındaki rolünün daha iyi anlaşılacağı ve bu verilerin kanser tedavisine yeni bir yaklaşım getirebileceği düşünüldü.

## SONUÇLAR

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Naringinin glioblastoma tedavisinde rutin olarak kullanılan temozolomid ile birlikte kullanımının hücrelerdeki apoptoz ve otofaji yollarına etkisinin araştırılması amaçlanan bu çalışma sonucunda;

1) U87 insan glioblastoma hücrelerine uygulanan temozolomidin en etkili uygulama süresinin 48 saat ve LD<sub>50</sub> dozunun 330 µM olduğu saptandı.

2) Temozolomid uygulaması sonunda hücrelerin apoptoza gittiği ve analizi yapılan apoptoz, otofaji ve stres gen ifadelerinde önemli artışlar olduğu belirlendi.

3) Naringinin uygulanan dozlarda U87 insan glioblastoma hücrelerinde araştırılan apoptoz yolağı genlerinin ifadelerinde artışa yol açmadığı, HSP70 ve ATG12 genlerinin ifadelerinde artışa neden olduğu saptandı.

4) Naringin tek başına uygulamasının hücrelerde stres oluşturduğu ancak hücrelerin apoptoza gitmediği ve otofajinin arttığı belirlendi.

5) Naringin ve temozolomidin birlikte kullanımında naringinin, temozolomidin apoptotik etkisine antagonist bir etki gösterdiği ve naringin uygulanan bütün gruplarda ölüm oranında azalma olduğu belirlendi.

6) ATG12 gen ifadesinde artış olan ve apoptoz genlerinin ifadesinde artış olmayan gruplarda LC3 I ve LC3 II proteinlerinde önemli bir artışla birlikte otofajinin gerçekleştiği saptandı. Elde edilen bu sonuca dayanarak ATG12'nin otofaji oluşumunda önemli bir yere sahip olduğu düşünüldü.

7) Naringin tek başına ve temozolomid ile birlikte kullanımında hücrelerde otofajinin arttığı ancak oluşan bu otofajinin standart otofajide yer alan bazı genlerin ifadesinde artış olmadan gerçekleştiği belirlendi. Bu sonuca dayanarak naringinin hücrelerde standart olmayan bazal otofajiyi artırdığı düşünüldü.

8) Apoptoz yolağı gen ifadelerinin arttığı ve apoptozun gerçekleştiği gruplarda otofaji genlerinde artış olsa dahi otofagozom oluşumunun gerçekleşmediği belirlendi. Bu hücrelerde gerçekleşen apoptoza bağlı olarak otofaji proteinlerinin de yıkılmış olabileceği düşünüldü.

9) Elde edilen veriler ışığında naringinin temozolomid ile birlikte kullanımının doz ve zamana bağlı olarak temozolomidin apoptotik etkisini azalttığı ve hücreleri otofajiye götürdüğü saptandı.

## ÖZET

Glioblastoma, dünya çapında çocuklarda ve yetişkinlerde görülebilen beyin tümörlerinin en yaygın ve sağkalım süresi en kısa olan türüdür (9-12 ay). Tedavisinde rutin olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi kullanılmakta ancak glioblastoma hücrelerinin sağlıklı beyin dokusu hücrelerinin aralarına girmesi, kemoterapiye ve apoptoza direnç göstermesi bu klasik tedavi yöntemlerinin uygulamasını kısıtlamakta ve hasta sağkalım süresini düşürmektedir.

Naringin özellikle turunçgillerde bulunan, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip bir biyoflavonoiddir. Bazı kanser türlerinde naringinin tümör oluşumunu baskıladığı, metastazı önlediği ve otofajiyi indüklediğine dair çalışmalar yapılmış olmakla birlikte kanser hücrelerindeki moleküler etki mekanizmaları yeterince araştırılmamıştır.

Bu çalışmada naringin flavonoidinin glioblastoma tedavisinde kullanılan temozolomid ile kombine uygulamalarında apoptoz ve otofaji üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla naringin ve temozolomidin tek başına ve birlikte kullanımının hücre canlılığına, apoptoza, gen ifadelerine ve LC3 protein ekspresyon düzeylerine etkileri sırasıyla MTT testi, TALİ görüntü tabanlı sitometre, RT-qPCR ve western blot yöntemleri ile analiz edildi.

Elde edilen verilere göre temozolomidin kullanılan dozlarda apoptotik ve otofajik genlerin ifadelerinde artışa neden olduğu ve hücreleri apoptotik hücre

ölümüne götürdüğü ancak LC3I ve LC3II protein seviyelerinde artışa neden olmadığı saptandı. Naringinin kullanılan dozlarda apoptotik genlerin ifadelerinde artışa neden olmadığı ancak LC3I ve LC3II protein seviyelerinde artışa neden olduğu saptandı. Naringinin temozolomid ile birlikte kullanımının doz ve zamana bağlı olarak temozolomidin apoptotik etkisini azalttığı, hücrelerde LC3I ve LC3II protein seviyelerinde artışa neden olduğu ve hücreleri otofajiye götürdüğü saptandı. Naringin tek başına ve temozolomid ile birlikte kullanımında hücrelerde otofajinin arttığı ancak oluşan bu otofajinin standart otofajide yer alan bazı genlerin ifadesinde artış olmadan gerçekleştiği belirlendi. Bu sonuca dayanarak naringinin hücrelerde standart olmayan bazal otofajiyi artırdığı düşünüldü.

**Anahtar kelimeler:** Glioblastoma, temozolomid, naringin, apoptoz, otofaji.

# **CROSSTALK BETWEEN APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN GLIOBLASTOMA TREATMENT: THE ROLE OF NARINGIN**

## **SUMMARY**

Glioblastoma is the most prevalent primary brain tumour which occur in adults and children worldwide and has a short median survival time (9-12 months). Current treatments include surgery, radiotherapy and chemotherapy but characterisation of diffuse infiltration between normal brain cells and resistance to chemotherapy and apoptosis make the current therapy restricted and lower the median survival time.

Naringin is a bioflavonoid found especially in citrus fruits and has antioxidant and antiinflammatory properties. Although several studies have shown that naringin represses tumour development, prevents metastasis and induces autophagy in some cancer types, the molecular mechanisms of naringin in cancer cells is still under investigation.

The aim of this study was to investigate the effect of naringin on apoptosis and autophagy in glioblastoma with temozolomid combination. To evaluate the effects of naringin, temozolomide and combination treatment on cell viability, apoptosis, gene expressions and protein levels; MTT assay, TALI image based cytometry, RT-qPCR and western blot methods are used respectively.

According to the results of the study, temozolomide induced apoptotic and autophagic gene expressions and apoptotic cell death but not LC3I ve LC3II protein levels in current doses. Naringin didn't induce apoptotic gene expressions but induce LC3I ve LC3II protein levels in current doses. Combination treatment of naringin with temozolomide reduced the apoptotic effects of temozolomide, induced LC3I ve LC3II protein levels and autophagy in dose and time dependent manner. In naringin treated cells (alone or in combination), autophagy is increased but this occurring autophagy is detected to be in the absence of some genes that is required in canonical autophagy. So that naringin is thought to induce basal like (non-canonical) autophagy.

**Key words:** Glioblastoma, temozolomide, naringin, apoptosis, autophagy.



## KAYNAKLAR

1. Lee SW, Kim HK, Lee NH, Yi HY, Kim HS, Hong SH, et al. The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells. *Cancer Lett.* 2015;360(2):195-204.
2. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 2001;15(11):1311-33.
3. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21(21):2683-710.
4. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(5):319-31.
5. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61(3):215-25; discussion 26-9.
6. Aoki T, Hashimoto N, Matsutani M. Management of glioblastoma. *Expert Opin Pharmacother.* 2007;8(18):3133-46.
7. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006;444(7120):756-60.
8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.

9. Mason WP, Cairncross JG. Drug Insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma--impact of a recent trial. *Nat Clin Pract Neurol*. 2005;1(2):88-95.
10. Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013(4):CD007415.
11. Lefranc F, Facchini V, Kiss R. Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist*. 2007;12(12):1395-403.
12. Klionsky DJ, Baehrecke EH, Brumell JH, Chu CT, Codogno P, Cuervo AM, et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy*. 2011;7(11):1273-94.
13. Law BY, Chan WK, Xu SW, Wang JR, Bai LP, Liu L, et al. Natural small-molecule enhancers of autophagy induce autophagic cell death in apoptosis-defective cells. *Sci Rep*. 2014;4:5510.
14. De A, De A, Papasian C, Hentges S, Banerjee S, Haque I, et al. Emblica officinalis extract induces autophagy and inhibits human ovarian cancer cell proliferation, angiogenesis, growth of mouse xenograft tumors. *PLoS One*. 2013;8(8):e72748.
15. Lindqvist LM, Heinlein M, Huang DC, Vaux DL. Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8512-7.
16. Maejima Y, Kyoji S, Zhai P, Liu T, Li H, Ivessa A, et al. Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *Nat Med*. 2013;19(11):1478-88.
17. Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, et al. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2012;287(15):12455-68.
18. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacognosy reviews*. 2014;8(16):122.
19. Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, Arya DS. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta Med*. 2014;80(6):437-51.
20. Li H, Yang B, Huang J, Xiang T, Yin X, Wan J, et al. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting beta-catenin signaling pathway. *Toxicol Lett*. 2013;220(3):219-28.
21. Wang D, Gao K, Li X, Shen X, Zhang X, Ma C, et al. Long-term naringin consumption reverses a glucose uptake defect and improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;102(1):13-20.

22. Globus JH, Strauss I. Spongioblastoma multiforme: a primary malignant form of brain neoplasm: its clinical and anatomic features. *Archives of Neurology & Psychiatry*. 1925;14(2):139-91.
23. Virchow R. *Die krankhaften Geschwülste: Strumen, Myome, Neurome, Angiome/von Rudolf Virchow: Hirschwald; 1863.*
24. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology*. 2013;15(suppl\_2):ii1-ii56.
25. Deltour I, Johansen C, Auvinen A, Feychting M, Klæboe L, Schüz J. Time trends in brain tumor incidence rates in Denmark, Finland, Norway, and Sweden, 1974–2003. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(24):1721-4.
26. Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, Kuick R, Blaivas M, Kurnit DM, et al. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer research*. 2001;61(18):6885-91.
27. Farrell CJ, Plotkin SR. Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurologic clinics*. 2007;25(4):925-46.
28. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61(1):25-41.
29. Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*2000.
30. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2007;114(2):97-109.
31. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, et al. Genetic pathways to glioblastoma. *Cancer research*. 2004;64(19):6892-9.
32. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development*. 2007;21(21):2683-710.
33. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(5):492-507.
34. Network CGAR. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061.
35. Lesniak MS, Brem H. Targeted therapy for brain tumours. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(6):499.

36. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell*. 2010;17(1):98-110.
37. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(5):319.
38. Berens ME, Giese A. "... those left behind." *Biology and Oncology of Invasive Glioma Cells*. *Neoplasia*. 1999;1(3):208-19.
39. Uddin AS. Neurologic Manifestations of Glioblastoma Multiforme 2015 [Available from: <http://emedicine.medscape.com>].
40. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):987-96.
41. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):997-1003.
42. Elder RH, Jansen JG, Weeks RJ, Willington MA, Deans B, Watson AJ, et al. Alkylpurine–DNA–N-Glycosylase Knockout Mice Show Increased Susceptibility to Induction of Mutations by Methyl Methanesulfonate. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(10):5828-37.
43. Smith SA, Engelward BP. In vivo repair of methylation damage in Aag 3-methyladenine DNA glycosylase null mouse cells. *Nucleic acids research*. 2000;28(17):3294-300.
44. Agnihotri S, Gajadhar AS, Ternamian C, Gorlia T, Diefes KL, Mischel PS, et al. Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(1):253.
45. ARSLAN SA, GÜNEY YY, ALTUNDAĞ MB, ABANUZ H, ERTAŞ G, DEMİR E, et al. Yüksek gradlı glial tümörlerde radyoterapi sonuçları ve prognostik faktörler: Ankara Onkoloji Hastanesi'nin beş yıllık deneyimi. *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*. 2014;29(3).
46. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(6):1046-69.
47. Giese A, Schröder F, Steiner A, Westphal M. Migration of human glioma cells in response to tumour cyst fluids. *Acta neurochirurgica*. 1996;138(11):1331-40.
48. Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran N, Hoelzinger D, Berens M. Molecular targets of glioma invasion. *Cellular and molecular life sciences*. 2007;64(4):458-78.

49. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*. 2009;324(5930):1029-33.
50. Warburg O. On the origin of cancer. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
51. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell*. 2008;13(6):472-82.
52. Stern DM, Du Yan S, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing research reviews*. 2002;1(1):1-15.
53. Plas DR, Thompson CB. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2002;13(2):75-8.
54. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*. 1994;33(31):9045-51.
55. Tisdale MJ. Antitumour imidazotetrazines—XV: Role of guanine O6 alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. *Biochemical pharmacology*. 1987;36(4):457-62.
56. Rottenberg D, Ginos J, Kearfott K, Junck L, Bigner D. In vivo measurement of regional brain tissue pH using positron emission tomography. *Annals of neurology*. 1984;15(S1):98-102.
57. 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.
58. Babu NJ, Sanphui P, Nath NK, Khandavilli UR, Nangia A. Temozolomide hydrochloride dihydrate. *CrystEngComm*. 2013;15(4):666-71.
59. Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, et al. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA repair*. 2004;3(11):1389-407.
60. Wedge S, Porteous J, Newlands E. 3-aminobenzamide and/or O6-benzylguanine evaluated as an adjuvant to temozolomide or BCNU treatment in cell lines of variable mismatch repair status and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity. *British journal of cancer*. 1996;74(7):1030.
61. Kyrtopoulos SA, Anderson LM, Chhabra SK, Souliotis VL, Pletsas V, Valavanis C, et al. DNA adducts and the mechanism of carcinogenesis and cytotoxicity of methylating agents of environmental and clinical significance. *Cancer detection and prevention*. 1997;21(5):391-405.

62. Margison GP, Santibáñez-Koref MF. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Role in carcinogenesis and chemotherapy. *Bioessays*. 2002;24(3):255-66.
63. Mojas N, Lopes M, Jiricny J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes & development*. 2007;21(24):3342-55.
64. D'Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, et al. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Molecular pharmacology*. 1998;54(2):334-41.
65. Cejka P, Stojic L, Mojas N, Russell AM, Heinimann K, Cannavó E, et al. Methylation-induced G 2/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *The EMBO journal*. 2003;22(9):2245-54.
66. Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA repair*. 2004;3(8):1091-101.
67. Zhang J, FG Stevens M, D Bradshaw T. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology*. 2012;5(1):102-14.
68. Nay SL, O'Connor TR. Direct repair in mammalian cells. *New Research Directions in DNA Repair: InTech*; 2013.
69. Horton JK, Wilson SH. Hypersensitivity phenotypes associated with genetic and synthetic inhibitor-induced base excision repair deficiency. *DNA repair*. 2007;6(4):530-43.
70. Kaina B, Christmann M. DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2002;40(8):354-67.
71. Margison GP, Povey AC, Kaina B, Santibáñez Koref MF. Variability and regulation of O 6-alkylguanine–DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*. 2003;24(4):625-35.
72. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair*. 2007;6(8):1079-99.
73. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:629-56.
74. Middleton MR, Margison GP. Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of a DNA-repair pathway. *The lancet oncology*. 2003;4(1):37-44.
75. Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis*. 2001;22(12):1931-7.
76. Alvino E, Castiglia D, Caporali S, Pepponi R, Caporaso P, Lacal PM, et al. A single cycle of treatment with temozolomide, alone or combined with O6-benzylguanine, induces strong chemoresistance in melanoma cell clones in vitro: role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the mismatch repair system. *International journal of oncology*. 2006;29(4):785-97.

77. Lee SW, Kim H-K, Lee N-H, Yi H-Y, Kim H-S, Hong SH, et al. The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells. *Cancer letters*. 2015;360(2):195-204.
78. Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, Kiss R. Present and potential future issues in glioblastoma treatment. *Expert review of anticancer therapy*. 2006;6(5):719-32.
79. Ochs K, Kaina B. Apoptosis induced by DNA Damage O-Methylguanine is Bcl-2 and Caspase-9/3 regulated and Fas/Caspase-8 independent. *Cancer research*. 2000;60(20):5815-24.
80. Katayama M, Kawaguchi T, Berger M, Pieper R. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death & Differentiation*. 2007;14(3).
81. Katayama M, Kawaguchi T, Berger M, Pieper R. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell death and differentiation*. 2007;14(3):548.
82. Milano V, Piao Y, LaFortune T, de Groot J. Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(2):394-406.
83. Giatromanolaki A, Sivridis E, Mitrakas A, Kalamida D, Zois CE, Haider S, et al. Autophagy and lysosomal related protein expression patterns in human glioblastoma. *Cancer biology & therapy*. 2014;15(11):1468-78.
84. Fu J, Liu Z-G, Liu X-m, Chen F-r, Shi H-L, Pangjessse C, et al. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(11):1255-9.
85. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*. 2013;4.
86. Amado NG, Cerqueira DM, Menezes FS, da Silva JFM, Neto VM, Abreu JG. Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastoma cell proliferation and changes  $\beta$ -catenin cellular localization. *Anti-cancer drugs*. 2009;20(7):543-52.
87. Park KI, Park HS, Nagappan A, Hong GE, Lee DH, Kang SR, et al. Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean *Citrus aurantium* L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food chemistry*. 2012;135(4):2728-35.
88. Delle Monache S, Sanità P, Trapasso E, Ursino MR, Dugo P, Russo M, et al. Mechanisms underlying the anti-tumoral effects of *Citrus bergamia* juice. *PLoS One*. 2013;8(4):e61484.

89. Androutsopoulos VP, Ruparelia K, Arroo RR, Tsatsakis AM, Spandidos DA. CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Toxicology*. 2009;264(3):162-70.
90. Sánchez-Rabameda F, Jáuregui O, Casals I, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventós RM. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*. 2003;38(1):35-42.
91. Exarchou V, Godejohann M, van Beek TA, Gerothanassis IP, Vervoort J. LC-UV-solid-phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano. *Analytical Chemistry*. 2003;75(22):6288-94.
92. Minoggio M, Bramati L, Simonetti P, Gardana C, Iemoli L, Santangelo E, et al. Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2003;47(2):64-9.
93. Sinclair WB. *The grapefruit: its composition, physiology & products*: UCANR Publications; 1972.
94. Asahina Y, Inubuse M. Über die Konstitution des Naringenins (II. Mitteilung über die Flavanon-Glucoside). *European Journal of Inorganic Chemistry*. 1928;61(7):1514-6.
95. Rouseff RL, Martin SF, Youtsey CO. Quantitative survey of naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1987;35(6):1027-30.
96. Hynes MJ, O'Coinceanainn Mn. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. *Journal of inorganic biochemistry*. 2004;98(8):1457-64.
97. Deng W, Fang X, Wu J. Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron? *Radiation Physics and Chemistry*. 1997;50(3):271-6.
98. Yadav V, Yadav S, Yadava S, Yadav KD.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Aspergillus flavus* MTCC-9606 isolated from lemon fruit peel. *International journal of food science & technology*. 2011;46(2):350-7.
99. Camargo CA, Gomes-Marcondes MCC, Wutzki NC, Aoyama H. Naringin inhibits tumor growth and reduces interleukin-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  levels in rats with Walker 256 carcinosarcoma. *Anticancer research*. 2012;32(1):129-33.
100. Nie Y-C, Wu H, Li P-B, Luo Y-L, Long K, Xie L-M, et al. Anti-inflammatory effects of naringin in chronic pulmonary neutrophilic inflammation in cigarette smoke-exposed rats. *Journal of medicinal food*. 2012;15(10):894-900.
101. Zeng L, Zhen Y, Chen Y, Zou L, Zhang Y, Hu F, et al. Naringin inhibits growth and induces apoptosis by a mechanism dependent on reduced activation of



NF- $\kappa$ B/COX-2-caspase-1 pathway in HeLa cervical cancer cells. *International journal of oncology*. 2014;45(5):1929-36.

102. Raha S, Yumnam S, Hong GE, Lee HJ, Saralamma VVG, Park H-S, et al. Naringin induces autophagy-mediated growth inhibition by downregulating the PI3K/Akt/mTOR cascade via activation of MAPK pathways in AGS cancer cells. *International journal of oncology*. 2015;47(3):1061-9.
103. Aroui S, Najlaoui F, Chtourou Y, Meunier A-C, Laajimi A, Kenani A, et al. Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway. *Tumor Biology*. 2016;37(3):3831-9.
104. Li J, Dong Y, Hao G, Wang B, Wang J, Liang Y, et al. Naringin suppresses the development of glioblastoma by inhibiting FAK activity. *Journal of drug targeting*. 2017;25(1):41-8.
105. Li H, Yang B, Huang J, Xiang T, Yin X, Wan J, et al. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting  $\beta$ -catenin signaling pathway. *Toxicology letters*. 2013;220(3):219-28.
106. Hasima N, Ozpolat B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell death & disease*. 2014;5(11):e1509.
107. Cope FOT, David L, Tomei L, Cope F. Apoptosis: the molecular basis of cell death 1991.
108. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):3-11.
109. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(6).
110. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):2942-55.
111. Yuan J. Death Receptor Signaling Interactive Pathway 2016 [Available from: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-apoptosis/death-receptor-signaling-interactive-pathway/pathways-apoptosis-death>].
112. Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13(19):2514-26.
113. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 2009;325(5938):332-6.
114. Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene*. 2012;31(49):5045-60.

115. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):2942-55.
116. Wertz IE, Dixit VM. Ubiquitin-mediated regulation of TNFR1 signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(3-4):313-24.
117. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):561-74.
118. Dewson G, Kratina T, Czabotar P, Day CL, Adams JM, Kluck RM. Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol Cell.* 2009;36(4):696-703.
119. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2000;2(3):156-62.
120. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-30.
121. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):647-56.
122. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 19):3209-14.
123. Tait SW, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(9).
124. Yuan J. Regulation of Apoptosis: Interactive Pathway 2012 [Available from: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-apoptosis/regulation-of-apoptosis-interactive-pathway/pathways-apoptosis-regulation>].
125. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.
126. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene.* 2008;27(48):6252-75.
127. Silke J, Meier P. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2).
128. Estornes Y, Bertrand MJ. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;39:106-14.
129. Chen DJ, Huerta S. Smac mimetics as new cancer therapeutics. *Anticancer Drugs.* 2009;20(8):646-58.
130. Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol.* 2001;153(5):999-1010.

131. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 2008;27(50):6434-51.
132. Johansson AC, Appelqvist H, Nilsson C, Kagedal K, Roberg K, Ollinger K. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*. 2010;15(5):527-40.
133. Appelqvist H, Waster P, Kagedal K, Ollinger K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(4):214-26.
134. Chen W, Li N, Chen T, Han Y, Li C, Wang Y, et al. The lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology (PH) and FYVE domains (LAPF), representative of a novel family of PH and FYVE domain-containing proteins, induces caspase-independent apoptosis via the lysosomal-mitochondrial pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(49):40985-95.
135. Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(7):545.
136. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology*. 2004;6(12):1221.
137. Denton D, Xu T, Kumar S. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunology and cell biology*. 2015;93(1):35.
138. Berry DL, Baehrecke EH. Autophagy functions in programmed cell death. *Autophagy*. 2008;4(3):359-60.
139. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(9):741.
140. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
141. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010;90(4):1383-435.
142. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct*. 2008;33(1):109-22.
143. Kochl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*. 2006;7(2):129-45.
144. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:107-32.

145. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(12):759-74.
146. Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 2009;5(8):1180-5.
147. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol.* 2009;11(12):1433-7.
148. Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.* 2014;24(1):58-68.
149. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 1998;273(7):3963-6.
150. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(9):709-30.
151. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol.* 2009;11(4):468-76.
152. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol.* 2009;11(4):385-96.
153. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol.* 2012;32(1):2-11.
154. Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, et al. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol.* 2008;10(7):776-87.
155. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell.* 2008;19(12):5360-72.
156. Carlsson SR, Simonsen A. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J Cell Sci.* 2015;128(2):193-205.
157. Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy.* 2010;6(6):764-76.
158. Dunlop EA, Tee AR. The kinase triad, AMPK, mTORC1 and ULK1, maintains energy and nutrient homeostasis. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(4):939-43.
159. Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy.* 2013;9(2):124-37.

160. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2008;182(4):685-701.
161. Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature.* 2007;447(7148):1121-5.
162. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol.* 2006;8(7):688-99.
163. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cialing HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1142-51.
164. Ciechomska IA, Goemans GC, Skepper JN, Tolkovsky AM. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene.* 2009;28(21):2128-41.
165. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005;122(6):927-39.
166. Vicencio JM, Ortiz C, Criollo A, Jones AW, Kepp O, Galluzzi L, et al. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):1006-17.
167. Chang NC, Nguyen M, Germain M, Shore GC. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *EMBO J.* 2010;29(3):606-18.
168. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.* 2008;30(6):678-88.
169. Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol.* 2010;191(1):155-68.
170. Hu B. Autophagy Signaling Interactive Pathway 2016 [Available from: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-autophagy/autophagy-signaling-interactive-pathway/pathways-autophagy>].
171. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 2013;495(7441):389-93.
172. Roberts R, Ktistakis NT. Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays Biochem.* 2013;55:17-27.

173. Simonsen A, Stenmark H. Self-eating from an ER-associated cup. *J Cell Biol.* 2008;182(4):621-2.
174. Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy.* 2010;6(4):506-22.
175. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell.* 2014;55(2):238-52.
176. Proikas-Cezanne T, Takacs Z, Donnes P, Kohlbacher O. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci.* 2015;128(2):207-17.
177. Velikkakath AK, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell.* 2012;23(5):896-909.
178. Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K, Kadera H, Kumada S, Sugai K, et al. De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet.* 2013;45(4):445-9, 9e1.
179. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* 2008;9(9):859-64.
180. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 2010;29(11):1792-802.
181. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell.* 2008;19(5):2092-100.
182. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem.* 2007;282(52):37298-302.
183. Li M, Chen X, Ye QZ, Vogt A, Yin XM. A high-throughput FRET-based assay for determination of Atg4 activity. *Autophagy.* 2012;8(3):401-12.
184. Li M, Hou Y, Wang J, Chen X, Shao ZM, Yin XM. Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7327-38.
185. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007;26(7):1749-60.

186. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol.* 2000;151(2):263-76.
187. Tanida I. Autophagy basics. *Microbiol Immunol.* 2011;55(1):1-11.
188. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 2007;26(10):2527-39.
189. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2006;8(10):1124-32.
190. Lindqvist L, Simon A, Baehrecke EH. Current questions and possible controversies in autophagy. *Cell death discovery.* 2015;1.
191. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 2009;1793(9):1516-23.
192. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical cancer research.* 2009;15(17):5308-16.
193. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin X-M, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical cancer research.* 2011;17(4):654-66.
194. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Current topics in developmental biology.* 2007;78:217-45.
195. Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, Zhang J. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer.* 2010;1806(2):220-9.
196. Christmann M, Diesler K, Majhen D, Steigerwald C, Berte N, Freund H, et al. Integrin  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  silencing sensitizes malignant glioma cells to temozolomide by suppression of homologous recombination repair. *Oncotarget.* 2017;8(17):27754.
197. Yang L, Wang Y, Guo H, Guo M. Synergistic anti-cancer effects of icariin and temozolomide in glioblastoma. *Cell biochemistry and biophysics.* 2015;71(3):1379-85.
198. Séry Q, Rabé M, Oliver L, Vallette FM, Gratas C. HB-EGF is associated with DNA damage and Mcl-1 turnover in human glioma cell lines treated by Temozolomide. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017;493(4):1377-83.
199. Zhang W-b, Wang Z, Shu F, Jin Y-h, Liu H-y, Wang Q-j, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in

- glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *Journal of biological chemistry*. 2010;285(52):40461-71.
200. Shi L, Zhang S, Feng K, Wu F, Wan Y, Wang Z, et al. MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis. *International journal of oncology*. 2012;40(1):119-29.
  201. Tan T-W, Chou Y-E, Yang W-H, Hsu C-J, Fong Y-C, Tang C-H. Naringin suppress chondrosarcoma migration through inhibition vascular adhesion molecule-1 expression by modulating miR-126. *International immunopharmacology*. 2014;22(1):107-14.
  202. Kanno S-i, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Journal of pharmacological sciences*. 2003;92(2):166-70.
  203. Erdogan S, Doganlar O, Doganlar ZB, Turkecul K. Naringin sensitizes human prostate cancer cells to paclitaxel therapy. *Prostate International*. 2017.
  204. Kim D-I, Lee S-J, Lee S-B, Park K, Kim W-J, Moon S-K. Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G 1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression. *Carcinogenesis*. 2008;29(9):1701-9.
  205. Ramesh E, Alshatwi AA. Naringin induces death receptor and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells. *Food and chemical toxicology*. 2013;51:97-105.
  206. Park YH, Seo JH, Park J-H, Lee HS, Kim K-W. Hsp70 acetylation prevents caspase-dependent/independent apoptosis and autophagic cell death in cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2017;51(2):573-8.
  207. Budina-Kolomets A, Balaburski GM, Bondar A, Beeharry N, Yen T, Murphy ME. Comparison of the activity of three different HSP70 inhibitors on apoptosis, cell cycle arrest, autophagy inhibition, and HSP90 inhibition. *Cancer biology & therapy*. 2014;15(2):194-9.
  208. Yang F, Yang Y-P, Mao C-J, Cao B-Y, Cai Z-L, Shi J-J, et al. Role of autophagy and proteasome degradation pathways in apoptosis of PC12 cells overexpressing human  $\alpha$ -synuclein. *Neuroscience letters*. 2009;454(3):203-8.
  209. Beckmann RP, Lovett M, Welch WJ. Examining the function and regulation of hsp 70 in cells subjected to metabolic stress. *The Journal of Cell Biology*. 1992;117(6):1137-50.
  210. Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Fok J, Kondo Y, Lopez-Berestein G. Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Research*. 2007;5(3):241-9.
  211. Balgi AD, Fonseca BD, Donohue E, Tsang TC, Lajoie P, Proud CG, et al. Screen for chemical modulators of autophagy reveals novel therapeutic inhibitors of mTORC1 signaling. *PloS one*. 2009;4(9):e7124.



212. Pan W, Yang H, Cao C, Song X, Wallin B, Kivlin R, et al. AMPK mediates curcumin-induced cell death in CaOV3 ovarian cancer cells. *Oncology reports*. 2008;20(6):1553-9.
213. Blankson H, Holen I, Seglen PO. Disruption of the cytokeratin cytoskeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Experimental cell research*. 1995;218(2):522-30.
214. Gossner G, Choi M, Tan L, Fogoros S, Griffith KA, Kuenker M, et al. Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2007;105(1):23-30.
215. Ali AB, Nin DS, Tam J, Khan M. Role of chaperone mediated autophagy (CMA) in the degradation of misfolded N-CoR protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *PLoS One*. 2011;6(9):e25268.
216. Haller M, Hock AK, Giampazolias E, Oberst A, Green DR, Debnath J, et al. Ubiquitination and proteasomal degradation of ATG12 regulates its proapoptotic activity. *Autophagy*. 2014;10(12):2269-78.
217. Kunanopparat A, Kimkong I, Palaga T, Tangkijvanich P, Sirichindakul B, Hirankarn N. Increased ATG5-ATG12 in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and their role in apoptosis. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(37):8361.
218. Mai S, Muster B, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan. *Autophagy*. 2012;8(1):47-62.
219. Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*. 2011;44(5):698-709.
220. Murrow L, Malhotra R, Debnath J. ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function. *Nature cell biology*. 2015;17(3):300-10.
221. Chang T-K, Shrivage BV, Hayes SD, Powers CM, Simin RT, Harper JW, et al. Uba1 functions in Atg7- and Atg3-independent autophagy. *Nature cell biology*. 2013;15(9):1067-78.

## ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ	SAYFA
Şekil 1. Beyin hücrelerinin ve glioblastomanın oluşumu	4
Şekil 2. Primer ve sekonder glioblastomanın oluşumu	6
Şekil 3. Glioblastoma multiform MRI görüntüsü	7
Şekil 4. Temozolomid ve etki mekanizması	12
Şekil 5. O6-MeG-DNA metiltransferaz (MGMT) enzimi ve etki mekanizması	13
Şekil 6. O6-MeG-DNA ve MMR tamir mekanizması	15
Şekil 7. Naringin ve Naringenine dönüşme mekanizması	17
Şekil 8. Dışsal apoptoz yolağının şeması	19
Şekil 9. İçsel apoptoz yolağının şeması	22
Şekil 10. Otofaji gerçekleşmekte olan iki hücrede otofagolizozomların yapısı	25
Şekil 11. Otofagozom oluşumunda izolasyon membranlarının (IM) endoplasmik retikulum (ER) ile yakından ilişkili olduğunu gösteren elektron mikroskopu görüntüsü	27
Şekil 12. Otofaji mekanizması ve rol alan bazı proteinler	29
Şekil 13. U87 insan glioblastoma hücrelerinin invert ışık mikroskopu	36

altındaki görüntüsü

<b>Şekil 14.</b> Temozolomidin kimyasal yapısı	39
<b>Şekil 15.</b> Naringinin kimyasal yapısı	39
<b>Şekil 16.</b> MTT'nin kimyasal yapısı	40
<b>Şekil 17.</b> Kantitatif gerçek zamanlı PCR cihazı (qRT PCR)	44
<b>Şekil 18.</b> Tali sitometre cihazı	45
<b>Şekil 19.</b> U87 hücre serisinde 24 saatlik TMZ dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi.	51
<b>Şekil 20.</b> U87 hücre serisinde 48 saatlik TMZ dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi.	52
<b>Şekil 21.</b> U87 hücre serisinde 24 saatlik NAR dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi.	54
<b>Şekil 22.</b> U87 hücre serisinde 48 saatlik NAR dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi.	55
<b>Şekil 23.</b> U87 hücre serisinde 48 saatlik NAR 100 µM ve TMZ dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi.	57
<b>Şekil 24.</b> U87 hücre serisinde 48 saatlik NAR 200 µM ve TMZ dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi.	58
<b>Şekil 25.</b> U87 hücre serisinde 48 saatlik 330 µM TMZ (LD50) ve NAR dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi.	60
<b>Şekil 26.</b> U87 hücre serisinde 48 saatlik 660 µM TMZ (2LD50) ve NAR dozlarının uygulandığı gruplarda MTT boyama sonucu canlı hücrelerin yüzdesi.	61
<b>Şekil 27.</b> U87 hücre serisinde a) Kontrol b) 330 µM TMZ ve c) 660 µM TMZ d) 100 µM NAR e) 200 µM NAR f) 330 µM TMZ+100 µM NAR g) 330 µM TMZ+200 µM NAR h) 660 µM TMZ+100 µM NAR ı) 660 µM TMZ+200 µM NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyaması sonucu boyanan hücrelerin gösterimi	63

- Şekil 28.** U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu ışığa vermeyen canlı hücrelerin yüzdesi. 64
- Şekil 29.** U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu boyanan ölü hücrelerin yüzdesi. 65
- Şekil 30.** U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu boyanan apoptotik hücrelerin yüzdesi. 65
- Şekil 31.** U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) boyama sonucu boyanan hücrelerin yüzdesi. 66
- Şekil 32.** U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi. 68
- Şekil 33.** U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi. 69
- Şekil 34.** U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi. 70
- Şekil 35.** U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda BCL2 gen ifadesinin değişimi. 70
- Şekil 36.** U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinin değişimi. 71
- Şekil 37.** U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinin değişimi. 72
- Şekil 38.** U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinin değişimi. 73
- Şekil 39.** U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda BAX gen ifadesinin değişimi. 73

<b>Şekil 40.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi.	74
<b>Şekil 41.</b> U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi.	75
<b>Şekil 42.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi.	76
<b>Şekil 43.</b> U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda Kaspaz 3 gen ifadesinin değişimi.	76
<b>Şekil 44.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi.	77
<b>Şekil 45.</b> U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi.	78
<b>Şekil 46.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi.	79
<b>Şekil 47.</b> U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda p53 gen ifadesinin değişimi.	79
<b>Şekil 48.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi.	80
<b>Şekil 49.</b> U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi.	81
<b>Şekil 50.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi.	82
<b>Şekil 51.</b> U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda HSP70 gen ifadesinin değişimi.	82
<b>Şekil 52.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi.	83

<b>Şekil 53.</b> U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi.	84
<b>Şekil 54.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi.	85
<b>Şekil 55.</b> U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda Beklin 1 gen ifadesinin değişimi.	85
<b>Şekil 56.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi.	86
<b>Şekil 57.</b> U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi.	87
<b>Şekil 58.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi.	88
<b>Şekil 59.</b> U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda ATG7 gen ifadesinin değişimi.	88
<b>Şekil 60.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi.	89
<b>Şekil 61.</b> U87 hücre serisine NAR dozları uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi.	90
<b>Şekil 62.</b> U87 hücre serisine TMZ LD50 ve 2LD50 dozları ve NAR kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi.	91
<b>Şekil 63.</b> U87 hücre serisine NAR dozları ve TMZ LD50 ve 2LD50 kombinasyonları uygulaması yapılan gruplarda ATG12 gen ifadesinin değişimi.	91
<b>Şekil 64.</b> U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda $\beta$ -aktin, LC3 I ve LC3 II protein bantlarının görüntüsü	92

**Şekil 65.** U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda LC3 I ve LC3 II protein seviyeleri.

93



<b>TABLolar LİSTESİ</b>	<b>SAYFA</b>
<b>Tablo 1.</b> Glioblastoma olgularına ait özellikler ve sağkalıma etkileri	9
<b>Tablo 2.</b> Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve menşei	34
<b>Tablo 3.</b> Çalışmada kullanılan sarf ve diğer malzemeler, markaları ve menşei	35
<b>Tablo 4.</b> Modifiye edilmiş Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) içeriği	37
<b>Tablo 5.</b> Bir reaksiyonluk cDNA ana karışım içerisindeki	42
<b>Tablo 6.</b> qRT PCR için kullanılan primer çiftleri, dizilimleri ve uzunlukları	43
<b>Tablo 7.</b> U87 hücre serisinde 50-1000 $\mu$ M doz aralıklarında TMZ uygulamasının hücre canlılığına etkisi.	53
<b>Tablo 8.</b> U87 hücre serisinde 25-1000 $\mu$ M doz aralıklarında NAR uygulamasının hücre canlılığına etkisi.	56
<b>Tablo 9.</b> U87 hücre serisinde 48 saatlik NAR 100 $\mu$ M ve 200 $\mu$ M ile 50-1000 $\mu$ M doz aralıklarında TMZ uygulamasının hücre canlılığına etkisi.	59
<b>Tablo 10.</b> U87 hücre serisinde 48 saatlik TMZ 330 $\mu$ M ve 660 $\mu$ M ile 50-1000 $\mu$ M doz aralıklarında NAR uygulamasının hücre canlılığına etkisi.	62
<b>Tablo 11.</b> U87 hücre serisinde TMZ, NAR ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda Tali sitometri ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdeleri	67



## ÖZGEÇMİŞ

<b>Ad:</b>	Meryem Ayşenur
<b>Soyad:</b>	MERAKLI TURHAN
<b>Doğum Yeri:</b>	Tire/İZMİR
<b>Doğum Tarihi:</b>	31.07.1992
<b>Görev Yeri:</b>	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
<b>Yabancı Dil:</b>	İngilizce
<b>E-Posta Adresi</b>	meryemaysenurmerakli@hotmail.com

<b>Tarih</b>	<b>Eğitim</b>
2015-	Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji A.B.D.- Yüksek Lisans
2010-2014	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü- Lisans
<b>Akademik Ünvanları</b>	
2015-	Araştırma Görevlisi

## YAYINLAR

1. Doğanlar O, Doğanlar ZB, Meraklı MA, Serttaş R, Üstünol E. Ferulik asidin insan meme ve prostat kanseri hücrelerinde oksidatif stres ilişkili apoptotik ve antikanserojen etkileri, 27 - 30 Ekim 2015, XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Fethiye
2. Doğanlar O, Doğanlar ZB, Tabakçioğlu K, Meraklı MA, Türker P, Kaşit M. İn vitro kan kültüründe ağır metal miks-genotoksisite ilişkisinde quercetin ve naringin flavonoidlerinin koruyucu rolü 16-19 Nisan 2015, II. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, Kayseri
3. Turhan MA, Doğanlar ZB. Crosstalk Between Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Treatment The Role of Naringin 5-7 Ekim 2017, Uluslararası Tıbbi, Aromatik ve Boya Bitkileri Sempozyumu (REYHAN 2017), Malatya

## PROJELER

1. Glioblastoma Tedavisinde Apoptoz ve Otofaji Arasındaki İlişkide Naringinin Rolünün Belirlenmesi, 2016, TÜBAP, Araştırmacı
2. ER stres indüklenmiş HT-29 kolon kanser hücre serisinde NF-KB inhibitörü ile birlikte uygulanan Naringinin mitokondrial apoptoz sinyal yolağındaki rolü, 2016, TÜBAP, Araştırmacı
3. Sağlıklı erkeklerde eksternal ısı şoku proteinlerinde egzersize bağlı değişiminin incelenmesi, 2017, TÜBAP, Araştırmacı
4. Antineoplastik kanser terapiyi kaynaklı retinal pigment hücre hasarında, antioksidan, apoptoz, otofaji yolakları arasındaki ilişki ve naringinin koruyucu rolü, 2017, TÜBAP, Araştırmacı