



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



**Olea europaea YAPRAK ÖZÜTÜNÜN (OLE) GLİOBLASTOMA  
HÜCRELERİNİN BİYOLOJİK DAVRANIŞLARINA OLAN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melis MUTLU

(Yüksek Lisans Tezi)

BURSA-2019



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

*Olea europaea* YAPRAK  
ÖZÜTÜNÜN (OLE)  
GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN  
BİYOLOJİK DAVRANIŞLARINA  
OLAN ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Melis MUTLU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Berrin TUNCA

118S799 numaralı TÜBİTAK 1002  
projesi kapsamında desteklenmiştir.

BURSA-2019

## ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "Oleu europaea Yaprak Özütünün (OLE) Glioblastoma Hücrelerinin Biyolojik Davranışlarına Olan Etkilerinin Araştırılması" adlı çalışmamın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Adı Soyadı  
Melis MUTLU


Tarih ve İmza

06.09.2019



## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Melis MUTLU tarafından hazırlanan *Olea europaea* Yaprak Özütünün (OLE) Glioblastoma Hücrelerinin Biyolojik Davranışlarına Olan Etkilerinin Araştırılması konulu Yüksek Lisans tezi 02.11.2023 günü, 11.00...-12.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Berrin TUNCA	
Üye	Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER	
Üye	Doc. Dr. Gürler AKPINAR	
Üye		
Üye		

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20.08.2023 tarih ve 2023/23 sayılı toplantısında alınan 02 numaralı karar ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER  
Enstitü Müdürü





## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

29.1.2019

Adı Soyadı: Melis MUTLU

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: *Olea europaea* Yaprak Özütünün (OLE) Glioblastoma Hücrelerinin Biyolojik Davranışlarına Olan Etkilerinin Araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

### DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Berrin TUNCA

İmza:

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI .....	II
KABUL ONAY .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER .....	IV
TÜRKÇE ÖZET .....	IX
İNGİLİZCE ÖZET .....	X
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1 Beyin Tümörleri .....	5
2.1.1 GB'lerin Epidemiyolojisi .....	6
2.1.2 GB'lerde Risk Faktörleri .....	7
2.1.3 GB'de Tümör Lokalizasyonu .....	8
2.1.4 GB Tedavisi .....	8
2.1.4.1 TMZ .....	9
2.2 GB Oluşumunda Etkili Olan Genetik ve Epigenetik Faktörler .....	10
2.2.1 Genetik Faktörler .....	11
2.2.1.1 PI3K/PTEN/Akt/mTOR Yolağı .....	11
2.2.1.2 RAS/MAPK Yolağı .....	14
2.2.1.3 pRB Yolağı .....	15
2.2.1.4 STAT3/ZIP4 Yolağı .....	16
2.2.1.5 TP53/MDM2/CDKN2A-P14ARF Yolağı .....	17
2.2.1.6 IDH 1/2 Mutasyonu .....	19
2.2.1.7 TERT Mutasyonu .....	19
2.2.1.8 Heterojenite kaybı (LOH) .....	20
2.2.2 Epigenetik Faktörler .....	20
2.2.2.1 DNA Metilasyonu .....	21
2.2.2.2 Histon Modifikasyonu .....	22
2.2.2.3 miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Değişimi .....	24
2.2.2.4 Long-noncoding RNA Ekspresyon Seviyelerinin Değişimi .....	25
2.3 GB'lerin Agresifliğinde Etkili Olan Moleküler Özellikler .....	29
2.3.1 Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Mekanizması .....	29
2.3.2 Kanser Kök Hücrelerinin Varlığı .....	32

2.3.3 Koloni Oluşturma Yeteneği .....	33
2.3.4 Yara İyileştirme Yeteneği .....	34
2.4 GB'lerin Tedavisinde Etkili Olabilecek Süreçler .....	35
2.4.1 Çoklu İlaç Direnci .....	35
2.4.2 Hücre Yaşlanması.....	37
2.5 Tümörün Agresifliğinin Belirlenmesinde 3 Boyutlu Tümör Modelinin Geliştirilmesi .....	39
2.6 GB Tedavisinde Bitkisel Özütlerin Kullanımı.....	43
2.6.1 <i>Olea europaea</i> Yaprak Özütü .....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Gereçler .....	47
3.1.1 Kullanılan Aletler ve Cihazlar .....	47
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	49
3.2. Yöntem .....	52
3.2.1 OLE'nin Temini ve Hazırlanışı.....	52
3.2.1.1 Hücre Hatlarının Temini .....	52
3.2.2 <i>İn-Vitro</i> Analizler.....	53
3.2.2.1 OLE ve TMZ'nin GB Hücrelerinin Biyolojik Davranışlarına Olan Etkilerinin Araştırılması.....	53
3.2.2.2 Kültür Ortamının Optimizasyonu ve Hücrelerin Çoğaltılması.....	53
3.2.2.3 Hücrelerin Pasajlanması.....	53
3.2.2.4 Hücre Sayımı.....	54
3.2.2.5 Hücrelerin Stoklanması .....	54
3.2.3 Ana Stokların Hazırlanması ve Uygun Konsantrasyonların Belirlenmesi .....	54
3.2.3.1 TMZ Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi.....	54
3.2.3.2 OLE Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi.....	55
3.2.4 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Muamele Edilmesinin Tümörün Agresifliği Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	56
3.2.4.1 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Yara İyileştirmesi Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi.....	56
3.2.4.2 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Koloni Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi.....	57
3.2.4.3 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte EMT Belirteçleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi .....	59
3.2.4.3.1 RNA İzolasyonu .....	60
3.2.4.3.2. Komplementer DNA (Complamenter DNA, cDNA) Sentezi.....	60

3.2.4.3.3 RT-PCR Analizi.....	61
3.2.4.4 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte CSC Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	62
3.2.4.5 OLE'nin Etkilerinin 3B Tümör Modelinde Değerlendirilmesi.....	62
3.2.5 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Muamele Edilmesinin Tedavi Yanıtı İle İlişkili Mekanizmalar Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	67
3.2.5.1 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte MDR İle İlişkili Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	67
3.2.5.2 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Hücre Yaşlanması Üzerine Etkisinin İncelenmesi .....	68
3.2.6 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte LncRNA Ekspresyon Profilleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	69
3.2.7. İstatistiksel Analiz .....	69
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>70</b>
4.1. OLE ve TMZ'nin Tek Başına ve Kombinasyon Durumunda T98G, U-87MG ve HUVEC Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi ..	70
4.1.1. OLE'nin GB ve Kontrol Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	70
4.1.1.1. OLE'nin T98G Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	70
4.1.1.2. OLE'nin U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	71
4.1.1.3. OLE'nin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	73
4.1.2. TMZ'nin GB ve Kontrol Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	74
4.1.2.1. TMZ'nin T98G Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	74
4.1.2.2. TMZ'nin U87MG Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	75
4.1.2.3. TMZ'nin HUVEC Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	76
4.1.3. TMZ ve OLE Kombinasyonunun Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	77
4.1.3.1. TMZ ve OLE Kombinasyonunun T98G Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi .....	77
4.1.3.2. TMZ ve OLE Kombinasyonunun U87MG Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi .....	79
4.2. GB Hücre Hatlarında OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....	80

4.2.1. T98G Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....	80
4.2.2. U87MG Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....	86
4.3. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	92
4.3.1. T98G Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	92
4.3.2. U87MG Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	95
4.4. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin MT ile İlişkili Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkileri .....	97
4.4.1. T98G Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonlarının MT ile İlişkili Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkileri .....	97
4.4.2. U87MG Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonlarının MT ile ilişkili Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkileri .....	103
4.5. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin CSC Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkileri .....	109
4.5.1. T98G Hücre Hatlarında OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonlarının CSC Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkileri.....	109
4.5.2. U87MG Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonlarının CSC Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkileri .....	117
4.6 GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin 3B Tümör Modeline Etkisinin Belirlenmesi.....	124
4.6.1 T98G Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin 3B Tümör Modeline Etkisinin Belirlenmesi.....	124
4.6.2 U87MG Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin 3B Tümör Modeline Etkisinin Belirlenmesi.....	145
4.7 GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin MDR İle İlişkili Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	164
4.7.1 T98G Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin MDR İle İlişkili Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	164
4.7.2 U87MG Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin MDR İle İlişkili Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	168
4.8. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin Hücre Yaşlanması Üzerine Etkileri.....	172
4.8.1 T98G Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin Hücre Yaşlanması Üzerine Etkileri.....	172
4.8.2. U87MG Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin Hücre Yaşlanması Üzerine Etkileri.....	175

<b>4.9. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin Birlikte LncRNA Ekspresyon Profilleri Üzerine Etkileri .....</b>	<b>178</b>
<b>4.9.1. T98G Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin Birlikte LncRNA Ekspresyon Profilleri Üzerine Etkileri .....</b>	<b>178</b>
<b>4.9.2. U87MG Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin Birlikte LncRNA Ekspresyon Profilleri Üzerine Etkileri .....</b>	<b>185</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>193</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>211</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>227</b>
<b>9. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>228</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>229</b>



## TÜRKÇE ÖZET

Glioblastoma (GB) merkezi sinir sisteminde en yaygın görülen ve en agresif olan primer beyin tümörüdür. GB'nin standart tedavisi, maksimum cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapiden oluşmaktadır. Temozolomid (TMZ), GB tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapi ilacıdır ancak TMZ tedavisine rağmen GB hastalarının prognozu oldukça kötü seyretmektedir. Bunun sebebi, hastalığın agresif oluşu ve kanser hücrelerinin TMZ'ye direnç geliştirmesidir. Son yıllarda kanser tedavisi üzerine yeni stratejilerin geliştirilmesinde bitki özütlerinden yararlanılmakta ve kanser türüne özgü farklı kemoterapik ilaçlarla birlikte kombin tedavi yöntemlerine odaklanılmaktadır. Mevcut tez çalışmasında, daha önceki çalışmalar ile sitotoksik etkisi bilinen *Olea europea* yaprak özütünün (OLE) tek başına ve TMZ ile birlikte kombin kullanılmasıyla tümörün agresifliği, ilaç direnci ve Long noncoding RNA'lar (LncRNA) üzerine etkilerinin belirlenmesi, aynı zamanda 3 boyutlu (3B) tümör modeli ile tümör boyutuna olan etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda OLE'nin tümörün agresifliği ile ilişkili EMT ve CSC belirteçlerine, ilaç direnci ile ilişkili MDR genlerine ve LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkilerinin belirlenmesi için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. OLE'nin tümörün agresifliği ile ilişkili yara iyileşmesi, koloni oluşumu ve ilaç direnci ile ilişkili hücre yaşlanması üzerine etkilerinin belirlenmesi amacı ile hücre kültür çalışmalarında fonksiyonel analizler ile gerçekleştirilmiştir. OLE'nin tümör boyutu üzerine etkisinin tespiti için ise 3B tümör modeli geliştirilmiştir. Sonuç olarak, OLE'nin tek başına ve TMZ ile birlikte EMT ve CSC belirteçlerini inhibe ederek tümörün agresifliğini önlediği, aynı zamanda MDR genlerinin ekspresyon seviyelerini düşürerek ilaç direncini kırdığı belirlenmiştir. Aynı zamanda OLE'nin, TMZ ile birlikte tümör boyutunda küçülme gösterdiği saptanmış ve TMZ ile birlikte sinerjik etki oluşturarak tedavide kullanılacak potansiyel bir terapötik ajan olabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Glioblastoma, *Olea europaea* yaprak özütü (OLE), Tümörün agresifliği, İlaç Direnç Mekanizması, 3 boyutlu kültür.

## İNGİLİZCE ÖZET

### “INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF LEAF EXTRACT (OLE) ON THE BIOLOGICAL BEHAVIOR OF GLIOBLASTOMA CELLS”

Glioblastoma (GB) is the most common and most aggressive primary brain tumor in the central nervous system. The standard treatment of GB consists of maximum surgical resection, chemotherapy and radiotherapy. Temozolomide (TMZ) is the most widely used chemotherapy drug in the treatment of GB. Despite TMZ treatment, the prognosis of GB patients is very poor. This is because the disease is aggressive and cancer cells develop resistance to TMZ. In recent years, plant extracts have been used to develop new strategies on cancer treatment and different chemotherapeutic drugs specific to the cancer type. In this thesis, it is aimed to determine the effects of *Olea europea* leaf extract (OLE) alone and in combination with TMZ on tumor aggressiveness, drug resistance and Long noncoding RNAs (LncRNA). It was also aimed to determine the effects of 3D tumor model on tumor size. For this purpose, RT-PCR method was used to determine the effects of OLE on EMT and CSC markers associated with tumor aggressiveness and drug resistance-associated MDR genes and LncRNAs on expression levels. In order to determine the effects of OLE associated with tumor aggressiveness on wound healing and colony formation and associated with drug resistance on cell aging such as functional analyzes were performed in cell culture studies. To determine the effect of OLE on tumor size, a 3D tumor model was developed. As a result, it was found that OLE alone and in combination with TMZ inhibited EMT and CSC markers to prevent tumor aggression and decreased drug resistance by decreasing expression levels of MDR genes. It has been shown that it can be a potential therapeutic agent to be used in treatment by as been shown to reduce tumor size and creating synergistic effect with TMZ.

**Keywords:** Glioblastoma, *Olea europaea* leaf extract, Tumor aggressiveness, Drug Resistance Mechanism, 3D culture.





## 1. GİRİŞ

Gliomalar insan primer merkezi sinir sistem tümörlerinin yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. En yaygın görülen glioma, Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflandırmasına göre, evre IV (WHO grade IV) olarak kabul edilen, 14-16 ay gibi çok kısa yaşam süresi olan Glioblastomadır (GB) (Vigneswaran ve ark., 2015). Nekroz ve vasküler proliferasyon ile karakterize olan GB'lerin standart tedavileri; cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapiden oluşmaktadır. GB'ler ile ilgili yapılan araştırmalarda ilerlemeler kaydedilmiş olsa da bu tümörlerin tedavisinde hala yeterince başarıya ulaşılamamıştır.

Alkilleyici bir ajan olan temozolomid (TMZ), kan-beyin bariyerini aşabilen ve oral kullanımda etkin olan GB'nin tedavisi için kullanılan kemoterapi ilacıdır. TMZ etkinliği hastaların O6-metil guanine-DNA metil transferaz (*MGMT*) promotör bölge metilasyon durumuna göre farklılık göstermektedir (Jiang ve ark., 2014). Ancak günümüzde, *MGMT* promotör bölge metilasyonu olan hastaların TMZ tedavisine iyi cevap vermesi beklenirken hastaların beklenen cevabı gösteremediği tespit edilmiş ve yeni terapötik hedeflerin bulunması ve alternatif yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekliliğini gündeme getirmiştir. TMZ tedavisinin başarısız olması, ilacın toksik etki göstermesi ve hastalarda yan etkilerini oluşturması ile ilişkilidir (Silber ve ark., 2012). Bunun yanında, kanser hücrelerinin çoklu ilaç direnci (MDR) göstermesi TMZ tedavisini etkileyen en önemli etkenlerden biridir (Ambudkar vd., 1999).

Agresif seyreden GB'lerin yayılım, göç ve metastaz yetenekleri yüksektir. Bu sebeple tümörün agresifliği ile ilişkili Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) ve kanser kök hücre (CSC) belirteçlerinin inhibe edilmesi yönündeki yapılacak çalışmalar GB tedavisindeki başarıyı arttırabilecektir (Scheel ve Weinberg, 2012). EMT, hücrelerin epitel özelliklerini yitirdiği, epigenetik ve biyokimyasal süreçlerle mezenkimal fenotip edindiği evrimsel bir süreçtir. EMT, GB'nin agresifliği ile büyük ölçüde ilişkilidir ve sıklıkla tümör nüksü ve metastaz ile bağlantılıdır (Kalluri ve Weinberg, 2009). Bu

sebeple EMT ana regülatör genlerinin (*Twist*, *Snail*, *Zeb1*, *N-kaderin* ve *E-kaderin*) GB'deki etkilerinin araştırılmasına ve baskılanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

GB'de kanser hücrelerinin bir alt popülasyonu olan GB kök hücreleri, tümör oluşumu, ilaç direnci, yayılım ve göç üzerinde önemli etkilere sahiptir. CSC faktörleri *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* GB dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde kök hücre özelliklerinin korunmasına ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Duesberg ve ark., 2011). Tümörlerin agresifliği ile yakından ilişkili olan CSC'lerin varlığının araştırılması ve inhibe edilmesi kanser tedavilerinin başarısı için önemlidir.

Tümör hücre biyolojisini incelemek için kullanılan hücre kültürü tekniklerinin geliştirilmesi kanser çalışmaları için hayati öneme sahiptir. Genel olarak *in-vitro* deneyler, 2 boyutlu (2B) tek tabakalı kültür kaplarında tümör hücrelerinin davranışlarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Ancak kanser hücrelerinin *in-vivo* deneylerden önce 2B kültür teknikler üzerinde denenmesinin güvenilir olup olmadığı hakkında tartışmalar vardır. Günümüzde tümör biyolojisi çalışmalarında kullanılan 2B hücre kültür yöntemlerinin *in-vivo* mimariyi ve mikro çevreyi doğru bir şekilde taklit edemediği savunulmuştur (Tibbitt ve Anseth, 2009). Son zamanlarda geliştirilen 3 boyutlu (3B) *in-vitro* tümör modelleri, *in-vivo*'ya benzer fizyolojik özelliklere sahip olduğu, kanser ve ilaç araştırmalarında güçlü bir araç olabileceği düşünülmektedir (Hamburger ve Salmon 1997). 3B kültür, *in-vitro* olarak kullanılan geleneksel 2B hücre kültür ile *in-vivo* olarak kullanılan hayvan test modelleri arasındaki boşluğu doldurabilen bir tümör modeli olarak kullanılmaktadır. 3B tümör modellerinin avantajları göz önüne alındığında, kanser ile ilgili yapılacak çalışmaların 3B tümör modellerinde geliştirmek kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tekniklerin geliştirilmesine farklı bir bakış sunacaktır.

Uzun kodlama yapmayan RNA'lar (LncRNA) protein kodlama potansiyeline sahip olmayan ancak DNA, proteinler ve diğer RNA'larla doğrudan etkileşim yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkript grubudur. LncRNA'lar, tanı, prognoz ve tedaviye yanıt için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilir. Çalışmalar LncRNA'ların kanser hücrelerindeki hücre proliferasyonunu, göçünü, invazyonunu ve apoptozunu çeşitli mekanizmalarla düzenlediğini göstermektedir (Batista ve Chang, 2013). Örneğin, LncRNA MALAT1, kanser hücrelerinin proliferasyonunu,

migrasyonunu ve invazyonunu özellikle akciğer kanseri metastazını düzenlemektedir (Ma ve ark., 2015). Aynı zamanda GB hücrelerinde yüksek ekspresyon seviyelerine sahip HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1 ve H19 LncRNA'ların düşük sağkalım ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu, bu LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinin azalmasının proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu engellediği bilinmektedir (Jiang ve ark., 2016; Wang ve ark., 2018 ve Zhou ve ark., 2015).

Son yıllarda bir çok kanser türünde yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde sıklıkla bitkilerden yararlanılmakta ve mevcut kullanılan tedavilerin daha efektif hale getirilmesi ve oluşan sitotoksik etkilerinin azaltılması çalışılmaktadır (Keleş ve ark., 2001). Ayrıca, bazı terapötik özelliği belirlenen bitkisel özütlerinin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımının sinerjik bir etki yaratarak kemoterapötik ajanın etkinliğini artırdığı, böylece tedavide mevcut ajanın dozunun düşürülerek, bu ajanın yol açabileceği yan etkilerin azaltılabileceğini ifade eden çalışmalar mevcuttur (Cragg ve Newman, 2006 ve Li ve ark., 2010).

Daha önceki çalışmalarımız ile *Olea europaea* (zeytin) yaprağından elde edilen bitki özütünün (OLE), GB ve GB kök hücrelerinde; hücre proliferasyonunu azalttığı, hücreleri hem apoptotik hem de nekrotik yolla öldürdüğü, *MGMT* metilasyon oranını ve TMZ'nin etkinliğini artırdığı, angiogenezi azalttığı, bevacizumab'ın etkinliğini artırdığı ve epigenetik etki olarak miRNA ekspresyonlarını etkilediği belirlenmiştir (Tezcan ve ark., 2017a; Tezcan ve ark., 2017b ve Tunca ve ark., 2012).

Mevcut tez çalışmasında, OLE'nin GB'de tedavi edici yönünün tek başına ve TMZ ile birlikte *in-vivo* çalışmalara yüksek oranda öncülük eden 3B kültür modeli ile tümörün agresifliği (Gen düzeyinde, EMT ve CSC belirteçlerini; hücre kültürü analizlerde, koloni oluşturma, yara iyileştirme) ve ilaç direnci (Gen düzeyinde, MDR; hücre kültürü analizinde, hücre yaşlanması) açısından etkilerinin değerlendirilmesi ve bu doğrultuda OLE'nin TMZ ile birlikte LncRNA'lar üzerine olan etkilerinin ortaya konulabilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında GB hücre hatlarında *in-vivo* mimariye en yakın olan 3B kültür modelinin kullanılmasıyla OLE'nin anti-tümöral etkinliğinin, tümörün agresifliği ve ilaç direnci üzerindeki etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın amacı başta GB olmak üzere, kanser tedavisinde kliniğe uygulanabilecek yeni bir ilaç geliştirmektir. Bu kapsamda mevcut tez çalışması, hem kanserli hastaların tedavisinde kullanılabilecek hem de ekonomik değeri olan bir ürün geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Beyin Tümörleri

Merkezi Sinir Sistemi tümörleri, astrositler ve oligodendrositler gibi birçok farklı hücresel soydan ortaya çıkabilmektedirler (Kleihues ve ark., 2002). Astrositler olarak adlandırılan yıldız şeklindeki beyin hücreleri, glial hücrelerden köken almaktadır. Glioma grubunda olan astrosit tümörleri, en sık görülen beyin tümörü formudur (Kleihues ve Cavenee, 2000). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflandırmasına göre astrosit kökenli tümörler Tablo 1'de gösterildiği gibi malignitelerine göre 6 gruba ayrılmaktadır (Kleihues ve ark., 1993). En az agresiflik özelliği gösteren ve uzun sağkalım ile ilişkili tümörler, evre I astrositoma olarak sınıflandırılan, Subependimal Dev Hücre ve Pilositik Astrositomalardır. Evre II astrositomalar, diffüz astrositomaları içermektedir. Evre III olarak belirlenen Anaplastik Astrositomalar daha fazla agresiflik özelliği göstermektedir. Evre IV olarak sınıflandırılan ve astrositomaların arasında en agresif özellik gösteren tümör grubu Glioblastoma (GB)'dır (Şekil 1). GB, nekroz ve vasküler proliferasyon ile karakterize olan ve yetişkinlerde merkezi sinir sisteminde en sık görülen beyin tümörüdür.

Tablo 1. Astrosit tümörlerin WHO kriterlerine göre gruplandırılması.

	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
Subependimal Dev Hücreli Astrositoma	●			
Pilositik Astrositoma	●			
Düşük Dereceli Astrositoma		●		
Pleomorfik Ksantoastrositoma		●	●	
Anaplastik Astrositoma			●	
Glioblastoma				●



Şekil 1. GB'nin radyolojik görüntüsü (Uludağ Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, GB hastasına ait radyolojik GB tümör görüntüsü).

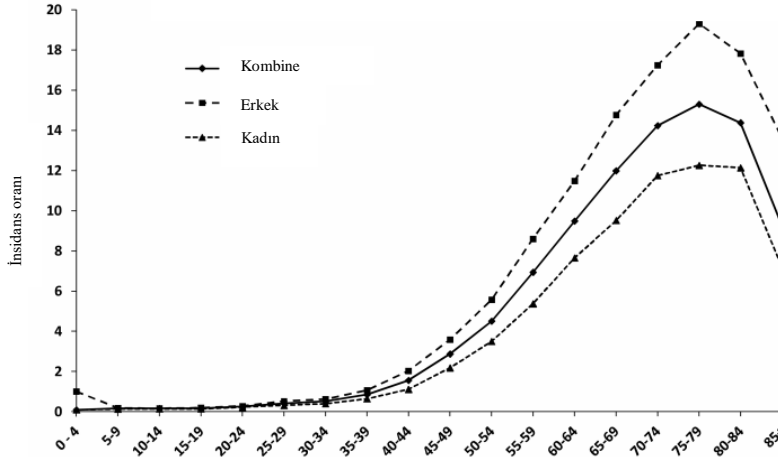
### 2.1.1 GB'lerin Epidemiyolojisi

GB'lerin yıllık ortalama yaşa göre hesaplanmış global insidansı Tablo 2'de gösterildiği gibi, 100.000 kişide 0,59 ve 3,69 değerleri arasında değişiklik göstermektedir (Arora ve ark., 2009; Chakrabarti ve ark., 2005; Dobes ve ark., 2011; Gausia ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010; Ostrom ve ark., 2013 ve Tamimi ve ark., 2015). GB tüm gliomaların %54'ünü, tüm beyin tümörlerinin ise %16'sını oluşturmaktadır (Ostrom ve ark., 2013). GB'lerin yaş insidansı, 75-84 yaşlarında artmakta, 85 yaşından sonra düşüş göstermektedir (Thakkar ve ark., 2014; Şekil 2). GB 15 ila 34 yaş aralığındaki kişilerin üçüncü en önemli ölüm nedenini oluşturmaktadır (Ohgaki ve Kleihues, 2005). 1993 yılında Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı tarafından açıklanan Türkiye'deki beyin tümörü insidansının 1.15/100 000 olduğu bildirilmiştir (TC Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı, 1997). Günümüzde Türkiye için primer beyin tümörü tanısı ile ilgili net bir rakama ulaşılmazken, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki orana benzer olabileceğini sanılmaktadır.

Tablo 2. GB'nin farklı ülkelerde gözlenen 100.000 kişi başına düşen yaşa göre ayarlı insidansı (Tamimi ve Juweid, 2017).

	Yıllar	Oran
Amerika	2006–2010	3.19
Avustralya	2000–2008	3.40
İngiltere	1999–2003	2.05
Kore	2005	0.59
Yunanistan	2005–2007	3.69
Ürdün	2012–2013	0.89

Cinsiyet ve yaş gruplarına göre insidans oranları, 2006-2010.



Şekil 2. GB için tanı ve cinsiyete göre ayarlanmış yaşa özgü insidans oranları, CBTRUS istatistik raporu: NPCR ve SEER, 2006–2010 (Thakkar ve ark., 2014).

## 2.1.2 GB'lerde Risk Faktörleri

GB'nin oluşum ve gelişimi için yaş dışındaki risk faktörleri net bir şekilde tanımlanmamıştır (Weller ve ark., 2015). GB insidansı kadınlarla kıyaslandığında erkeklerde daha yüksek oranda olduğu ve beyaz insanlarda siyah insanlara göre daha sık görüldüğü saptanmıştır (Ostrom ve ark., 2014). Ancak bu asimetric dağılımların nedenleri belirsizdir. GB'nin, %1'den az bir oranla Turcot sendromuyla ve Nörofibromatozis tip 1 ve 2 gibi kalıtsal kanser sendromlarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Ohgaki ve ark., 2010). Cep telefonu kullanımı, glioma oluşumu açısından kapsamlı bir şekilde araştırılmış ancak kesin bir ilişki bildirilmemiştir (Interphone Study Group, 2010). Bunun yanında bu tümörün oluşumunun sigara içimiyle veya diğer kanserojen ajanlarla ilişkisi olmadığı ortaya konmuştur (Wirsching



ve ark., 2016). Sitomegalovirüs genlerinin ekspresyonunun ve bu gen ürünlerinin GB'nin malign fenotipini destekleyen yollarla etkileşimde olduğu tartışılmış ancak sonucunda Sitomegalovirüs'ün glioma başlatıcı bir ajan olarak kesin bir rolünün olduğu doğrulanmamıştır (Dziurzynski ve ark., 2012). Bunlarla birlikte yapılan çalışmalar genel olarak iyonlaştırıcı radyasyonun, GB gelişimi için bilinen en önemli eksojen risk faktörü olduğu saptanmıştır (Connelly ve Malkin, 2007).

### **2.1.3 GB'de Tümör Lokalizasyonu**

Gliomalar sıklıkla frontal (%25.8), temporal (%19.7) ve parietal (%12.2) loblarda görülmektedir. Buna karşılık oksipital lob (%3.2), serebellar lob (%2.9), beyin sapı (%4.2) veya omurilikte (%4.3) görülen gliomalar oldukça nadirdir (Ostrom ve ark., 2014). Çoğu GB, supratentorial bölüm ile sınırlı kalsa da genel olarak beyindeki yerleşim yerleri ile ilgili net bir bilgi bulunmamaktadır. Bunun nedeni hastalığın erken evrelerinden itibaren GB'yi oluşturan hücrelerin hızla yayılmasıdır. Beyin sapı gliomaları yetişkinlerde nadir gözlenmekte ancak pediatrik GB'lerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (Weller ve ark., 2015). Radyasyon Tedavisi Onkoloji Grubu'nun ön-temozolomid döneminde tedavi edilen 645 yetişkin hasta grubu ile yaptığı bir çalışmada, tümör dokusunun frontal lobta bulunan GB hastalarının sağkalımının, temporal veya parietal lobta bulunan GB hastalarına göre daha uzun olduğunu göstermişlerdir (Simpson ve ark., 1993). Ancak bu yüksek sağkalımın hastalardaki daha genç yaş ve daha yüksek rezeksiyon miktarı gibi olumlu prognostik özelliklerle birleşmesinden dolayı olabileceği açıklanmıştır.

### **2.1.4 GB Tedavisi**

GB, prognozu oldukça kötü seyreden, kan-beyin bariyeri nedeniyle sınırlı kemoterapi etkinliği olan ve en yaygın görülen beyin tümörüdür. GB'ler moleküler temelde primer ve sekonder olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (Cohen ve ark., 2013 ve Rakheja ve ark., 2013). Primer GB'ler, ileri yaşta kendine özgü ortaya çıkan lezyonlardır. Bunlar glial öncü hücrelerden direkt olarak gelişen ve ilk histopatolojik incelemede GB tanısı konulan tümörlerdir. Sekonder GB'ler ise düşük dereceli gliomalardan (grade II ve III) progresyon göstererek gelişen tümörlerdir. İzositrat

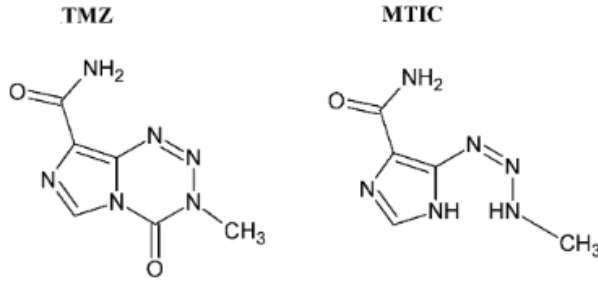
dehidrogenaz 1 (*IDH1*) ve izositrat dehidrogenaz 2 (*IDH2*) mutasyonları, primer GB ile sekonder GB arasındaki ayırıcı tanıda kullanılan genetik belirteçler olarak tanımlanmışlardır (Yang ve ark., 2012). *IDH1* mutasyonları sıklıkla daha iyi prognoza sahip olan sekonder GB' lerde görülmektedir. Ancak yapılan çalışmalar ile primer GB'lerde de %6 oranında *IDH* mutasyonlarının gözlemlendiği tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2016).

GB'nin standart tedavisi, cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapiden oluşmaktadır. Maksimum cerrahi rezeksiyon, bu hastalığın yaşam süresinin uzatılması için en önemli faktörlerden birisidir. Ancak GB'nin infiltratif özelliğinden ve tümörün beyin içerisindeki konumundan dolayı maksimum rezeksiyon her zaman gerçekleştirilememektedir. Cerrahi sonrası uygulanan tedavi, kalan hücrelerin çoğalmasını engelleyen radyoterapi tedavisidir. Radyoterapi aynı zamanda cerrahisi mümkün olmayan tümör çaplarının küçültülmesinde de kullanılmaktadır. Alkilleyici bir ajan olan temozolomid (TMZ), GB'nin tedavisi için kullanılan en etkili kemoterapi ilacıdır (Stupp ve ark., 2005). TMZ ile gerçekleştirilen kemoterapi, GB hastalarının sağkalım sürelerindeki artışa katkı sağlasa da kanser hücreleri, TMZ'ye karşı direnç geliştirebilmektedir ve bu durum çok sayıda hastada kemoterapinin başarısız olmasına yol açmaktadır. GB hastalarının ortalama yaşam süresi 15 aydan daha azdır ve 2 yıllık sağkalım oranı %26–33'dür (Scott ve ark., 1998). Etkili tedavilerin geliştirilmesi, tümörün agresif oluşu, nüks ve metastaz gözlenmesi ve hastalığın heterojenliği nedeniyle karmaşık ve zordur. Günümüzde, ilaçlara direnç gösteren ve agresif seyreden GB'nin tedavisinde kullanılacak sitotoksik etkisi daha az ve daha efektif olan yeni yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yolda GB'de etkili olan sinyal yollarının ve moleküler belirteçlerin belirlenmesi ve genetik tabanlı tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

#### **2.1.4.1 TMZ**

TMZ, oral kullanımda etkin olan, kan-beyin bariyerini aşabilen ve düşük toksisite özelliği gösteren alkilleyici bir ajandır. TMZ, mide asidi pH'sında oldukça stabildir ancak fizyolojik pH'da aktif metabolit MTIC'e [5- (3-dimetil-1-triazenil) imidazol-4-karboksamid] hidrolize olmakta ve böylece tümör doku üzerindeki aktivitesini

göstermektedir (Lopes ve ark., 2013; Şekil 3). Bu ilaç, DNA üzerinde O6-metilguanin eklentileri oluşturmakta ve tek veya çift iplikli DNA kırılmalarının oluşmasına yol açmaktadır. Bunun sonucunda ise glial hücrelerde apoptoz ve yaşlanma mekanizmalarını tetiklemektedir (Aasland ve ark., 2019).

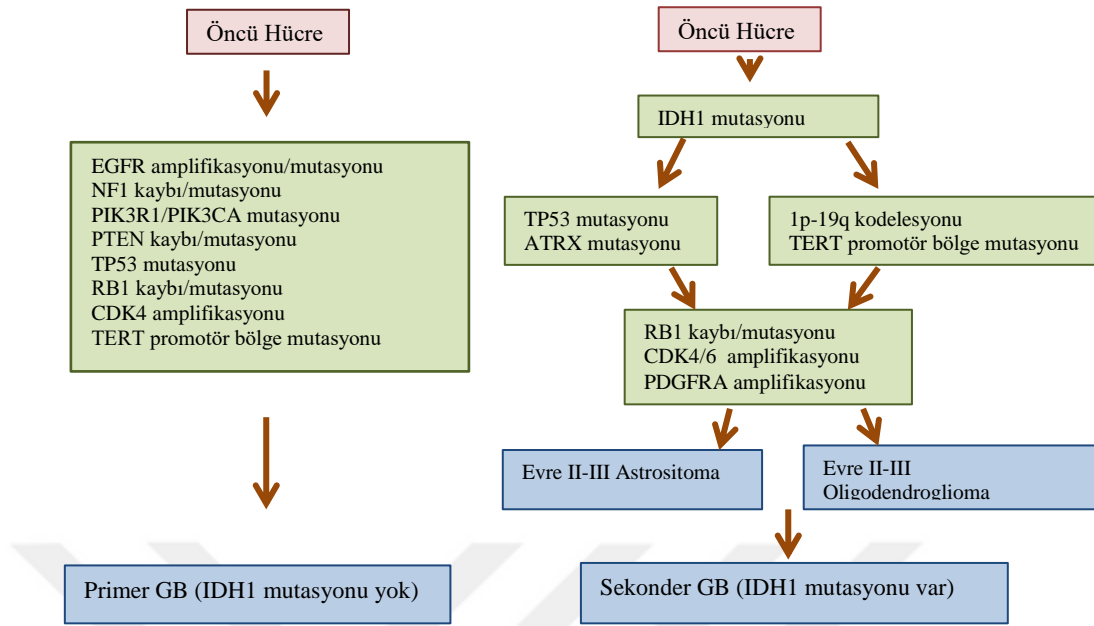


Şekil 3. TMZ ve MTIC'in kimyasal yapısı (Ramalho ve ark., 2019).

TMZ ile tedavi edilen GB hastalarının tedaviye verdikleri yanıt O6-metil guanine-DNA metil transferaz (*MGMT*) gen ifadesine göre farklılık göstermektedir. DNA tamir genlerinden biri olan *MGMT* gen ürünü, guaninin O6 pozisyonundan alkilleyici ajanlar tarafından eklenen metil gruplarını uzaklaştırarak TMZ tedavisine karşı direnç göstermesine sebep olmaktadır. Bu nedenle, hastanın TMZ tedavisine olumlu cevap vermesi, *MGMT* geninin promotör bölgesinin metilasyon yoluyla transkripsiyonel olarak susturulması ile ilişkilidir. Ancak, *MGMT* her ne kadar TMZ tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılsa da *MGMT* geni metile olan ve olmayan bazı hastaların TMZ tedavisine beklenildiği gibi cevap vermediğinin gösterildiği farklı çalışmalar literatürde mevcuttur (Jiang ve ark., 2014 ve Silber ve ark., 2012).

## 2.2 GB Oluşumunda Etkili Olan Genetik ve Epigenetik Faktörler

GB'nin heterojenliği sebebiyle, GB hastalarında görülen genetik ve epigenetik faktörler değişkenlik göstermektedir. GB genetik olarak primer ve sekonder GB olarak ayrılmakta ve bu ayrımında saptanan birçok genetik belirteç bulunmaktadır (Şekil 4). Primer ve sekonder GB'ler birbirlerine benzer yapıya sahip olsa da genetik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler yönünden farklılık göstermektedir. GB'leri genetik ve epigenetik değişikliklere göre sınıflandırmak ve tedavi stratejilerini bu değişikliklere göre belirlemek, GB tedavisindeki başarıyı arttırabilecektir.



Şekil 4. Primer ve sekonder GB oluşumunda etkili olan genetik değişiklikler (Aldape ve ark., 2015).

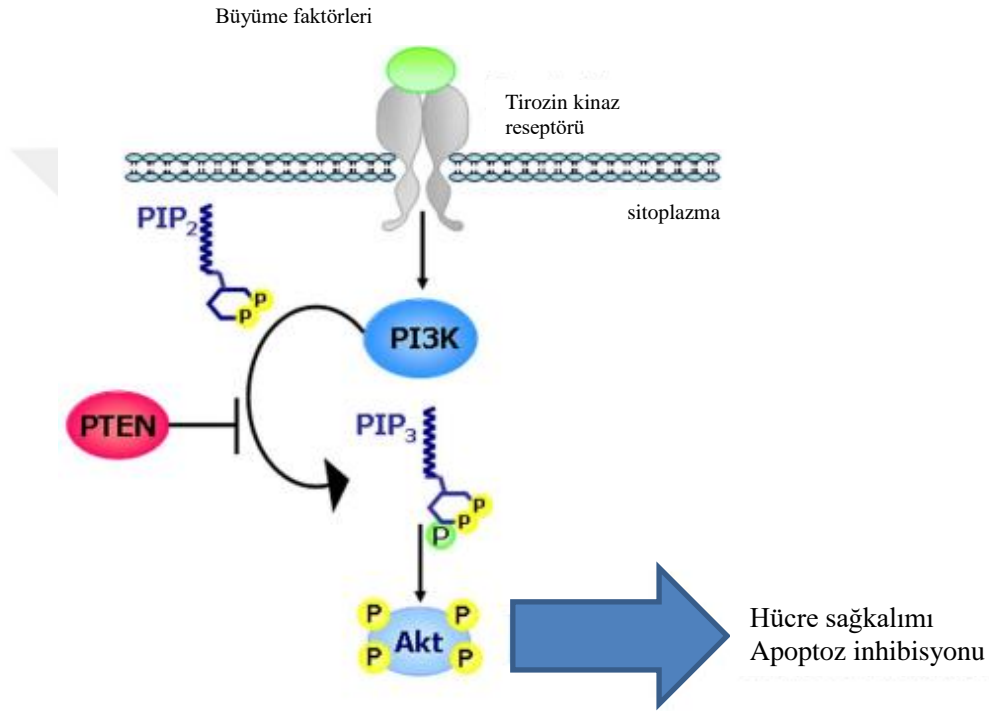
## 2.2.1 Genetik Faktörler

Genom çapında profil oluşturma çalışmaları kapsamında GB'nin genomik heterojenliği araştırılmış ve tedavinin geliştirilmesinde yararlı olabilecek farklı moleküler belirteçler tanımlanmıştır (Ohgaki ve Kleihues, 2007). GB'nin oluşumunda PI3K/PTEN/Akt/mTOR, RAS/MAPK, pRB, STAT3/ZIP4 ve TP53/MDM2/CDNK2A-P14ARF yollarındaki değişimler, *IDH* ve *TERT* genlerindeki mutasyonlar ve heterozigozite kaybı (LOH) gibi genetik faktörler sıklıkla gözlenmektedir. LOH 10q, hem primer hem de sekonder GB'lerde sıklıkla görülmektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) amplifikasyonu, *PTEN* ve *TERT* mutasyonları, primer GB'ye özgü genetik değişikliklerdir. Sekonder GB'lerde ise *TP53* ve *IDH* mutasyonları sık görülen genetik değişikliklerdir (Crespo ve ark., 2015).

### 2.2.1.1 PI3K/PTEN/Akt/mTOR Yolağı

PI3K-PTEN-Akt-mTOR yolağı, proliferasyon, apoptoz ve hücre göçü gibi tümör oluşumunda ve gelişiminde kritik rol oynayan hücre fonksiyonları düzenlemektedir

(Şekil 5). Bu sinyal yolağının ilk hücre içi üyesi fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) kompleksidir. Bu kompleksin aktivasyonu, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi birçok büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Aktive edilen PI3K, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat üretmekte ve bu da Akt'nin harekete geçmesini sağlamaktadır. Akt daha sonra mTOR'u aktive etmektedir. *PTEN* gibi tümör baskılayıcılar ise bu yolu inhibe etmektedir (Zoncu ve ark., 2011).

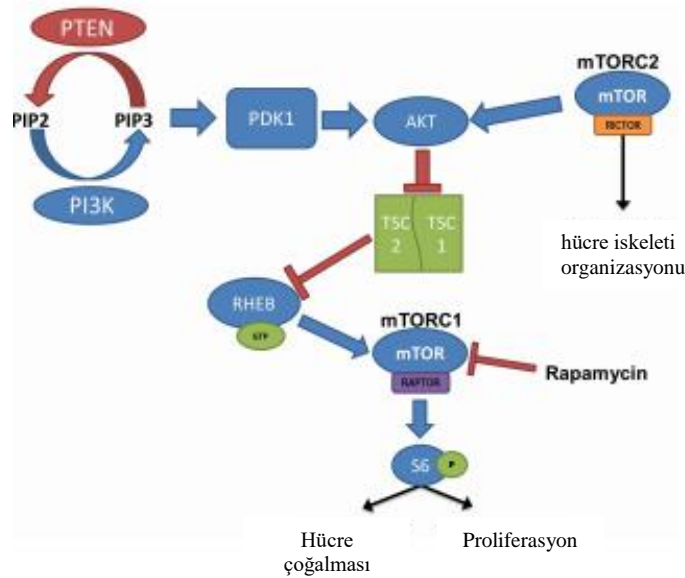


Şekil 5. PI3K/PTEN/Akt/mTOR Yolağı (Molinari ve Frattini, 2013).

PI3K kompleksi, hücrel proliferasyon, farklılaşma, metabolizma ve hayatta kalma gibi fonksiyonlar ile büyüme faktörlerini birbirine bağlamaktadır. PI3K sinyal yolağının aktivasyonu veya mutasyonunun, GB gelişiminde büyük önemi vardır (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). PI3K yolağı, *PTEN* delesyonları veya *EGFR* ve/veya vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (*VEGFR*)/trombosit türevli büyüme faktörü reseptörünün (*PDGFR*) amplifikasyonları ile GB'lerin yaklaşık %70'inde değişime uğramaktadır (Zhi ve ark., 2009). *EGFR*'nin aşırı ekspresyonu, GB'de en sık görülen durumdur ve bu anormal amplifikasyon PI3K

yolağının aktivasyonunun artmasına neden olmaktadır (Shinojima ve ark., 2003). *EGFR* geninin 2-7. ekzonlarının delesyonuyla EGF ligandından bağımsız bir mutasyon olarak oluşan *EGFRvIII* mutasyonu, GB'de yaygın görülen bir diğer mutasyondur ve kötü prognozun önemli bir göstergesidir (Wong ve ark., 1992). GB'de *EGFR* için ortalama amplifikasyon oranı yaklaşık %35, *EGFRvIII* mutasyonunun oranı ise yaklaşık %40'tır. Aralarında görülen bu yakın ilişki sebebiyle *EGFR* ve *EGFRvIII*'ün GB'lerde terapötik yaklaşımlar için kullanılabilir bir hedef olabileceği düşünülmektedir (Mischel ve Cloughesy, 2003).

mTOR, mTOR kompleksleri 1 ve 2 (mTORC1, mTORC2) olmak üzere iki kısımdan oluşmakta ve PI3K'nın hem aşağı akış efektöründe hem de yukarı akış regülatöründe görev almaktadır. Böylece GB tümörigenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Akhavan ve ark., 2010; Şekil 6). mTORC1, onkogenlerin translasyonunda görev alarak onkogenlerin oluşumunu desteklemekte, aynı zamanda otofajiyi inhibe ederek, anjiyogenez oluşumunu teşvik etmektedir. mTORC2, Akt aktivasyonu yoluyla glikoz alımını uyarmakta ve hayatta kalmaya yardımcı olan serum/glukokortikoid regüle edilmiş kinazı uyararak kanser büyümesini teşvik etmektedir.



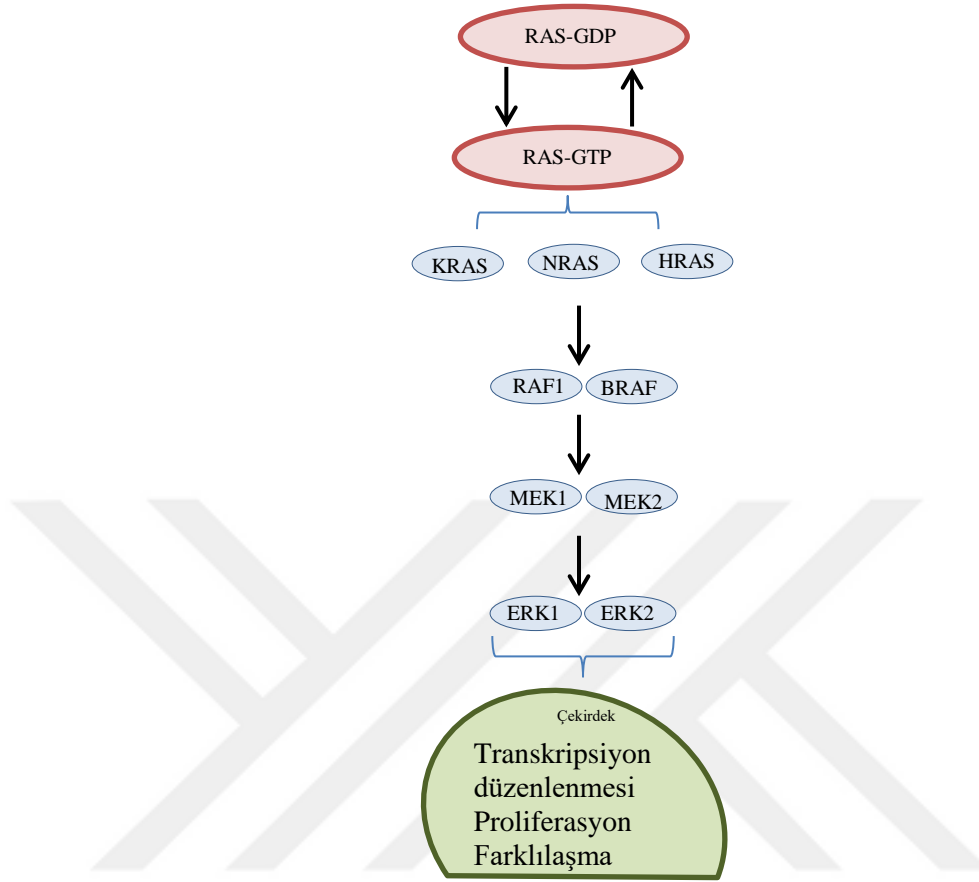
Şekil 6. mTOR, PI3K/Akt yolu üzerinden sinyal göndererek, hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenlemektedir (Lasarge CL ve Danzer, 2014).

*PTEN* (10. kromozomda bulunan fosfataz ve tensin homologu), tümör baskılayıcı gen olarak görev almakta ve *PTEN*'deki mutasyonlar GB dahil olmak üzere birçok kanserin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Mao ve ark., 2012). *PTEN*, hücre içi fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfat seviyelerini azaltarak Akt sinyalini inhibe etmekte ve PI3K/AKT/PKB yolağını negatif olarak düzenlemektedir (Lu ve ark., 2005). Bu nedenle *PTEN*, aşağı akış hedef genlerini düzenlemede kritik bir rol oynamaktadır. *PTEN*'in mutasyonlarına neden olan kromozom 10'un heterozigotluk kaybı, GB'lerde sıklıkla görülmektedir. Bu nedenle *PTEN*'in indüklenmiş ekspresyonu, amplifiye olmuş veya mutasyona uğramış EGFR-PI3K-Akt-mTOR yolağı gözlenen GB'lerde terapötik bir strateji olarak işlev görmektedir.

### **2.2.1.2 RAS/MAPK Yolağı**

İnsan *RAS* genleri (Rat Sarcoma), *H-Ras*, *N-Ras* ve *K-Ras* adı verilen birbiriyle ilişkili üç gen ile onkogenik aktivasyon gerçekleştirmektedirler (Hurley ve ark., 1984). *RAS*, G protein ailesine aittir; bu nedenle, *RAS*'ın aktivasyonu veya inaktivasyonu, guanosin trifosfat (GTP) veya guanosin difosfat (GDP) 'a bağlanarak kontrol edilmektedir. Aktif *RAS*, direkt olarak RAF kinazı aktive etmekte ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağının aşağı akışını düzenlemektedir (Thomas ve ark., 1992). *RAS*, PI3K yolağı da dahil olmak üzere diğer yolakların faaliyetleri ile ilişkili olmakta ve *RAS* yolağı, hücre çoğalması, farklılaşması, sinyal iletimi ve apoptozda rol oynamaktadır.

EGFR, PDGFR, ve reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) gibi büyüme faktör reseptörleri, *RAS*'ın aktivitelerinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Aktive edilen *RAS* daha sonra RAF'ı aktive etmekte ve *RAS*'ın aşağı akış hedef gen transkripsiyonunu ve hücre aktivitelerini düzenleyen MEK ve MAPK dahil bir dizi kinazı fosforile etmektedir. *RAS*/MAPK yolundaki farklı ekspresyon seviyeleri, hücre büyümesi ve çoğalması gibi kanser gelişiminde görülen hücre fonksiyonlarının oluşumuna sebep olmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. RAS/MAPK sinyal yolağı (Takagaki ve ark., 2012).

Birçok kanserde RAS/MAPK yolağının anormal ekspresyon seviyeleri görülmektedir. Yüksek dereceli astrositoma ve GB'lerde, *RAS*'ın yüksek ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir (Arvanitis ve ark., 1991) Bu sebeple RAS/MAPK yolunun anormal aktivasyonunun, glioma tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

### 2.2.1.3 pRB Yolağı

Bir tümör baskılayıcı olan retinoblastom (pRB), E2F ailesinin transkripsiyon faktörlerini inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini ve hücre çoğalmasını önlemektedir. pRB, siklin bağımlı kinazların (CDK'lar) kompleksleri tarafından düzenlenen *RB* geni tarafından kodlanmaktadır. *RB* geni, 13q14.1-q14.2'de bulunmakta ve burada oluşan mutasyonlar astrositomaların malign özellik göstermesinde rol oynamaktadır (Henson ve ark., 1994). Aynı zamanda bu alandaki



mutasyonlar, yüksek dereceli gliomaların %20'sinden fazlasında görülmektedir (Tortosa ve ark., 2000).

pRB normalde, G1 fazında, cyclin D/CDK4/CDK6 tarafından oluşturulan fosforilasyon ile etkisiz hale gelmekte ve bu da pRB'nin E2F'den salınmasına ve daha sonra S fazında hücre ilerlemenin teşvik edilmesine yol açmaktadır. CDK inhibitörü olan ve genellikle GB'de etkisiz hale getirilen CDKN2B, CDK4 veya CDK6 ile kompleks oluşturmakta ve böylece CDK'lerin aktivasyonunu önlemektedir. Bu inhibisyonun aşağı yöndeki etkisi, pRB'nin aktivasyon durumunu koruyarak hücre döngüsünün G1'e ilerlemesini önlemektedir. CDKN2B'nin etkisizleştirilmesinin yanında CDK4 ve CDK6'nın amplifikasyonu da GB'lerde oldukça yaygındır, bu durum hem CDK4 hem de CDK6'nın astrositik tümörlerinin oluşumunda ve gliomanın ilerlemesinde önemli rol oynadığını göstermektedir.

pRB yolağı, CDK4/CDK6/Cyclin D kompleksinin kinaz aktivitesi tarafından inaktive edildiğinden dolayı CDK4/6'nın inhibisyonunun, yüksek *pRB* ekspresyonuna sahip GB hastalarında yeni bir kemoterapötik tedavi stratejisi olabileceği düşünülmektedir.

#### **2.2.1.4 STAT3/ZIP4 Yolağı**

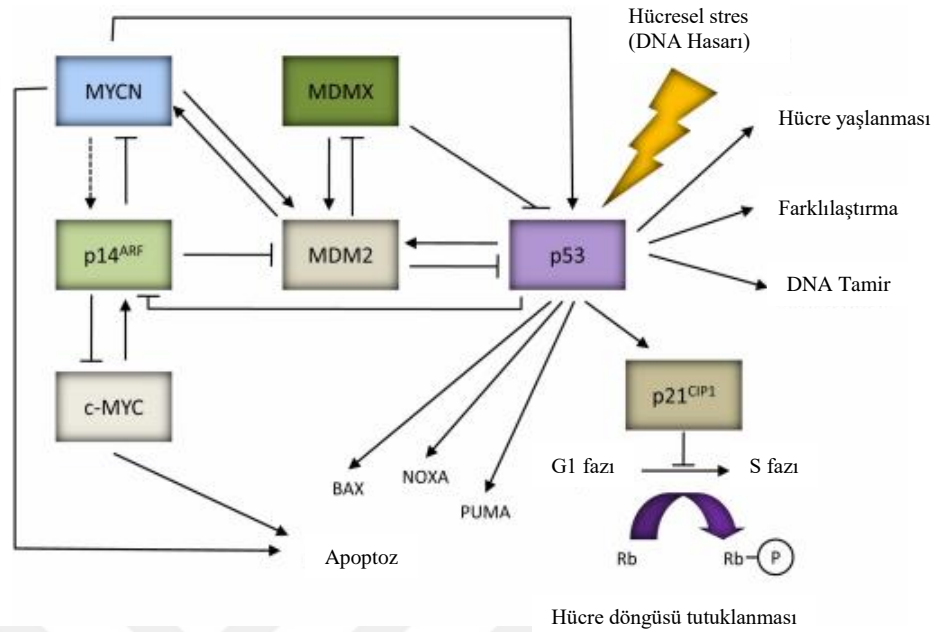
STAT protein kompleksleri, transkripsiyon faktörü olarak işlev gören SH2 (Src Homology-2) alanlarına sahip sitoplazmik proteinlerin bir ailesidir. STAT proteinleri, plazma membranından çekirdeğe gelen sinyalleri ileterek sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin hücre tepkilerini belirlemektedirler (Abal ve ark., 2006). Böylece hedef genlerin transkripsiyonunu aktive ederek proliferasyon, göç ve apoptoz gibi hücre aktivitelerini düzenlemektedir. STAT3, EGF tarafından aktive edilebilen STAT ailesi proteinlerinden biridir ve GB dahil olmak üzere birçok tümörde aşırı eksprese edilmektedir (Rahaman ve ark., 2002) Yapılan çalışmalar ile *STAT3*'ün, nöral kök hücre ve astrositlerin gelişiminde önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (Rajan ve McKay, 1998). Önceleri sadece onkogenik özelliğe sahip olduğu düşünülen *STAT3*'ün son zamanlarda yapılan çalışmalar ile GB'de tümör baskılayıcı ya da onkogenik rollere karşı işlev gösterdiği bulunmuştur (De la Iglesia ve ark., 2008). Son çalışmalar, eser element olan çinko seviyeleri ile kanser riski arasında ciddi ilişkinin bulunduğunu

saptamışlardır. Çinko taşıyıcısı olan *ZIP4*'ün, insan pankreas kanserinde aşırı eksprese edildiği ve devamında hücre proliferasyonuna ve kanser ilerlemesine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Li ve ark., 2007). Bu çalışmalar ışığında *ZIP4*'ün GB hücrelerinde de yüksek eksprese edildiği ve düşük sağkalım ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *ZIP4*, *STAT3*'ün ve ilgili moleküllerin aktivitesini düzenlemektedir. Bu sebeple *ZIP4* ve *STAT3*'ün glioma malignitesini ve göçünü kontrol etmede terapötik bir hedef olabileceği savunulmuştur (Mao ve ark., 2012).

### **2.2.1.5 TP53/MDM2/CDKN2A-P14ARF Yolağı**

*P53* yolağı, birçok kanserde görülen ve tümörigenezde mutasyona uğramış en yaygın yolaktır. Tümör baskılayıcı bir gen olan *p53*, hücre döngüsü ve apoptozu indükleyerek DNA hasarına sebep olmakta ve çeşitli genotoksik ve sitotoksik streslere cevap vermektedir (Şekil 8). *P53* geni aynı zamanda geniş bir transkripsiyon faktörüdür. Çoğunluğu tümör gelişimi ve tümör göçü ile ilişkili olan 2.500'den fazla geni düzenlemektedir. *P53* mutasyonları genellikle sekonder GB'lerin gelişiminde rol oynamaktadırlar ve düşük dereceli diffüz astrositomaların yaklaşık %65'inde bulduklarından dolayı tümörün erken evrede tespitini sağlayabilmektedirler (Huse ve Holland, 2010).

*MDM2*, *p53* yolağının önemli bir düzenleyicisi olan E3 ubiquitin ligazıdır. *P53*, transkripsiyonel inhibisyon ve E3 ligaz aktivitesindeki degradasyon olmak üzere iki şekilde negatif olarak düzenlenmektedir. *MDM2* ekspresyonunun artması, tüm GB'lerin yaklaşık %10'unda meydana gelmektedir.

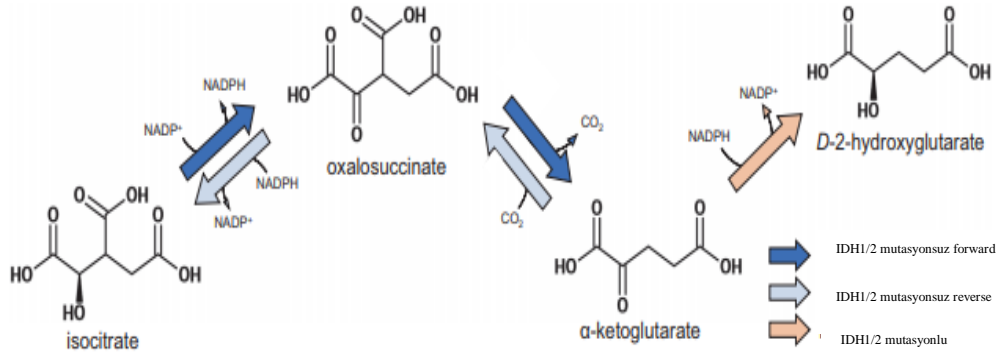


Şekil 8. Hücresel strese karşılık gelen *p53*, apoptoz, hücre döngüsü tutuklama, farklılaşma, DNA tamiri veya hücre yaşlanma gibi çeşitli hücre tepkilerde yer alan genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Chen ve Tweddle, 2012).

Tümör baskılayıcı protein olan ARF (p14ARF), p53 yolağının yukarı akış düzenleyicilerinden biridir. ARF, p53'ün transkripsiyonel aktivitelerini, doğrudan MDM2'ye bağlayarak ve E3 ubiquitin ligaz aktivitesini inhibe ederek düzenlemektedir (Haupt ve ark., 1997 ve Kubbutat ve ark., 1997). ARF'nin inaktivasyonu veya mutasyonu, hem düşük dereceli hem de yüksek dereceli gliomalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Her ikisi de CDK2A lokusu tarafından kodlanan ARF ve INK4a (p16INK4A), sırasıyla, p53 ve pRB anahtar büyüme kontrol yollarının önemli düzenleyicileridir. GB'de en sık görülen mutasyonlardan biri, bu lokusun homozigot delesyonudur (p16INK4a/p14ARF/p15INK4b) (Solomon ve ark., 2008) Ayrıca, fare modeli çalışmalarında ve insan glioma numunelerinin analizlerinde, Labuhn ve ark.'ları (2001) ARF ve INK4a'nın birlikte delesyonunun, düşük ve yüksek dereceli gliomalardan tümör progresyonunu arttırdığını bulmuşlardır. Bu bulgu, ARF ve INK4a'yı içeren lokusun GB patogenezinde önemli bir katkıda bulunduğunu ve bu lokusun delesyonunun GB gelişiminde önemli bir olay olabileceğini düşündürmektedir.

### 2.2.1.6 IDH 1/2 Mutasyonu

*IDH* geni, izositratın  $\alpha$ -ketoglutarata ( $\alpha$ -KG) dönüşümünde görev alan enzimi kodlamakta ve NAD(P)<sup>+</sup>'nın NAD(P)H'a indirgenmesini katalizlemektedir (Dang ve ark., 2010; Şekil 9). İnsanda 3 adet IDH katalitik izoenzimini kodlayan 5 adet *IDH* geni (*IDH1*, *IDH2*, *IDH3A*, *IDH3B* ve *IDH3G*) bulunmaktadır. GB'de sıklıkla *IDH1* geninde 132. aminoasit olan arjinin histidine (CGT→CAT) dönmesi sonucunda oluşan R132H mutasyonu gözlenmektedir. *IDH2*'nin en sık görülen mutasyonu ise R172K mutasyonu (G515A) olan arjinin lizine dönüşümüdür (Cohen ve ark., 2013). Daha iyi prognoza öncülük eden *IDH* mutasyon durumunun bu tümördeki biyolojik katkısının anlaşılabilmesi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilecektir.



Şekil 9. IDH1 ve IDH2 mutasyonsuz ve mutasyonu enzimlerin biyokimyasal reaksiyonları (Molenaar ve ark., 2018).

### 2.2.1.7 TERT Mutasyonu

İnsan telomerazları, kromozomların ucundaki telomerik bölgelerde bulunan, DNA'nın uzunluğunu düzenleyen, hücrelölümsüzleşme ve onkogeneizde önemli rol oynayan ribonükleoproteinlerdir. Kanserin belirtilerinden biri, telomer kontrolünün düzensizleşmesidir ve bu işlem, tüm gelişmiş kanserlerin %90'ında aktif olan telomeraz enzimi tarafından düzenlenmektedir. Telomeraz ters transkriptaz (*TERT*), telomeraz kompleksinin katalitik alt birimidir. Değişen *TERT* ekspresyonunun, meme kanseri, sarkomlar ve beyin tümörleri gibi birçok tümörde kısa sağkalım süresi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. *TERT* promotör bölge mutasyonları ise melanomlar, liposarkomlar, mesane kanseri ve gliomalar dahil olmak üzere birçok kanser tipinde sıklıkla görülmektedir (Ducrest ve ark., 2002; Gertler ve ark., 2004 ve Lu ve ark., 2011) *TERT* promoter mutasyonlarının primer GB'lerin %70-80'inde ve

oligodendrogliomaların %70'inden fazlasında meydana geldiği ancak *IDH1/2* mutant sekonder GB'lerde daha az sıklıkla gözlemlendiği tespit edilmiştir (Baylin ve ark., 2001)

### **2.2.1.8 Heterojenite kaybı (LOH)**

Heterojenite kaybı (LOH), kanserde genetik sapmaları tanımlamış etkili bir alternatif yaklaşımdır. LOH 10q, 10q25-qter'de görülen delesyon ile GB'lerde meydana gelen en sık saptanan genetik değişimdir. LOH 10q, hem primer (%60) hem de sekonder GB'lerde (%80) benzer sıklıkla görülmektedir (Rasheed ve ark., 1995). LOH 10q25-qter, düşük dereceli veya anaplastik astrositomadan GB'ye geçiş ile ilişkili olduğu bulunmuş, primer ve sekonder GB'lerin patogenezinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Fujisawa ve ark., 1999). 1p ve 19q kromozomal kollarında genetik madde kaybı, dengesiz translokasyondan 1 hibrit kromozom kaybına ve dolayısıyla LOH'a neden olabilmektedir. 1p kaybı GB'lerin yaklaşık %30'unda görülmektedir. 1p/9q' kaybı, düşük dereceli oligodendrogliomaların yaklaşık %80'inde, anaplastik oligodendrogliomaların %60'ında, oligoastrositomaların %30'unda ve GB'lerin de dahil olduğu astrositik gliomaların %10'unda görülmektedir. Bu sebeple 1p/19q kodelesyonu GB'de prognostik öneme sahiptir (Riemenschneider ve ark., 2010).

LOH 22q sekonder GB'lerde (%82), primer GB'lere (%41) göre daha sık görülmektedir. Primer GB'de görülen 22q delesyonu, 22q12.3-13.2 ve 22q13.31 olarak iki bölgedeki delesyon ile tanımlanmıştır. LOH 19q sekonder GB'de daha sık bulunmasına rağmen, LOH 1p ve 13q primer ve sekonder GB'lerde benzer bir sıklıkta görülmektedir (Crespo ve ark., 2015).

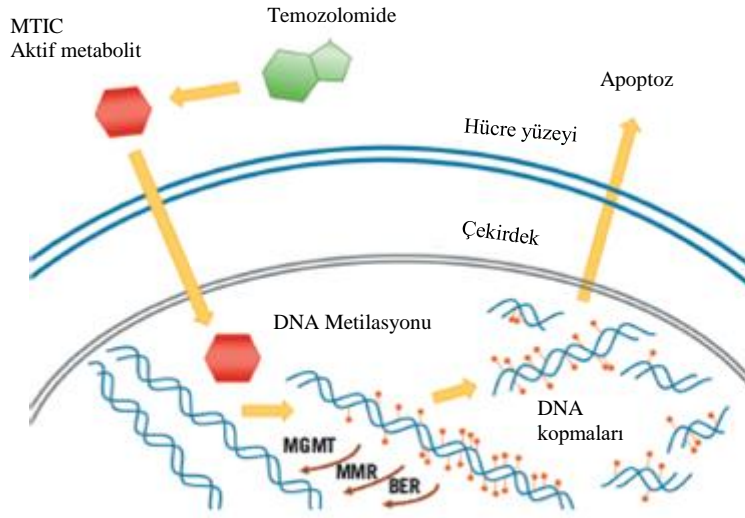
### **2.2.2 Epigenetik Faktörler**

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar ile genetik mekanizmalar ile birlikte epigenetik mekanizmaların kanserde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Epigenetik değişiklikler, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik oluşturmadan gen ifadesini düzenleyen mekanizmalardır. Epigenetik değişiklikler DNA ya da RNA temelli olabilmektedir. DNA tabanlı olarak; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, RNA tabanlı olarak; mikroRNA'lar (miRNA) ve kodlama yapmayan uzun RNA'lar (Long noncoding; LncRNA) kanserde sıklıkla çalışılmaktadır.

### 2.2.2.1 DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu düzenleyen majör epigenetik modifikasyondur. DNA metilasyon durumu, kalıtsal ve geri dönüşümlüdür. Aynı zamanda hücre bölünmesi sırasında korunmaktadır. DNA metilasyonunun ekspresyonu, transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu yoluyla baskılanmaktadır. Anormal DNA metilasyonu, kanserin başlatılmasında ve ilerlemesinde ciddi bir öneme sahiptir. DNA metilasyonu, DNA'daki sitozin ve guanin CpG adalarına metil grubu ekleyen bir enzim olan DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından gerçekleştirilmektedir ve memelilerde üç temel DNMT bulunmaktadır; DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B (Kim, 2014 ve Maleszewska ve Kaminska, 2013).

Birçok kanserde olduğu gibi GB'lerde de anormal DNA metilasyon durumu tespit edilmiştir. GB'de DNA metilasyonu, TMZ tedavisine verilen cevap ile güçlü bir ilişkiye sahiptir (Şekil 10). Alkilleiyici bir ajan olan TMZ, N-7 ve O-6 pozisyonundaki guanini ve N-6 pozisyonundaki adenini metillemektedir. TMZ'nin etkisi, yanlış eşleşme tamir sistemi (DNA Mismatch Repair) ve ilacın aktivitesini baskılayan O-6 eklentilerini uzaklaştıran *MGMT* geninin ürünü ile sınırlanabilmektedir. *MGMT* geni, mutasyon ve delesyon gibi genetik değişikliklerden etkilenebilmekte ve *MGMT* metilasyon durumu promotör bölge metilasyonu ile düzenlenebilmektedir (Alel'u-Paz ve ark., 2012). *MGMT* promotörünün metilasyonu, DNA onarımındaki hata ile sonuçlanmakta ve GB hastaları TMZ gibi alkile edici ajanlarla yapılan tedaviye daha iyi yanıt vermektedir (Sciuscio ve Hegi, 2013). *MGMT* metilasyon durumu, GB hastalarında ilaç yanıtını tahmin etmek için rutinde de kullanılan bir biyobelirteçtir.



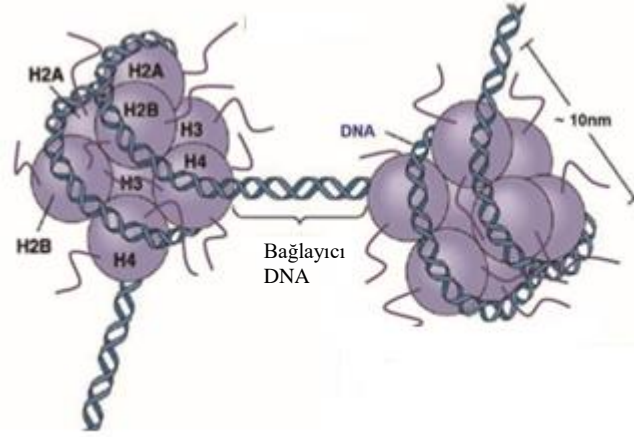
Şekil 10. TMZ mekanizması, MMR; Yanlış Eşleşme Tamiri, BER; Baz Eksizyon Onarımı (Schreck ve Grossman, 2018).

#### 2.2.2.2 Histon Modifikasyonu

H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olarak isimlendirilen histonlar, DNA ile birlikte üç boyutlu kromatin kompleksini oluşturan pozitif yüklü proteinlerdir (Kornberg ve Lorch, 1999; Şekil 11). Histon modifikasyonları, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, sumolasyon, ADP ribozilasyon ve deaminasyon gibi olayları içermektedir. Bu belirtilen histon modifikasyonlarının her biri doğrudan ya da dolaylı olarak kromatin yapısını etkilemekte ve sonucunda DNA onarımı, replikasyonu ve gen transkripsiyonunda değişikliklere neden olmaktadır (Kondo ve ark., 2014).

Asetilasyon ve deasetilasyon, dengeli asetilasyon durumunu koruyan, histon asetiltransferazlar ve histon deasetilazların (HDAC) aracılık ettiği dinamik bir süreçtir. HDAC'in artan ekspresyonu, GB dahil olmak üzere birçok tümörde tespit edilmiş ve HDAC inhibitörleri (HDACi), GB tedavisi için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Klinik öncesi çalışmalar HDACi'nin GB hücrelerine karşı yüksek derecede etkili olduğunu göstermiştir ancak klinik çalışmaların devamı hayal kırıklığı ile sonuçlanmıştır. Yetişkin hasta grubunda yapılan bir çalışmada HDACi olarak kullanılan FDA onaylı Vorinostat'in, tek ajan ve biyolojik tedavilerle kombinasyon olarak kullanılması durumundaki etkileri araştırılmış, tek ajan olarak kullanıldığında

küçük hasta grubunda uzun süreli hastalık stabilizasyonu gözlenmiş ancak biyolojik tedavilerle kombinasyonunun sonucunda sağkalımı etkilemediği tespit edilmiştir (Kim, 2014).



Şekil 11. Histone, kromatin yapısının temel birimi olan nükleozomun temelini oluşturmaktadır (Kim, 2014).

Histon metilasyonu, histon asetilasyonu ile birlikte keşfedilmiş ancak işlevi yıllarca belirsizliğini korumuştur. Bunun sebebi metilasyonun, DNA-protein etkileşimlerini etkilemediğinin düşünülmesidir. İlk keşfedilen histon demetilaz olan LSD1 tanımlandığında, histon metilasyonunun, farklı sınıflara bölünmüş yaklaşık 30 enzimin aracılık ettiği geri dönüşümlü bir işlem olduğu ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarla bağlantılı olduğu ortaya çıkmıştır (Shi ve ark., 2004). Histon metilasyonu, H3 ve H4'ün belirli lizin ve arjinin aminoasidini içermekte ve transkripsiyonu aktive edebilmekte veya baskılayabilmektedir. GB'lerde histon metilasyonu pediatrik ve yetişkin hastalarda farklı etki göstermektedir. Histon varyantı H3.3 (H3F3A) aktif kromatin alanlarını işaretlemekte ve pediatrik tümörlerde 27. pozisyondaki lizinde (*K27M*) ve 34. pozisyondaki glisinde (*G34R/V*) olmak üzere iki bölgede mutasyona uğrayabilmektedir (Schwartzentruber ve ark., 2012). *H3F3A* mutasyonlarının pediatrik düşük dereceli gliomalarda, embriyonel tümörlerde veya ependimomlarda görülmesinin net bir kanıtının olmamasına rağmen pediatrik yüksek dereceli gliomalar için %100 özgül olduğu bildirilmiştir (Gielen ve ark., 2013). Ancak histon *H3.3* mutasyonlarının erişkin GB'lerde tanımlanmadığı bildirilmiştir (Gielen ve ark., 2013). *K27M* ve *G34R/V* mutasyonları çocukluk çağı yüksek dereceli gliomalarda farklı yaş ve tümör yerleşimi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Khuong-Quang ve ark., 2012).



*K27M histon H3.3* mutasyonları daha küçük çocuklarda daha sık görülmekte ve orta hat beyin saps ve talamik GB'nin %70-80'inde bulunmaktadır (Sturm ve ark., 2012). *G34R/V histon H3.3* mutasyonlarının daha büyük yaştaki çocuklarda daha sık görülmekte ve hemisferik gliomalarda gözleendiği belirtilmektedir. *K27M histon H3.3* mutasyonu saptanan hastalarda, mutasyon gözlenmeyen hastalara kıyasla daha kısa sağkalım gözleendiği belirtilmiştir (Sturm ve ark., 2012). Bununla birlikte, kısa sağkalımın kısmen pediatrik gliomaların beyin sapsını ve orta hatta lokalize olmalarından kaynaklandığı düşünölmüştür.

### **2.2.2.3 miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Değişimi**

miRNA'lar, 18-25 nükleotid uzunluğunda kodlayıcı olmayan, mRNA hedeflerini susturarak gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak işlev gören korunmuş RNA'lardır (Burgess ve ark., 2008). miRNA'lar, GB'ler dahil olmak üzere kanser hücrelerinin çeşitli fonksiyonlarında önemli rollere sahiptirler. Aynı zamanda kemoterapi ve radyoterapi tedavisindeki direnç ile ilişkili genlerinin %60'ını düzenlediği tahmin edilmektedir (Virant-Klun ve ark., 2016). GB'de düzensiz mikroRNA'lar tarafından hedeflenen genlerin, hücre çoğalması, apoptoz direnci, otofaji, hücre göçü ve metastaz, anjiyogenez ve ilaç direnci dahil olmak üzere birçok süreçte ilişkili olduğu bulunmuştur (Yang ve ark., 2015). MikroRNA'lar farklı dokularda çoklu hedeflere yönelebildiklerinden dolayı, onkogenik veya anti-onkogenik etkilere sahip olabilmektedirler. GB oluşumu ve gelişimi ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonunda meydana gelen değişimler Tablo 3'de gösterilmiştir.

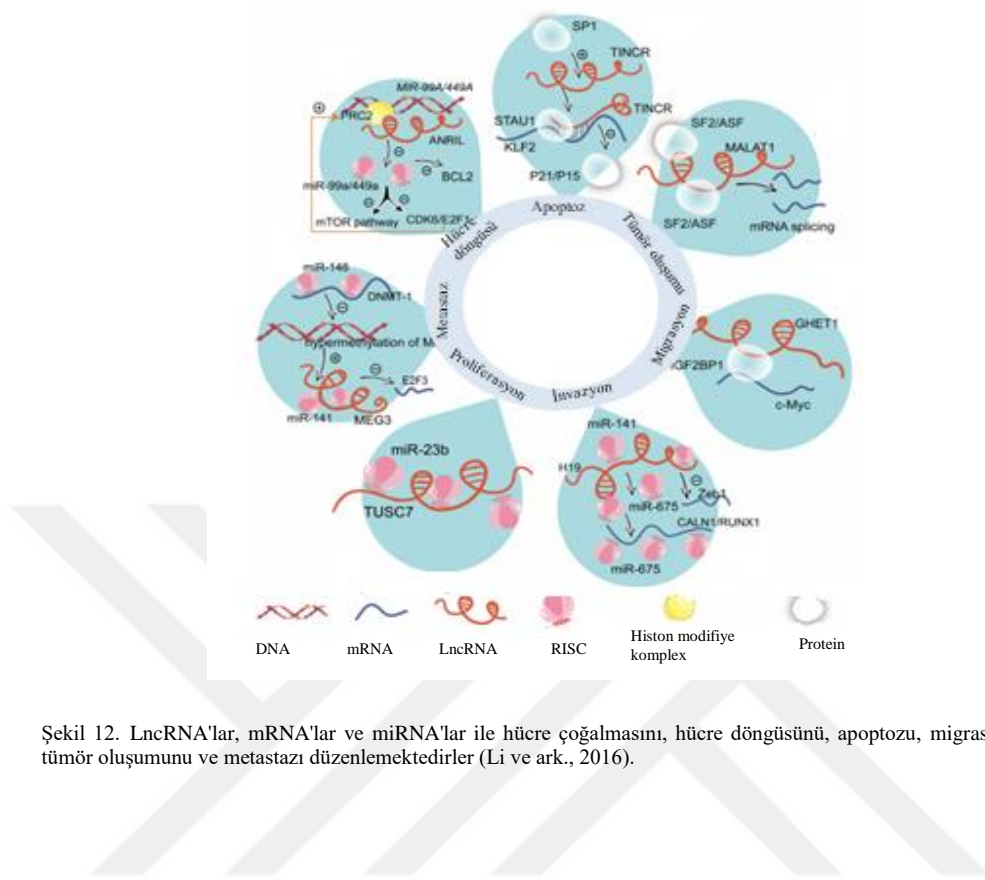
Tablo 3. GB'de belirlenen etkili miRNA'lar.

Etkili olduğu süreçler	miRNA'lar			
Tümör oluşumu	miRNA-124 (-)	miRNA-34a (-)	miRNA-326 (-)	
Hücre yayılması ve göçü	miRNA-125b (+)	miRNA-302-362 (-)	miRNA-34a (-)	miRNA-128 (-)
	miRNA-326 (-)	miRNA-218 (-)	miRNA-124 (-)	
Kök hücre oluşturma özelliği	miRNA-9/9 (+)	miRNA-124 (-)	miRNA-34a (-)	miRNA-137 (-)
	miRNA-146a (-)	miRNA-18 (-)	miRNA-128 (-)	
Hücre çoğalması	miRNA-137 (+)	miRNA-34a (+)	miRNA-128 (-)	miRNA-146a (-)
	miRNA-17-92 (-)	miRNA-125b (-)	miRNA-451 (-)	
İlaç direnci	miRNA-9 (-)	miRNA-10a (+)	miRNA-195 (+)	miRNA-455-3p (+)

(-): Düşük ekspres, (+): Yüksek ekspres

#### 2.2.2.4 Long-noncoding RNA Ekspresyon Seviyelerinin Değişimi

Uzun kodlama yapmayan RNA'lar (LncRNA), 200 nükleotitten daha uzun olan ve protein kodlama potansiyeline sahip olmayan bir transkript grubudur (Ulitsky ve Bartel, 2013). LncRNA'lar, embriyonik gelişim, hücrel farklılaşma ve kanser dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte rol oynayan önemli düzenleyiciler olarak işlev görmektedirler (Batista ve Chang, 2013). LncRNA'lar, hedef genlerini transkripsiyonel veya transkripsiyon sonrası seviyelerde düzenlemektedirler (Şekil 12). LncRNA'lar protein kodlayan genlerle karşılaştırıldığında, LncRNA'ların biyolojik fonksiyonlar ve tümör durumları ile daha yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar LncRNA'ların glioma ile ilişki içinde olduklarını ancak rollerinin ve altında yatan mekanizmaların belirsiz kaldığını göstermektedir (Tablo 4). Bu sebeple gliomanın biyolojik davranışlarının düzenlenmesindeki olası işlevlerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doğrultuda LncRNA'ların gelecek zamanda tedavide kullanılacak biyobelirteç adayları olabilecekleri düşünülmektedir.



Şekil 12. LncRNA'lar, mRNA'lar ve miRNA'lar ile hücre çoğalmasını, hücre döngüsünü, apoptozu, migrasyonu, invazyonu, tümör oluşumunu ve metastazı düzenlemektedirler (Li ve ark., 2016).

Tablo 4. Gliomalar ile ilişkili LncRNA'lar.

LncRNA	Biyolojik fonksiyon	Moleküler mekanizmalar / hedefler
HOTAIR (+)	GB hücrelerinde proliferasyon ve tümörigeniz ile ilişkili	Wnt / $\beta$ -katenin sinyali
CRNDE (+)	Glioma hücrelerinde büyüme ve göç ile ilişkili	miR-136-5p, miR-186 ve miR-384 için ceRNA'lar
NEAT1 (+)	Glioma patogenezi destekler	<i>EZH2</i>
XIST (+)	Glioma hücrelerinin kemo davranışları ile ilişkili	miR-152, miR-429, miR-29c ve miR-137 için ceRNA'lar
H19 (+)	GB hücrelerinde hücre göçü ve anjiyogenez ile ilişkili	<i>RB1</i> ekspresyonunu negatif olarak düzenlemekte
UCA1 (+)	Glioma hücrelerinin çoğalması ve göçü ile ilişkili	miR-182 ve miR-122 için ceRNA'lar
MEG3 (-)	Glioma hücre proliferasyonunun bozulması ile ilişkili	<i>MDM2, p53</i>
MALAT1 (+)	Gliomada tümör baskılayıcı fonksiyon ile ilişkili	ERK / MAPK sinyalinin etkisizleştirilmesi
TUSC7 (-)	Hücre proliferasyonu ve glioma hücrelerinin göçünü engelleme ve TMZ direncinin baskılanması ile ilişkili	miR-23b ve miR-10a için ceRNA'lar

(-): Düşük ekspresyon, (+): Yüksek ekspresyon

Metastaz ile ilişkili akciğer adenokarsinom transkript 1 (MALAT1), 11q13.1 kromozomu üzerinde bulunan 8.7 kb uzunluğunda bir LncRNA'dır (Wang ve ark., 2016). MALAT1 ilk olarak metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde tespit edilmiş ve yüksek ekspresyonunun kanser gelişimi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. MALAT1'in, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri için potansiyel bir terapötik hedef olarak kullanılabilirliği kabul edilmiştir (Ji ve ark., 2003). Gliomalarda yapılan çalışmalar ile MALAT1 ekspresyonunun gliomaların malign durumuyla ilişkili olduğu ve yüksek MALAT1 ekspresyonunun glioma hastalarında ilaç direncine bağlı olarak kötü prognosis ile yakından bağlantılı olduğu ortaya konmuştur (Ma ve ark., 2015). Beyin tümörü hücrelerinde MALAT1 yıkımının, tümör hücrelerinin büyümesinin engellenmesi ve gliomalarda hücre apoptozunun başlatılması ile sonuçlanmıştır (Xiang ve ark., 2016).

HOX transkript antisens RNA (HOTAIR), kromozom 12 içerisinde HOXC geninin lokusundaki antisensinden kopyalanan bir LncRNA'dır (Cai ve ark., 2014). HOTAIR'in yüksek ekspresyonunun, hepatosellüler karsinom, mide ve akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde, tümör hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve kemoterapi ilaçlarına karşı oluşan direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Xue ve ark., 2016). Bu nedenle, HOTAIR, birçok kanser türünde kötü prognozun bir belirtici olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında HOTAIR'in, gliomalarda da moleküler alt tiplendirme için potansiyel bir terapötik hedef olarak kullanılabilir önemli bir belirteç adayı olabileceği araştırılmıştır. HOTAIR'in yüksek ekspresyonunun, GB hastalarında genel sağkalım ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, GB hücrelerinde HOTAIR'in inhibisyonu, hücre döngüsünün durdurulmasına ve hücre göçünün zayıflamasına katkı sağlayacağı gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2015).

LncRNA H19, kromozomun 11p15.5 bölgesinde, telomerik alana yakın bir konumda bulunmaktadır (Raveh ve ark., 2015). H19'un, ilk önce bir tümör baskılayıcı olarak görev aldığı tanımlanmış, daha sonraki çalışmalarda ise H19'un fonksiyonel olarak tümör gelişim evrelerinde rol oynadığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016). Gliomalarda H19, çeşitli mekanizmalar ile tümör oluşumuna ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunmakta ve H19'un yüksek ekspresyonu GB hücrelerinin göç ve anjiyogenezini desteklemektedir. Farelerde yapılan bir çalışma ile artmış H19 seviyesinin ksenograft tümörlerinin büyüme oranını arttırdığını tanımlanmıştır (Jia ve ark., 2016 ve Jiang ve ark., 2016).

LncRNA LOXL1 antisens RNA 1 (LOXL1-AS1), kromozomun 15q24.1 bölgesinde bulunmakta ve 10.781 nükleotitten oluşmaktadır (Hauser ve ark., 2015). LOXL1-AS1, akciğer, hepatosellüler karsinom, glioma, meme kanseri, prostat kanseri gibi çeşitli insan kanserlerinde araştırılmıştır ve tümörigenezde önemli rol oynadığı tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2018 ve Zhang ve ark., 2018). GB'lerde LOXL-AS1'in yüksek ekspresyonu, kemoterapi ilaçlarına direnç ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiş ve LOXL-AS1'in baskılanması durumunda hücre proliferasyonunun engellendiği tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2018).

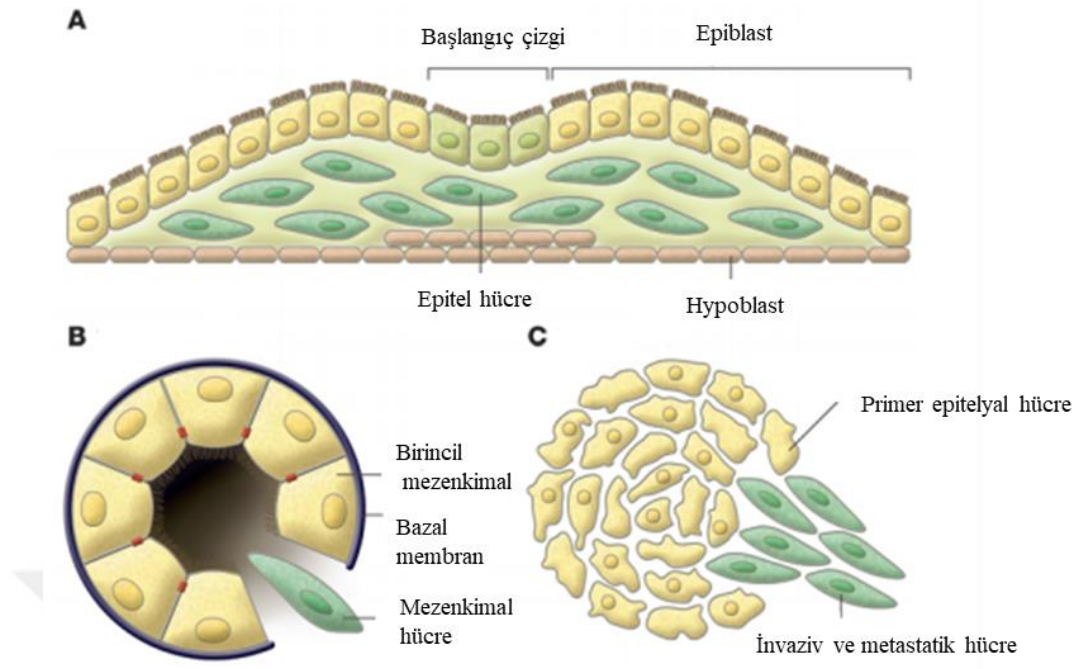
LncRNA PVT1, kromozomun 8q24. bölgesinde bulunmakta ve onkogen adayı olarak tanımlanmaktadır (Ding ve ark., 2015). LncRNA PVT1, hücre çoğalması,

apoptoz ve göç gibi biyolojik işlemlerde görev almakta ve meme, prostat, yumurtalık, mide ve akciğer kanserlerinde aşırı eksprese edilmektedir (Chen ve ark., 2018; Nagoshi ve ark., 2012; Wan ve ark., 2018 ve Yu ve ark., 2018). GB'lerde yapılan çalışmada, yüksek PVT1 ekspresyonunun, GB'nin agresifliği ile ilişkili olduğu ve baskılanmasının hücrelerdeki proliferasyonun azalmasına, apoptozun artmasına ve göç yeteneklerinin baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir.

## **2.3 GB'lerin Agresifliğinde Etkili Olan Moleküler Özellikler**

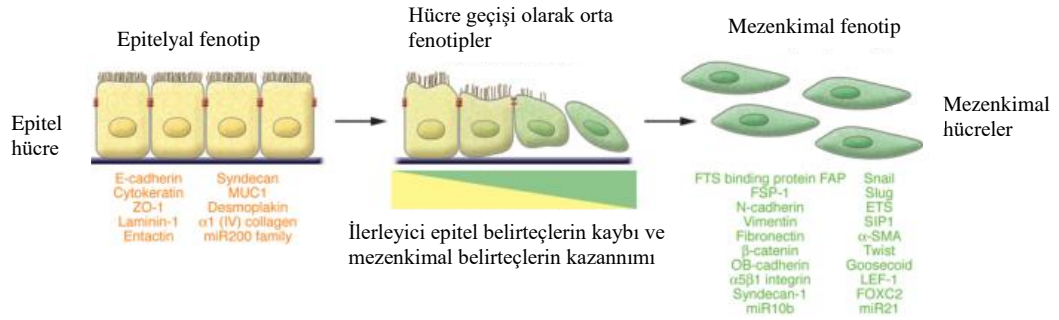
### **2.3.1 Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Mekanizması**

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), epitelyal hücrelerin çeşitli biyokimyasal değişikliklere maruz kalmasıyla epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellik kazanmaları durumudur (Kalluri ve Weinberg, 2009). Hücrelerde EMT, hücre adezyon özelliğinde azalma ve yüksek göç kapasitesine sahip hücrelerin oluşumu ile karakterize edilmektedir. EMT, içinde buldukları biyolojik süreci temel alan Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 olmak üzere üç farklı tipte sınıflandırılmaktadır (Şekil 13). Tip 1 EMT'ler, implantasyon, embriyo oluşumu ve organ gelişimi ile ilişkilendirilmektedir. Tip1 EMT'lerde fibrozise neden olma ve çevre dokulara yayılma ile sonuçlanan göç özelliği yüksek bir fenotip gözlenmemektedir. Ek olarak Tip 1 EMT'ler, ikincil epitel oluşturmak için mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) potansiyeline sahip mezenkimal hücreler üretebilmektedir (Zeisberg ve Neilson, 2009). Tip 2 EMT'ler, yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve organ fibrozu ile ilişkilendirilmektedir. Tip 2 EMT'ler, travma ve enflamasyon sonucunda oluşan hasarı onarmak ve dokuları yeniden oluşturmak için fibroblastları ve diğer ilgili hücreleri üretmektedir (Kalluri ve Weinberg, 2009). Tip 3 EMT'ler, genetik ve epigenetik değişiklikler geçirmiş neoplastik hücrelerde, anomal hücre büyümesini ve tümörlerin gelişimini destekleyen genlerde meydana gelmektedir. Tip 3 EMT'ye sahip hücreler göç ve metastaz yapabilmekte ve devamında yaşamı tehdit edici belirtiler oluşturabilmektedir (Kalluri ve Weinberg, 2009).



Şekil 13. EMT'nin farklı türleri. A. Tip 1 EMT. B. Tip 2 EMT. C. Tip 3 EMT (Kalluri ve Weinberg, 2009).

EMT ile ilgili ilk çalışma, 1960'ların sonlarında, Hay (1968) tarafından yayımlandı. Bu çalışma ile epitel hücrelerin embriyogenez sırasında, embriyonun iç kısmına geçerek mezoderm oluşturduklarını göstermişlerdir (Trelstad ve ark., 1967). 1980'lerde ise Greenburg ve Hay (1982), yetişkin ve embriyonik epitel hücre fenotipinde gerçekleşen epitelyal-mezenkimal değişiklikleri tanımlamışlardır. 1990'lı yıllara gelindiğinde biriken çalışmalar ile embriyogenez sırasında gözlenen bu geçişe benzer bir sürecin, kanser ilerlemesi ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (Thiery, 2002). Ayrıca, hücrelerin morfolojilerinde değişiklik göstererek kemoterapiye direnç oluşturduğu kanıtlanmıştır (Lee ve ark., 2006). EMT'nin başlaması ve tamamlanması için çeşitli moleküler işlemler gerçekleşmektedir. Bunlar, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, hücre yüzey proteinlerinin ekspresyonu, yeniden düzenlenme ve sitoskeletal proteinlerin ekspresyonu ve spesifik miRNA'ların ekspresyonu gibi birçok durumda görev almaktadır. Bu süreçte görev alan genler hücrenin EMT'sini göstermek için biyobelirteç olarak kullanılmaktadırlar (Şekil 14).



Şekil 14. Epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere geçişi (Kalluri ve Weinberg, 2009).

EMT sürecinin başlamasında ve oluşan mezenkimal durumun sürdürülmesinde farklı sinyaller rol oynamaktadır. EMT'nin en önemli özelliklerinden birisi, *CDH1* geni tarafından kodlanan hücre-hücre yapışma glikoproteini olan *E-kaderin*'in kaybıdır. Bunun sonucunda hücre-hücre etkileşimlerinin kaybı ve ara filament bileşimindeki hücrelerin sito-keratinlerden *vimentine* dönüşümleri gözlenmektedir. Bu sayede hücrelerin göç kapasitesi artmaktadır. Bunun yanında EMT mekanizması ile ilişkili *Zeb1*, *Snail*, *Twist* ve *N-kaderin*'in yüksek ekspresyonu mezenkimal geçişi desteklemekte ve hücre göçüne sebep olmaktadır. *E-kaderin* ekspresyonunun arttırılması, *Zeb1*, *Snail*, *Twist* ve *N-kaderin* ekspresyonlarının azaltılması tümörün ilerlemesini önlemekte ve kemoterapi ilaçlarına karşı duyarlı hale getirmektedir.

Gliomalardan köken alan hücreler, kök hücreler, sinir kök hücreleri ve oligodendrosit hücreleri olabilmektedir (Lindberg ve ark., 2009 ve Liu ve ark., 2011). Glial hücreler gelişimsel olarak nöroepitelyal soydan türetilmektedir ve klasik epitelyal hücrelerden farklı bir davranış sergilemektedirler. Gliomalar birkaç yönden mezenkimal olarak kabul edilebilecek bir fenotip sergilediklerinden dolayı glialden mezenkimale geçiş (GMT) veya mezenkimal geçiş (MT) terimi önerilmektedir (Mahabir ve ark., 2014).

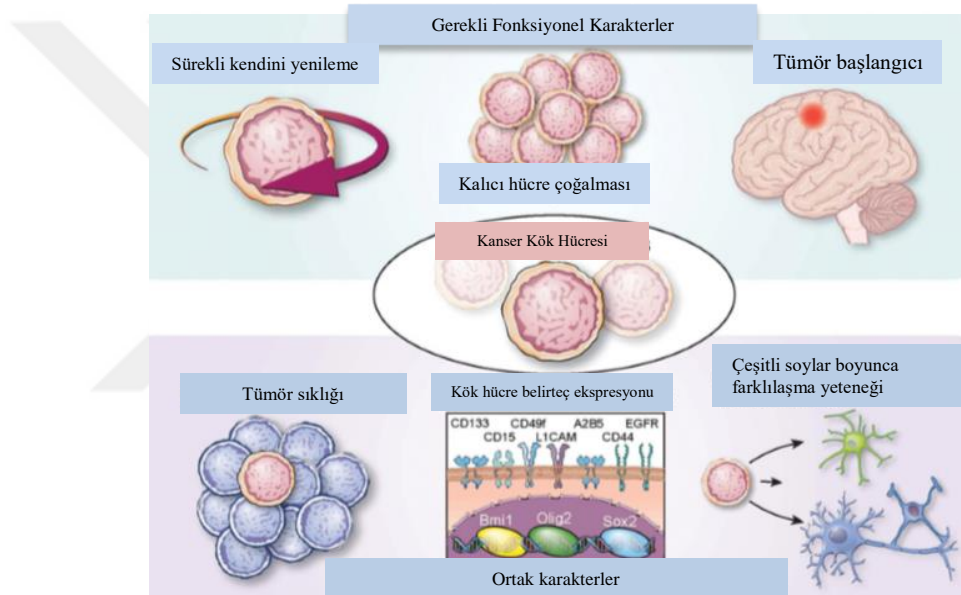
GB'ler son derece yüksek göç potansiyeline sahip olmaları nedeniyle çevre dokulara yayılım göstermektedir. MT, GB hücrelerine bu göç özelliğini veren mekanizmalardan biridir (Iser ve ark., 2017). Farklı transkripsiyon faktörlerinin arasındaki işbirliği, GB'de MT mekanizmasının başlatılmasında büyük öneme sahiptir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi GB'lerde de EMT ile ilişkili *Zeb1*, *Snail*, *Twist* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyonundaki değişimler hücrelerin mezenkimal



fenotip kazanımını desteklemektedir. Bu nedenle, EMT süreci ile ilişkili faktörlerin inhibisyonunu sağlayan yeni moleküllerin geliştirilmesi, GB tedavisine yardımcı olabilmektedir.

### 2.3.2 Kanser Kök Hücrelerinin Varlığı

Kanser Kök Hücre (CSC), sinir kök hücrelerinin özelliklerine sahip küçük bir kanser grubu olarak tanımlanmaktadır. Bu hücreler, kendi kendini yenileme, farklılaşma, tümör kitlesi oluşturma ve göç edebilme yeteneklerine sahiptirler (Şekil 15).



Şekil 15. CSC'lerin fonksiyonel karakterleri (Lathia ve ark., 2015).

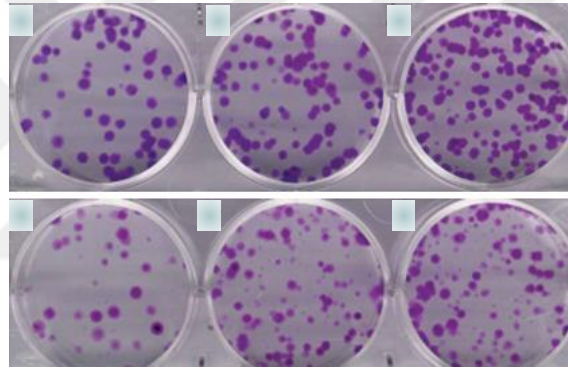
GB dahil olmak üzere diğer beyin tümörleri, potansiyel bir farklılaşma yeteneğine sahip hücresel özellik göstermektedirler (Duesberg ve ark., 2011). GB'ler glial belirteçleri ifade eden hücrelerin yanı sıra, sinir belirteçlerini ifade eden hücreleri de içermektedir. Bu da GB'lerin oluşumunda multipotent nöral kök hücrelerin varlığını göstermektedir. Bu gibi karışık tip GB'ler, nöral kök hücrelerden veya multipotent kök hücre benzeri özellikler edinmiş farklı hücre tiplerinden gelişebilmektedirler. GB kanser kök hücrelerinin (GBCSC), normal nöral kök hücrelerle ortak özellikleri bulunmaktadır. Nöral kök hücrelerinin tıpkı GBCSC'ler gibi, kendilerini yenileme, yüksek proliferasyon kapasitesi ve sinir sistemi soylarından farklılaşma yeteneği

(nöronlar, astrositler ve oligodendrositler) gibi özellikleri bulunmaktadır (Schneider ve ark., 2016). Ancak CSC'ler proliferasyon, farklılaşma genlerinin anormal ekspresyonu, kromozomal anormallikler ve tümör oluşumu gibi özellikleriyle nöral kök hücrelerden farklılık göstermektedir. GBCSC'lerin güçlü bir tümör başlatma, kemoterapi ilaçlarına direnç gösterme ve oluşan tümörün korunumu gibi ciddi fonksiyonel özellikleri vardır. GBCSC'lerin varlığı ile ilişkili olarak çeşitli biyobelirteçler tanımlanmıştır. Bu biyobelirteçler hücre konumlarına göre sınıflandırılmıştır. Bunlar; hücre yüzey biyobelirteçleri (*CD133*, *CD44*, *A2B5*, *CD15*, *CD81* ve *TPT1*), transkripsiyonel faktörler (*SOX2*, *SALL4*, *OCT4*, *STAT3*, *NANOG*), post-transkripsiyonel faktörler (miRNA, LncRNA) ve transkripsiyonel baskılayıcılardır (Li ve ark., 2009; Olmez ve ark., 2015; Rahaman ve ark., 2002 ve Zhang ve ark., 2015). Aynı zamanda Notch, Hedgehog-Gli, RTK-Akt, Wnt- $\beta$ -katenin, STAT3 gibi sinyal yolları, GBCSC oluşumunda rol oynamaktadırlar (Borah ve ark.,2015).

### **2.3.3 Koloni Oluşturma Yeteneği**

Puck ve Marcus (1956), hücre kültürü tekniğine bağlı olarak kültür kaplarında memeli hücrelerinin uygun besiyeri kullanılarak koloni oluşturma yeteneğinin değerlendirilmesi ile ilgili bir makale yayınlamışlardır. Koloni oluşumları için test edilecek az sayıdaki hücrenin mikro çevresini koşullandırmak için çok sayıda "besleyici" hücre kullanmışlardır. Koloni oluşum deneyi ilerleyen yıllarda, besleyici hücrelere ihtiyaç olmadan, gelişmiş kompleks kültür ortamı kullanılarak birçok farklı hücre tipiyle yapılan çok çeşitli çalışmalar için kullanılmıştır. Kullanılan bu deney, apoptoz ve nekroz gibi hücrenin ölümüne neden olabilecek, tedavilerden sonra çoğalma kapasitesini koruyan tüm hücreleri tespit edebilmektedir (Brown ve Attardi, 2005). Kolonojenik testler ayrıca *in-vivo* tekniklerle çeşitli dokulardaki kök hücreler için de geliştirilmiştir. 1961'de, farelerin kemik iliğinden alınan kök hücrelerle ağır ışınlanmış hayvanların dalaklarında kolonilerin üretilebileceği gösterilmiştir (Till ve McCulloch, 1961). Daha sonra, cilt kök hücrelerinde hücrelerin çoğalmasını engelleyen doz işleminden sonra ışınlanmış farelerin derisinde nodüllerin üretilebildiği gösterilmiştir.

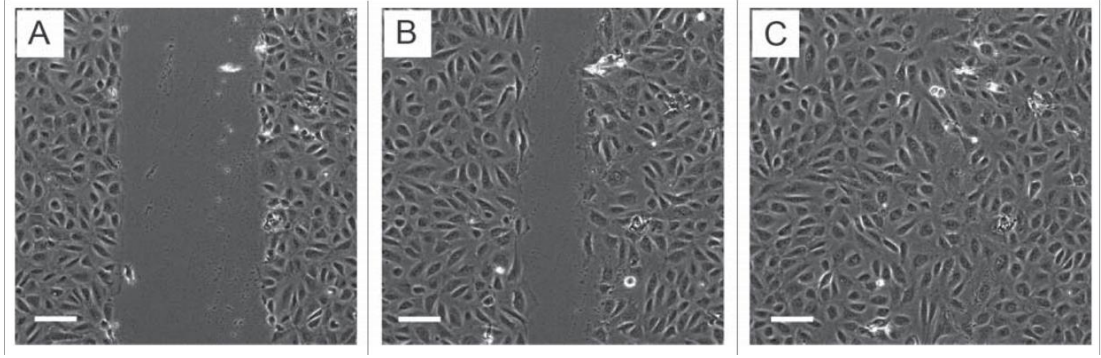
Koloni oluşum deneyi, ilaç veya bitki özütleri ile tedavi edilen ve lme gitmeyen hücrelerin agresifliğini test etmede kullanılan güncel bir testtir. Tedavide kullanılması planlanan ve çalışmaları hızla devam eden bitki özütlerinin birçok kanser türünde koloni oluşumunu baskıladığı tespit edilmiştir. Bu kapsamda yapılan birçok çalışma, tümörler ve normal dokular arasında kemoterapötik veya bitkisel ajanlara duyarlılıktaki farklılıkları, çeşitli şartlar ve uygulama şekilleriyle tedavi etkinliği hakkında bilgi vermiştir (şekil 16). CSC'lerin dokulardaki sürekli çoğalma kapasitesi, normal dokuların devam eden bütünlüğünü ve işlevini bozmaktadır. Oldukça agresif seyreden GB'lerdeki kök hücrelerin sınırsız çoğalma kapasitesinin ortadan kaldırılması rekürrenslerin önlenmesi için gereklidir. Bu sebeple tedavi edildikten sonra ölümden kaçan ve çoğalan hücrelerin agresifliğinin test edilmesi yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.



şekil 16. Akiğer tümör hücresine ait SW-1573 hücrelerinden üretilen kolonilerin altı kuyulu plakalarda görüntülenmesi (Franken ve ark., 2006).

### 2.3.4 Yara İyileştirme Yeteneği

Yara iyileşme deneyi, kolektif hücre gnn araştırmak için kullanılan iki boyutlu standart bir *in-vitro* tekniktir (Friedl ve ark. 2009; Friedl ve Wolf, 2010; Ilina ve Friedl, 2009; Rorth, 2009 ve Vedula ve ark., 2013). Bu yöntem, tek bir tabaka üzerindeki hücrelerin fiziksel veya mekanik olarak dışlanmasıyla hücre içermeyen alanın oluşturulması ile gerçekleştirilmektedir (Jonkman ve ark., 2014). Hücresiz alana maruz kalan hücreler boşluğa doğru yönelmeye ve boşluğu geçmeye başlamaktadırlar. Endotelyal hücreler üzerinde gerçekleştirilen bir yara iyileşme deneyinden alınan görüntü dizisi şekil 17'de gösterilmektedir.



Şekil 17. Yara iyileşmesi deneyinde, farklı zaman aralıklarında (A,B,C) elde edilen görüntüler (Jonkman ve ark., 2014).

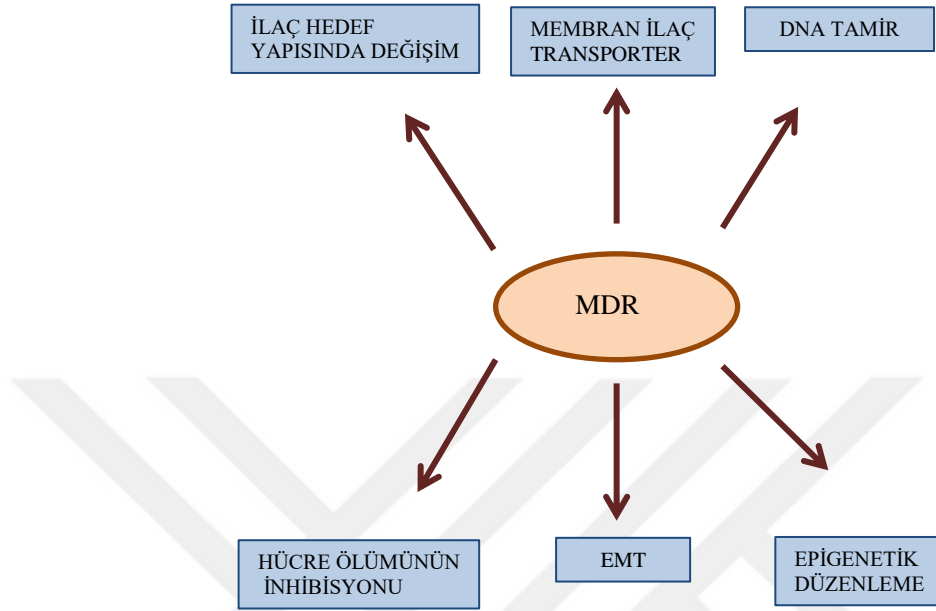
Yara iyileşme deneyi hücre göçünün bir türü olarak bilinmektedir. Bu göç, hücreler arası bağlantılar ile iki boyutta hareket eden epitel ve endotel hücreler tarafından oluşturulmaktadır. Göç, metastaz, embriyonik morfogenez ve doku hasarı gibi çeşitli işlemlerde ortaya çıkabilmektedir (Fujisawa ve ark., 2012; Lecomte ve ark., 2011; Martin ve Parkhurst, 2004 ve Pouliot ve Burrows, 2000). Yara iyileşmesi deneyinden elde edilebilecek en yaygın bilgilerden birisi, hücrelerin kolektif hareket hızının bir ölçüsü olan boşluk kapanma hızıdır. Boşluk kapanma hızı, hücrelerin RNA girişimi (RNAi) ile muamele edilmesi, hücre dışı matris bileşiminin düzenlenmesi veya substrat sertliği gibi çeşitli çevresel süreçlerin değiştirilmesi gibi farklı koşullar altında ölçülebilmektedir (Simpson ve ark., 2008 ve Vitorino ve Meyer, 2008). Hücre göçünü düzenleyen çeşitli hücresel mekanizmalar bulunmaktadır. Özellikle hücre göçü ve metastazı ile ilişkili olduğu tespit edilen EMT sürecinin yara iyileşme deneyinde, hücrelerin boşluğu kapatmasında etkili olan mekanizma olarak işlev gördüğü belirlenmiştir (Yarrow ve ark., 2005). Yara iyileşme deneyi, hücrelerin molekül taraması veya ilaç keşfi gibi verimli uygulamalar için de kolayca uyarlanabilmektedir.

## 2.4 GB'lerin Tedavisinde Etkili Olabilecek Süreçler

### 2.4.1 Çoklu İlaç Direnci

Beyin tümörünün tedavisi onkolojinin en güçlük yaşadığı alanlardan birisidir. Beyin tümörlerinin ve özellikle GB'nin, radyoterapi ve kemoterapi tekniklerinin ilerlemesine rağmen prognozları oldukça kötüdür. Karşılaşılan zorluklardan birisi, cerrahi rezeksiyonun tam gerçekleştirilememesi ve çevrede kalan hücrelerin anormal çoğalmasıyla tümörün tekrardan oluşmasıdır. Adjuvan kemoterapi tedavisi, beyin

tümörleri için kullanılan esas tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu kemoterapi tedavisinin etkinliğini sınırlayan en önemli problem çeşitli mekanizmalar ile ilişkili olan çoklu ilaç direnci (MDR)'dir. (Régina ve ark., 2001; Şekil 18).



Şekil 18. MDR'nin etkili olduğu çeşitli mekanizmalar.

MDR, sentetik ve doğal sitotoksinlere karşı kendiliğinden oluşan veya sonradan kazanılmış bir direnç mekanizması olarak tanımlanmaktadır. Kendiliğinden oluşan direnç, tümörün ilk kez alınan kemoterapi ilacına karşı oldukça az oranda cevap vermesi veya hiç cevap vermemesidir. Sonradan kazanılmış direnç ise, tümörün ilk başlarda ilaca cevap vermesi ancak bir süre sonra cevap vermemesi ile gösterilmektedir. Birçok primer beyin tümörü doğal olarak kemoterapiye dirençlidir. Bunun yanında sitotoksik ilaçların kan-beyin bariyeri boyunca sınırlı geçişi, membran transport proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonundaki değişime bağlı olarak hücre içine ilaç girişinin azalması, fazla sayıda kullanılan ilaca bağlı olarak DNA tamir sistemlerinin verdiği cevap ve hedeflenen molekülün ilaca bağlanma özelliğinin kısıtlanması gibi mekanizmalar ile tümör hücrelerinin ilaca karşı zayıf yanıt göstermesi gözlenebilmektedir.

MDR'nin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan P-glikoproteini (P-gp) kodlayan *MDR1* geni, kan-beyin bariyerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir (Gros ve ark., 1986). *P-gp*, kan-beyin bariyerindeki kılcal damar endotel hücrelerinde

sentezlenmekte ve kemoterapi ilaçlarının hedeflenen beyin hücrelerine giriş ve çıkışında rol oynamaktadır ve bu sebeple ilaç direncinde etkilidir. GB'lerde *P-gp* yüksek miktarda eksprese olmakta ve bu da GB'lerde kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Nagane ve ark., 1999). *P-gp*, esas olarak MDR ile ilişkili protein ailesini (MRP) içeren ABC protein ailesine aittir. MRP ailesinin dokuz üyesinin en iyi çalışıldığı *MRP1* geni, glioma hücre hatlarında ve klinik örneklerde tespit edilmiş ve ilaç direncinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Tivnan ve ark., 2015). MRP familyasından, *MRP1*, *MRP3* ve *MRP5* kan-beyin bariyerinde eksprese edilmekte ve toksik bileşiklere karşı savunmada rol oynamaktadırlar. *MRP1*, *MRP5*, *LRP1* genleri MDR ile yakından ilişkilidir. Bu genleri hedef alacak yeni yöntemlerin geliştirilmesi, ilaca karşı oluşan direncin kırılmasına ve GB tedavilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

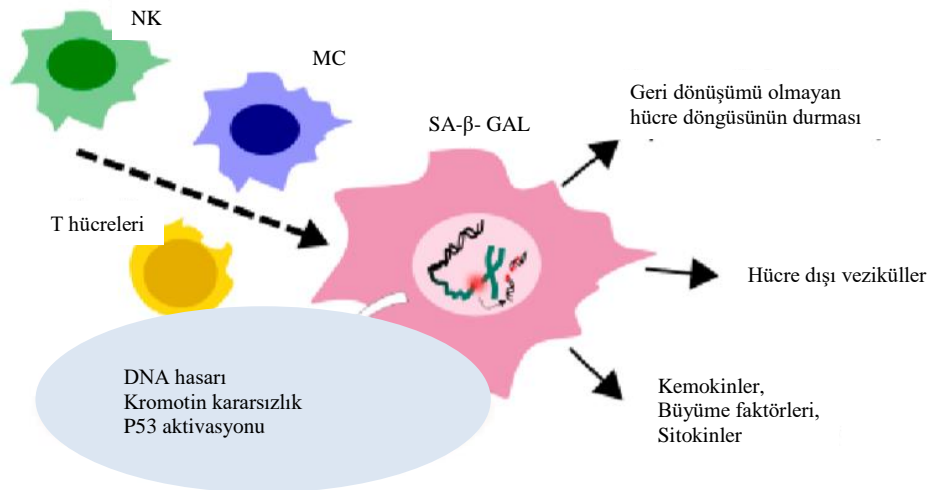
#### **2.4.2 Hücre Yaşlanması**

Kanser hücrelerinde görülen anormal hücre çoğalmasına karşı, günümüzde hücresel bölünmelerini durdurmayı hedefleyen birçok anti-kanser stratejisi kullanılmaktadır. Bu kullanılan stratejiler apoptoz ile ilişkilendirilmekte ancak genellikle hücreler için apoptoz yeterli kalmamaktadır (Lin ve ark., 2017). Hücresel yaşlanma, hücrelerin mitotik aktivite kaybı ile bölünmelerin durmasıyla sonuçlanan, çeşitli yapısal ve fonksiyonel özelliklerle karakterize edilen bir durumdur (Schmitti, 2017). Bu nedenle, kanser hücrelerinin anormal çoğalmasını durdurmak için hücrelerin tamamını apoptoza götürmek yeterli değildir. Bunun yanında, tedavi edildikten sonra apoptoza gitmeyen hücrelerin hücresel yaşlanmaya girmesinin tedavi için yeterli olabileceği öngörülmektedir (Pawlowska ve ark., 2018).

Yaşlanmış hücreler, hücre döngüsünde durmakta ve bu süreçte hücre çoğalmasını gerçekleştirememektedirler. Genel olarak, yaşlanma iki şekilde görülmektedir; replikasyona bağlı yaşlanma ve erken yaşlanma (De Magalhaes ve Passos, 2018). Replikasyon ile bağlantılı yaşlanma tipinde, DNA polimeraz, kromozom uçlarının replikasyonunu başlatamamakta ve her hücresel bölünme sonrasında kromozom uçlarının kısalmasına neden olmaktadır (Rincheval ve ark., 2002). Bunun sonucunda hücre yaşlanmaya maruz kalmakta ve bölünmeyi durdurmaktadır. Erken yaşlanma ise

oksidatif, genotoksik ve replikatif stres gibi birçok hücresel stresler sonucunda ortaya çıkmaktadır (Goligorsky ve Hirschi, 2016). Kemoterapi ilaçlarından kaynaklı hücresel yaşlanma bu durum ile ilişkilidir.

Hücre çoğalmasının durmasının yanı sıra, yaşlanan hücreler, genişletilmiş sitoplazma ve sitoplazmik granüller ile birlikte yaşlanma ile ilişkili  $\beta$ -galaktosidaz (SA- $\beta$ -gal) aktivitesinin arttırılması gibi başka morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir (Pawlowska ve ark., 2018). Bunun yanında yüksek oranda DNA hasarı ve kromozomal sapma göstermektedirler. Bu gibi diğer özellikler, yaşlanan hücreler için standart olan yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipini (SASP) belirler. SASP görülen hücreler, kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer çözümler serbest bırakmakta ve makrofajlar, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) ve T-lenfositler gibi immünolojik sistem bileşenleri tarafından temizlenmektedir (Şekil 19). Bu da, organizmanın yaşlanmasına katkıda bulunan düşük dereceli bir enflamasyona yol açabilmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalar ile hücresel yaşlanmanın, organizmaların yaşlanmasında ve yaşa bağlı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Naylor ve ark., 2013). Yaşlanan hücreler, insan doku ve organlarında birikmekte ve ciddi fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadırlar (Baker ve ark., 2011). Ayrıca yaşlanan hücreler, görülme sıklığı yaşla birlikte artan hastalıkların başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Baker ve ark., 2016).



Şekil 19. SASP gösteren bir yaşlanma hücresinin gösterimi, NK; Natural Killer Cells, Doğal Öldürücü Hücreler, MC; Mitotic Catastrophe, Mitotik felaket. (Pawlowska ve ark., 2018).

Kanser hücrelerinde görülen yaşlanma, geri dönüşü olmayan bir şekilde bölünme kabiliyetini yitiren hücre topluluğu olarak ortaya çıktığından ciddi bir problemi teşkil



etmektedir (Mikula ve ark., 2018). Bununla birlikte, yaşlanan hücrelerin kanserojenik özelliklere sahip olduğu ve apoptoza direnç gösterdiği tespit edilmiştir. GB hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, erken yaşlanmanın, p53'e bağımlı bir şekilde başlatılabileceği gösterilmiştir (Jeon ve ark., 2016 ve Paget ve ark., 2012). GB hücre oluşumunda görev alan birkaç proteinin hücre yaşlanma ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. EMT ile ilişkili bir protein olan Forkhead Box O1'in (FOXO1) ve histon deasetilaz olan sirtuin 1 (SIRT1) ekspresyonları yaşlanmayı kolaylaştırmaktadır (Yan ve Wu, 2018).

Yaşlanmayı ertelemenin, doku hasarının engellenmesinde ve yaşa bağlı belirli hastalıkların geciktirilmesinde büyük önemi vardır. Yaşlanma semptomlarını geciktirebilecek doğal bileşikler yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bunlardan örnek olarak verilecek biri kurkumindir (Bielak-Zmijewska ve ark., 2019). Kurkumin yaşlanma semptomlarını hafifletmekte ve hücre yaşlanmanın doğrudan dahil olduğu yaşa bağlı hastalıkların ilerlemesini ertelemektedir (Bielak-Zmijewska ve ark., 2019). Bunun gibi doğal bileşiklerin geliştirilmesi yaşlanma ile ortaya çıkan semptomların yok edilmesine yardımcı olabilecektir.

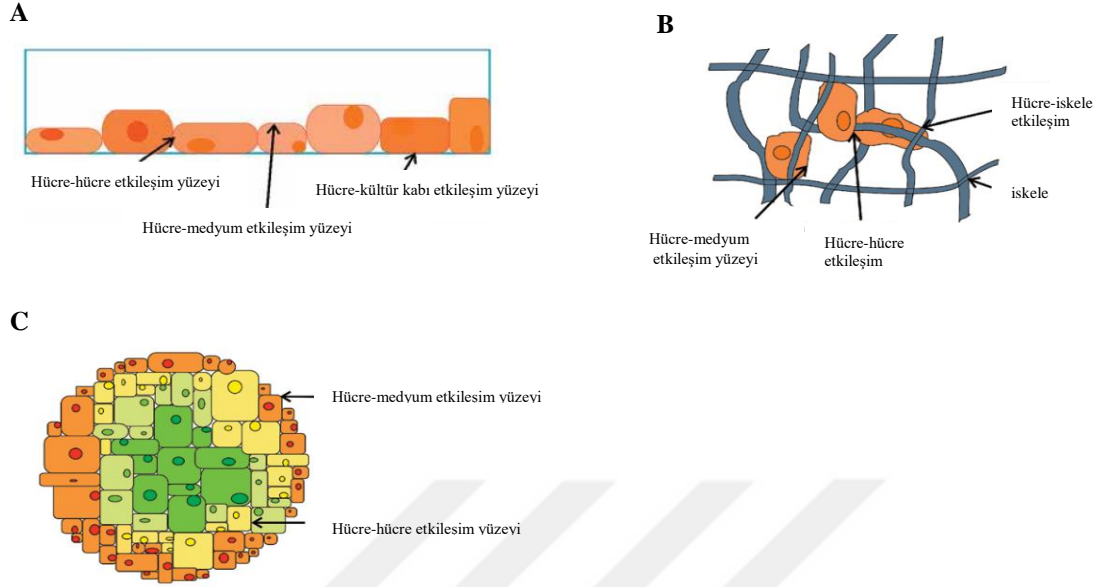
Hücrelerdeki yaşlanma tespiti için, yaşlanmanın bir biyolojik işareti olan yaşlılık ile ilişkili beta-galaktosidaz sıklıkla kullanılmaktadır (Kurz ve ark., 2000). Bu teknik, yaşlanan hücrelerin genç hücrelere göre daha yüksek oranda beta-galaktosidaz aktivitesi göstermesiyle ilişkilendirilen bir yöntemdir. Aktivitedeki bu artış, beta-galaktosidaz protein seviyelerindeki artışla eş değer olarak ortaya çıkmaktadır. Acridine Orange boyama, replikatif yaşı ve lizozom içeriğindeki beta-galaktosidazdaki artışı gösterilmektedir.

## **2.5 Tümörün Agresifliğinin Belirlenmesinde 3 Boyutlu Tümör Modelinin Geliştirilmesi**

Doku ve organların oluşumunun, fizyolojisi ve fizyopatolojisinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılabilmesi için hücre kültür sistemleri ve hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 20). *In-vitro* hücre kültürleri, hücre davranışlarının altında yatan mekanizmaların anlaşılmasını iletirmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, tek tabaka hücre kültür popülasyonlarının, iki boyutlu (2B)



substratlar üzerinde kültürlenmesi ile gerçekleştirilmektedir. 2B hücre yapılarıyla yapılan deneyler, moleküler biyoloji, kök hücre farklılaşması ve doku morfogenezini gibi karmaşık biyolojik olayların yorumlanmasına ve açıklanmasına yardımcı olmaktadır (Jaiswal ve ark., 1997). Aynı zamanda 2B hücre kültür deneyleri, hücre fonksiyonları ve hücrelerin mikro çevresi ile etkileşimleri arasındaki ilişki hakkında bilgi vermektedir. Discher ve ark. (2005), insan mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşma yeteneğinin 2B kültürün mekanik sertliği ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar ile 2B hücre kültürünün, moleküler düzeyde epigenetik faktörlerin fizyolojik olayları nasıl etkilediğini incelemek için etkin bir yöntem olduğu doğrulanmıştır. Ancak son çalışmalar ile bazı durumlarda 2B yöntemin, *in-vivo* cevabına eş değer olmayan ve saptıran hücre biyoaktivitelerine yol açabileceği gösterilmiştir. Örneğin, kanser hücrelerinin, kanser oluşum ve gelişimindeki birçok önemli özellikleri, 2B hücre kültüründe uygun şekilde modellenemediği, tek katmanla sınırlı olduklarında doğal olmayan davranış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu kısıtlamanın üstesinden gelmek için, kanser hücrelerinin biyolojik davranışlarını *in-vitro* koşullarda daha doğru bir şekilde anlayabilmek ve *in-vivo* koşulları daha iyi taklit etmek için yeni üç boyutlu (sferoid, organoid kültür, 3B) hücre kültür platformları oluşturulmaktadır. Bissell ve arkadaşları, insan meme epitel hücrelerinin 2B hücre modelinde kültürlendiklerinde tümör hücreleri gibi agresif geliştiğini ancak 3B hücre modelinde kültürlendiklerinde normal büyüme davranışına geri döndüklerini göstermişlerdir (Petersen ve ark., 1992). 3B çalışmalarından elde edilen sonuçlar, hücre dışı matriks elemanlarının 2B'den 3B'ye doğru boyutlandırılmasını, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, mekanik tepkilerini ve hücre sağkalımını önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir (Tibbitt ve Anseth, 2009). Bu sebeple özellikle tümör biyolojisinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasında yalnızca 2B tümör modelinin kullanılması yetersiz kalmaktadır.



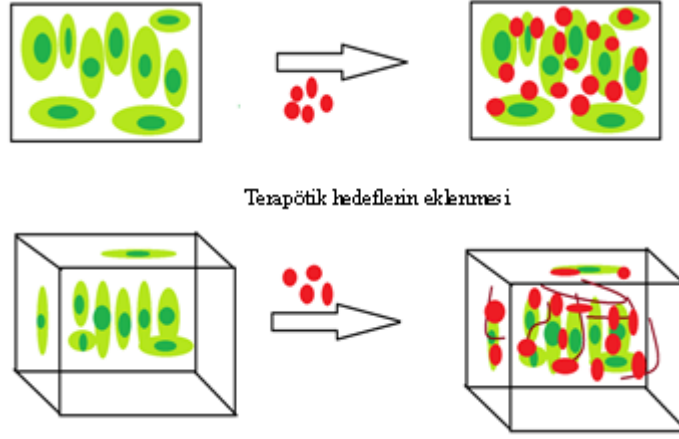
Şekil 20. Araştırma çalışmalarında yaygın olarak kullanılan hücre kültürü yöntem türleri. A. Kültür kabının dibinde bir tek tabakada yassılaştırılmış hücreler. B. Bir iskeleye bağlı hücreler. C. Kültür ortamında süspanse edilmiş veya jel benzeri bir maddede yetiştirilen bir hücre grubu (Kapałczyńska ve ark., 2018).

3B hücre kültür modellemesi ilk olarak 1970'lerde Hamburger ve Salmon tarafından yumuşak agar çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir (Hamburger ve Salmon 1997). Yapılan bu çalışma ile tümör hücrelerinde ve 3B hücre kültür ortamında çoğalan hücrelerin morfolojisi ve davranışları arasındaki ciddi benzerlikler tanımlanmış ve belgelenmiştir. 3B kültürlerde, hücrelerin morfolojisi ve polaritesi korunmakta ve 3B ortamda çoğalan hücreler, hücrel topoloji, gen ekspresyonu, sinyalleşme ve metabolizma bakımından *in-vivo* olarak büyüyen hücrelere yüksek benzerlik göstermektedir. Doku ve organların *in-vivo* etkileşimlerinin modellenmesini amaçlayan 3B hücre kültürü yaklaşımlarının hızla çalışılması, kanser biyolojisinin altında yatan biyokimyasal ve biyomekanik sinyallerin çalışılmasına yeni olanaklar sağlamaktadır. Bu kapsamda 3B kültürün 2B kültüre göre ciddi farklılıkları belirlenmiş ve güncel çalışmalar ile bu farklılıklar geliştirilmeye çalışılmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. 2B ve 3B hücre kültür yöntemlerinin karşılaştırılması (Kapalczyńska ve ark., 2018).

	2B Kültür Modeli	3B Kültür Modeli
Kültür oluşum zamanı	Birkaç dakika ile birkaç saat arasında	Birkaç saat ile birkaç gün arası
Kültür kalitesi	Yüksek performans, tekrar üretilebilirlik, uzun vadeli kültür, yorumlaması kolay, basit kültür yapımı	Daha kötü performans ve tekrar üretilebilirlik, yorumlanması zor, kültürleri gerçekleştirilmesi daha zor
<i>In-vivo</i> taklit yeteneği	Dokunun doğal yapısını veya tümör kitlesini taklit etmez	<i>In-vivo</i> dokular ve organlar 3D biçiminde üretilmektedir
Hücre etkileşimleri	Hücre-hücre ve hücre-hücre-çevre etkileşimi yoksun	Hücre-hücre ve hücre-dışı ortamın uygun etkileşimleri yüksek
Hücrelerin özellikleri	Değişen morfoloji ve bölünme biçimleri; çeşitli fenotip ve polarite kaybı	Korunmuş morfoloji ve bölünme yolu, çeşitli fenotip.
Temel bileşiklere erişim	Oksijene, besin maddelerine, metabolitlere ve sinyal moleküllerine sınırsız erişim	Oksijene, besin maddelerine, metabolitlere ve sinyal moleküllerine değişken erişim ( <i>in-vivo</i> ile benzer)
Moleküler mekanizmalar	Gen ekspresyonunda değişiklikler, mRNA eklenmesi, hücrelerin topolojisi ve biyokimyası	Genlerin ekspresyonu, eklenmesi, topolojisi ve hücrelerin <i>in-vivo</i> olarak biyokimyası
Kültür maliyeti	Ucuz, ticari olarak temin edilebilen testler	Daha pahalı, daha az piyasada mevcut olan testler

Tedavide kullanılması planlanan terapötik hedeflerin, *in-vivo*'ya yüksek benzerlik gösteren 3B modellerinde uygulanması hedefin başarısını daha doğru göstermektedir (Şekil 21). Bu sebeple 3B kültür, tümör ve ilgili ilaç araştırmalarında güçlü bir yöntem olabilmektedir. 3B tümör modellerinin avantajları göz önüne alındığında bu kapsamda yapılacak çalışmalar, 3B tümör hücre kültürünü uygulamak için başarılı bir şekilde tasarlanan yöntemlere ve tekniklere genel bir bakış sunabilecektir.



Şekil 21. Terapötik ajanların 2B ve 3B yöntemler ile uygulanmasının karşılaştırılmış basit şeması.

## 2.6 GB Tedavisinde Bitkisel Özütlerin Kullanımı

Bitkisel özütler yıllardan beri anti-septikler, anti-depresanlar ve anti-enflamatuvarlar olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında bağışıklık sistemini kuvvetlendirici ve kanser risklerini önleyici etkilere sahip oldukları kabul edilmiştir (Mohammadi ve ark., 2015). Birçok hastalıkların tedavisinde, sentetik ilaçlara göre daha güvenli ve etkili olan bitkisel ilaçlar kullanılmaktadır. Bitkisel ilaçlar, özellikle kanser tedavisi için sık kullanılan alternatif ve tamamlayıcı ilaçlardır. Araştırmacılar, kanser tedavisi alan her on kişiden altısının tedavide kullanılan sentetik ilaçlara ek olarak bitkisel ilaç kullandığını tespit etmişlerdir (Huang ve ark., 2012). Bunun sebebini ise bitkisel ilaçların, tedavi sırasında veya sonrasında yan etkilerinin ve toksik etkilerinin olmamasına ve ilaç bağımlılığı görülme olasılığının çok daha düşük olmasına dayandırmışlardır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile doğal bileşiklerin, kanserin gelişiminde, ilerlemesinde ve metastazında büyük öneminin olduğu vurgulanmıştır. Anti-oksidan yapıları nedeniyle soya izoflavonları, kurkumin, epigallokateşin, resveratrol ve retinoidler gibi çeşitli doğal bileşiklerin kanserdeki etkileri araştırılmış ve GB tedavisinde kemoterapötik ilaçların etkinliğini arttırmada kullanılabilirliği belirlenmiştir (Puli ve ark., 2010; Singh-Gupta ve ark., 2011 ve Virk-Baker ve ark., 2010).

GB tedavisi, tümör hücrelerinin heterojenliği, yüksek agresif özellik göstermesi, çevre dokulara yayılması ve kan-beyin bariyeri varlığı nedeniyle oldukça güçtür. Çoklu tedavi yaklaşımlarında tümör hücreleri üzerinde, düşük sitotoksik etki yaratan farklı moleküler mekanizmalara sahip terapötik ajanların kullanılması hedeflenmektedir. Çoklu tedavi yaklaşımlarının, GB tedavisi için etkili bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple günümüzde GB üzerinde çeşitli bitkisel özütlerin ve kemoterapötik ilaçlar ile çoklu tedavi yaklaşımların geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

### 2.6.1 *Olea europaea* Yaprak Özütü

Ülkemizin doğal zenginliklerinden biri olan *Olea europaea* (Zeytin), Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde birçok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılan güçlü bir antioksidandır (Şekil 22). *Olea europaea*'nın yapraklarından elde edilen özütler (OLE) yüksek oranda sekoiridoid, tripten ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşenleri içermektedir. (Hamdi ve Castellon, 2005; Ryan ve Robards, 1998 ve Tabera ve ark., 2004). Bu özütün içerdiği en önemli biyoaktif bileşen bir sekoiridoid olan oleuropeindir (Han ve ark., 2009). Bugüne kadar OLE'nin anti-tümöral özellikleri birkaç farklı çalışmada ele alınmış olup, bu makalelerde lösemi, kolon, melonoma ve meme kanseri hücre hatları değerlendirilerek, bu bitki özütünün anti-proliferatif ve apoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 22. Zeytin yaprağı ve OLE'nin görüntüsü.

Anabilim Dalımız tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, OLE'nin insan GB hücre hattı olan T98G hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etki oluşturduğu ve proliferasyonu anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (Tunca ve ark., 2012). T98G hücrelerin OLE varlığında TMZ ile tedavi edildiğinde miRNA hedef genlerinin (miR-181b, miR-153, miR-145, miR-137) belirgin şekilde yukarı doğru düzenlendiği ve hücreleri hem apoptotik hem de nekrotik yolla öldürüldüğü gösterilmiştir (Tunca ve ark., 2012). Benzer şekilde OLE'nin *MGMT* metilasyon hızı üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve OLE'nin, GB hücrelerinin metilasyon oranını anlamlı derecede arttırdığı ( $P<0.001$ ) belirlenmiştir. *MGMT*'nin metilasyonunun arttırılması, TMZ'nin mekanizması için faydalı olduğundan, OLE'nin düşük metillenmiş *MGMT*'li hastaların TMZ cevabına katkıda bulunabileceğini varsayılmıştır (Tezcan ve ark., 2017a). Yapılan bir başka çalışmada, OLE'nin CSC (+) tümörleri üzerinde *VEGFA*, *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyonunun azaltılması ile anti-anjiyojenik ve anti-invaziv etki gösterdiği ve sinerjistik olarak bevacizumab'ın etkinliğini arttırdığı kanıtlanmıştır (Tezcan ve ark., 2017b). Çalışmalar ile OLE'nin GB hücreleri ve CSC (+) tümörlerinde anti-kanser etkisinin epigenetik mekanizmaları modüle ederek ortaya koyduğu belirlenmiştir (Tezcan ve ark., 2014).

Mevcut tez kapsamında;

- OLE'nin glial tümörler üzerindeki tedavi edici yönünün, *in-vivo* çalışmalara öncü bilgiler sunabilen 3B kültür yönteminin kullanılmasıyla değerlendirilmesi
- OLE'nin tümörün biyolojik davranışlarının tümörün agresifliği ile ilişkili olarak değerlendirilmesi
  - EMT belirteçleri (*Twist*, *Snail*, *Zeb1*, *N-kaderin*, *E-Kaderin*)
  - CSC belirteçleri (*CD133*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT4*)
  - Koloni oluşturma
  - Yara iyileştirme
- OLE'nin ilaç direnci üzerine etkilerinin değerlendirilmesi
  - MDR (MDR; *MRP1*, *MRP5*, *LRP1* gen ekspresyonları)
  - Hücre yaşlanması
- Bu mekanizmalarda OLE'nin LncRNA'lar üzerine olan etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Böylece OLE'nin *in-vivo* çalışmalar için öngörülen tedavi potansiyelinin ve etkili olabileceği hücrel mekanizmaların daha iyi açıklanabilmesi amaçlanmıştır.

Mevcut projede elde edilecek anlamlı bulgular ile günümüz tedavisinde kullanılan ilaçlara direnç gösteren ve agresif seyreden GB'lerin tedavisinde kullanılabilir sitotoksik etkisi daha az ve daha efektif olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1 Kullanılan Aletler ve Cihazlar

+4°C Soğutucu (Alaska, Türkiye)

+4°C Soğutucu (Asterm, Türkiye)

-20°C Derin Dondurucu (Bosch, Türkiye)

-20°C Derin Dondurucu (Vestel, Türkiye)

-80°C Derin Dondurucu (Nüve, Türkiye)

-150°C Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)

Santrifüj (Nüve, Türkiye)

Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Danimarka)

Soğutmalı Santrifüj (Bechman Coulter, ABD)

Mikro Santrifüj (Clever Scientific, İngiltere)

Laminal Kabin (Labogene, Danimarka)

UV Laminal Kabin (Biosan, Lethonya)

Hassas Terazi (AND, Japonya)

Vortex (Velp Scientifica, İtalya)

Vortex (Biosan, Lethonya)

UV/Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD)



Isıtıcı Blok (Cleaver Scientific, İngiltere)

24 Kuyulu Çalkalayıcı Isıtıcı Blok (Biosan, Lethonya)

20 Kuyulu Isıtıcı Blok (Techne, İngiltere)

Yatay Elektroforez (Biorad, ABD)

Yatay Elektroforez Jel Sistemi (Maxicell, ABD)

UV Görüntüleme Cihazı (Vilber, Fransa)

Mikrodalga Fırın (White - westinghouse, ABD)

Etüv (Ecocell, Almanya)

CO2 İnkübatör (Panosomic, Japonya)

Profilex PCR Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Thermal Cycler (Biorad, ABD)

Light Cycler 482 Real Time PCR (Roch, İsviçre)

Step One Plus Sistem Real- Time PCR (Applied Biosystem, ABD)

Otomatik DNA Dizi Analizi Cihazı (Beckman Coulter, ABD)

Multi mod Reader (Berthold Technologies, ABD)

Işık Mikroskobu (Olympus, Japonya)

Inverted Mikroskop (Labomed, ABD)

Fluoroskan Microplate Fluorometer (Thermo Fisher, ABD)

Muse Cell Analyzer (Milipor Merc, Almanya)

Multipipet (Boeco, Almanya)

0.5-10 µl Pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

10-100 µl Pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

20-200 µl Pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

100-1000 µl Pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

Pipet Controller (Acumax, Hindistan)

### **3.1.2 Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

%95'lik Ethanol (Sigma Altrich, ABD)

Methanol (Sigma Altrich, ABD)

İzopropanol (Sigma Altrich, ABD)

TRizol Reagent (Thermo Scientific, ABD)

Agoraz (Nonza, İsviçre)

Etidyum Bromür (Amresco, ABD)

DNA Jel Loading Solüsyon (Thermo Scientific, ABD)

DNA Leader (Gibco, Thermo Scientific, ABD)

Zymo RNA Isolation Kit (Zymo Research, ABD)

Tris Base Buffer (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

Boric Asit (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

Edta (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

HS Prime Premix (GeNET Bio, Kore)

Multi HS Prime Premix (GeNET Bio, Kore)

Exprime Taq Premix (GeNET Bio, Kore)

Dye Labeled Oligos (Bio-Synthesis, ABD)

DNA Size Standard Kit 600bp (Beckman Coulter, ABD)

GenomeLab Separation Buffer (Beckman Coulter, ABD)

Separation Gel LPAI (Beckman Coulter, ABD)

Sample Loading Solution (Beckman Coulter, ABD)

RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hollanda)

High Pure RNA Isolation Kit (Roche, İsviçre)

High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)

SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)

QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hollanda)

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hollanda)

Dimetil Sülfoksit (Sigma Aldrich, ABD)

HCl (Sigma Aldrich, ABD)

Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)

Gluteraldehit (Sigma Aldrich, ABD)

Tripan Blue (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Dulbecco's modification of Eagle medium (DMEM) (Sigma Aldrich, ABD)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma Aldrich, ABD)

Sodium Pyruvate (Merck Biochom, Almanya)

Penicillin-Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Trypsin EDTA (%0.25), fenol red (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Cell Proliferation Reagent WST-1 kit (Boster, ABD)

L-Glutamin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Ribodamin 123 (Sigma, Aldrich, ABD)

CellMAX™ Colonogenic Assay Kit (BioPioneer, ABD)

Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, ABD)

Taqman Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD)

TaqMan Non-coding RNA Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Hanging Drop System (PerkinElmer, ABD)

Transwell Migration Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD)

CytoSelect 24-well Wound Healing Assay Kiti (Fluorometric) (Boivison, ABD)

EZCell Cell Invasion Assay Kit (Boivison, ABD)

EZCel Cell Migration/Chemotaxis Assay Kit (Boivison, ABD)

Multidrug Resistance Assay Kit (Fluorometric) (Sigma Aldrich, ABD)

Temozolomide (Sigma, ABD)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1 OLE'nin Temini ve Hazırlanışı

OLE (05.06.2007,10-00014-00015-0), Kale Naturel (Edremit, Balıkesir)'den ücretsiz olarak temin edildi. Firma tarafından OLE, %15 oleuropein içeriği, stabilitesi ve mikrobiyolojik saflığı kontrol edilerek hazırlandı. İlk filizlerini Şubat ayında veren *Olea europaea*'nın cv türünün yaprakları, Balıkesir, Edremit bölgesinden budama mevsimi olan Şubat ayında budanan dallardan toplanıp yıkatılıp gölgede kurutuldu. *Olea europaea* cv türünün yaprakları bu ayda toplandığı için budanan dalların pestisit ve herbisit gibi araştırmamızın sonuçlarını olumsuz yönde etkileyecek kimyasal maddeler içerme ihtimali ortadan kaldırıldı. Yapraklar bir ay süresince karanlıkta ve oda sıcaklığında kurutuldu ve daha sonra bitki değirmeninde toz haline getirilerek %80 etanolde oda sıcaklığında bekletildi. *Olea europaea*'nin etken maddesi olan oleuropeininin bozulmasını engellemek için, etanol ekstresinin etanolü Spray Dryer sisteminde düşük basınçta ve 55°C'yi geçmeyen ısıda uçurularak özüt toz haline getirildi.

#### 3.2.1.1 Hücre Hatlarının Temini

Tez projesi kapsamında çalışılan, TMZ'ye direnç gösteren insan GB hücre hattı olan T98G, TMZ'ye duyarlılık gösteren U87MG hücre hattı ve kontrol olarak kullanılan Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) hücre hattı AnaBilim Dalı stoklarımızdan temin edildi. Hücre hatlarının özellikleri Tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri.

Hücre Hatlarının Özellikleri			
	T98G	U87MG	HUVEC
<b>Organizma</b>	İnsan	İnsan	İnsan
<b>Doku</b>	Beyin	Beyin	Göbek bağı
<b>Morfoloji</b>	Epitel	Epitel	Epitel
<b>Büyüme Özellikleri</b>	Yapışkan	Yapışkan	Yapışkan
<b>Hastalık</b>	GB	GB	Normal
<b>Yaş</b>	61	44	Yeni doğan
<b>TMZ yanıtı ilişkisi</b>	Dirençli	Dirençsiz	
<b>MGMT metilasyon durumu</b>	un-metile	metile	
<b>p53 mutasyon durumu</b>	mutasyon var	mutasyon yok	

### **3.2.2 *İn-Vitro* Analizler**

#### **3.2.2.1 OLE ve TMZ'nin GB Hücrelerinin Biyolojik Davranışlarına Olan Etkilerinin Araştırılması**

OLE ve TMZ'nin tek başına ve kombin olarak verilmesi ile tümörün agresifliği, koloni oluşumu, yara iyileştirme ve hücre yaşlanması üzerine etkileri, TMZ'ye direnç gösteren T98G ve TMZ'ye duyarlılık gösteren U87MG hücre hatlarında araştırıldı.

#### **3.2.2.2 Kültür Ortamının Optimizasyonu ve Hücrelerin Çoğaltılması**

Kryo tüplerde stoklanan T98G, U87MG ve HUVEC hücre hatları Anabilim Dalı'mızda bulunan -150°C derin dondurucudan alınarak 37°C su banyosunda çözdürüldü. Hücreler, %10 oranında fetal bovine serum, %1 penisilin-streptomisin, 2 mM L-glutamin ve 1 mM sodyum pyruvate içeren DMEM-F12 besiyeri ile 15 ml falkonlara aktarıldı. Hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımları dökülerek hücrelerin üzerlerine 1 ml DMEM-F12 eklendi. Pipetaj yapılarak homojen hale gelmesi sağlanan hücreler, daha önceden 5 ml DMEM-F12 eklenen T25 cm<sup>2</sup> boyutundaki filtrelili flasklara aktarıldı. Hücrelerin 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde çoğaltılması beklendi.

#### **3.2.2.3 Hücrelerin Pasajlanması**

T98G, U87MG ve HUVEC hücre hatlarının, T25 cm<sup>2</sup> boyutunda filtrelili flasklardaki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Flask içerisindeki 5 ml besiyeri pipet ile uzaklaştırıldı. Ardından hücrelerin üzerine 2 ml fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) eklenerek hücrelerin yıkanması sağlandı. Hücreleri yıkadıktan sonra flask içerisindeki PBS pipet yardımı ile çekildi. Hücreleri tuttukları flask yüzeyinden kaldırmak için her bir hücreye 2 ml 1X Tripsin-EDTA (%0.25 tripsin 1 mM EDTA) eklenerek 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 5 dk bekletildi. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırdıktan sonra flaskların içerisine 4 ml DMEM-F12 eklendi. Hücre süspansiyonları 15'lik falkona aktarıldı ve ardından 1200

rpm'de 5 dk boyunca santirüf edildi. Santrifüjden sonra pellet kısmının üzerinde bulunan süpernatant kısım dökülerek uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 ml besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak homojen hale gelmesi sağlandı. Hücreler sayılarak hücre yoğunluklarına göre flasklara ayrıldı. Flasklar 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi.

#### **3.2.2.4 Hücre Sayımı**

Hücrelerin sayımı, canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesinde kullanılan Tripan mavisi (%0,4'lük) boyası ile gerçekleştirildi. Pasajlama işlemi sırasında 15'lik falkon tüp içerisinde oluşan pelletin üzerine 1 ml besiyeri eklendi ve homojen karışım oluşması sağlandı. Daha sonra hücrelerden 10 µl çekilerek steril epenforf tüp içerisine aktarıldı. Üzerine 90 µl Tripan mavisi boyası eklenerek pipetaj yapıldı. Bu karışım Thoma lamı üzerine alınarak üzeri lamel ile kapatıldı. Hücre sayımı gerçekleştirmek üzere Thoma lamı ışık mikroskobu altında incelendi. Thoma lamı üzerinde bulunan 16 büyük karenin içerisindeki 25 küçük karenin üst ve sağ bölgelerindeki çizgileri kesen hücreler sayıldı. Sayma işlemi üç kez tekrarlandı. Sayılan hücrelerin ortalaması alınarak dilüsyon faktörü ve 10<sup>4</sup> ile çarpılarak hücre sayısı belirlendi.

#### **3.2.2.5 Hücrelerin Stoklanması**

Flasklardaki hücrelerin yoğunluğu %80-90'a ulaştıktan sonra pasajlama aşamasında anlatıldığı gibi hücreler kaldırıldı. Daha sonra hücre sayımı gerçekleştirildi. Stoklanacak her hücre sayısının 10.000.000 (olması gereken aralık 5.000.000-20.000.000) olması sağlandı. Her bir hücre için kryo tüpler hazırlandı ve etiketlendi. İçerisinde 10.000.000 hücre bulunan DMEM F-12'den 900 µl, DMSO'dan 100 µl alınarak kryo tüplere aktarıldı. Kryo tüpler öncelikle -20°C'ye aktarıldı. 3-4 saat sonunda hücreler -150°C derin dondurucuya alınarak stoklama işlemi tamamlandı.

### **3.2.3 Ana Stokların Hazırlanması ve Uygun Konsantrasyonların Belirlenmesi**

#### **3.2.3.1 TMZ Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi**

TMZ'nin ana stoğu 10 mg/ml DMSO içerisinde çözündürülerek hazırlandı ve ana stok TMZ -20°C'de saklandı. Anabilim Dalı'mızda daha önceki çalışmalarda belirlenen

TMZ dozları dikkate alınarak WST-1 deneyleri için uygun konsantrasyon aralığı belirlendi (Tunca ve ark., 2012; Tablo 7).

Ana Stok Konsantrasyonu: 50.000  $\mu$ M

Ara Stok Konstasyonu (AR1): 30  $\mu$ l Ana Stok TMZ + 1470  $\mu$ l Besiyeri

Tablo 7. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca T98G ve U87MG hücrelerine uygulanan TMZ konsantrasyonları.

Uygulanan dozlar	AR1 TMZ ( $\mu$ l)	Besiyeri ( $\mu$ l)
200 $\mu$ M	20	80
250 $\mu$ M	25	75
300 $\mu$ M	30	70
350 $\mu$ M	35	65
400 $\mu$ M	40	60
450 $\mu$ M	45	55
500 $\mu$ M	50	50

TMZ'nin T98G, U87MG ve HUVEC hücrelerindeki hücre proliferasyonu ve canlılık miktarı üzerine etkisinin ölçülmesi için WST-1 analizi gerçekleştirildi. WST-1 analizi, WST-1 kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Hücreler öncelikle 96 kuyulu hücre kültürü kaplarına her bir kuyuya 20.000 hücre olacak şekilde ekildi. Daha sonra Tablo 7'de belirtilen dozlar verildi ve 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi. Belirlenen her saat sonunda her bir kuyuya 10  $\mu$ l WST-1 (Biovision, ABD) boyası eklendi ve hücre kültür plakaları 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 45-60 dk inkübe edildi. Deney sonunda ölçümler 460-520 nm referans dalga boyu aralığında Elisa Reader'da (Tecan, İsviçre) gerçekleştirildi. Muamele edilmeyen hücreler, kontrol hücresi olarak belirlendi ve canlılığı %100 olarak kabul edildi. Muamele gören hücrelerinin canlılık oranları ise kontrol hücreye kıyasla yüzdelik olarak ifade edildi. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

### 3.2.3.2 OLE Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi

OLE Ana Stoğu 1g/4ml (0.25 mg/1ml) olacak şekilde hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Aynı şekilde Anabilim Dalı'mızda daha önceki çalışmalarda belirlenen OLE



dozları dikkate alınarak WST-1 deneyleri için uygun konsantrasyon aralığı belirlendi (Tunca ve ark., 2012, Tablo 8).

Ara Stok Konstasyonu (AR1): 40 µl Ana Stok OLE + 60 µl dH<sub>2</sub>O

Tablo 8. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca T98G ve U87MG hücrelerine uygulanan OLE konsantrasyonları.

Uygulanan dozlar	AR1 OLE (µl)	Besiyeri (µl)
100 µg/ml	0,1	99,9
250 µg/ml	0,25	99,75
500 µg/ml	0,5	99,5
1 mg/ml	1	99
1,5 mg/ml	1,5	99,5
2 mg/ml	2	98
2,5 mg/ml	2,5	97,5
3 mg/ml	3	97

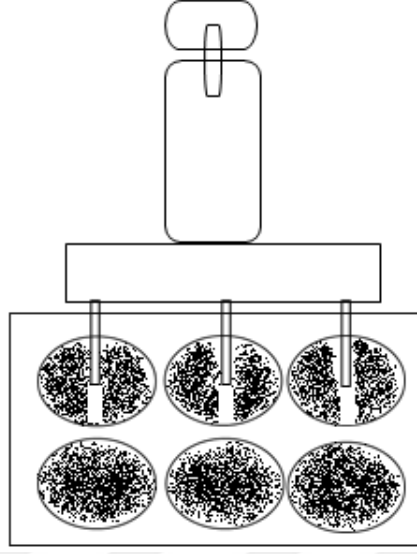
OLE'nin T98G, U87MG ve HUVEC hücrelerindeki hücre proliferasyonu ve canlılık miktarı üzerine etkisinin ölçülmesi için 3.2.3.1'de belirtildiği gibi WST-1 analizi gerçekleştirildi.

### **3.2.4 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Muamele Edilmesinin Tümörün Agresifliği Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi**

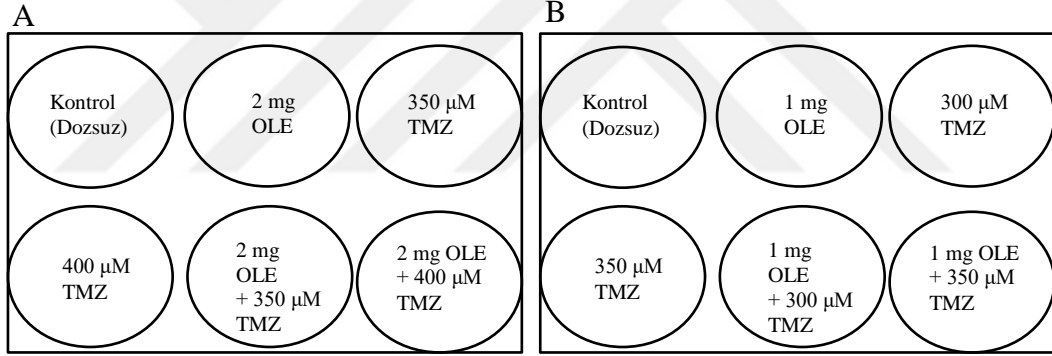
#### **3.2.4.1 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Yara İyileştirmesi Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi**

OLE'nin yara iyileştirmesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için 6 kuyulu hücre kültür kaplarına  $1 \times 10^6$  T98G ve U-87MG hücreleri ekildi. Kuyulardaki hücre yoğunluğu %90'a ulaşmaya kadar 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi ve bir kez 1X PBS ile yıkandı. Kuyuların içerisinde yaklaşık olarak 1 mm genişlik oluşturabilmek için 200 µl mikropipet ucu ile çizik oluşturuldu (Şekil 23). Kuyular tekrar 2 defa 1X PBS ile yıkandıktan sonra görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (0. saat). T98G ve U87MG için belirlenmiş etkin OLE, TMZ ve OLE + TMZ içeren besiyerleri, 6 kuyulu kültür kaplarına eklendi (Şekil 24). Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi. 0, 6, 12 ve 24 saat sonlarında

ters (inverted) mikroskop ile 20X büyütme ile görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Deneysel 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 23. Yara iyileşme deneyinde çizik oluşumu.



Şekil 24. A. T98G hücreleri için 6 kuyulu hücre kültür kap düzeni. B. U87MG hücreleri için 6 kuyulu hücre kültür kap düzeni.

Oluşan çizik aralıklarının kapanma yüzdeleri, üç ayrı görüntü kullanılarak PowerPoint ile ölçülerek hesaplandı. Sonuçlar, muamele edilmeyen kontrole karşı yara kapanması oranı olarak ifade edildi ve Two-way Anova testi ile belirlendi.

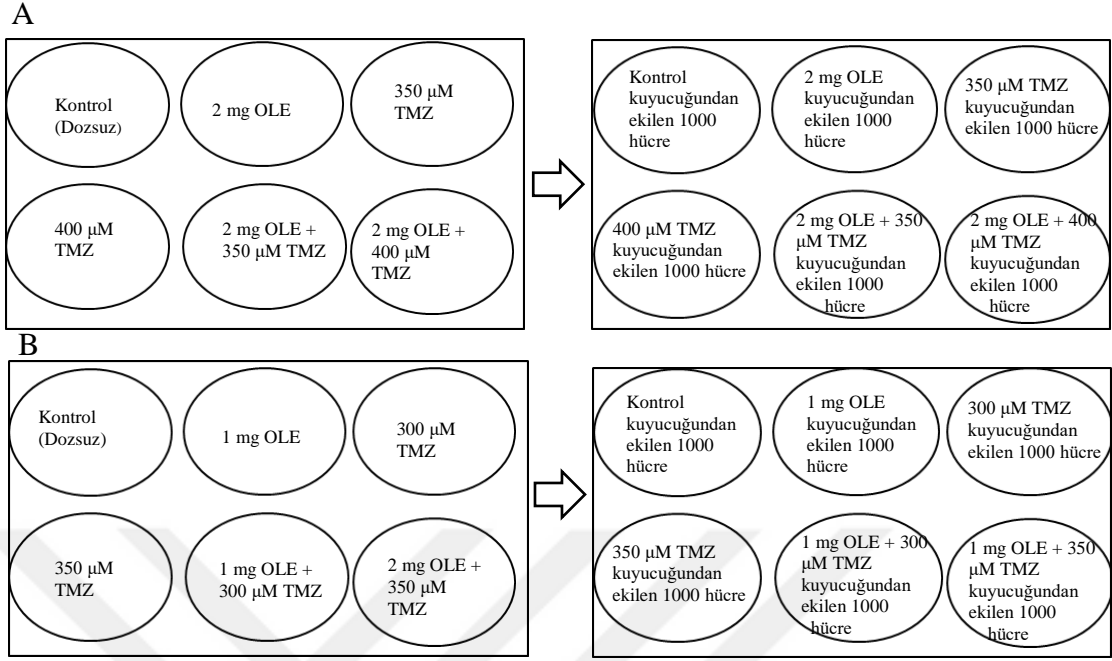
### 3.2.4.2 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Koloni Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

OLE'nin T98G ve U87MG hücrelerindeki koloni oluşumu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için CellMAX<sup>TM</sup> Colonogenic Assay Kit (BioPioneer, ABD) kullanıldı.

T98G ve U87MG hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına her bir kuyuda  $25 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekildi. Kültür kapları %70 yoğunluğa ulaşınca kadar  $37^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edildi. %70 yoğunluğa ulaşan hücrelere her hücre için ayrı olan etkin OLE, TMZ ve OLE + TMZ dozları verildi. Kültür kapları  $37^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak tekrardan 6 kuyulu hücre kültür kaplarına bu defa her bir kuyuda  $1 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekildi ve hücreler 10 gün boyunca inkübe edildi (Şekil 25). Hücrelerin besiyeri 5. günde değiştirildi. İnkübasyon sonunda kuyulardaki besiyeri çekilerek 2 kez 1X PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 1 ml Fiksasyon Tamponu eklendi ve 15 dk boyunca oda ısısında bekletildi. Daha sonra hücrelerin üzerine 1 ml Boyama Solüsyonu eklendi ve 45 dk boyunca oda ısısında bekletildi. Boyama sonlarında hücreler 3 kez 1X PBS ile yıkandı. Mavi renk ile boyanan koloniler ters (inverted) mikroskop ile 20X büyütme altında sayıldı. Hücrelerin koloni oluşturma oranları ve canlılık fraksiyonları aşağıda verilen formüllere göre hesaplandı. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

**Kaplama verimliliği:**  $\frac{\text{Oluşan Koloni Sayısı}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı}} \times 100$

**Koloni oluşum oranları:**  $\frac{\text{Doz Verilen Hücrenin Kaplama Alanı}}{\text{Kontrol Grubu Kaplama Verimliliği}} \times 100$



Şekil 25. A. T98G hücrelerine verilen dozlar ve 1000 hücre ekiminin gösterimi. B. U87MG hücrelerine verilen dozlar ve 1000 hücre ekiminin gösterimi.

### 3.2.4.3 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte EMT Belirteçleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

EMT mekanizmasının GB'lerde invazyona ve metastaza neden olduğu bilinmektedir. OLE'nin EMT mekanizması üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi için EMT mekanizmasında görev alan 5 farklı EMT belirteçlerinin ekspresyon durumları incelendi (Tablo 9). Kontrol gen olarak *GAPDH* (Hs02786624\_g1) kullanıldı. Ekspresyon durumu 3.2.5.3.3'te gösterildiği gibi Taqman Master Mix kullanılarak RT-PCR analizi ile belirlendi.

Tablo 9. EMT belirteçleri ve primer numaraları.

Genler	Primer Numaraları
<i>E-Kaderin</i>	Hs01013959_m1
<i>N-Kaderin</i>	Hs00983056_m1
<i>Twist</i>	Hs01675818_s1
<i>Snail</i>	Hs_00195591_m1
<i>Zeb1</i>	Hs01566408_m1

### 3.2.4.3.1 RNA İzolasyonu

Hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirmek için, 6 kuyulu kültür kaplarına  $1 \times 10^6$  T98G ve U87MG hücreleri ekildi. Kültür kapları %90 yoğunluğa ulaşmaya kadar  $37^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edildi. %90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek 1X PBS ile yıkandı. Her iki hücre için ayrı ayrı belirlenen etkin OLE, TMZ ve OLE + TMZ dozlarından oluşan besiyeri 6 kuyulu hücre kaplarına eklendi ve 24 saat süresince  $37^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyondan alınan hücreler tripsin ile kaldırılarak  $12.000 \times \text{g}$ 'de 5 dk santrifüj edildi. Zymo RNA Isolation Kit (Zymo Research, ABD) kullanılarak kit protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Buna göre, hücre pelletinin üzerine 400  $\mu\text{l}$  RNA Lysis Buffer eklenerek  $12.000 \times \text{g}$ 'de 1 dk santrifüj edildi. Karışım Zymo-Spin IIC filtreli tüpe alındı ve  $8.000 \times \text{g}$ 'de 30 sn santrifüj edildi. Altta kalan kısım üzerine 320  $\mu\text{l}$  etanol eklenerek Zymo-Spin IIC filtreli tüpe aktarıldı ve  $12.000 \times \text{g}$ 'de 1 dk santrifüj edildi. Altta kalan kısım atıldı ve filtreli tüplerin üzerine 400  $\mu\text{l}$  RNA Prep Buffer eklendi.  $12.000 \times \text{g}$ 'de 2 dk santrifüj edildikten sonra yıkama aşamasına geçildi. İlk yıkama işlemi için 800  $\mu\text{l}$ , ikinci yıkama işlemi için 400  $\mu\text{l}$  RNA Wash Buffer eklendi ve her bir yıkama işleminin sonunda  $12.000 \times \text{g}$ 'de 1 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra filtreli tüpler steril 1.5 ml'lik ependorf tüplerinin içerisine alınarak 30  $\mu\text{l}$  sulandırma solüsyonu eklendi ve  $10.000 \times \text{g}$ 'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda RNA eldesi gerçekleştirildi. Elde edilen tüm RNA'ların kaliteleri ve 260/280 nm dalga boyundaki optik dansiteleri Nanodrop 2000 spectrophotometer'da kontrol edildi.

### 3.2.4.3.2. Komplementer DNA (Complamenter DNA, cDNA) Sentezi

Elde edilen kaliteli total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Öncelikle cDNA sentezinde kullanılacak RNA'ların konsantrasyonlarının eşit olması için tüm RNA'lardan 500 ng olacak şekilde yeni ara stoklar oluşturuldu. 500 ng'lık ara stok RNA'lardan High Capacity cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kit'in reaksiyonu ve PCR koşulları Tablo 10 ve Tablo 11'de belirtildiği gibi yapıldı. Elde edilen cDNA'lar  $-20^\circ\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

Tablo 10. High Capacity cDNA Synthesis reaksiyonunun hazırlanması.

10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 MI
10X RT Random Primer	2.0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µL
RNase Inhibitor	1.0 µL
Nuclease-free H2O	3.2 µL
Total	10.0 µL

Tablo 11. High Capacity cDNA Synthesis reaksiyon koşulları.

25 °C	10 dk
37 °C	120 dk
85 °C	5 dk
4 °C	∞

### 3.2.4.3.3 RT-PCR Analizi

Genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için elde edilen cDNA’lardan Taqman Master Mix kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirildi. RT-PCR analizi için gerekli reaksiyon karışımı ve RT-PCR reaksiyon koşulları Tablo 12 ve Tablo 13’de gösterilmiştir. RT-PCR analizi Step one Plus™ RT-PCR (Applied Biosystem, ABD) cihazında gerçekleştirildi. RT-PCR’den elde edilen sonuçlar Applied Biosystem StepOne™ RT-PCR Software aracılığı ile CT değeri şeklinde alındı. Elde edilen CT değerleri “RT2 Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5” kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 12. RT-PCR reaksiyon karışımı.

20X Taqman Gene Expression Assay	0.5 µL
2X Taqman Gene Expression Assay Master Mix	5 µL
cDNA (500 ng)	2 µL
RNase-free water	2.5 µL
Toplam	10 µL

Tablo 13. RT-PCR reaksiyon koşulları.

50 °C	2 dk	
95 °C	10 dk	
95 °C	15 sn	40 döngü
60 °C	60 dk	

### 3.2.4.4 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte CSC Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

OLE'nin CSC mekanizması üzerine etkisinin belirlenebilmesi için 4 farklı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon durumları incelendi (Tablo 14). Kontrol gen olarak *GAPDH* kullanıldı. cDNA sentezi 3.2.5.3.2'de, ekspresyon durumu ise 3.2.5.3.3'te gösterildiği gibi Taqman Master Mix kullanılarak Tablo 13'deki reaksiyon koşulları ile RT-PCR analizi ile belirlendi.

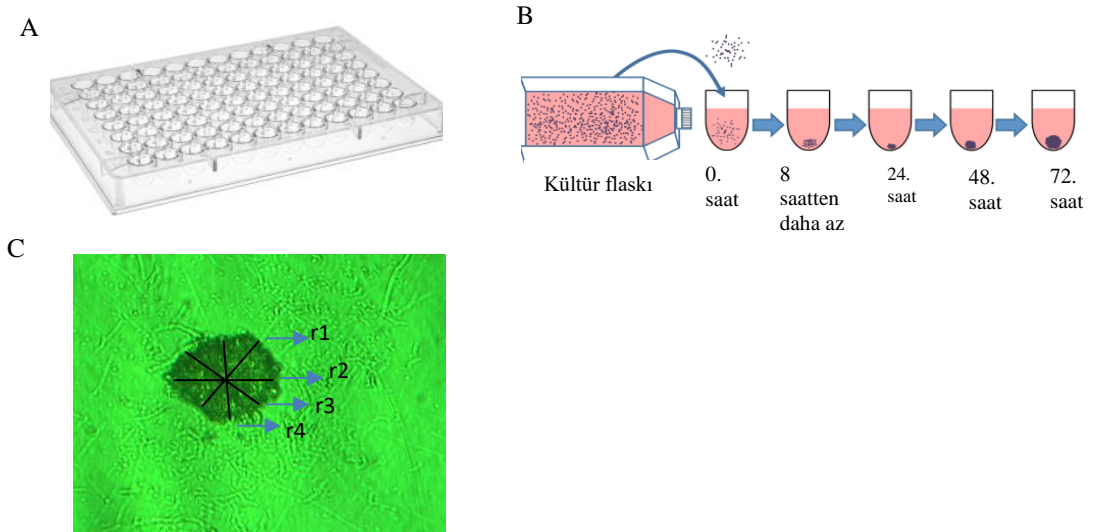
Tablo 14. CSC biyobelirteçleri ve primer numaraları.

Genler	Primer Numaraları
<i>CD133</i>	Hs01009259_m1
<i>NANOG</i>	Hs02387400_g1
<i>SOX2</i>	Hs01053049_s1
<i>OCT4</i>	Hs04260367_gH

### 3.2.4.5 OLE'nin Etkilerinin 3B Tümör Modelinde Değerlendirilmesi

3B kültür ortamının oluşturulması için PerkinElmer'in CellCarrier Sferoid ULA 96 kuyulu mikropalakaları kullanıldı (Şekil 26 A, B). Bu mikropalakalar farklı hücrelerde yuvarlak şekillerde sferoid oluşumunu sağlayan Ultra Düşük Eklenti (Ultra-Low Attachment, ULA) kaplı yüzeylerden oluşmaktadır. PerkinElmer'in CellCarrier Sferoid ULA mikropalaka kaplaması satellite sferoid büyümesini önlemede yardımcı olmakta ve bunun yanında daha kolay veri toplamayı ve analiz yapmayı sağlamaktadır. T98G ve U87MG hücrelerinin 3B ortamına bağlı olarak sferoid yapılarının oluşturulabilmesi için T75 hücre kültür flasklarında çoğaltıldı. Flasklar içerisindeki hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek bir kez 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak 12.000 x g' de 5 dk santrifüj edildi ve hücre sayımı gerçekleştirildi. CellCarrier Sferoid ULA mikropalakadaki her bir kuyu için gerekli hücre sayısı, farklı hücre konsantrasyonunda ve farklı hücre tiplerinde değişiklik gösterebileceği için öncelikle optimizasyon işlemi gerçekleştirildi. Her bir kuyunun toplam hacmi 100 µl olacak şekilde planlandı. En yüksek hücre sayısı içeren kuyuya 40.000 hücre, en düşük hücre sayısı içeren kuyuya 40 hücre olacak şekilde hücreler

2X seyreltilerek hazırlandı ve toplam 11 farklı hücre sayısı içeren mikropate elde edildi. Hücre ekilmeyen 1. kuyuya yalnızca 100 µl besiyeri eklenerek negatif kontrol olarak kullanıldı. Farklı hücre sayıları içeren hücre süspansiyonları 96'lı Sferoid plaka'nın kuyularına ekildi (Tablo 15). Hücrelerin ekilme işlemleri manuel pipet yardımı ile yapıldı ve pipet uçlarının kuyu içerisindeki 3B yapının oluşmasını sağlayan ULA yüzeyine zarar vermemesine dikkat edildi. 3B sferoid mikropata 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi. Sferoid yapının oluşumu ve büyümesi günlük olarak ters (inverted) mikroskop ile izlendi ve görüntüledi. Hücreler üzerindeki besiyeri değişikliği, sferoid yapıdaki hücrelerin zarar görmemesi için 100 µl olan toplam hacimden 50 µl çekilip 50 µl yeni besiyeri eklenmesi ile gerçekleştirildi. 3. günün sonunda sferoid yapının tamamlanması ile hücreler üzerindeki etkinliği belirlenen dozlar (T98G için 2 mg OLE, 350 µM TMZ, 400 µM TMZ, 2 mg OLE + 350 µM TMZ, 2 mg OLE + 400 µM TMZ, U87MG için 1 mg OLE, 300 µM TMZ, 350 µM TMZ, 1 mg OLE + 300 µM TMZ, 1 mg OLE + 350 µM TMZ) hücrelere verildi (Tablo 16). Optimizasyon gerçekleştirildikten sonra en uygun olan 2 hücre sayısı ile deneye devam edildi (Tablo 17). Oluşan tümör modelleri ters (inverted) mikroskop 20X büyütme ile görüntüledi. 3B tümör boyutunun ölçümü Şekil 26 C'de gösterildiği gibi 4 farklı yarıçap ölçülerinin ortalaması ile hacminin hesaplanması şeklinde gerçekleştirildi.



Şekil 26. A. PerkinElmer CellCarrier Sferoid ULA 96 kuyulu mikropata. B.Hücrelerden sferoid oluşumunun görsel olarak gösterimi. C. 3B tümör kitlesinin yarıçap ölçümü.



Tablo 15. 96 kuyulu mikroplakaya eklenen farklı hücre sayılarının gösterimi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrol (Hücresiz)	40 hücre	80 hücre	156 hücre	312 hücre	625 hücre	1.250 hücre	2.500 hücre	5.000 hücre	10.000 hücre	20.000 hücre	40.000 hücre
B	Kontrol (Hücresiz)	40 hücre	80 hücre	156 hücre	312 hücre	625 hücre	1.250 hücre	2.500 hücre	5.000 hücre	10.000 hücre	20.000 hücre	40.000 hücre
C	Kontrol (Hücresiz)	40 hücre	80 hücre	156 hücre	312 hücre	625 hücre	1.250 hücre	2.500 hücre	5.000 hücre	10.000 hücre	20.000 hücre	40.000 hücre
D	Kontrol (Hücresiz)	40 hücre	80 hücre	156 hücre	312 hücre	625 hücre	1.250 hücre	2.500 hücre	5.000 hücre	10.000 hücre	20.000 hücre	40.000 hücre
E	Kontrol (Hücresiz)	40 hücre	80 hücre	156 hücre	312 hücre	625 hücre	1.250 hücre	2.500 hücre	5.000 hücre	10.000 hücre	20.000 hücre	40.000 hücre
F	Kontrol (Hücresiz)	40 hücre	80 hücre	156 hücre	312 hücre	625 hücre	1.250 hücre	2.500 hücre	5.000 hücre	10.000 hücre	20.000 hücre	40.000 hücre
G	Kontrol (Hücresiz)	40 hücre	80 hücre	156 hücre	312 hücre	625 hücre	1.250 hücre	2.500 hücre	5.000 hücre	10.000 hücre	20.000 hücre	40.000 hücre
H	Kontrol (Hücresiz)	40 hücre	80 hücre	156 hücre	312 hücre	625 hücre	1.250 hücre	2.500 hücre	5.000 hücre	10.000 hücre	20.000 hücre	40.000 hücre

Tablo 16. 96 kuyulu mikroplakadaki hücrelerin üzerine verilen dozlar

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrol (Hücresi z)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)
B	Kontrol (Hücresi z)	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE
C	Kontrol (Hücresi z)	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ	300 µM TMZ
D	Kontrol (Hücresi z)	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ	350 µM TMZ
E	Kontrol (Hücresi z)	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ	1 mg OLE + 300 µM TMZ
F	Kontrol (Hücresi z)	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ	1 mg OLE + 350 µM TMZ
G	Kontrol (Hücresi z)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)
H	Kontrol (Hücresi z)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)

Tablo 17. A. T98G ve U87MG hücreleri için belirlenen en uygun hücre sayılarının 96 kuyulu mikroplakadaki gösterimi. B. T98G ve U87MG hücreleri için belirlenen dozların verilmesi.

A.

	T98G						U87MG					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre
B	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre
C	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre
D	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre
E	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre
F	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre
G	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre
H	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	40 hücre	80 hücre	80 hücre

B.

	T98G						U87MG					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)
B	2 mg OLE	2 mg OLE	2 mg OLE	2 mg OLE	2 mg OLE	2 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE	1 mg OLE
C	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	300 $\mu$ M TMZ	300 $\mu$ M TMZ	300 $\mu$ M TMZ	300 $\mu$ M TMZ	300 $\mu$ M TMZ	300 $\mu$ M TMZ
D	400 $\mu$ M TMZ	400 $\mu$ M TMZ	400 $\mu$ M TMZ	400 $\mu$ M TMZ	400 $\mu$ M TMZ	400 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ	350 $\mu$ M TMZ
E	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 300 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 300 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 300 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 300 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 300 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 300 $\mu$ M TMZ
F	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	2 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ	1 mg OLE + 350 $\mu$ M TMZ
G	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)
H	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)	Kontrol (Hücrel i, dozsuz)

### 3.2.5 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Muamele Edilmesinin Tedavi Yanıtı İle İlişkili Mekanizmalar Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

#### 3.2.5.1 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte MDR İle İlişkili Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

OLE'nin MDR ile ilişkili gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisinin belirlenebilmesi için 3 farklı MDR belirteçlerinin ekspresyon durumları incelendi

(Tablo 18). Kontrol gen olarak *GAPDH* kullanıldı. cDNA sentezi 3.2.5.3.2’de, ekspresyon durumu ise 3.2.5.3.3’te gösterildiği gibi Tablo 13’deki RT-PCR koşulları ile analiz edildi.

Tablo 18. MDR biyobelirteçleri ve primer numaraları.

Genler	Primer Numaraları
<i>MRP1</i>	Hs00184500_m1
<i>MRP5</i>	Hs00981089_m1
<i>LRP1</i>	Hs00233856_m1

### 3.2.5.2 OLE’nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte Hücre Yaşlanması Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Hücre yaşlanması deneyi Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, ABD)’in prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. 6 kuyulu hücre kültür kaplarına  $25 \times 10^4$  T98G ve U-87MG hücreleri ekildi. Kültür kapları  $37^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde %90 yoğunluğa ulaşmaya kadar inkübe edildi. Hücre yoğunluğu %90’a ulaştığında hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi ve 1X PBS ile yıkandı. T98G ve U-87MG hücreleri için belirlenen OLE, TMZ ve OLE+TMZ’nin etkin dozlarından oluşan besiyeri 6 kuyulu hücre kaplarına eklenerek 24 saat süresince  $37^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edildi. Öncelikle kit içerisinde 10X verilen fiksatif ve boyama solüsyonları deneyde kullanılmak üzere distile su ile 1X’e seyreltildi. X-Gal çözeltisini hazırlamak için 1 ml DMF içerisinde 20 mg X-Gal çözeltisi çözdürüldü. Lekelenecek her kuyu için; 930  $\mu\text{l}$  1X boyama solüsyonu, 10  $\mu\text{l}$  100X solüsyon A, 10  $\mu\text{l}$  100X solüsyon B ve 50  $\mu\text{l}$  20mg/1ml X-Gal stok çözeltisinden oluşan  $\beta$ -Galactosidaz Boyama Solüsyonu hazırlandı. 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek 2 defa 1X PBS ile yıkandı. Her kuyuya 1 ml 1X fiksatif solüsyon eklendi ve oda sıcaklığında 10-15 dk beklendi. Hücrelerin üzerinden fiksatif solüsyon çekilerek 2 defa 1X PBS ile yıkandı. Her bir kuyuya deney öncesinde hazırlanan  $\beta$ -Galactosidaz Boyama Solüsyonundan 1 ml eklendi. Buharlaştırmanın önlenmesi için 6 kuyulu kültür kapları parafilm ile kaplandı. Kültür kapları  $37^\circ\text{C}$ ’de  $\text{CO}_2$ ’siz kuru inkübatörde inkübe edildi. 24 saat sonunda ışık mikroskobu ile görüntüleme yapıldı. Her bir kültür flaskındaki rastgele üç alan fotoğraflandı.  $\beta$ -gal-

pozitif olarak adlandırılan mavi boynan hücreler sayıldı ve ortalaması alındı. Deney sonunda kültür kaplarının uzun süreli saklanması için hücrelerin üzerindeki boyama solüsyonu çekildi ve %70'lik gliserol ile hücrelerin üzeri kaplandı. Kültür kapları +4°C'de saklandı. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

### 3.2.6 OLE'nin Tek Başına ve TMZ ile Birlikte LncRNA Ekspresyon Profilleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

OLE'nin LncRNA ekspresyon profillerine üzerine etkisinin belirlenebilmesi için 5 farklı LncRNA belirteçlerinin ekspresyon durumları incelendi (Tablo 19). Kontrol gen olarak *GAPDH* kullanıldı. cDNA sentezi 3.2.5.3.2'de, ekspresyon durumu ise 3.2.5.3.3'te gösterildiği gibi Tablo 13'deki RT-PCR koşulları ile analiz edildi.

Tablo 19. LncRNA isimleri ve primer numaraları.

Genler	Primer Numaraları
MALAT1	Hs03453854_g1
HOTAIR	Hs03296661mH
LOXL1-AS1	Hs04274784_m1
PVT1	Hs01069023_m1
H19	Hs03663733_g1

### 3.2.7. İstatistiksel Analiz

Verilere ait tamamlayıcı istatistikler sayı yüzde ve ortalama olarak gösterildi. Gruplar arası farklılıklar One Way ve Two Way ANOVA testi ile belirlendi. Gen ekspresyon analizleri web tabanlı "RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5" programından yararlanılarak yapıldı.

Yapılan tüm istatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism 6.0 ve SPSS (25.0) programları kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm analizler için  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. OLE ve TMZ'nin Tek Başına ve Kombinasyon Durumunda T98G, U-87MG ve HUVEC Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

#### 4.1.1. OLE'nin GB ve Kontrol Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

##### 4.1.1.1. OLE'nin T98G Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

OLE'nin T98G hücrelerindeki lethal dozları, Anabilim Dalı'mızda daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmiş ve yayınlanmıştır (Tunca ve ark., 2012). Bu dozların göz önüne alınarak mevcut deney setinin optimizasyonunun sağlanabilmesi için yapılan WST-1 analizine göre T98G hücrelerinin 24 ve 48 saat boyunca OLE ile muamelesinden sonra elde edilen değerler Tablo 20'de gösterilmiştir. WST-1 analizinde elde edilen değerlere göre T98G hücrelerindeki OLE'nin belirlenen canlılık oranları Şekil 27'de gösterilmiştir.

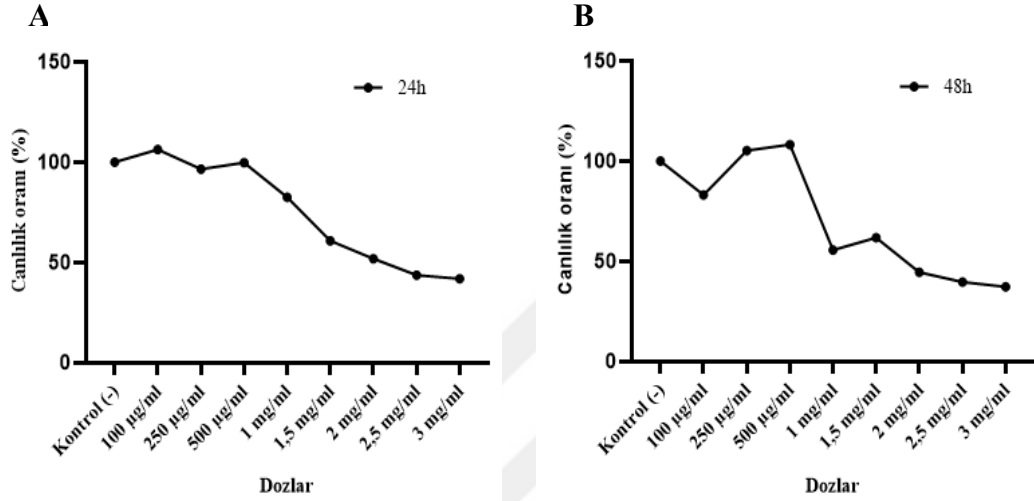
Tablo 20. 24 ve 48 saatlik OLE muamele sonucunda T98G hücrelerinde gerçekleşen WST-1 analizi sonuçları.

24 saat									
	(-) Kontrol	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1 mg/ml	1,5 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,759	0,805	0,799	0,852	0,679	0,435	0,386	0,335	0,307
2. deneme	0,71	0,799	0,686	0,698	0,548	0,425	0,363	0,321	0,308
3. deneme	0,773	0,781	0,682	0,688	0,625	0,505	0,415	0,326	0,325
Ortalama	0,747	0,795	0,722	0,746	0,617	0,455	0,388	0,327	0,3133
48 saat									
	(-) Kontrol	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1 mg/ml	1,5 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,855	0,699	1,06	0,844	0,489	0,506	0,399	0,314	0,335
2. deneme	0,954	0,701	0,907	0,95	0,391	0,538	0,372	0,376	0,314
3. deneme	0,779	0,753	0,758	1,008	0,561	0,556	0,382	0,336	0,316
Ortalama	0,862	0,717	0,908	0,934	0,48	0,533	0,384	0,342	0,321

(-)Kontrol: Muamelesiz hücre

OLE'nin etkin saati 24 saat olarak belirlendi. OLE'nin 24. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 1,5 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G hücrelerindeki canlılık oranı %60,8 olarak, 2 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G hücrelerinde ise canlılık

oranı %42,06 olarak belirlendi ( $p < 0.0001$ ). OLE'nin 48. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 1,5 mg/ml OLE uygulanan T98G hücrelerindeki canlılık oranı %61,82, 2 mg/ml OLE uygulanan T98G hücrelerindeki canlılık oranı ise %42,06 olarak belirlendi ( $p < 0.0001$ ). OLE'nin 24. saatte 2 mg/ml konsantrasyonu T98G hücrelerinde lethal etki gösterdiği belirlendi ( $p < 0.001$ ).



Şekil 27. A. T98G hücrelerinin 24 saatlik OLE ile muamele sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları. B. T98G hücrelerinin 48 saatlik OLE ile muamele sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları, h: saat ( $p < 0.001$ , One sample t test).

#### 4.1.1.2. OLE'nin U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

OLE'nin U87MG hücreleri üzerindeki etkin dozları, Anabilim Dalı'mızda daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Tezcan ve ark., 2014). Bu dozlar dikkate alınarak yapılan WST-1 analizine göre OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerinin 24 ve 48 saat sonra elde edilen değerleri Tablo 21'de gösterilmiştir. WST-1 analizine göre belirlenen canlılık oranları Şekil 28'de gösterilmiştir.

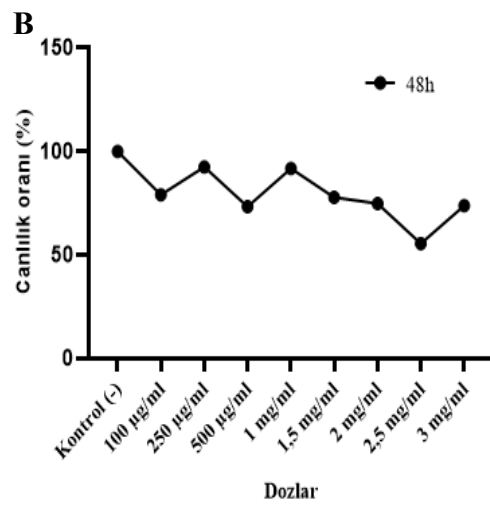
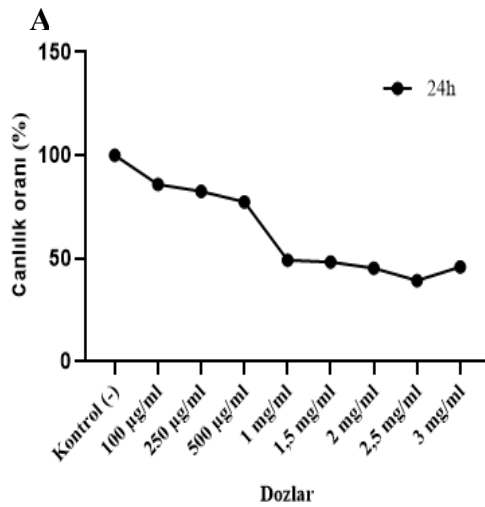


Tablo 21. 24 ve 48 saatlik OLE ile muamele sonucunda U-87MG hücrelerinde gerçekleşen WST-1 analizi sonuçları.

24 saat									
	(-) Kontrol	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1 mg/ml	1,5 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,654	0,618	0,531	0,51	0,348	0,304	0,293	0,277	0,302
2. deneme	0,668	0,558	0,539	0,509	0,294	0,302	0,289	0,261	0,303
3. deneme	0,633	0,504	0,543	0,494	0,32	0,339	0,304	0,23	0,293
Ortalama	0,651	0,56	0,537	0,504	0,32	0,315	0,295	0,256	0,299
48 saat									
	(-) Kontrol	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1 mg/ml	1,5 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,44	0,354	0,427	0,41	0,438	0,347	0,323	0,278	0,371
2. deneme	0,49	0,358	0,451	0,371	0,423	0,354	0,346	0,224	0,322
3. deneme	0,435	0,367	0,385	0,219	0,391	0,361	0,352	0,255	0,314
Ortalama	0,455	0,359	0,421	0,333	0,417	0,354	0,34	0,252	0,335

(-)Kontrol: Muamelesiz hücre

OLE'nin U87MG hücrelerindeki etkin saati 24 saat olarak belirlendi. OLE'nin 24. saatteki sitotoksik etkisi incelendiğinde, 1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerindeki canlılık oranı %49,2 olarak, 1,5 mg/ml ve 2 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerindeki canlılık oranları ise sırasıyla; %48,33, %45,31 olarak belirlendi ( $p < 0.001$ ). 48. saatteki sitotoksik etkisi incelendiğinde ise, 1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerindeki canlılık oranı %91,72, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml ve 3 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerindeki canlılık oranları sırasıyla; %77,80, %74,79, %55,45, %73,77 olarak belirlendi. OLE'nin 1 mg/ml konsantrasyonu U87MG hücrelerinde ölümcül etki gösterdiği belirlendi ( $p < 0.001$ ).



Şekil 28. A. U87MG hücrelerinin 24 saatlik OLE ile muamele sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları. B. U87MG hücrelerinin 48 saatlik OLE ile muamele sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları, h: saat (p<0.001, One sample t test).

#### 4.1.1.3. OLE'nin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

HUVEC hücrelerinde OLE'nin sitotoksik etkisi, GB hücre hatlarında etkin olan dozlar doğrultusunda gerçekleştirildi ve WST-1 analizinden elde edilen veriler Tablo 22'de gösterildi.

OLE'nin HUVEC hücrelerindeki 24. saatteki sitotoksik etkisi incelendiğinde, minimum doz olan 100 µg/ml uygulandığında canlılık oranı % 76,4 olarak, U87MG hücreleri için belirlenen en etkin doz olan 1 mg/ml uygulandığında canlılık oranı %64,96, T98G hücreleri için belirlenen en etkin doz olan 2 mg/ml uygulandığında canlılık oranı %92,11 olarak belirlendi. 48. saatteki sitotoksik etkisi incelendiğinde, 100 µg/ml uygulandığında canlılık oranı % 111,11, 1 mg/ml uygulandığında canlılık oranı %87,60, 2 mg/ml uygulandığında canlılık oranı %79,34 olarak tespit edildi (p<0.001).

Tablo 22. 24 ve 48 saatlik OLE muamele sonucunda HUVEC hücrelerinde gerçekleşen WST-1 analizi sonuçları.

24 saat									
	(-) Kontrol	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1 mg/ml	1,5 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,446	0,309	0,237	0,297	0,297	0,289	0,357	0,347	0,348
2. deneme	0,422	0,321	0,333	0,3	0,272	0,323	0,412	0,344	0,391
3. deneme	0,425	0,359	0,317	0,302	0,271	0,318	0,422	0,34	0,339
Ortalama	0,431	0,329	0,295	0,299	0,28	0,31	0,397	0,343	0,359
48 saat									
	(-) Kontrol	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1 mg/ml	1,5 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,321	0,352	0,342	0,3	0,277	0,3	0,273	0,311	0,272
2. deneme	0,319	0,347	0,327	0,287	0,288	0,312	0,26	0,29	0,261
3. deneme	0,304	0,35	0,329	0,289	0,262	0,301	0,216	0,309	0,256
Ortalama	0,314	0,349	0,332	0,292	0,275	0,304	0,249	0,303	0,263

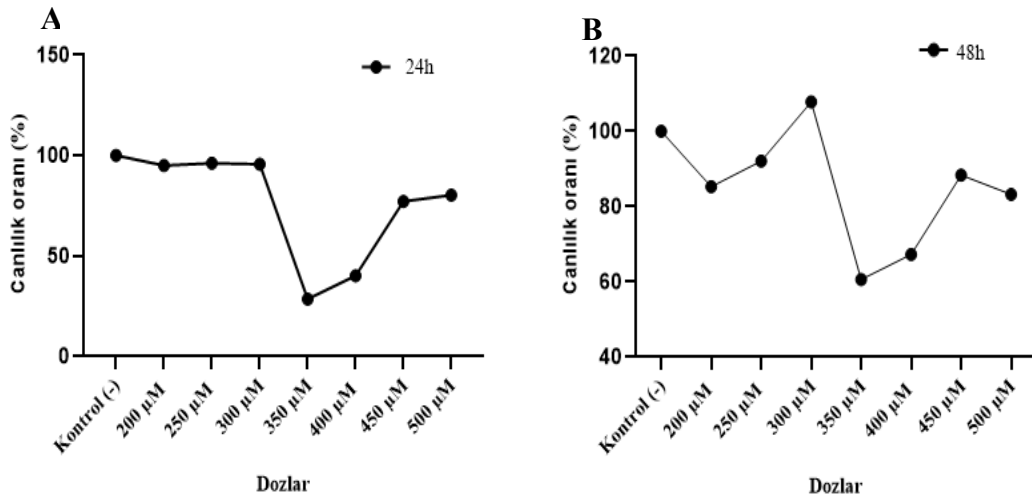
## 4.1.2. TMZ'nin GB ve Kontrol Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

### 4.1.2.1. TMZ'nin T98G Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

TMZ'nin T98G hücreleri üzerindeki etkin dozları, Anabilim Dalı'mızda daha önce yapılan çalışmalar ile belirlendi. TMZ'nin 6 farklı dozu 24 ve 48 saat boyunca T98G hücrelerine verildi ve WST-1 analizinden elde edilen veriler Tablo 23'de belirtildi. TMZ'nin T98G hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi doza ve zamana bağlı olarak WST-1 analizine göre elde edilen sonuçlar Şekil 29'da sunuldu.

Tablo 23. 24 ve 48 saatlik TMZ muamele sonucunda T98G hücrelerinde gerçekleşen WST-1 analizi sonuçları.

24 saat								
	(-) Kontrol	200 µM	250 µM	300 µM	350 µM	400 µM	450 µM	500 µM
1. deneme	0,87	0,818	0,836	0,896	0,281	0,379	0,771	0,679
2. deneme	0,897	0,837	0,82	0,872	0,223	0,257	0,597	0,708
3. deneme	0,848	0,832	0,858	0,735	0,244	0,415	0,651	0,714
Ortalama	0,871	0,829	0,838	0,834	0,249	0,35	0,673	0,7
48 saat								
	(-) Kontrol	200 µM	250 µM	300 µM	350 µM	400 µM	450 µM	500 µM
1. deneme	0,457	0,396	0,406	0,458	0,311	0,208	0,435	0,44
2. deneme	0,435	0,352	0,457	0,486	0,251	0,321	0,371	0,328
3. deneme	0,426	0,376	0,351	0,477	0,237	0,358	0,359	0,329
Ortalama	0,439	0,374	0,404	0,473	0,266	0,295	0,388	0,365



Şekil 29. A. T98G hücrelerinin 24 saat TMZ ile muamele edikten sonraki belirlenen hücre canlılık oranları. B. T98G hücrelerinin 48 saat TMZ ile muamele edikten sonraki belirlenen hücre canlılık oranları, h: saat (p<0.001, One sample t test).

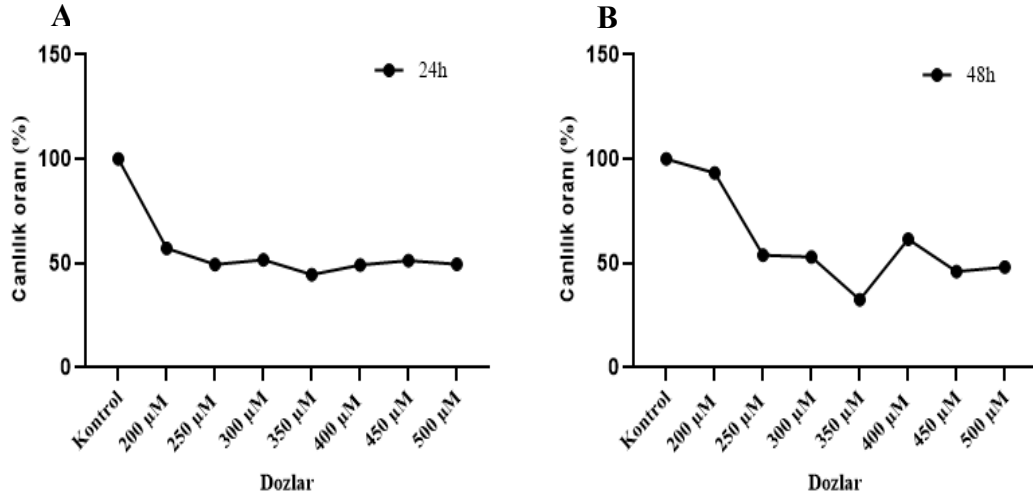
TMZ'nin T98G hücrelerindeki etkin süresi 24 saat olarak belirlendi. TMZ'nin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 24. saatte 350 µM ile muamele edilen T98G hücrelerindeki canlılık oranı %28,60, 400 µM ile muamele edilen T98G hücrelerinde ise canlılık oranı %40,19 olarak belirlendi (p<0.001). 48. saatteki sitotoksik etkisine bakıldığında, 350 µM ile muamele edilen T98G hücrelerindeki canlılık oranı %60,62, 400 µM ile muamele edilen T98G hücrelerindeki canlılık oranı %67,29 olarak tespit edildi (p<0.001). TMZ'nin 24. saatteki 350 µM ve 400 µM konsantrasyonları T98G hücreleri için ölümcül etki gösteren dozları olarak belirlendi (p<0.001).

#### 4.1.2.2. TMZ'nin U87MG Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

TMZ'nin U87MG hücreleri üzerindeki etkin dozları, T98G hücreleri üzerine yapılan çalışmaların öncülüğünde belirlendi. U87MG hücrelerine TMZ'nin 6 farklı dozu 24 ve 48 saat boyunca muamele edildi ve WST-1 analizinden elde edilen veriler Tablo 24'de gösterildi. TMZ'nin U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi doza ve zamana bağlı olarak WST-1 analizine göre elde edilen sonuçlar Şekil 30'da gösterildi.

Tablo 24. 24 ve 48 saatlik TMZ muamele sonucunda U87MG hücrelerinde gerçekleşen WST-1 analizi sonuçları.

24 saat								
	(-) Kontrol	200 µM	250 µM	300 µM	350 µM	400 µM	450 µM	500 µM
1. deneme	0,571	0,284	0,234	0,259	0,221	0,255	0,268	0,272
2. deneme	0,558	0,359	0,29	0,292	0,235	0,256	0,267	0,266
3. deneme	0,476	0,275	0,27	0,279	0,26	0,279	0,289	0,258
Ortalama	0,535	0,306	0,264	0,276	0,238	0,263	0,274	0,265
48 saat								
	(-) Kontrol	200 µM	250 µM	300 µM	350 µM	400 µM	450 µM	500 µM
1. deneme	0,293	0,436	0,198	0,21	0,112	0,211	0,167	0,186
2. deneme	0,383	0,298	0,193	0,237	0,093	0,246	0,167	0,193
3. deneme	0,437	0,305	0,209	0,144	0,158	0,228	0,179	0,157
Ortalama	0,371	0,346	0,2	0,197	0,121	0,228	0,171	0,178



Şekil 30. A. U87MG hücrelerinin 24 saatlik TMZ ile muamele sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları. B. U87MG hücrelerinin 48 saatlik TMZ ile muamele sonrasında belirlenen hücre canlılık oranları, h: saat ( $p < 0.001$ , One sample t test).

U87MG hücrelerindeki TMZ'nin etkin süresi 24 saat olarak belirlendi. TMZ'nin U87MG hücrelerindeki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 300 µM ile muamele edilen U87MG hücrelerinde 24. saatteki canlılık oranı %51,71, 350 µM ile muamele edilen hücrelerdeki canlılık oranı ise %44,61 olarak belirlendi ( $p < 0.001$ ). 48. saatteki sitotoksik etkileri, 300 µM ile muamele edilen hücrelerdeki canlılık oranı %53,09, 350 µM ile muamele edilen hücrelerdeki canlılık oranı %32,61 olarak belirlendi ( $p < 0.001$ ). TMZ'nin U87MG hücrelerinde, 24. saatteki 300 µM ve 350 µM konsantrasyonlarının en ölümcül etki gösteren dozları olarak tespit edildi ( $p < 0.001$ ).

#### 4.1.2.3. TMZ'nin HUVEC Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

TMZ'nin HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkisi, GB hücre hatlarında belirlenen etkin dozlar doğrultusunda gerçekleştirildi ve WST-1 analizinden elde edilen veriler Tablo 25'te gösterildi.

TMZ'nin HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde, 24. saatte minimum doz olan 200µM ile muamele edildiğinde canlılık oranı %73,21, U87MG hücreleri için belirlenen en etkin doz olan 300 µM ile muamele edildiğinde canlılık oranı %92,12, T98G hücreleri için belirlenen en etkin doz olan 400 µM ile muamele

edildiğinde canlılık oranı %76,10 olarak belirlendi. 48. saatteki sitotoksik etkisi, 200  $\mu\text{M}$  ile muamele edildiğinde canlılık oranı %93,03, 300  $\mu\text{M}$  ile muamele edildiğinde canlılık oranı %86,75, 400  $\mu\text{M}$  ile muamele edildiğinde ise canlılık oranı %79,52 olarak belirlendi ( $p < 0.001$ ).

Tablo 25. 24 ve 48 saatlik TMZmuamelesi sonucunda HUVEC hücrelerinde gerçekleşen WST-1 analizi sonuçları.

24 saat								
	(-) Kontrol	200 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	300 $\mu\text{M}$	350 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{M}$	450 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$
1. deneme	0,412	0,3	0,376	0,359	0,362	0,303	0,336	0,315
2. deneme	0,335	0,244	0,376	0,339	0,321	0,269	0,366	0,276
3. deneme	0,358	0,265	0,389	0,32	0,309	0,269	0,33	0,231
Ortalama	0,368	0,269	0,38	0,339	0,33	0,28	0,344	0,274
48 saat								
	(-) Kontrol	200 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	300 $\mu\text{M}$	350 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{M}$	450 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$
1. deneme	0,393	0,417	0,37	0,375	0,206	0,3	0,4	0,379
2. deneme	0,362	0,358	0,401	0,335	0,216	0,312	0,388	0,349
3. deneme	0,393	0,293	0,38	0,286	0,246	0,301	0,355	0,29
Ortalama	0,382	0,356	0,383	0,332	0,222	0,304	0,381	0,339

### 4.1.3. TMZ ve OLE Kombinasyonunun Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

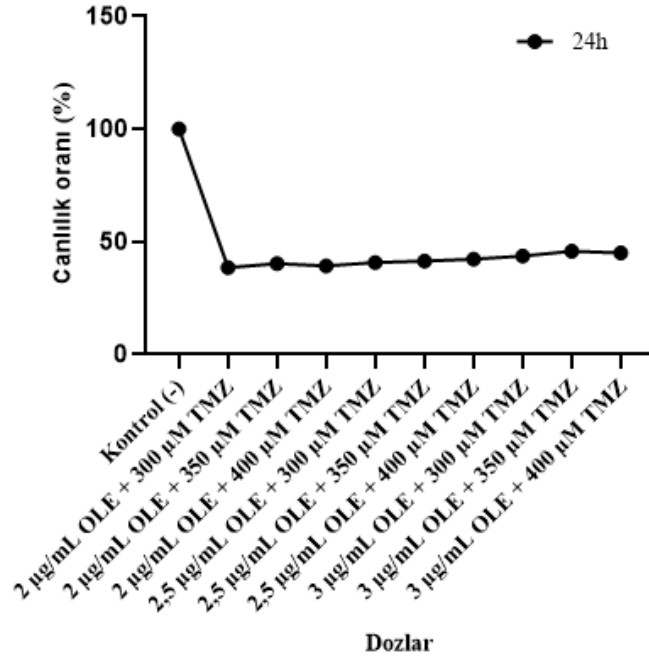
#### 4.1.3.1. TMZ ve OLE Kombinasyonunun T98G Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

TMZ ve OLE'nin kombinasyonunun T98G üzerindeki sitotoksik etkisi, 24 saat boyunca OLE+TMZ'nin etkin dozlarının muamele edilmesiyle belirlendi ve WST-1 analizinden elde edilen veriler Tablo 26'da gösterildi. Tek başına 350  $\mu\text{M}$  ve 400  $\mu\text{M}$  TMZ'ye göre 2 mg/ml, 2 mg/ml ve 3 mg/ml OLE ile TMZ'nin kombinasyonu verilen hücrelerdeki canlılık oranlarında ciddi azalma olduğu tespit edildi. OLE+TMZ kombinasyonunun T98G hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 analizine göre elde edilen değerler Şekil 31'de gösterildi.

Tablo 26. T98G hücrelerinin 24 saat sonunda OLE+TMZ muamelesi sonucunda gerçekleşen WST-1 analizi sonuçları.

		24 saat								
	(-) Kontrol	2 mg/ml OLE + 300 µM TMZ	2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ	2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ	2,5 mg/ml OLE + 300 µM TMZ	2,5 mg/ml OLE + 350 µM TMZ	2,5 mg/ml OLE + 400 µM TMZ	3 mg/ml OLE + 300 µM TMZ	3 mg/ml OLE + 350 µM TMZ	2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ
1. deneme	0,676	0,247	0,266	0,244	0,26	0,251	0,263	0,275	0,31	0,287
2. deneme	0,617	0,24	0,25	0,248	0,254	0,273	0,263	0,278	0,275	0,289
3. deneme	0,589	0,239	0,242	0,247	0,255	0,257	0,27	0,27	0,278	0,271
Ortalama	0,627	0,242	0,252	0,246	0,256	0,26	0,265	0,274	0,287	0,282

T98G hücrelerinde, 24. saatteki 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ve 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ konsantrasyonlarının sırasıyla canlılık oranları %38,57 ve %40,27 olarak belirlendiği için ölümcül etki gösteren dozları olarak belirlendi (p<0.001).



Şekil 31.24 saatlik OLE+TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinin hücre canlılık oranları, h: saat (p<0.001, One sample t test).

#### 4.1.3.2. TMZ ve OLE Kombinasyonunun U87MG Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

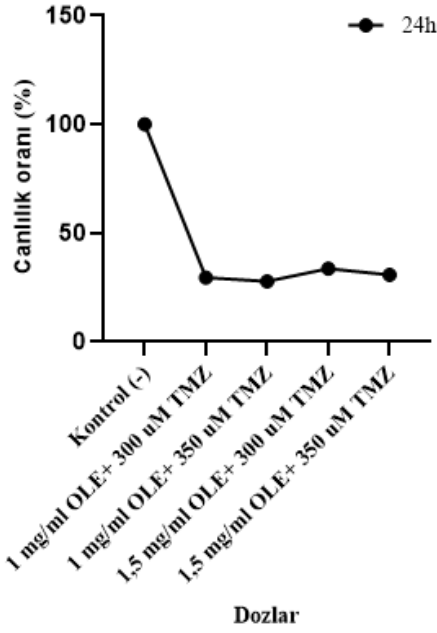
U87MG hücreleri üzerinde TMZ ve OLE'nin kombinasyonunun 24 saatteki sitotoksik etkisi, OLE+TMZ'nin etkin dozlarının muamele edilmesiyle belirlendi ve WST-1 analizinden elde edilen değerler Tablo 27'de gösterildi. 300 µM ve 350 µM TMZ'ye kıyasla OLE'nin etkin dozları olan 1 mg/ml ve 1,5 mg/ml OLE ile TMZ'nin kombinasyonunda hücrelerdeki canlılık oranlarında ciddi azalma belirlendi.

Tablo 27. 24 saat sonunda OLE+TMZ muamelesi sonucunda U87MG hücrelerinde gerçekleşen WST-1 analizi sonuçları.

	(-) Kontrol	24 saat			
		1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ	1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ	1,5 mg/ml OLE + 300 µM TMZ	1,5 mg/ml OLE + 350 µM TMZ
1. deneme	0,745	0,189	0,175	0,204	0,189
2. deneme	0,544	0,176	0,171	0,206	0,204
3. deneme	0,573	0,185	0,172	0,217	0,18
Ortalama	0,62	0,183	0,172	0,209	0,191

U87MG hücrelerine uygulanan 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ve 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ konsantrasyonlarının 24. saatteki canlılık oranları sırasıyla; %29,53 ve %27,81 olarak belirlendi ve bu dozların lethal etki gösteren dozları olduğu tespit edildi ( $p < 0.001$ ; Şekil 32).





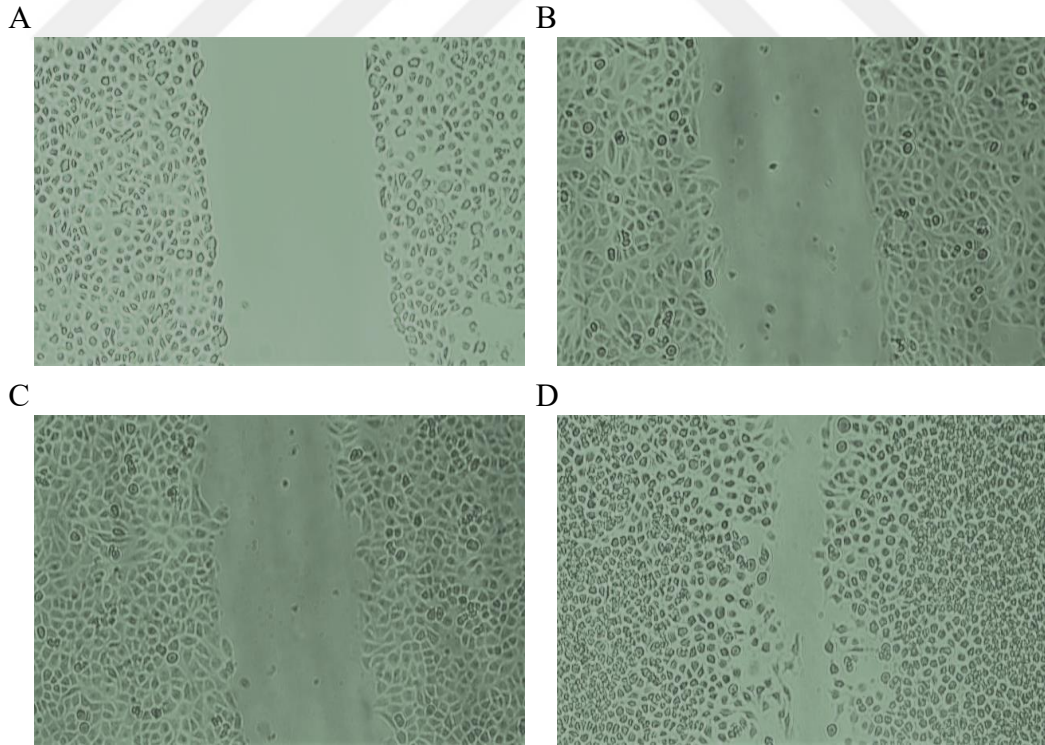
Şekil 32. 24 saatlik OLE+TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinin hücre canlılık oranları, h: saat ( $p < 0.001$ , One sample t test).

## 4.2. GB Hücre Hatlarında OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

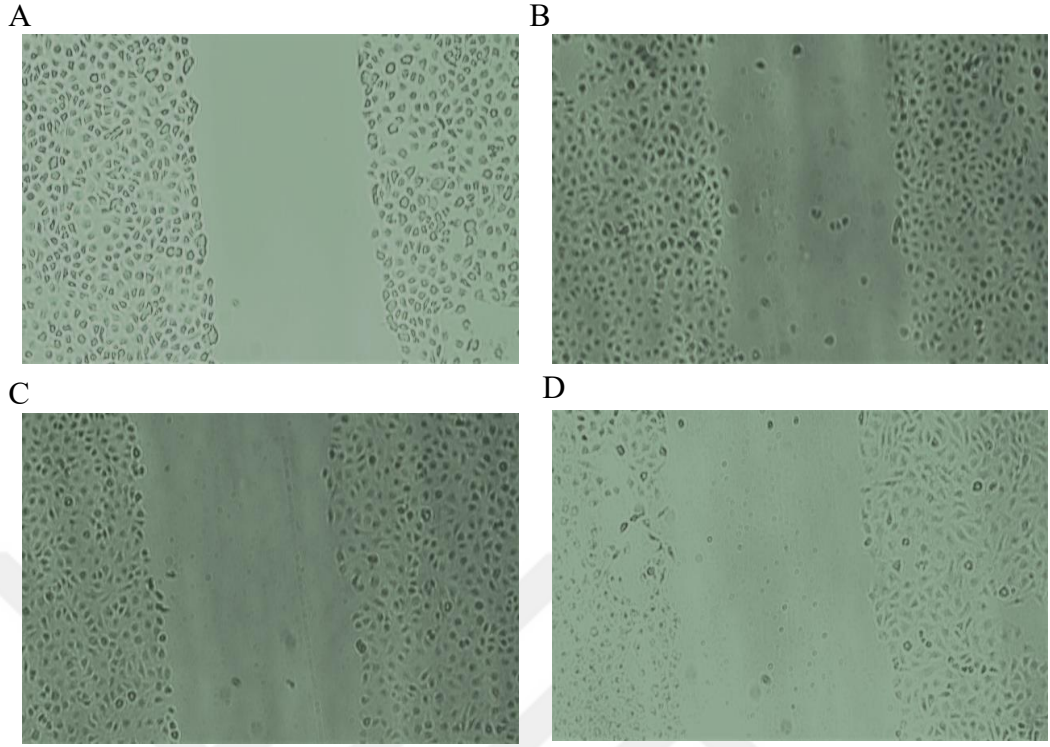
### 4.2.1. T98G Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

T98G hücreleri için belirlenen etkin OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyon dozlarının hücrelerin migrasyon özelliklerine olan etkisinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen yara iyileşme deneyi sonucunda, doz verilmeyen T98G hücrelerinde (kontrol) 24 saatin sonunda oluşturulan açıklıkta ciddi oranda kapanma gözlemlendi (Şekil 33). T98G hücrelerinin en etkin dozları olarak belirlenen 2 mg/ml OLE, 350 µM TMZ ve 400 µM TMZ dozları ile muamele edilen hücrelerin doza bağlı olarak migrasyon özelliklerinde anlamlı bir azalış gözlemlendi (Şekil 34, Şekil 35 ve Şekil 36). OLE+TMZ (2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ve 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ) kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde yara iyileşmesi sonucunda oluşturulan çizik alanının arttığı gözlemlendi (Şekil 37 ve Şekil 38). OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin, tek başına 350 µM TMZ ve 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelere

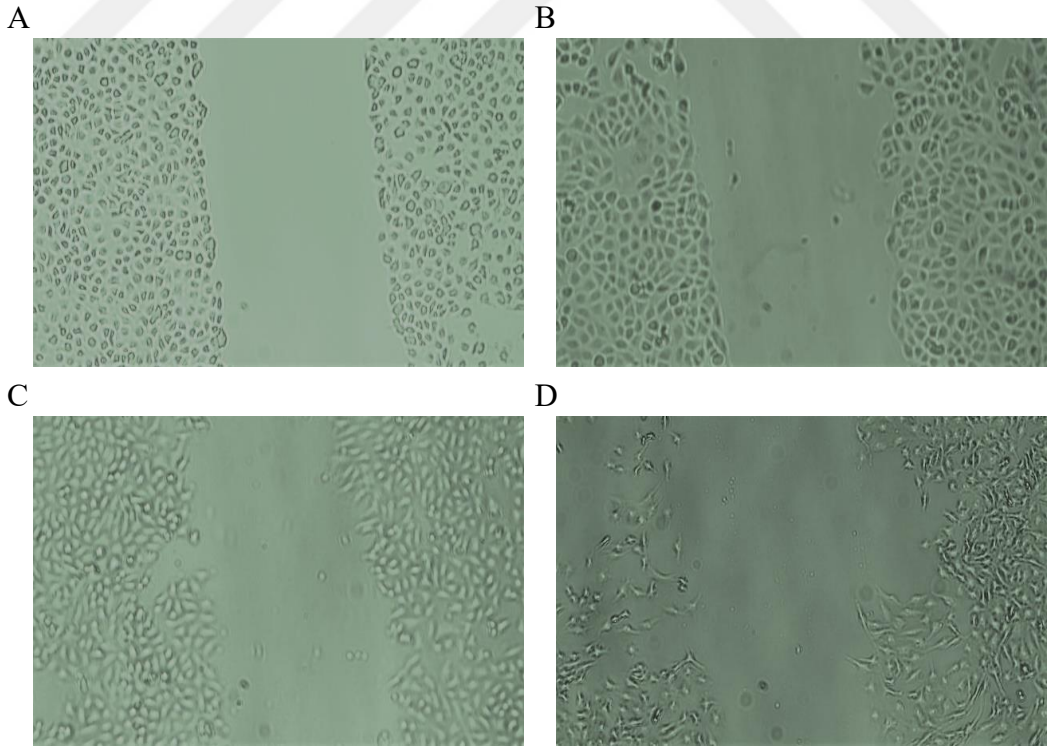
kıyasla migrasyon yeteneklerinin daha çok baskılandığını ve tek başına verilen dozlara göre kapanma oranının daha az olduğu saptandı. TMZ'nin bu deneyde toksik etkisinden dolayı çizik alanının sınırlarını bozduğunu ve sınır üzerindeki hücreleri bölge bölge degrede ederek yara iyileşme alanını arttırdığı gözlemlendi. OLE'nin çizik alanının sınırlarını koruyarak kapanma alanını koruduğu ve migrasyon özelliğini baskıladığı gösterildi. Ek olarak OLE ile kombinasyon sonucunda TMZ ile bozulan sınırların OLE'nin tek başına uygulandığı duruma benzer şekilde korunmuş sınırların elde edildiği gözlemlendi. Kontrol hücrelerinde 6, 12 ve 24. saat sonlarında migrasyon hızının oldukça yüksek olduğu ancak OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerdeki 24. saat sonunda migrasyon hızının oldukça az olduğu tespit edildi (Şekil 39). Sonuç olarak, OLE'nin son derece agresif seyreden T98G hücrelerinin migrasyon yeteneklerini önemli ölçüde baskıladığı, kemoterapi ilacı olan TMZ gibi migrasyon hızını azalttığı, aynı zamanda tek başına TMZ ile muamele edilen hücrelere kıyasla TMZ'nin OLE ile kombinasyonu sonucunda yara açıklığını daha fazla arttırdığı ve TMZ ile sinerjik etki göstererek hücre göçünü engellediği belirlendi.



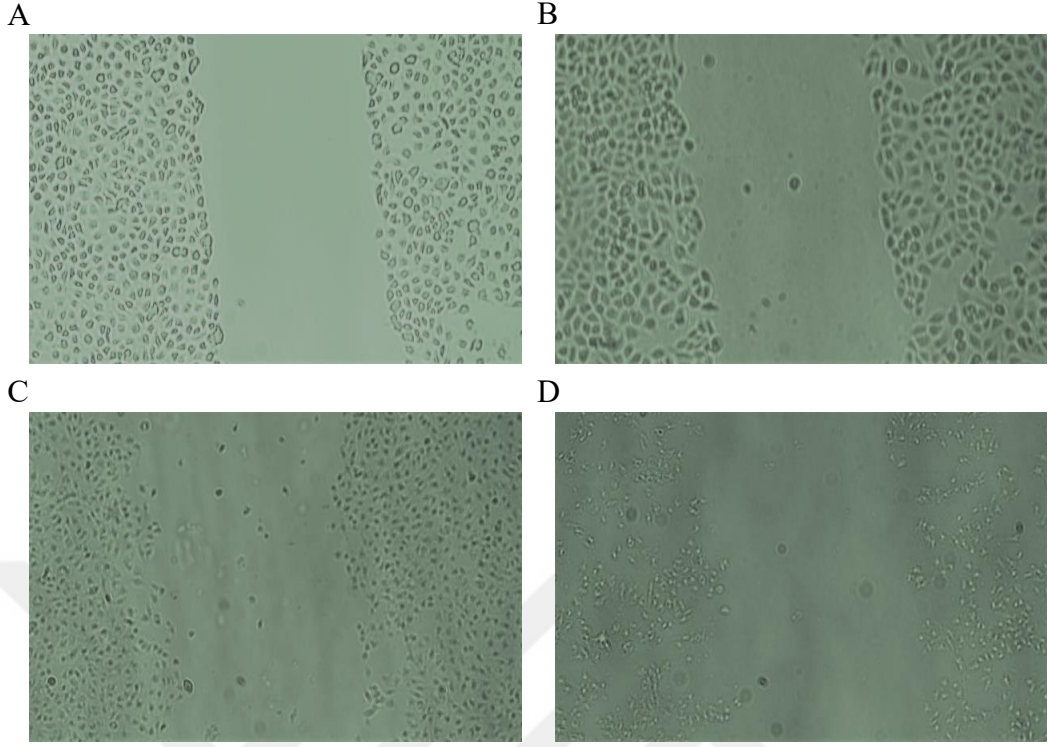
Şekil 33. Muamele edilmemiş T98G hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.



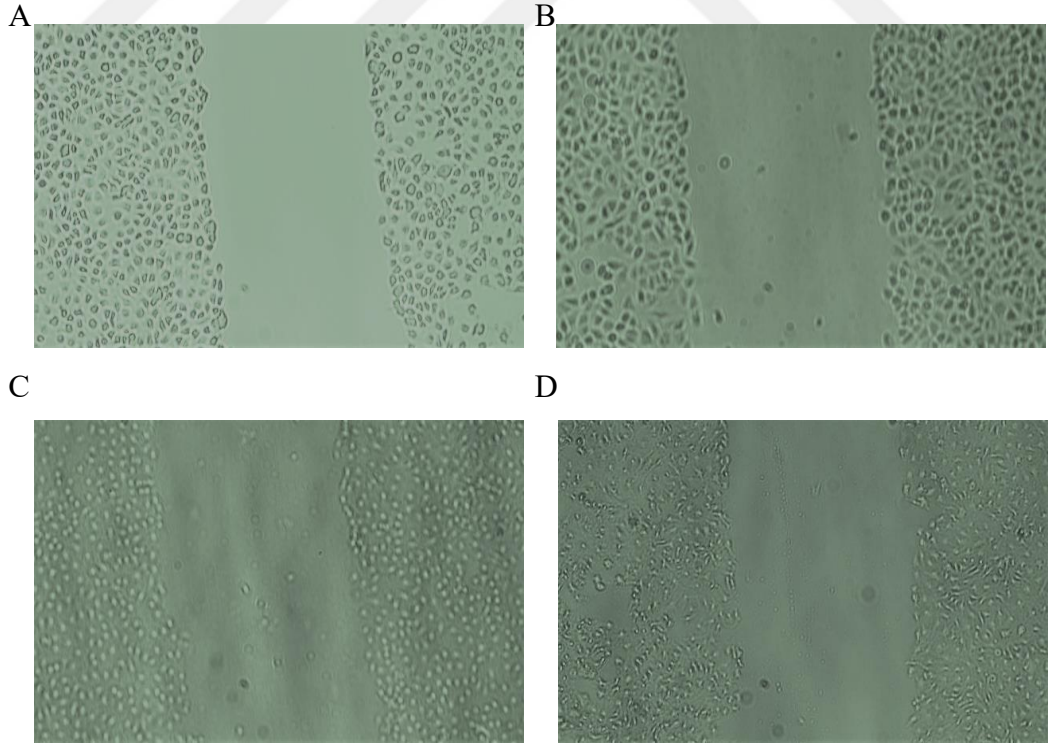
Şekil 34. 2 mg/ml OLE ile muamele edilmiş T98G hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.



Şekil 35. 350 µM TMZ ile muamele edilmiş T98G hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.

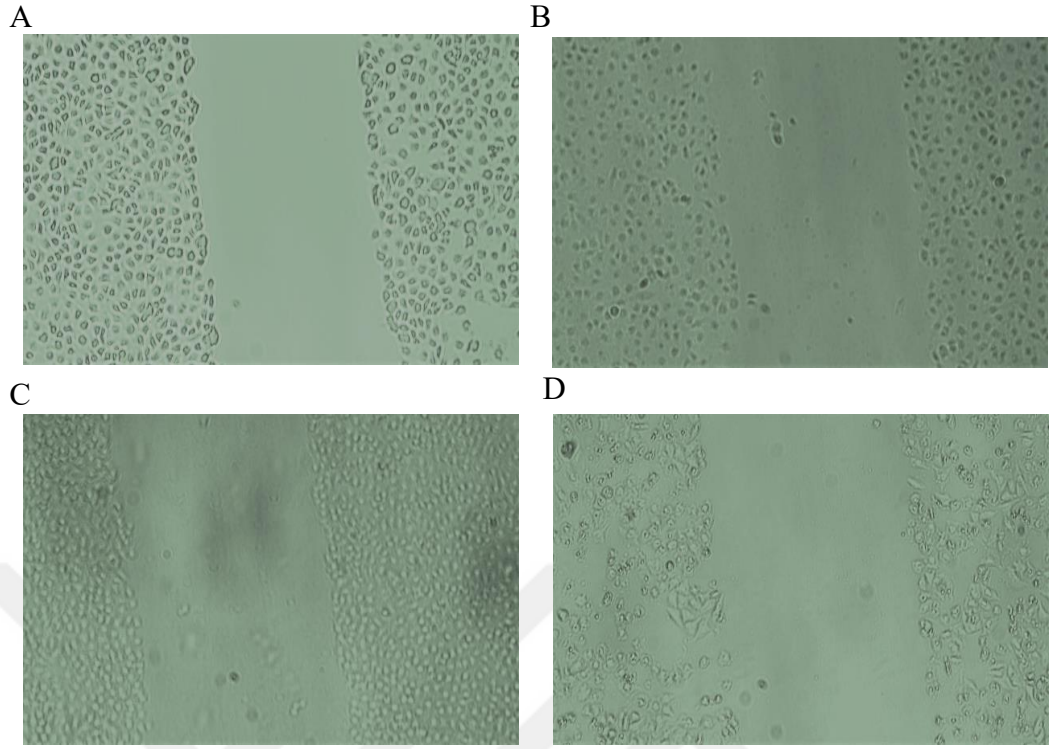


Şekil 36. 400 µM TMZ ile muamele edilmiş T98G hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.

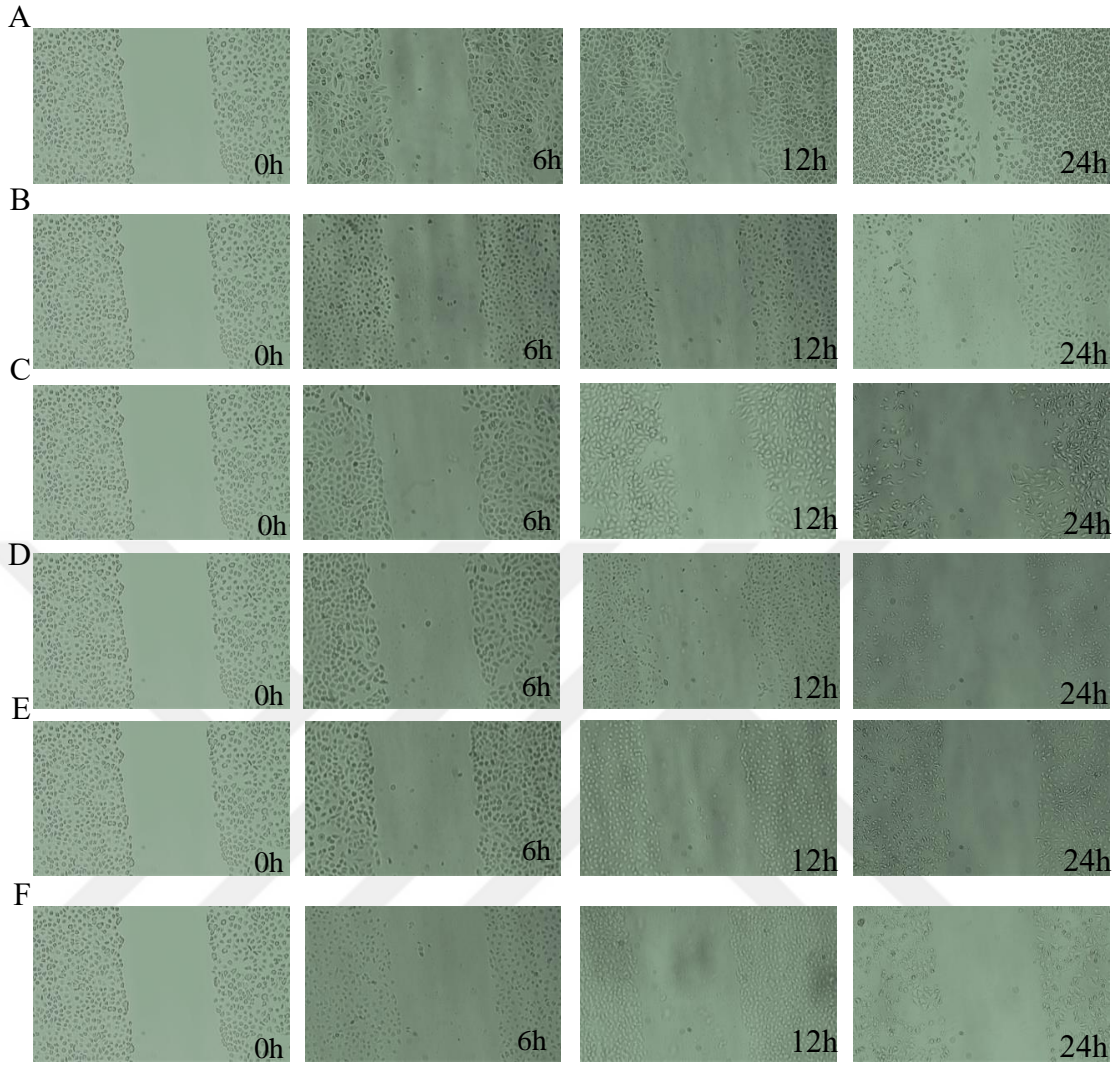


Şekil 37. 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilmiş T98G hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.



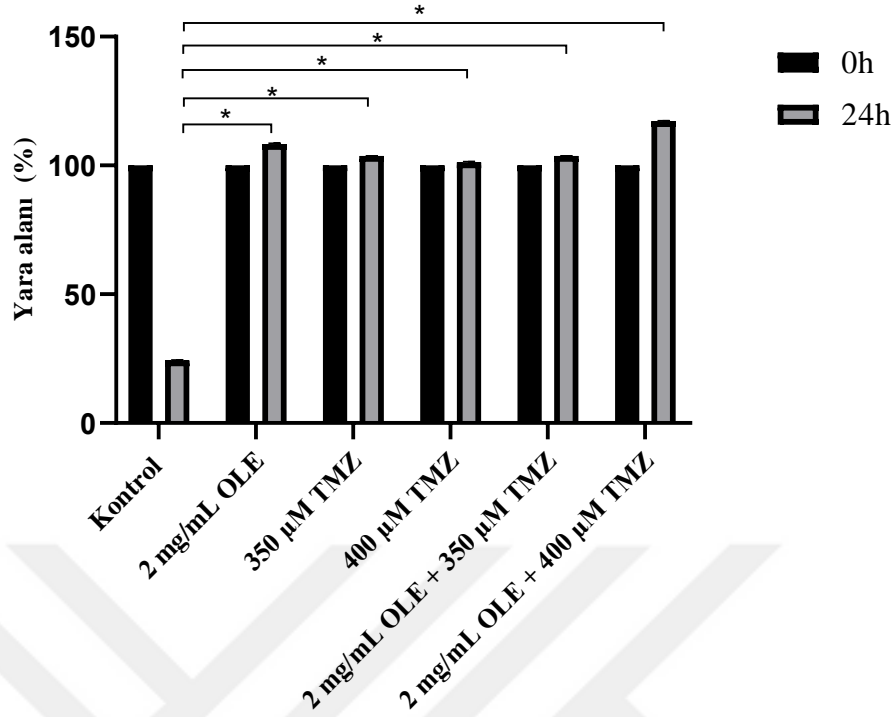


Şekil 38. 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilmiş T98G hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.



Şekil 39. Farklı dozlar ile muamele edilmiş T98G hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının toplu gösterimi, h: saat. (A) Muamele edilmemiş T98G hücresi, (B) 2 mg/ml OLE, (C) 350  $\mu$ M TMZ, (D) 400  $\mu$ M TMZ, (E) 2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ (F) 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ.

Deney sonucunda, muamele edilmemiş T98G hücrelerinde (kontrol) 24 saatin sonunda %75 oranında kapanma gözlemlendi. 2 mg/ml OLE, 350  $\mu$ M TMZ, 400  $\mu$ M TMZ, 2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ ve 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerde ise sırasıyla; %8, %3, %2, %3 ve %17 oranda yara alanında artış gözlemlendi (Şekil 40). Böylece, OLE'nin tıpkı TMZ gibi T98G hücrelerinin migrasyon yeteneklerini önemli ölçüde baskıladığı ve TMZ ile sinerjik etki oluşturarak OLE+TMZ kombinasyonu ile yara açıklığını daha fazla arttırdığı belirlendi.

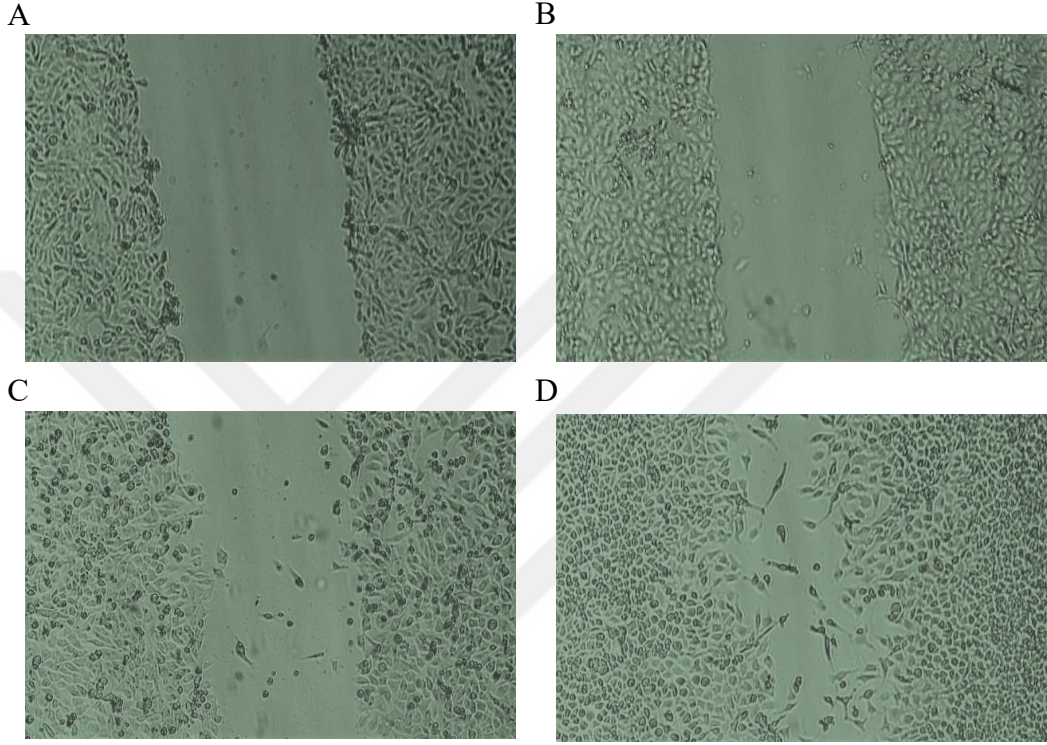


Şekil 40. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun T98G hücrelerinde, kontrol hücelere kıyasla göç kabiliyetini baskıladığı belirlendi (\* p < 0.001, İki yönlü ANOVA). Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi, h: saat.

#### 4.2.2. U87MG Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

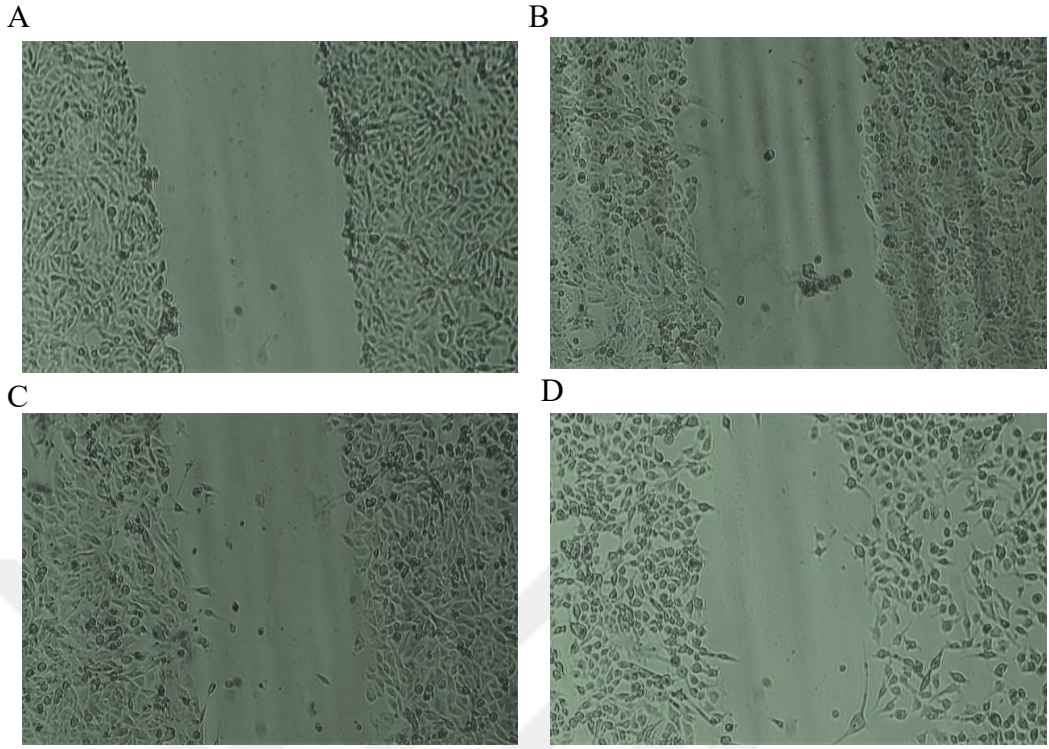
U87MG hücreleri üzerinde belirlenen OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyon dozlarının hücrelerin migrasyon yeteneklerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen yara iyileşme deneyi sonucunda, doz verilmeyen U87MG hücrelerinde (kontrol) 24 saatin sonucunda oluşturulan açıklıkta yüksek oranda kapanma gözlemlendi (Şekil 41). U87MG hücrelerinin etkin dozları olarak saptanan 1 mg/ml OLE, 300 µM TMZ ve 350 µM TMZ dozları ile muamele edilen hücrelerin doz kapsamında migrasyon özelliklerinde anlamlı bir azalış gözlemlendi (Şekil 42, Şekil 43 ve Şekil 44). U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ve 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerdeki yara iyileşmesi sonucunda oluşturulan çizik alanının kontrolle karşılaştırıldığında arttığı gözlemlendi (Şekil 45 ve Şekil 46). Tek başına OLE, 300 µM TMZ ve 350 µM TMZ ile muamele edilen hücelere kıyasla OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin, yara iyileşme yüzeyinin kapanmasının daha az oranda olduğu ve migrasyon yeteneklerinin

daha çok baskıldığı belirlendi. OLE ile muamele edilen hücrelerin çizik alanının sınırlarını koruyarak kapanma alanını koruduğu saptandı. Muamele edilmemiş hücrelerde 6, 12 ve 24. saat sonlarında migrasyon hızının oldukça fazla olduğu ancak OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerdeki 24. saat sonunda migrasyon hızının oldukça düşük olduğu tespit edildi (Şekil 47).

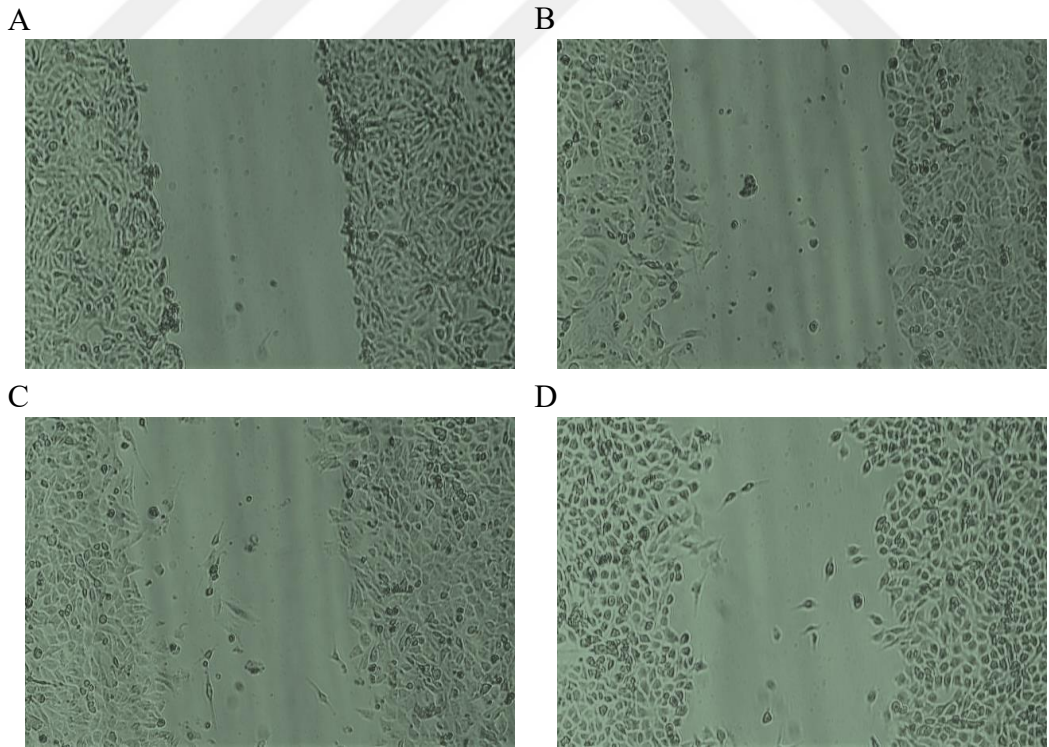


Şekil 41. Muamele edilmemiş U87MG hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.

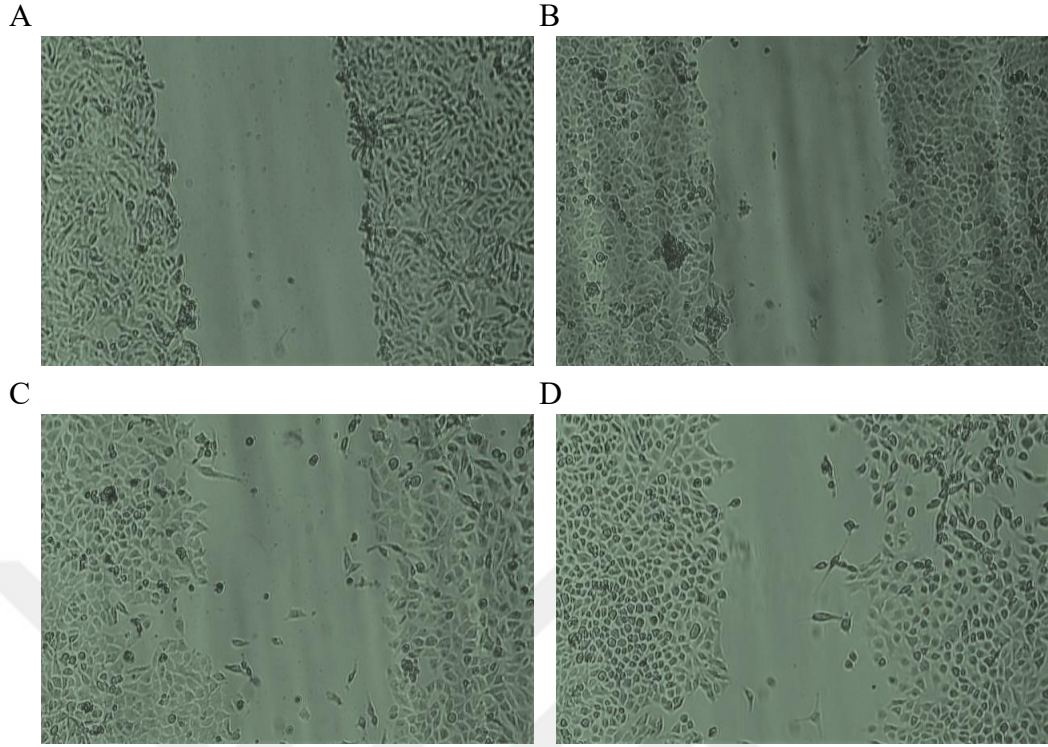




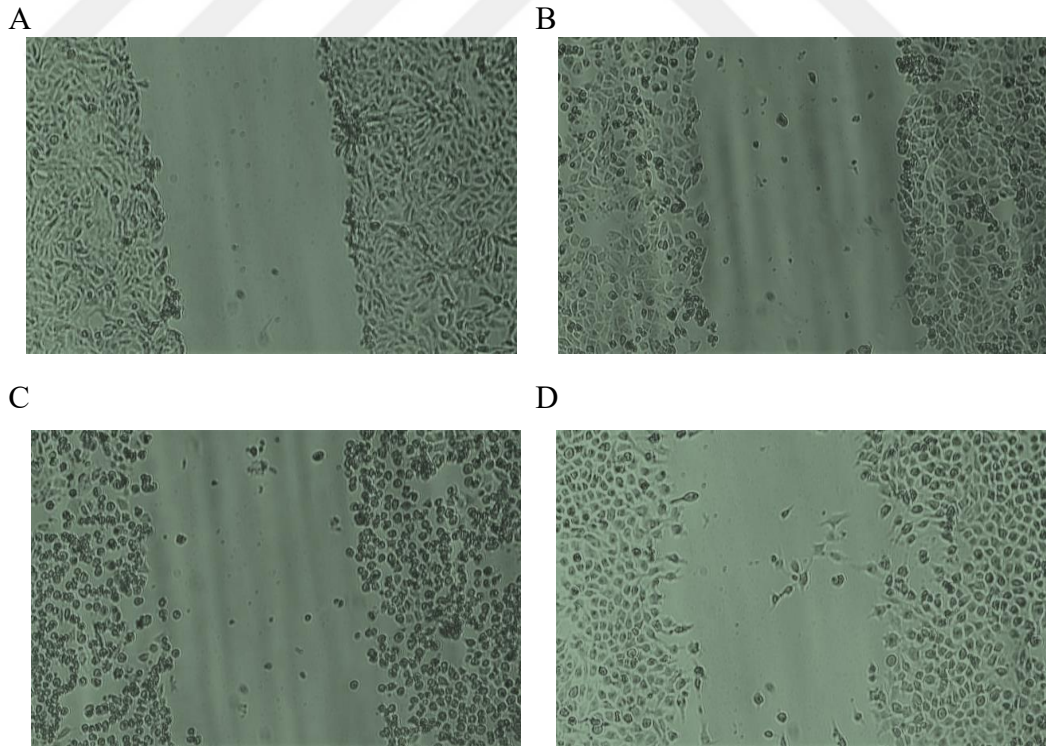
Şekil 42. 1 mg/ml OLE ile muamele edilmiş U87MG hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.



Şekil 43. 300 µM TMZ ile muamele edilmiş U87MG hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.

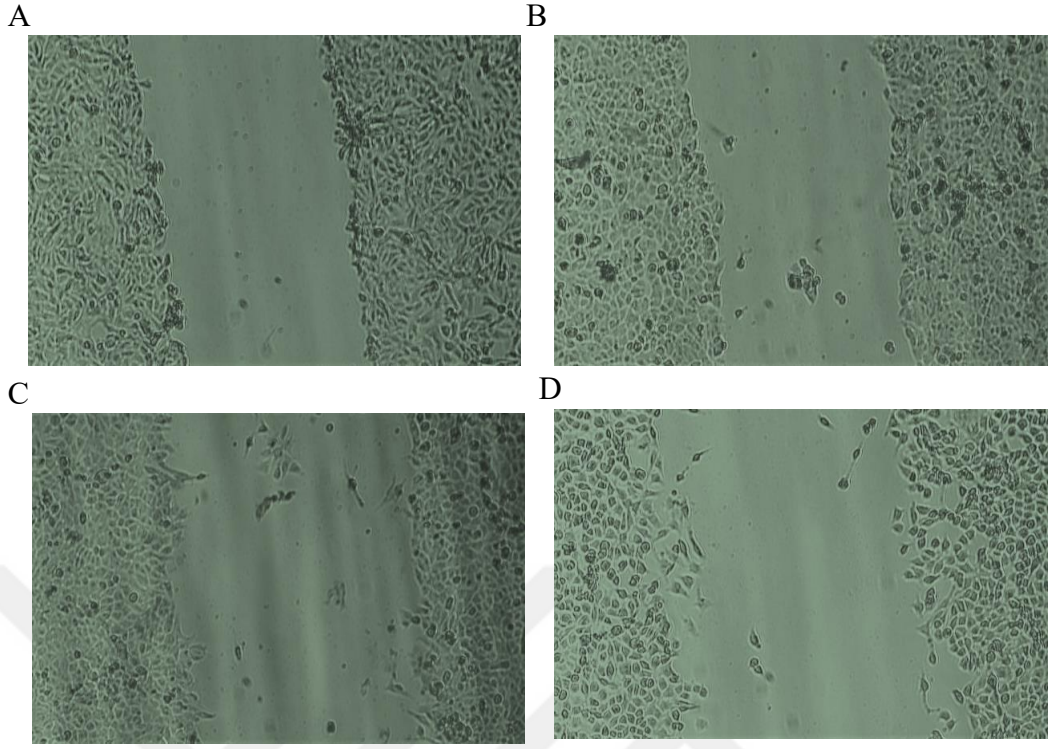


Şekil 44. 350 µM TMZ ile muamele edilmiş U87MG hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.

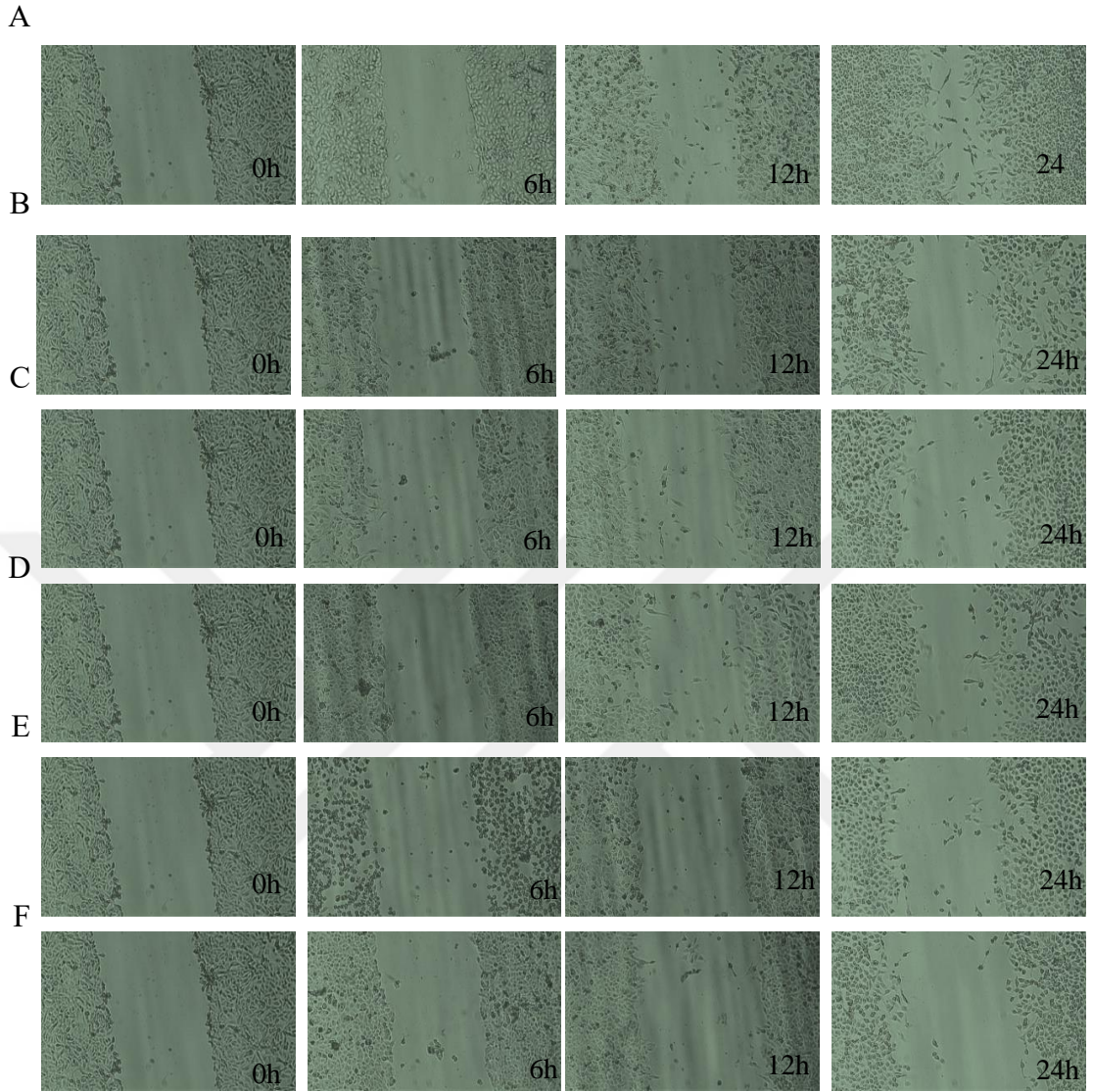


Şekil 45. 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilmiş U87MG hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.



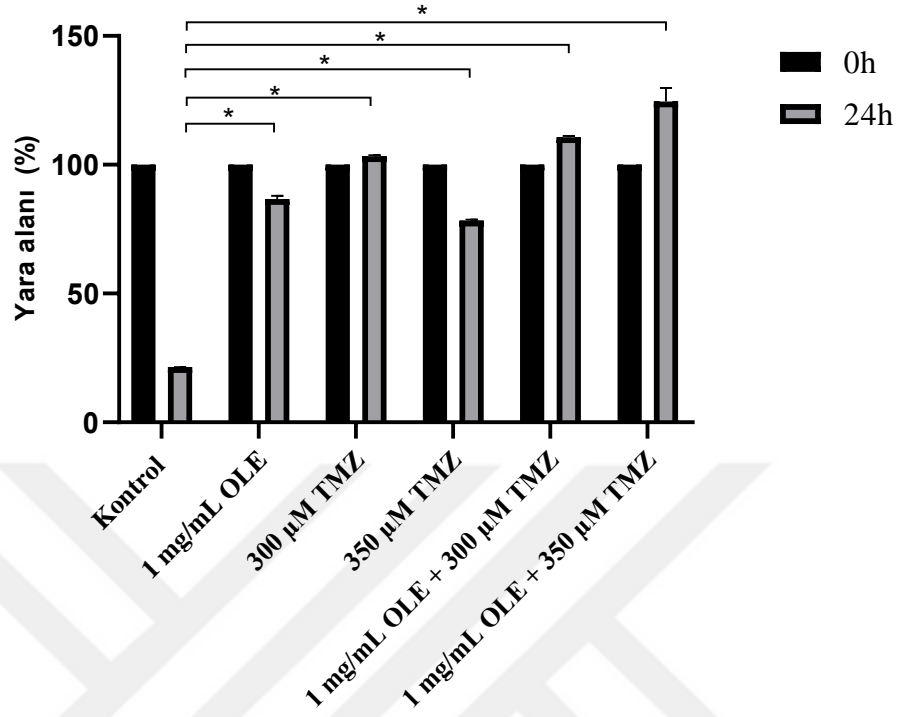


Şekil 46. 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilmiş U87MG hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 6h, (C) 12h, (D) 24h.



Şekil 47. Farklı dozlar ile muamele edilmiş U87MG hücrelerinin farklı saatlerdeki yara iyileşmesi kapanmasının toplu gösterimi, h: saat. (A) Muamele edilmemiş U87MG hücresi, (B) 1 mg/ml OLE, (C) 300  $\mu$ M TMZ, (D) 350  $\mu$ M TMZ, (E) 1 mg/ml OLE + 300  $\mu$ M TMZ (F) 1 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ.

Deney sonucunda, 24 saatin sonunda muamele edilmemiş U87MG hücrelerinde (kontrol) %79 oranda kapanma gözlemlendi. 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerde %15, 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerde ise %22 oranında kapanma gözlemlendi. 300  $\mu$ M TMZ, 1 mg/ml OLE + 300  $\mu$ M TMZ ve 1 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerde sırasıyla; %3, %10 ve %28 oranda yara alanında artış gözlemlendi (Şekil 48). Böylece, U87MG hücrelerinde OLE ile muamele edilen hücrelerin, TMZ ile muamele edilen hücrelere benzer şekilde migrasyon yeteneklerini baskıladığı ve TMZ ile sinerjik etki oluşturarak OLE+TMZ kombinasyonu ile yara açıklığını tek başlarına uyguladıkları durumdan daha fazla arttırdığı belirlendi.

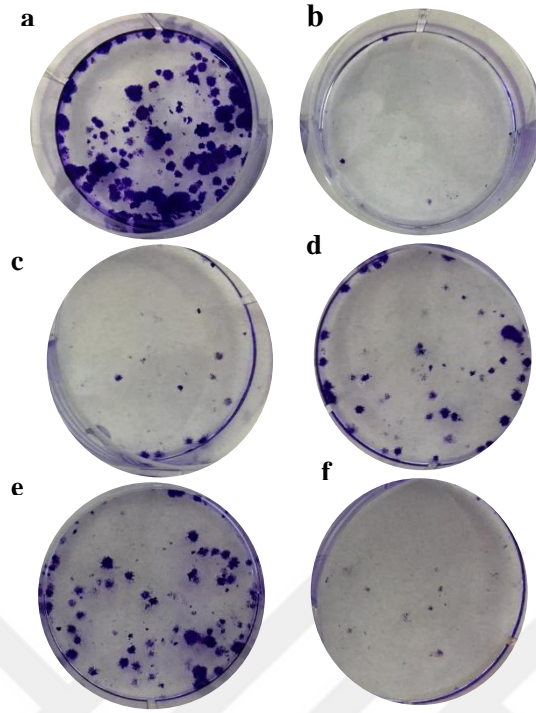


Şekil 48. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun U87MG hücrelerinde, kontrol hücrelere kıyasla göç kabiliyetini baskıladığı belirlendi (\* p < 0.001, İki yönlü ANOVA). Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi, h: saat.

### 4.3. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

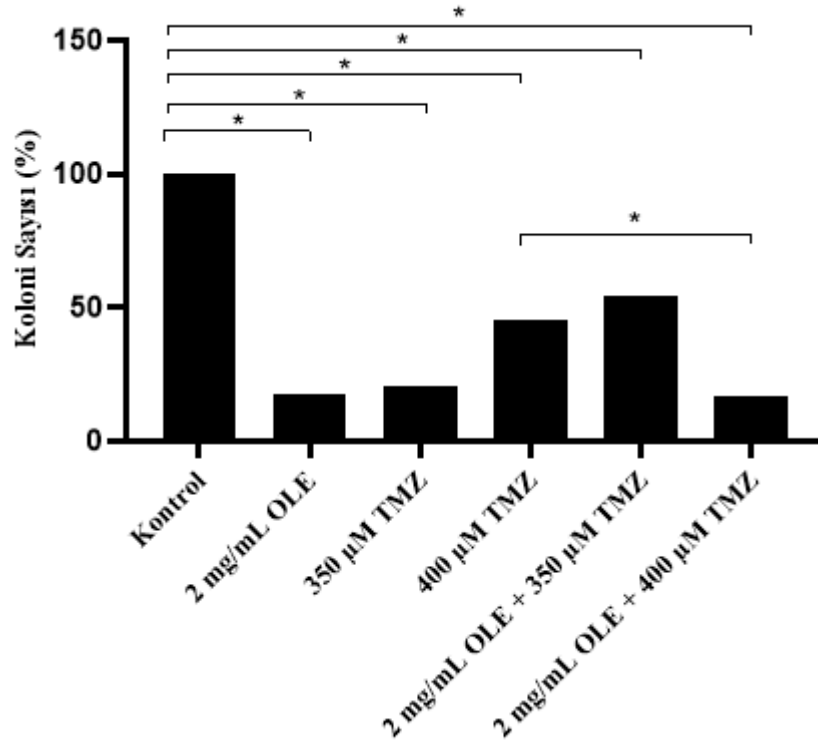
#### 4.3.1. T98G Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun T98G hücrelerinde koloni oluşturma yeteneği üzerine etkisi değerlendirildiğinde, muamele edilmemiş T98G hücrelerine (kontrol) göre OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde koloni sayısının azaldığı gözlemlendi (Şekil 49).



Şekil 49. OLE ve TMZ'nin T98G hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkileri (a) Kontrol (Muamelesiz T98G), (b) 2 mg/ml OLE, (c) 350 µM TMZ, (d) 400 µM TMZ ve (e) 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ, (f) 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ.

T98G hücrelerinde, kontrol olarak belirlenen muamele edilmemiş T98G grubunun ortalama koloni sayısı 216 iken, 2 mg/ml OLE, 350 µM TMZ, 400 µM TMZ, 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ, 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin ortalama koloni sayısı sırasıyla; 38, 45,98, 118 ve 36 olarak belirlendi (Şekil 50). Oluşan koloni sayılarının ortalamaları koloni boyutlarına bakılmaksızın sayıldı. Şekil 49'da görüldüğü gibi muamele edilmemiş T98G (kontrol) hücrelerinin oluşturduğu koloni boyutlarının, doz uygulanan hücrelerin koloni boyutlarındakinden daha büyük olduğu tespit edildi. Deney kaplarındaki ortalama kaplama verimlilikleri ise muamelesiz T98G hücrelerinde %21,65 olmasına rağmen, dozların yukarıdaki sırayla ortalama kaplama verimlilikleri; %3,8, %4,5, %9,8, %11,8 ve %3,6 olarak hesaplandı. Bunlara ek olarak muamelesiz T98G grubuna göre koloni oluşum oranları belirtilen sırayla, %17,55, %20,7, %45,2, %54,5 ve %16,6 olduğu saptandı (Tablo 28).



Şekil 50. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun T98G hücrelerinde, muamele edilmeyen T98G hücrelerine kıyasla koloni yeteneklerine etkisi (\* p < 0.001, Bağımsız t-test). Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

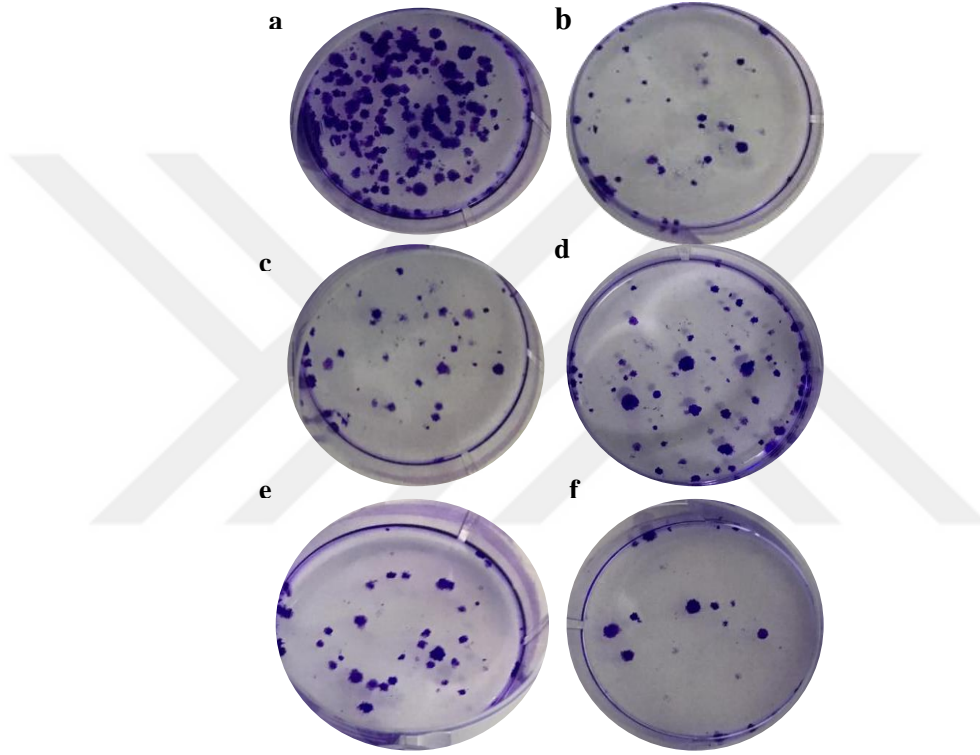
Tablo 28. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun T98G hücrelerinin koloni oluşumu üzerine etkisi.

Dozlar	Ortalama Koloni Sayısı	Kaplama verimliliği (%)	Koloni oluşum oranları (%)
Muamele edilmemiş T98G hücresi	216	21.65	100
2 mg/ml OLE	38	3.8	17.55
350 µM TMZ	45	4.5	20.7
400 µM TMZ	98	9.8	45.2
2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ	118	11.8	54.5
2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ	36	3.6	16.6



#### 4.3.2. U87MG Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonunun Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun U87MG hücrelerinde koloni oluşturma yeteneği üzerine etkisi incelendiğinde, muamele edilmemiş U87MG hücrelerine (kontrol) göre etkin OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen U87MG hücrelerinde koloni sayılarının azaldığı gözlemlendi (Şekil 51).

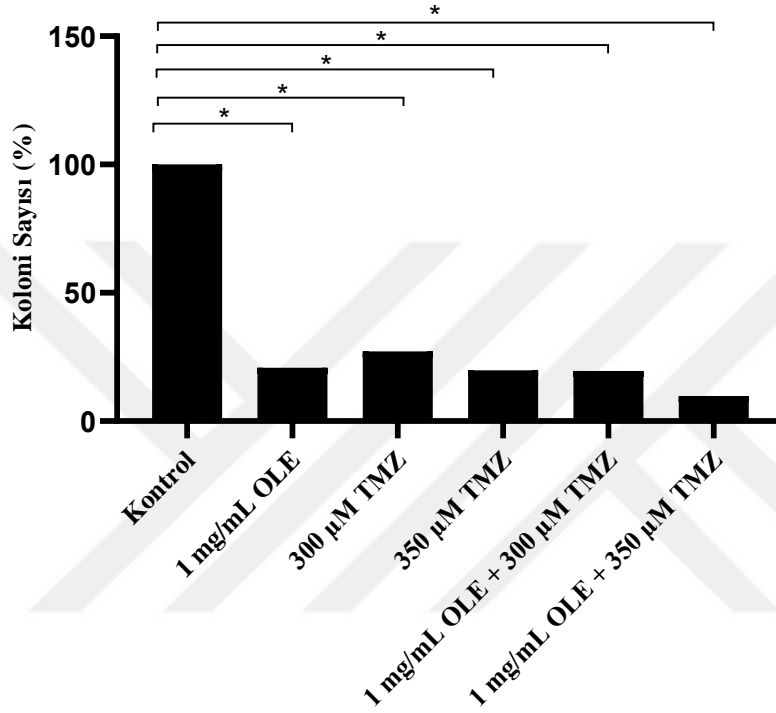


Şekil 51. OLE ve TMZ'nin U87MG hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkileri (a) Kontrol (Muamelesiz U87MG), (b) 1 mg/ml OLE, (c) 300 µM TMZ, (d) 350 µM TMZ ve (e) 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ, (f) 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ.

Kontrol olarak kullanılan muamele edilmemiş U87MG hücrelerinin ortalama koloni sayısı 235 iken, 1 mg/ml OLE, 300 µM TMZ, 350 µM TMZ, 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ, 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin ortalama koloni sayısı sırasıyla; 49, 64, 70, 46 ve 23 olarak tespit edildi (Şekil 52). Oluşan koloni sayılarının belirlenmesi, koloni boyutlarına bakılmadan gerçekleştirildi. Şekil 51'de görüldüğü gibi muamele edilmemiş U87MG hücrelerinin oluşturduğu koloni boyutlarının, doz uygulanan diğer U87MG hücre gruplarının koloni boyutlarından daha büyük olduğu tespit edildi. Deney kaplarındaki ortalama



kaplama verimlilikleri ise muamelesiz U87MG hücrelerinde %23.5, dozların yukarıda verilen sırayla ortalama kaplama verimlilikleri; %4.9, %6.4, %7.0, %4.6 ve %2.3 olarak belirlendi. Aynı zamanda muamelesiz U87MG hücrelerine göre koloni oluşum oranları belirtilen sırayla, %20.8 %27.2, %29.7, %19.5 ve %9.7 olduğu saptandı (Tablo 29).



Şekil 52. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun U87MG hücrelerinde, muamele edilmeyen U87MG hücrelerine kıyasla koloni yeteneklerine etkisi (\* p < 0.001, Bağımsız t-test). Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

Tablo 29. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun U87MG hücrelerinin koloni oluşumu üzerine etkisi.

Dozlar	Ortalama Koloni Sayısı	Kaplama verimliliği (%)	Koloni oluşum oranları (%)
Muamele edilmemiş U87MG hücresi	235	%23.5	100%
1 mg/ml OLE	49	%4.9	%20.8
300 uM TMZ	64	%6.4	%27.2
350 uM TMZ	70	%7.0	%29.7
1 mg/ml OLE + 300 uM TMZ	46	%4.6	%19.5
1 mg/ml OLE + 350 uM TMZ	23	%2.3	%9.7

#### 4.4. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin MT ile İlişkili Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkileri

##### 4.4.1. T98G Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonlarının MT ile İlişkili Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkileri

OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının T98G hücrelerinde MT mekanizması ile ilişkili *E-kaderin*, *N-kaderin*, *Twist*, *Snail* ve *Zeb1* genlerinde mRNA ekspresyon seviyesine etkisinin belirlenmesi amacıyla etkin dozlardan gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 30'da gösterildi.

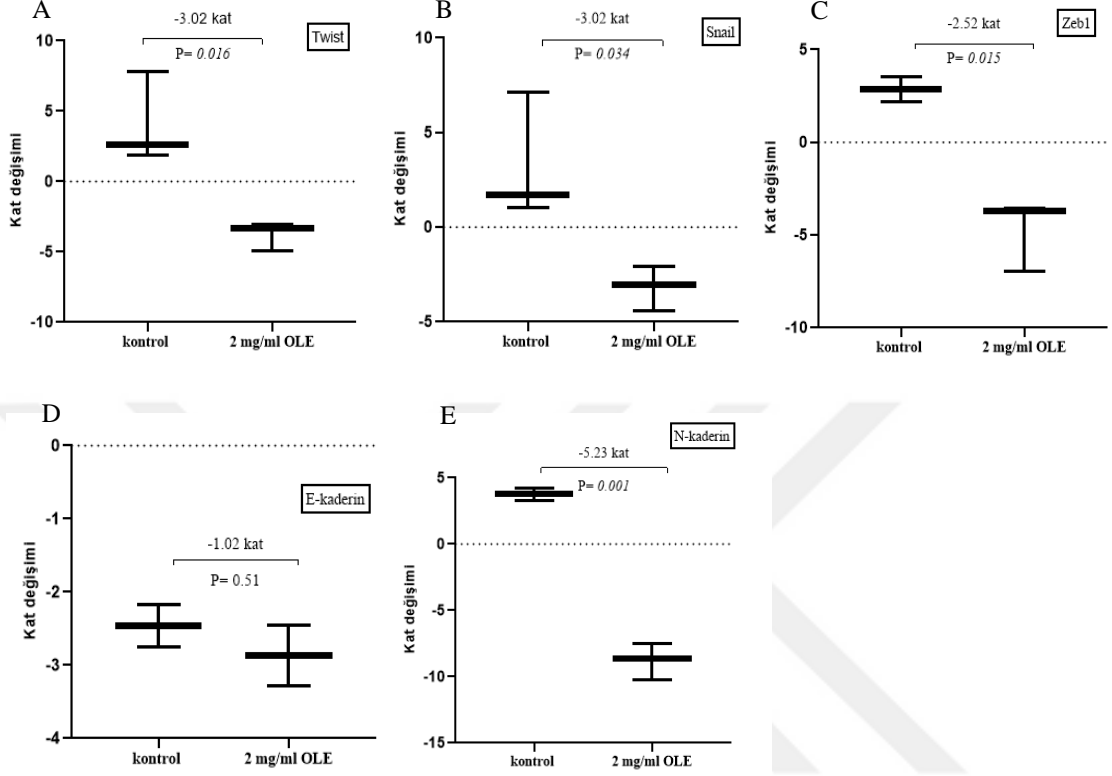
Tablo 30. T98G hücrelerinde, kontrole göre MT ile ilişkili genlerin ekspresyon değerleri.

	<i>Twist</i>	<i>Snail</i>	<i>Zeb1</i>	<i>E-kaderin</i>	<i>N-kaderin</i>
<b>2 mg/ml OLE</b>					
2ΔCT	0,0259	0,003621	0,006824	0,000001	0,009272
Kat Değişimi	-3.02 kat	-3.02 kat	-2.52 kat	-1.02 kat	-5.23 kat
p değeri	p= 0.016*	p= 0.034*	p= 0.015*	p= 0.51	p= 0.001*
<b>350 μM TMZ</b>					
2ΔCT	0,018305	0,002039	0,002034	0,000004	0,002913
Kat Değişimi	- 5.21 kat	- 5.37 kat	-6.49 kat	1.37 kat	-16.66 kat
p değeri	p= 0.013*	p= 0.031*	p= 0.004*	p= 0.24	p= 0.001*
<b>400 μM TMZ</b>					
2ΔCT	0,055671	0,003833	0,00406	0,000003	0,007612
Kat Değişimi	- 1.71 kat	-2.86 kat	- 4.23 kat	4.16 kat	- 3.54 kat
p değeri	p= 0.040*	p= 0.023*	p= 0.047*	p= 0.070	p= 0.175
<b>2 mg/ml OLE + 350 μM TMZ</b>					
2ΔCT	0,02063	0,010483	0,012051	0,000057	0,045737
Kat Değişimi	-4.62 kat	-1.04 kat	-1.42 kat	21.26 kat	-1.06 kat
p değeri	p=0.010*	p=0.167	p=0.005*	p=0.043*	p=0.000*
<b>2 mg/ml OLE + 400 μM TMZ</b>					
2ΔCT	0,034779	0,007676	0,013023	0,000014	0,039939
Kat Değişimi	-2.74 kat	-1.43 kat	-1.32 kat	11.13 kat	-1.21 kat
p değeri	p=0.028*	p=0.071	p=0.003*	p=0.044*	p=0.001*

\*: İstatistiksel olarak anlamlı, p<0.05

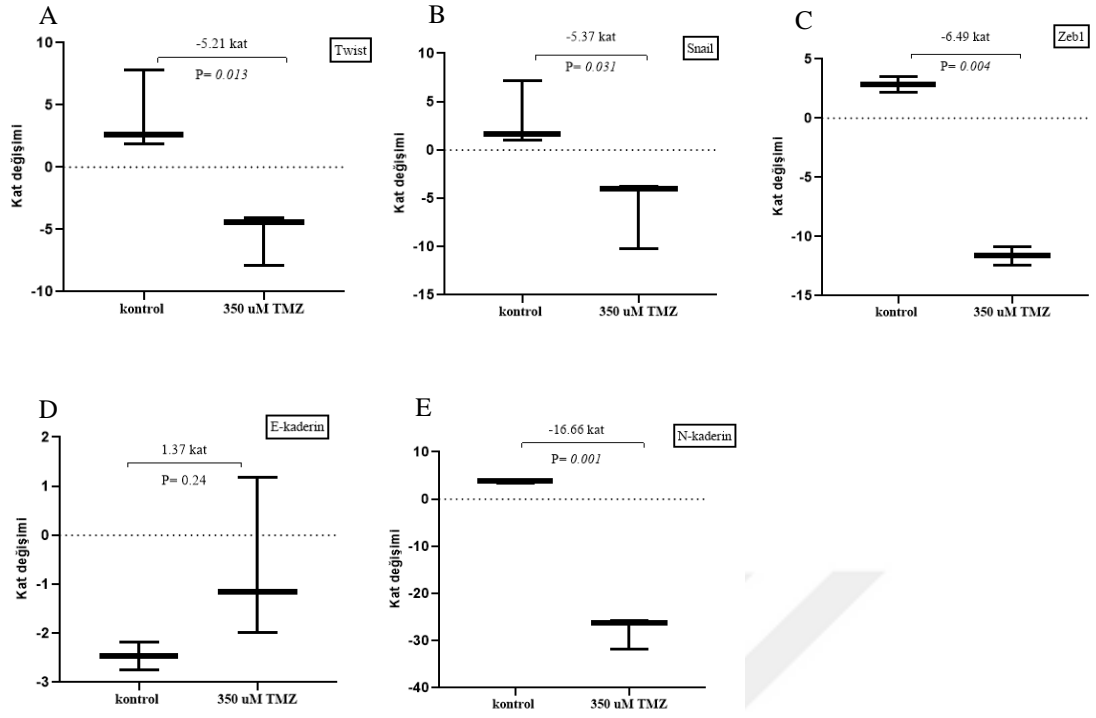
2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz T98G hücreleri (kontrol) ile karşılaştırılmasında *Twist*, *Snail*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon

seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi (sırasıyla; -3.02 kat  $p=0.016$ , -3.02 kat  $p=0.034$ , -2.52 kat  $p=0.015$ , -5.23 kat  $p=0.001$ ; Şekil 53).



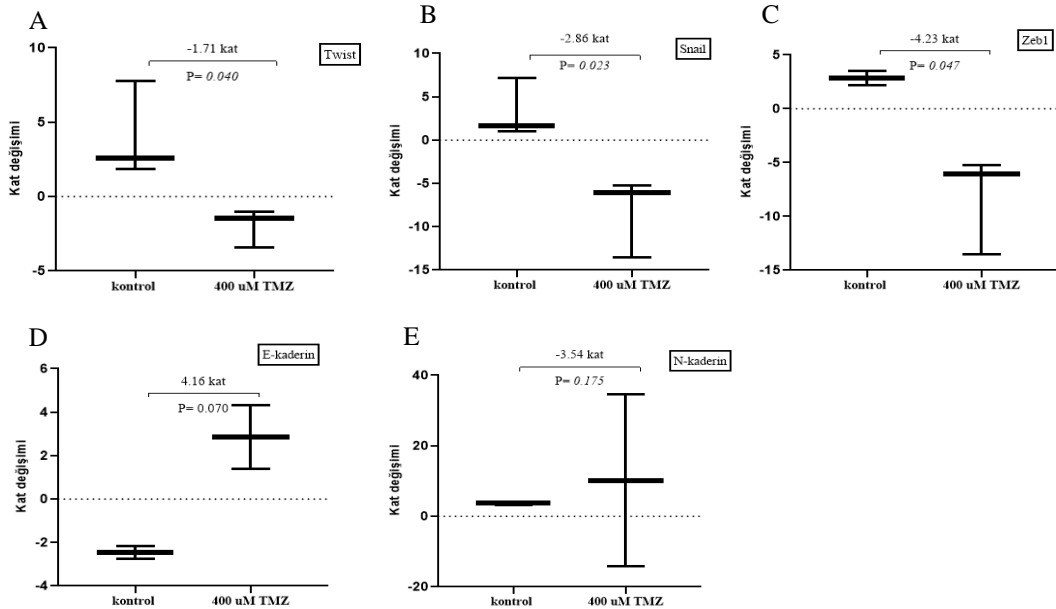
Şekil 53. T98G hücrelerinde OLE'nin MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz T98G hücrelerine göre *Twist*, *Snail*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldü (sırasıyla, - 5.21 kat  $p=0.013$ , - 5.37 kat  $p=0.031$ , - 6.49 kat  $p=0.004$ , -16.66 kat  $p=0.001$ ; Şekil 54).



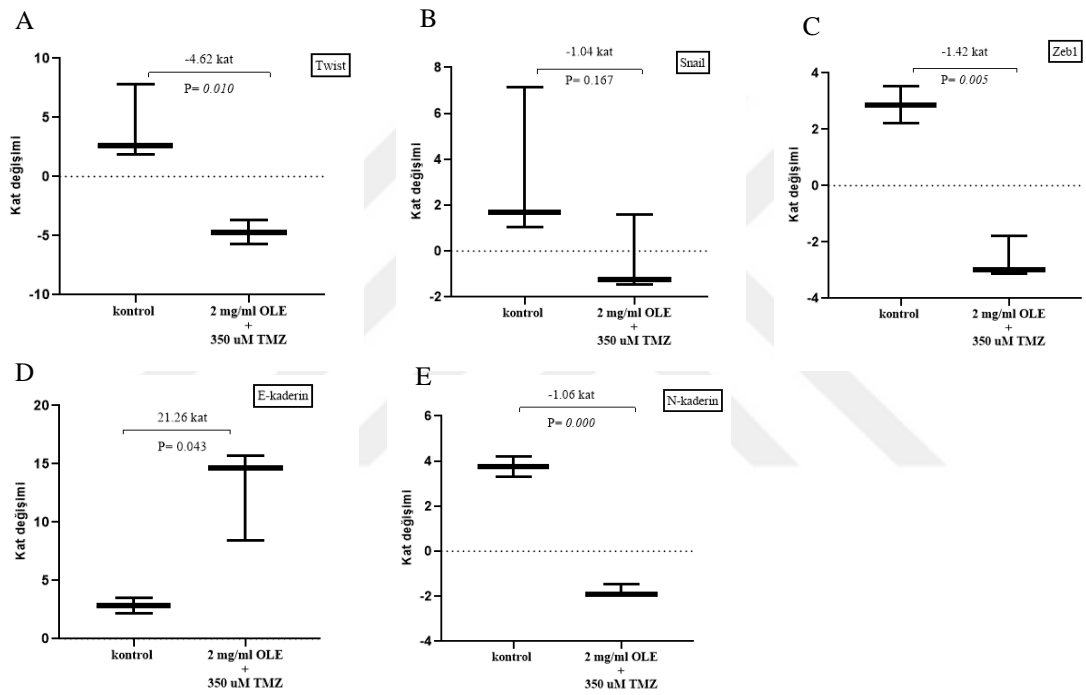
Şekil 54. T98G hücrelerinde 350 µM TMZ'nin MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

Hücrelerin 400 µM TMZ ile muamele edilmesi *Twist*, *Snail*, *Zeb1* genlerine etki ederek ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı (sırasıyla; - 1.71 kat p=0.040, -2.86 kat p=0.023, - 4.23 kat p=0.047; Şekil 55).

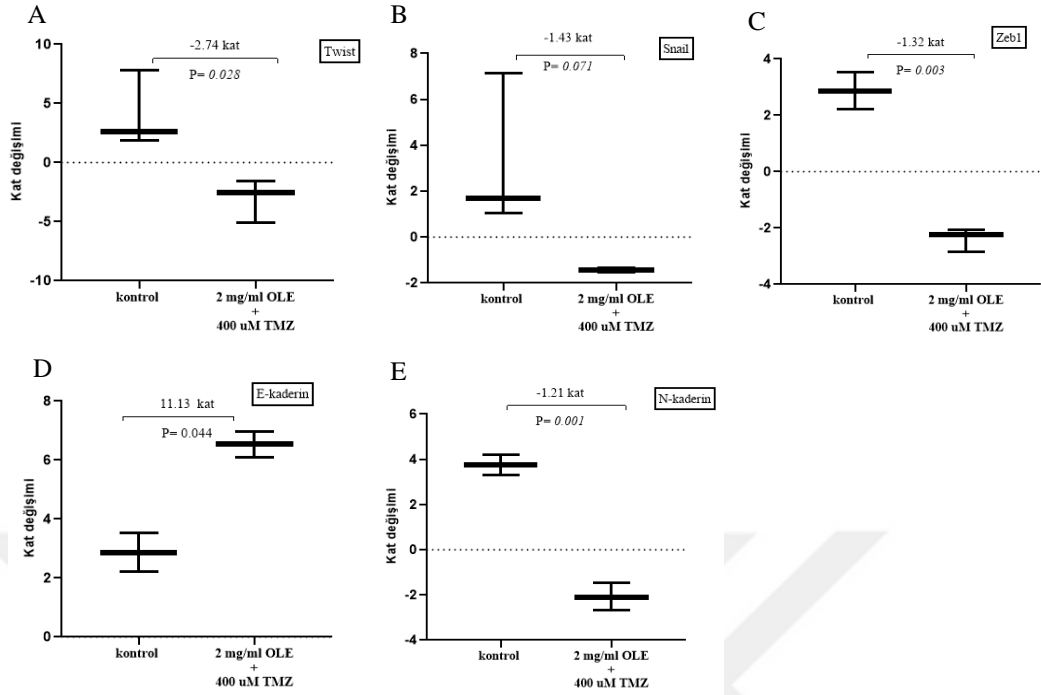


Şekil 55. T98G hücrelerinde 400 µM TMZ'nin MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

OLE+TMZ kombinasyonlarında, 2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ ve 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerde *Twist*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Tek başlarına OLE ve TMZ muamele edilen hücrelerde *E-kaderin* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmezken, 2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ ve 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ kombinasyonları ile muamelesinde *E-kaderin* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla; 21.26 kat p=0.043, 11.13 kat p=0.044; Şekil 56 ve Şekil 57).

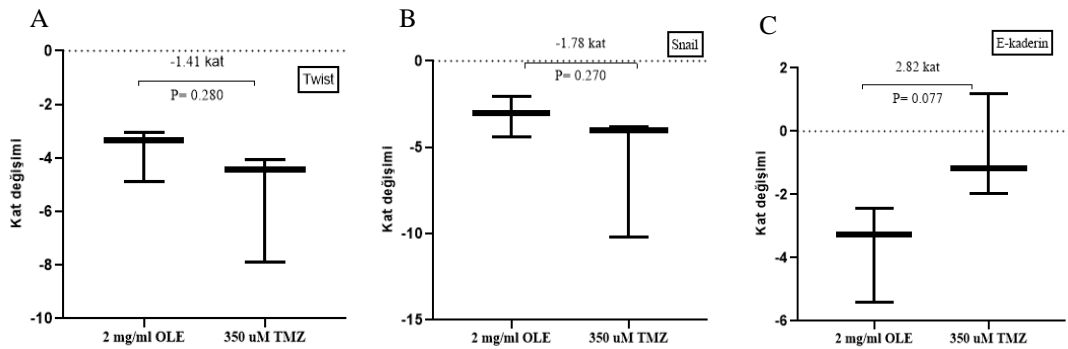


Şekil 56. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ kombinasyonunun MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

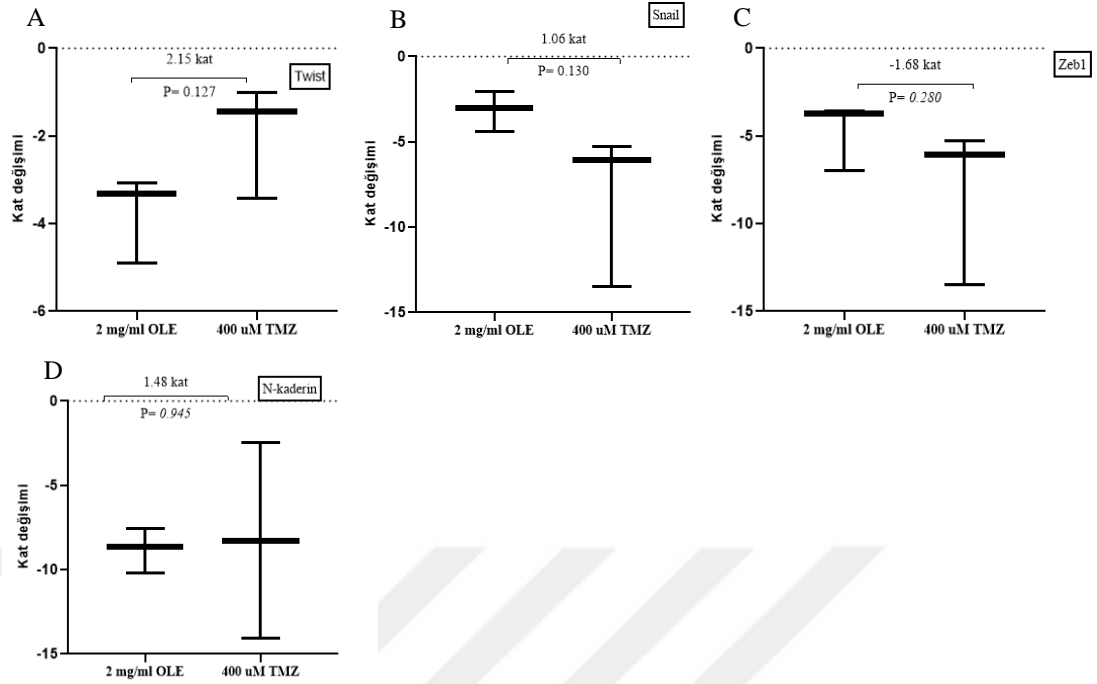


Şekil 57. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ kombinasyonunun MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin, 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücreler ile karşılaştırılmasında Şekil 58’te gösterildiği gibi *Twist*, *Snail* ve *E-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde, 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücreler ile karşılaştırılmasında ise Şekil 59’da gösterildiği gibi *Twist*, *Snail*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanamadı. Bu sonuç OLE’nin TMZ ile benzer etki gösterdiğini doğruladı.

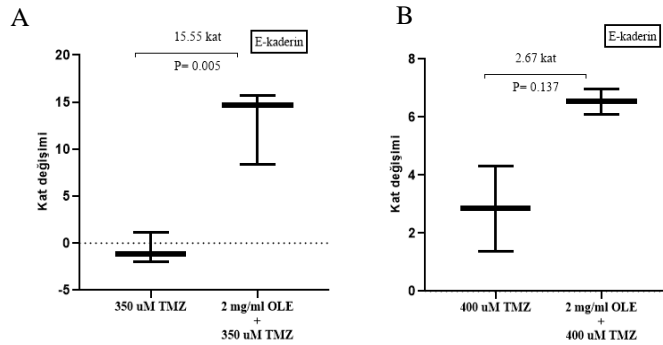


Şekil 58. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile 350  $\mu$ M TMZ’nin karşılaştırılmalı MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *E-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.



Şekil 59. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile 400 µM TMZ'nin karşılaştırılmalı MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1* (D) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmiş T98G hücresi.

350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin, 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin OLE + 400 µM TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmasında *E-kaderin* ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlendi (sırasıyla; 15.55 kat  $p=0.005$ , 2.67 kat  $p=0.137$ ; Şekil 60). Bu sonuç OLE'nin TMZ'nin GB hücreleri üzerindeki tedavi edici etkinliğini desteklediğini göstermektedir.



Şekil 60. T98G hücrelerinde 350 µM TMZ ile 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ'nin (A) ve 400 µM TMZ ile 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ'nin (B) karşılaştırılmalı *E-kaderin* geninin ekspresyon seviyesine etkisi. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

#### 4.4.2. U87MG Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonlarının MT ile ilişkili Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkileri

U87MG hücrelerinde, OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının MT mekanizması ile ilişkili *E-kaderin*, *N-kaderin*, *Twist*, *Snail* ve *Zeb1* genlerinde mRNA ekspresyon seviyesine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen veriler Tablo 31’de gösterildi.

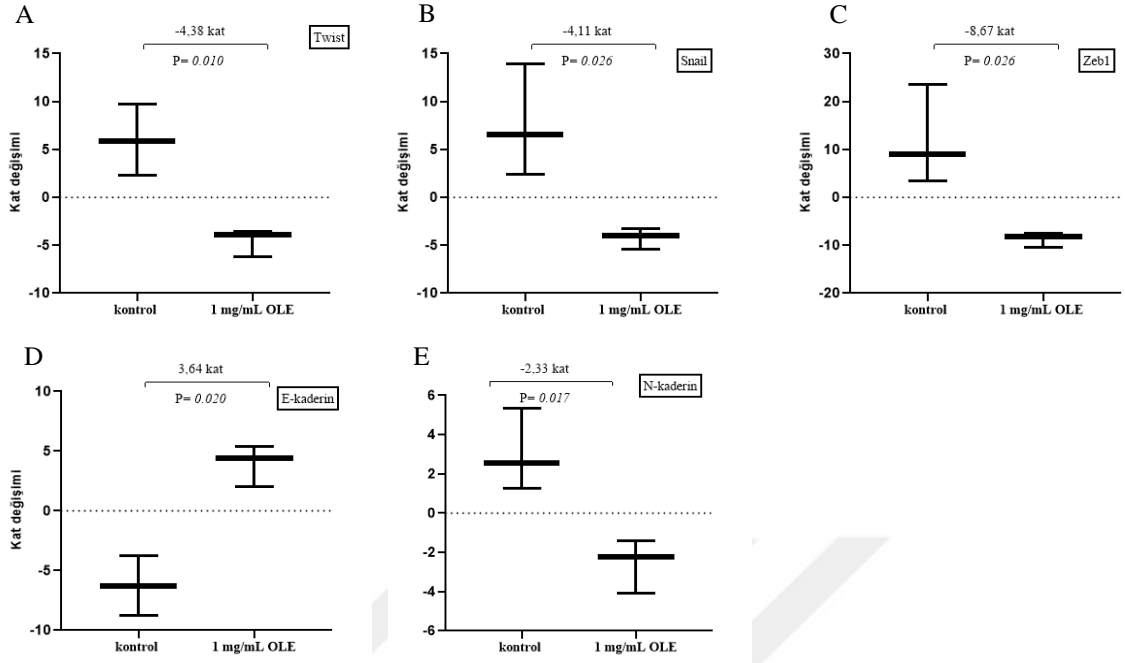
Tablo 31. U87MG hücrelerinde MT ile ilişkili genlerin ekspresyon değerleri.

		<i>Twist</i>	<i>Snail</i>	<i>Zeb1</i>	<i>E-kaderin</i>	<i>N-kaderin</i>
1 mg/ml OLE						
	2 $\Delta$ CT	0,018219	0,003053	0,003205	0,00003	0,001529
	Kat değişimi	-4.38 kat	-4.11 kat	-8.67 kat	3.64 kat	-2.33 kat
	p değeri	p= 0.010*	p= 0.026*	p= 0.026*	p= 0.020*	p= 0.017*
300 $\mu$ M TMZ						
	2 $\Delta$ CT	0,017566	0,002029	0,002344	0,000025	0,001288
	Kat değişimi	-4.54 kat	-6.18 kat	-11.85 kat	2.99 kat	-2.76 kat
	p değeri	p= 0.009*	p= 0.017*	p= 0.020*	p= 0.018*	p= 0.015*
350 $\mu$ M TMZ						
	2 $\Delta$ CT	0,011134	0,001342	0,001897	0,000011	0,001182
	Kat değişimi	-7.17 kat	-9.35 kat	- 14.65 kat	1.29 kat	- 3.01 kat
	p değeri	p= 0.005*	p= 0.011*	p= 0.017*	p= 0.136	p= 0.018*
1 mg/ml OLE + 300 $\mu$ M TMZ						
	2 $\Delta$ CT	0,019289	0,002632	0,005123	0,000006	0,001363
	Kat değişimi	-4.14 kat	-4.76 kat	-5.42 kat	1.30 kat	-2.61 kat
	p değeri	p=0.009*	p=0.021*	p=0.043*	p=0.716	p=0.011*
1 mg/ml OLE + 350 $\mu$ M TMZ						
	2 $\Delta$ CT	0,014485	0,001788	0,003919	0,000006	0,001556
	Kat değişimi	-5.51 kat	-7.02 kat	-7.09 kat	1.36 kat	-2.29 kat
	p değeri	p=0.007*	p=0.014*	p=0.033*	p=0.157	p=0.017*

\*: İstatistiksel olarak anlamlı, p<0.05

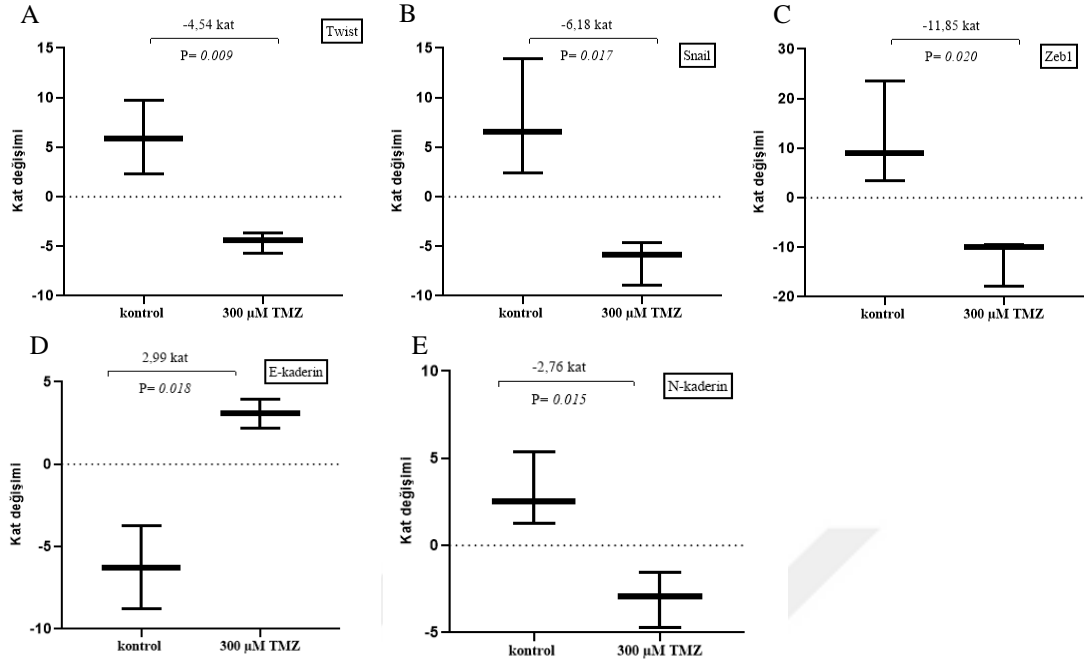
1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerin, muamelesiz U87MG hücreleri (kontrol) ile kıyaslandığında *Twist*, *Snail*, *Zeb1*, *E-kaderin* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi (sırasıyla; -4.38 kat p=0.010, -4.11 kat p=0.026, -8.67 kat p=0.026, 3.64 kat p=0.020, -2.33 kat p=0.017; Şekil 61).





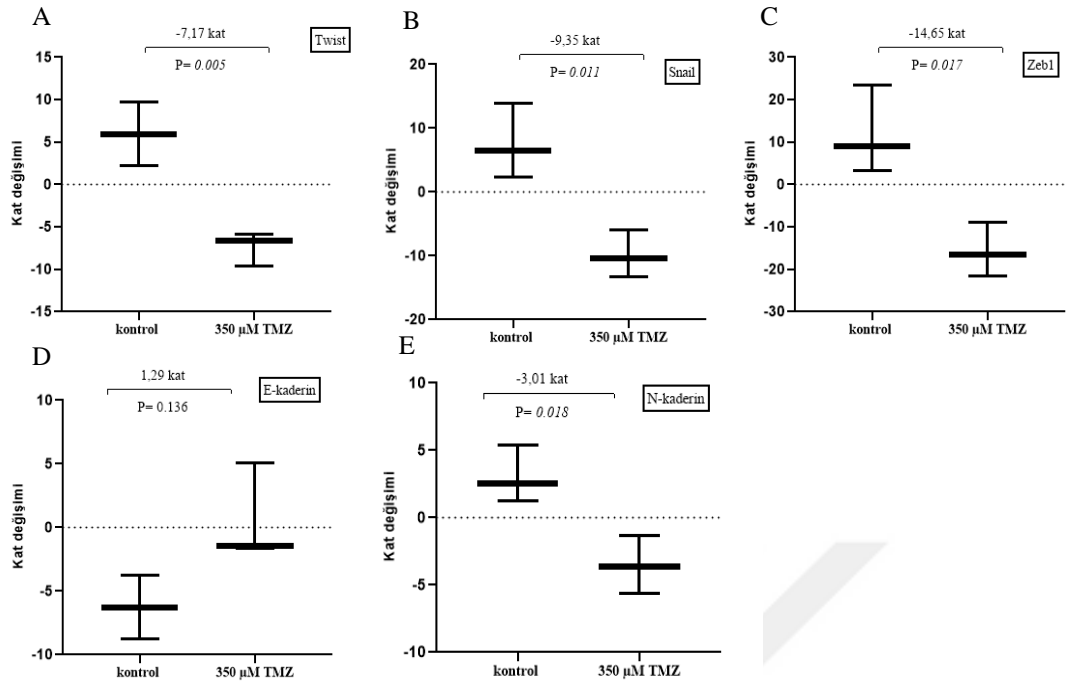
Şekil 61. U87MG hücrelerinde OLE'nin MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz U87MG hücrelerine göre *Twist*, *Snail*, *Zeb1*, *E-kaderin* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldü (sırasıyla, -4.54 kat  $p=0.009$ , - 6.18 kat  $p=0.017$ , -11.85 kat  $p=0.020$ , 2.99 kat  $p=0.018$ , -2.76 kat  $p=0.015$ ; Şekil 62).



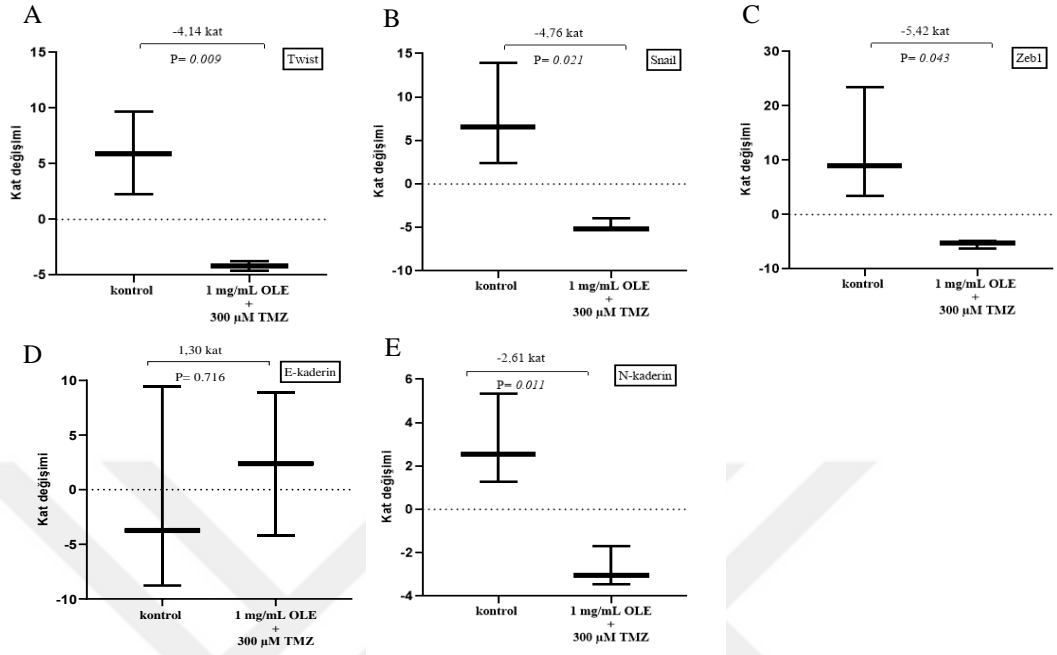
Şekil 62. U87MG hücrelerinde 300 µM TMZ'nin MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

Hücrelerin 350 µM TMZ ile muamele edilmesi *Twist*, *Snail*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi (sırasıyla; -7.17 kat p=0.005, -9.35 kat p=0.011, - 14.65 kat p=0.017, -3.01 kat p=0.018; Şekil 63).

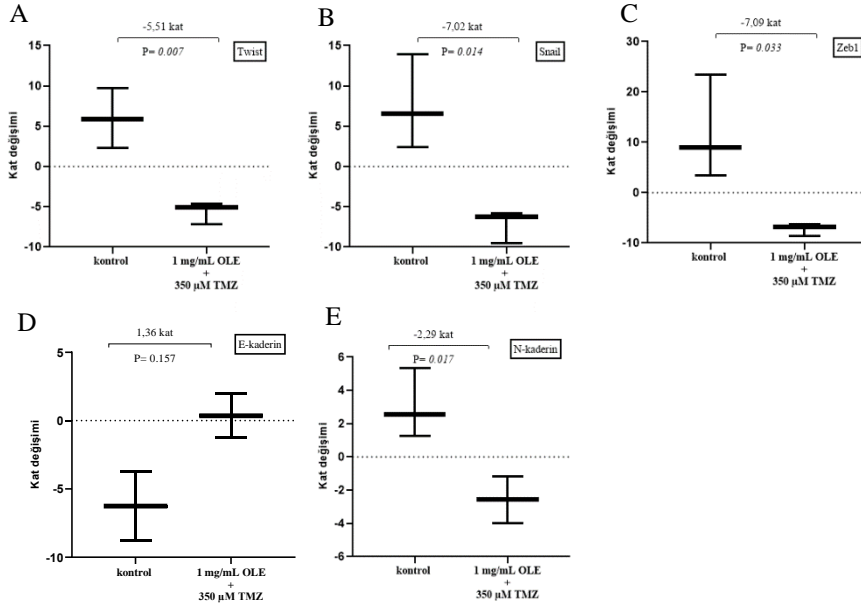


Şekil 63. U87MG hücrelerinde 350 µM TMZ'nin MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

MT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri OLE+TMZ kombinasyonları ile muamele edilen U87MG hücrelerinde değerlendirildiğinde, 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ve 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerde *Twist*, *Snail*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi (1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ için sırasıyla; -4.14 kat p=0.009, -4.76 kat p=0.021, -5.42 kat p=0.043, -2.61 kat p=0.011; 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ için sırasıyla -5.51 kat p=0.007, -7.02 kat p=0.014, -7.09 kat p=0.033, -2.29 kat p=0.017 Şekil 64 ve Şekil 65).

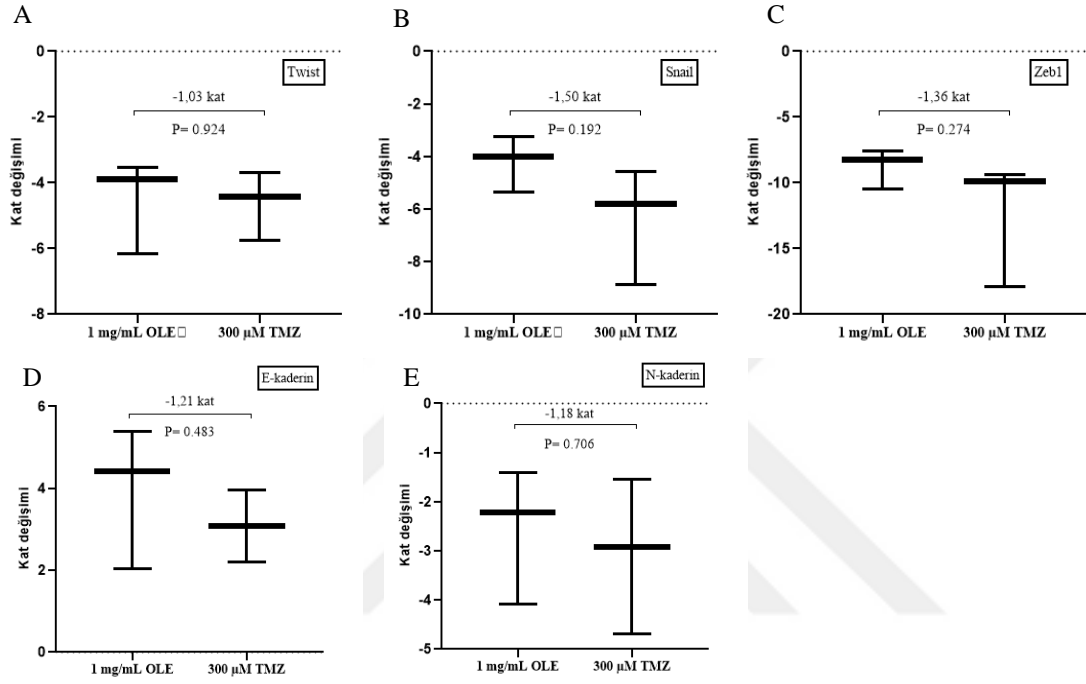


Şekil 64. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE+ 300 µM TMZ kombinasyonunun MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi

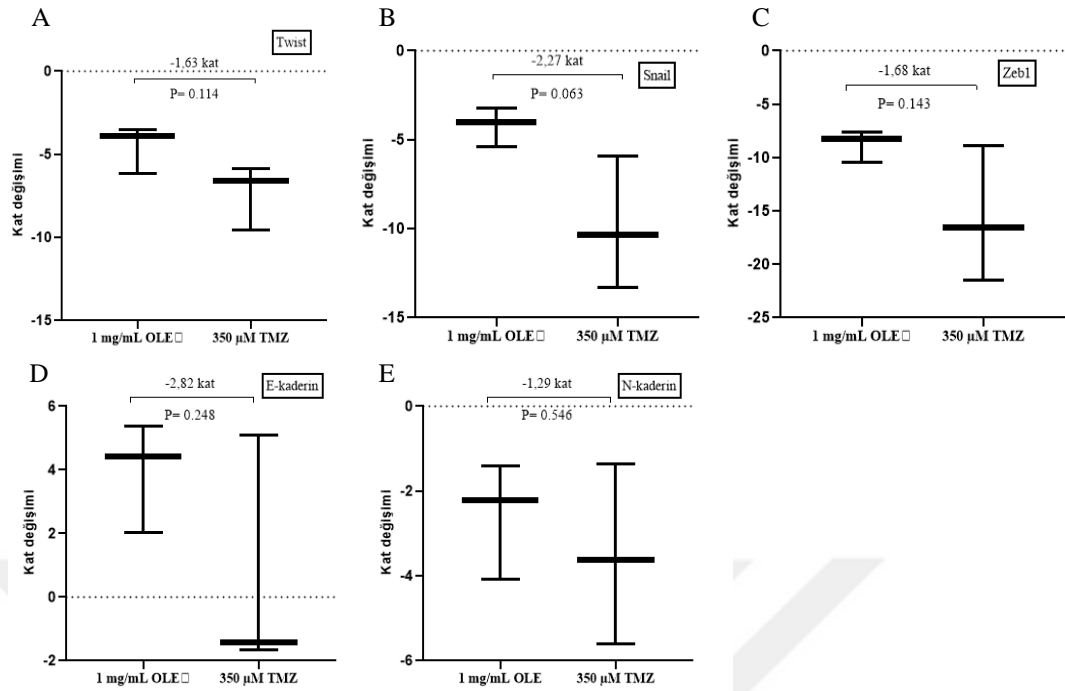


Şekil 65. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ kombinasyonunun MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi. (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin, 300  $\mu$ M ve 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücreler ile karşılaştırılmasında *Twist*, *Snail*, *Zeb*, *N-kaderin* ve *E-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak bir anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 66, Şekil 67). Bu sonuçlar OLE'nin TMZ'e benzer etki gösterdiğini belirledi.



Şekil 66. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile 300  $\mu$ M TMZ'nin karşılaştırılmalı MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.



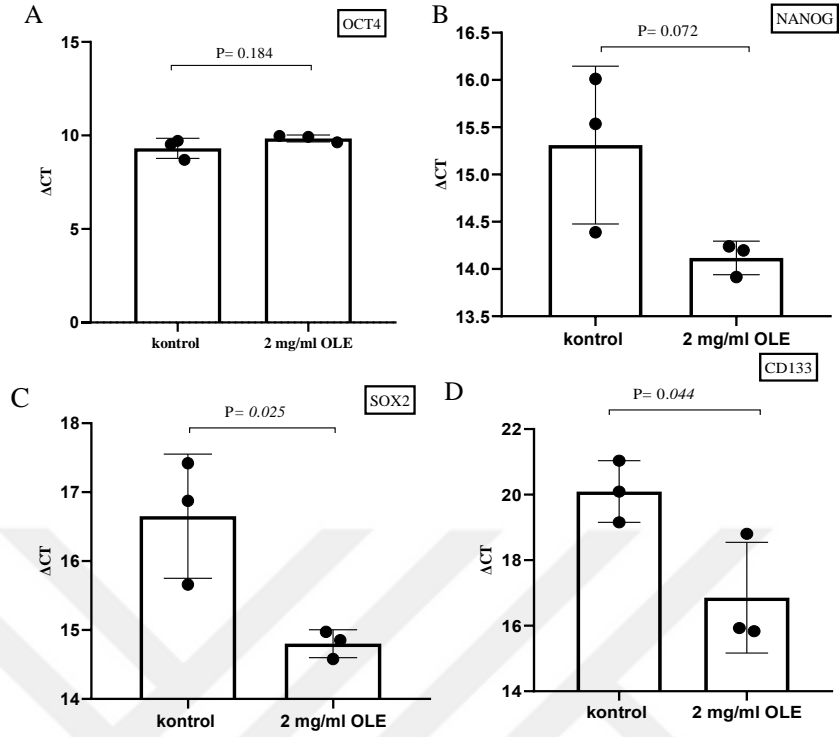
Şekil 67. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile 350 µM TMZ'nin karşılaştırılmalı MT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *Twist*, (B) *Snail*, (C) *Zeb1*, (D) *E-kaderin*, (E) *N-kaderin*.. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

#### 4.5. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin CSC Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkileri

##### 4.5.1. T98G Hücre Hatlarında OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonlarının CSC Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkileri

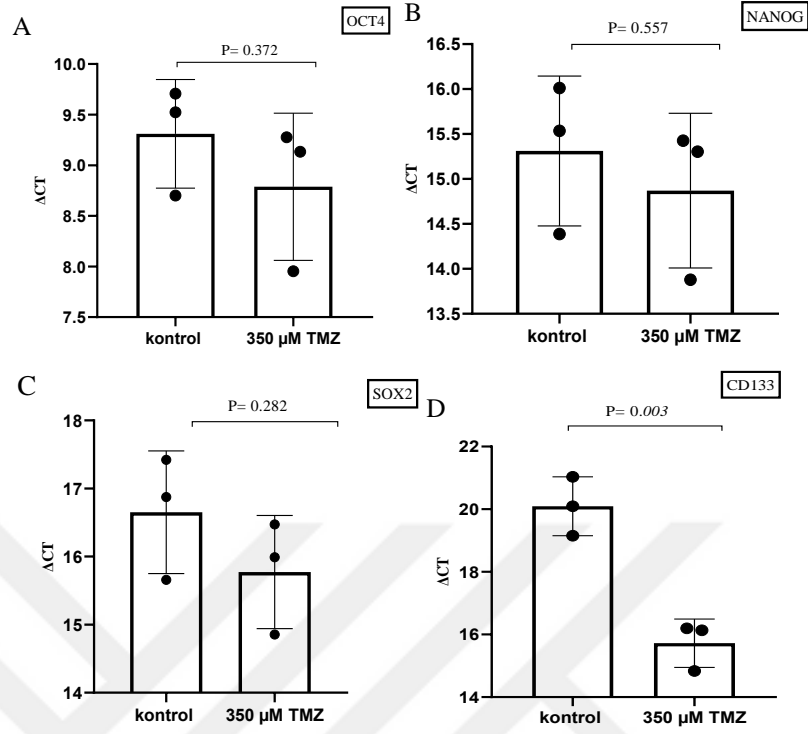
OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının T98G hücrelerinde, CSC biyobelirteçlerinden *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin mRNA ekspresyon seviyesine etkisinin belirlenmesi amacı ile istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

2 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G hücrelerin, muamelesiz T98G hücreleri ile kıyaslandığında *SOX2* ve *CD133* genlerinde ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmakla birlikte *NANOG* geninin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan azalma tespit edildi (sırasıyla; p=0.025, p=0.044, p=0.072; Şekil 68).



Şekil 68. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B)*NANOG*, (C) *SOX2* (D)*CD133*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.

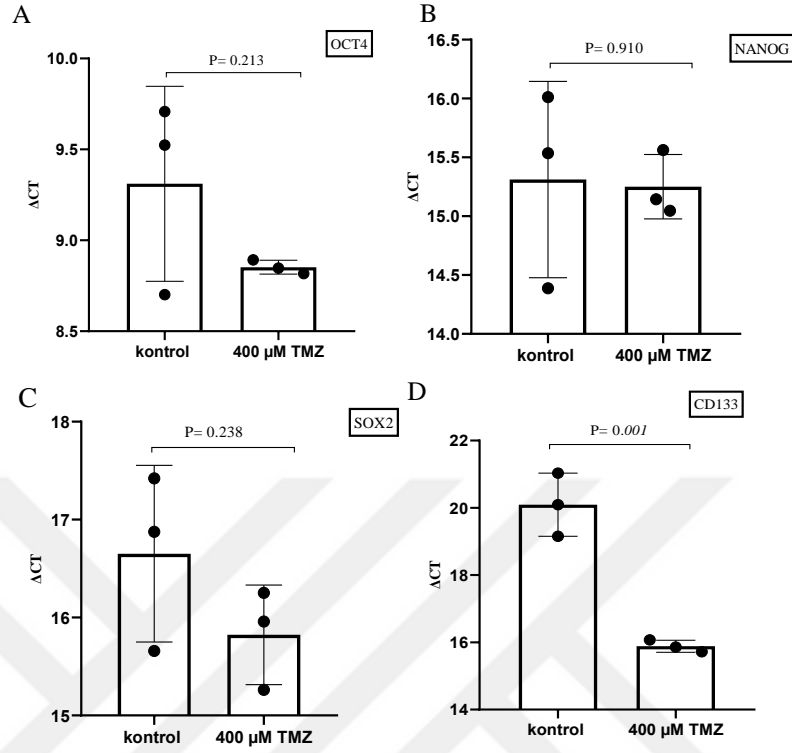
350  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinin, muamelesiz T98G hücrelerine göre *CD133* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olmakla birlikte, *OCT4*, *NANOG* ve *SOX2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan düşüş gözlemlendi (sırasıyla,  $p=0.003$ ,  $p=0.372$ ,  $p=0.557$ ,  $p=0.282$ ; Şekil 69).



Şekil 69. T98G hücrelerinde 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.

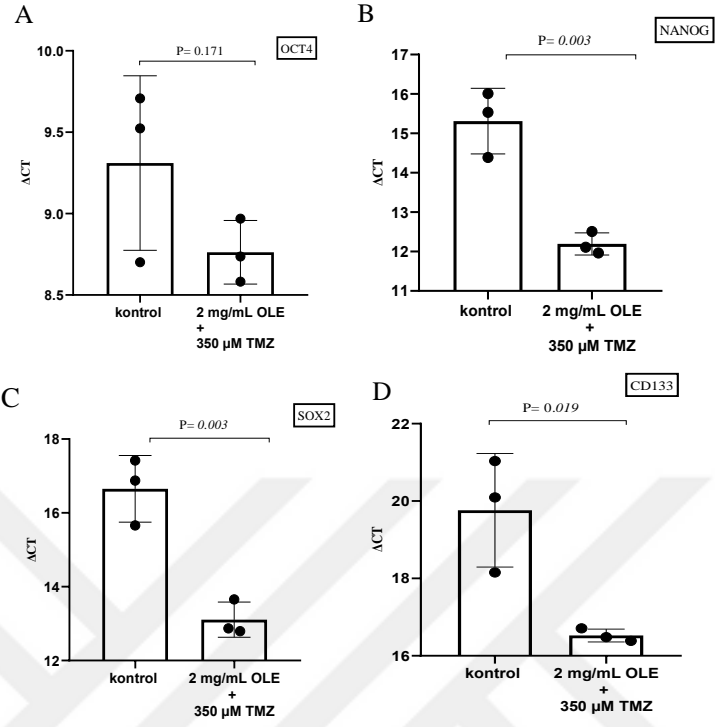
400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerde *CD133* geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olmakla birlikte *OCT4* ve *SOX2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan azalma tespit edildi (sırasıyla;  $p=0.001$ ,  $p=0.213$ ,  $p=0.238$ ; Şekil 70).



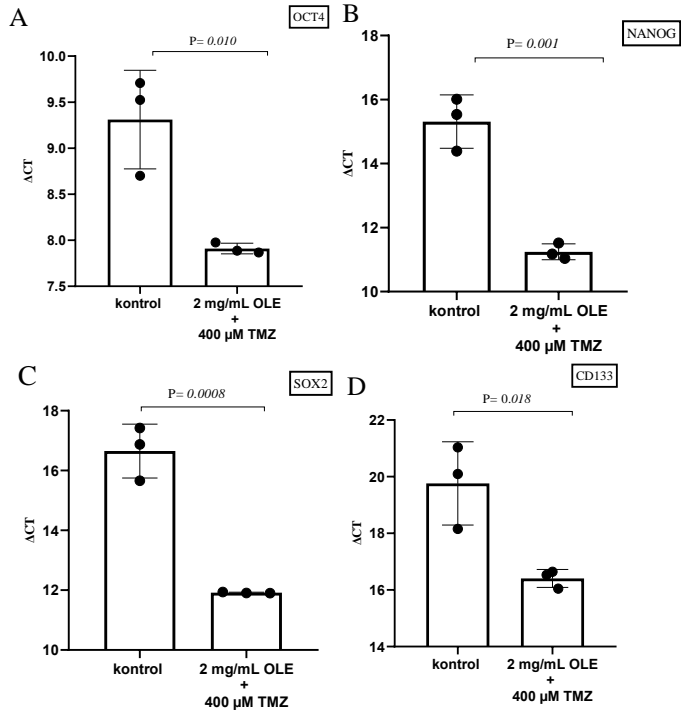


Şekil 70. T98G hücrelerinde 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

OLE+TMZ kombinasyonlarının CSC biyobelirteçleri üzerine etkilerine bakıldığında, 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerde *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmakla birlikte *OCT4* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan azalma olduğu belirlendi (sırasıyla;  $p=0.003$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.019$ ; Şekil 71). 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerde muamele edilmeyen T98G hücrelerine kıyasla *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi (sırasıyla;  $p=0.010$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.0008$ ,  $p=0.018$ ; Şekil 72).

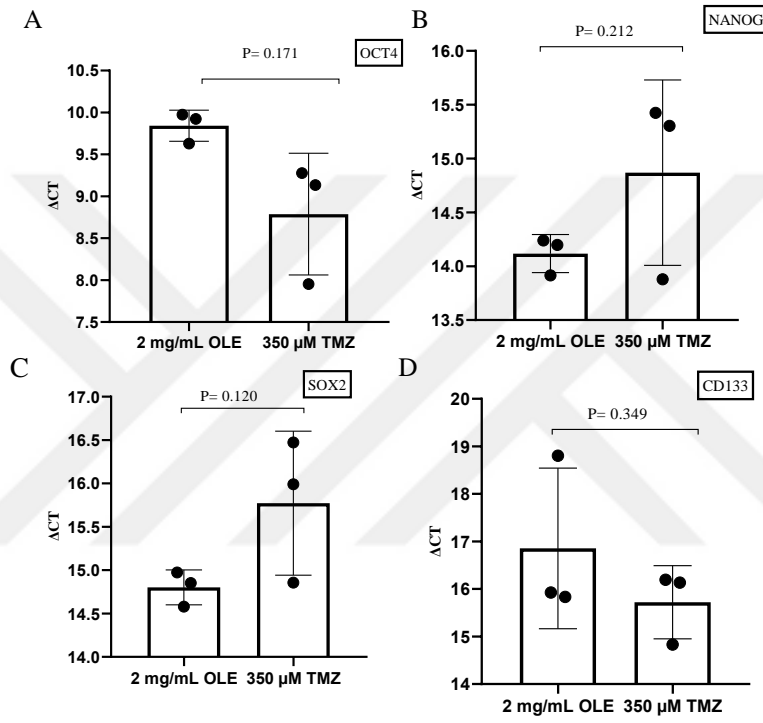


Şekil 71. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.



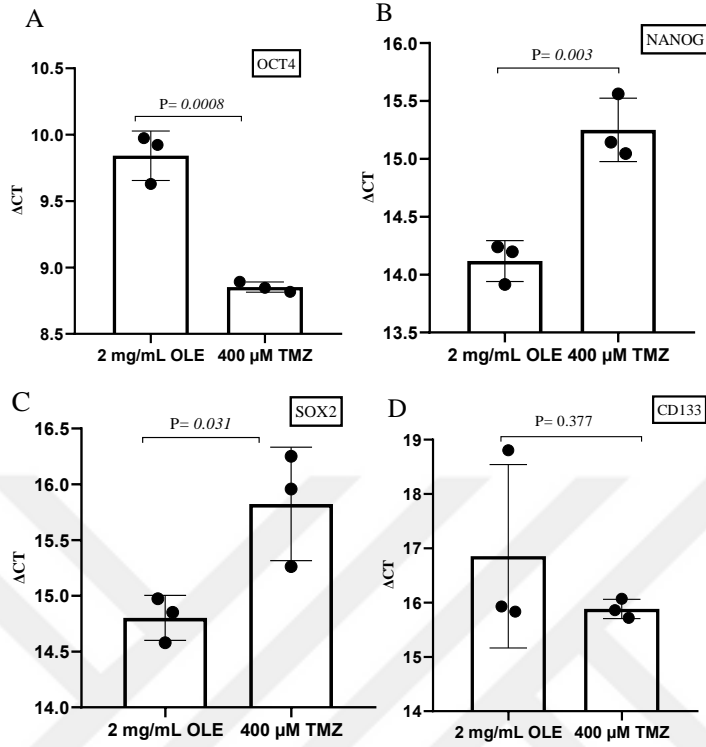
Şekil 72. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerde 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücelere kıyasla *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (sırasıyla,  $p=0.171$ ,  $p=0.212$ ,  $p=0.120$ ,  $p=0.349$ ; Şekil 73). Bu sonuç CSC belirteçlerinde OLE'nin TMZ gibi etki gösterdiğini doğruladı.



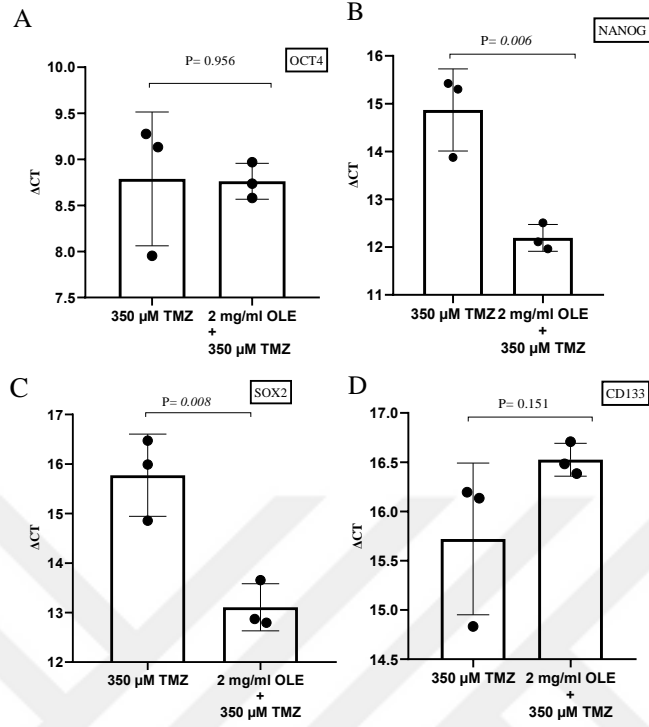
Şekil 73. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile 350  $\mu$ M TMZ'nin karşılaştırılmalı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücelerde 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücelere kıyasla *OCT4* geninin ekspresyon seviyesi anlamlı olarak daha düşük seviyede olduğu, 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücelerde ise *NANOG* ve *SOX2* genlerinin ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlemlendi (sırasıyla,  $p=0.0008$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.031$ ; Şekil 74).

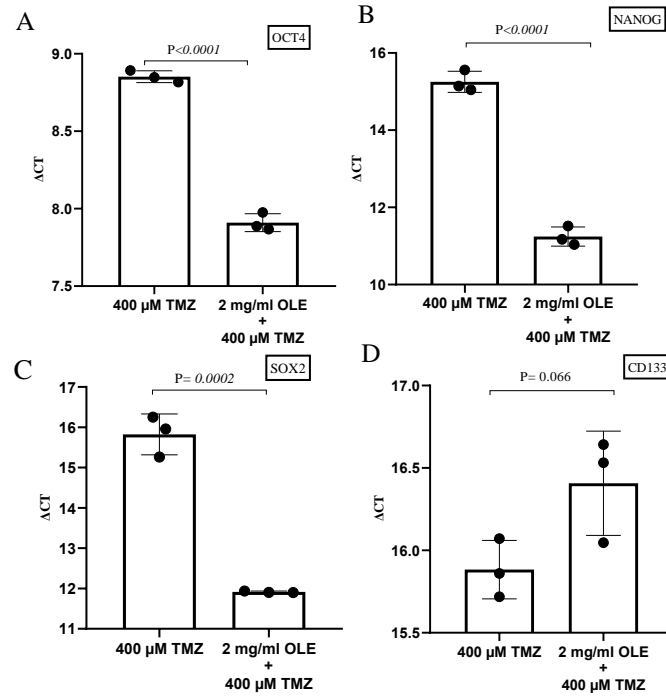


Şekil 74. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile 400 μM TMZ'nin karşılaştırılmalı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

2 mg/ml OLE + 350 μM TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin 350 μM TMZ ile muamele edilen hücreler ile karşılaştırılmasında, *NANOG* ve *SOX2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlendiği tespit edildi (sırasıyla;  $p=0.006$ ,  $p=0.008$ ; Şekil 75). 2 mg/ml OLE + 400 μM TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin tek başına 400 μM TMZ ile muamele edilen hücreler ile karşılaştırılmasında *OCT4*, *NANOG* ve *SOX2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edildi (sırasıyla;  $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ ,  $p=0.0002$ ; Şekil 76).



Şekil 75. T98G hücrelerinde 350 µM TMZ ile 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ'nin karşılaştırılmalı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

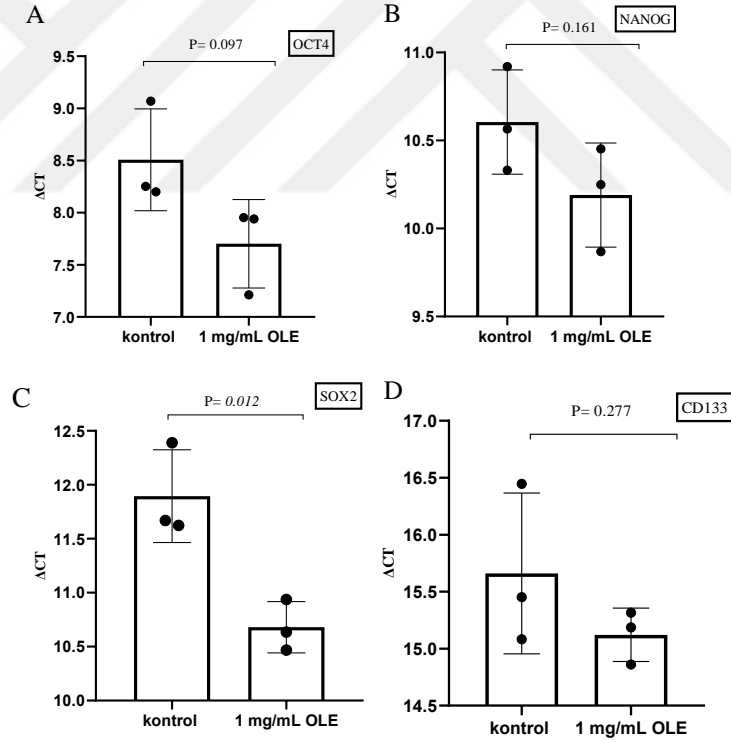


Şekil 76. T98G hücrelerinde 400 µM TMZ ile 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ'nin karşılaştırılmalı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi.

#### 4.5.2. U87MG Hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ Kombinasyonlarının CSC Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkileri

OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının U87MG hücrelerinde, CSC biyobelirteçlerinden *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin mRNA ekspresyon seviyesine etkisinin tespit edilmesi amacı ile istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

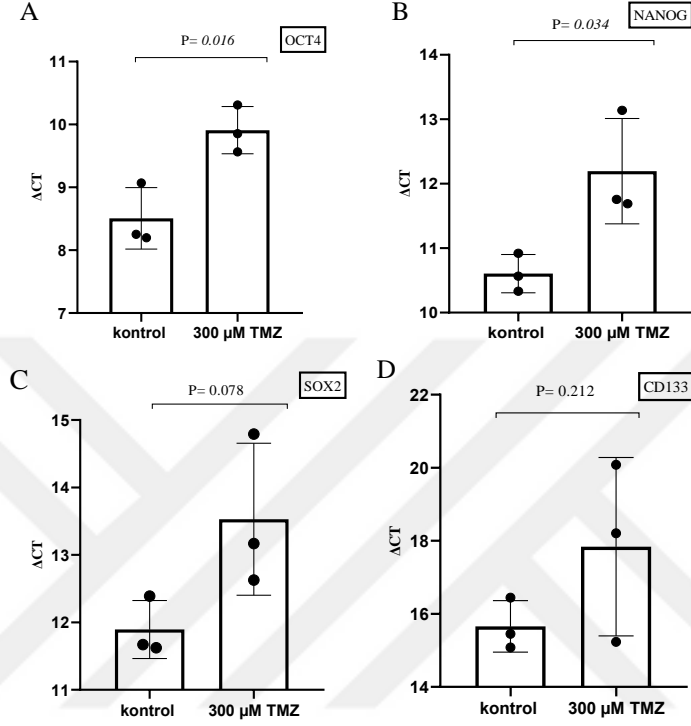
1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerin, muamelesiz U87MG hücrelerine göre *SOX2* geninde anlamlı olmakla birlikte *OCT4*, *NANOG* ve *CD133* genlerinde ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan bir azalma gösterdiği tespit edildi (sırasıyla;  $p=0.012$ ,  $p=0.097$ ,  $p=0.161$ ,  $p=0.277$ ; Şekil 77).



Şekil 77. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

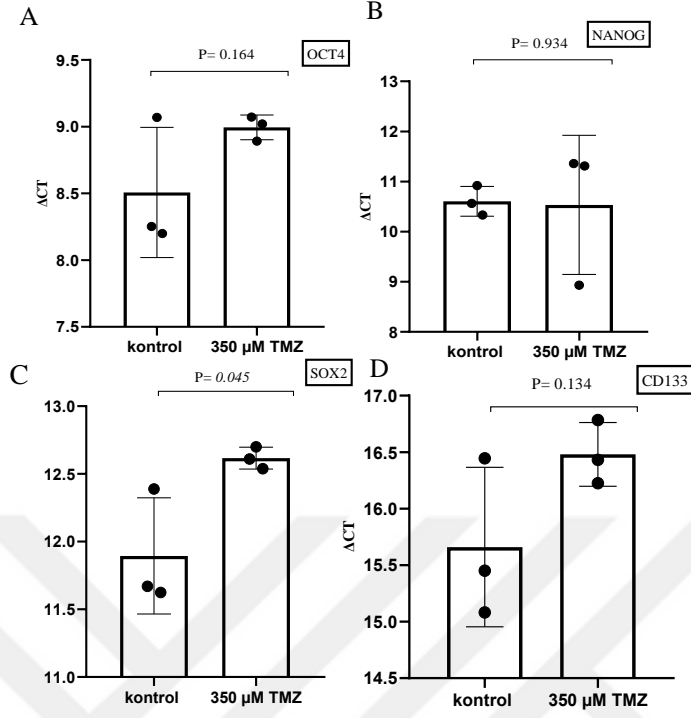
300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz U87MG hücrelerine göre (kontrol) *OCT4* ve *NANOG* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmakla birlikte, *SOX2* ve *CD133* genlerinde istatistiksel olarak

anlamliya ulaşamayan artış gzlendi (sirasıyla,  $p=0.016$ ,  $p=0.034$ ,  $p=0.078$ ,  $p=0.212$ ; Şekil 78).



Şekil 78. U87MG hrelerinde 300 µM TMZ ile muamele edilen hrelerin CSC biyobelirtelerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hresi.

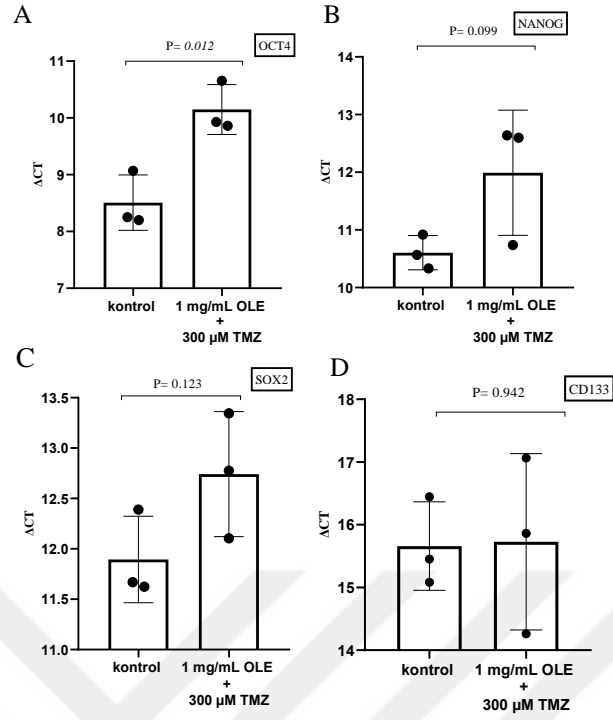
350 µM TMZ ile muamele edilen hrelerde, *SOX2* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmakla birlikte, *OCT4*, *NANOG* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan artış gzlendi (sirasıyla,  $p=0.045$ ,  $p=0.164$ ,  $p=0.934$ ,  $p=0.134$ ; Şekil 79).



Şekil 79. U87MG hücrelerinde 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

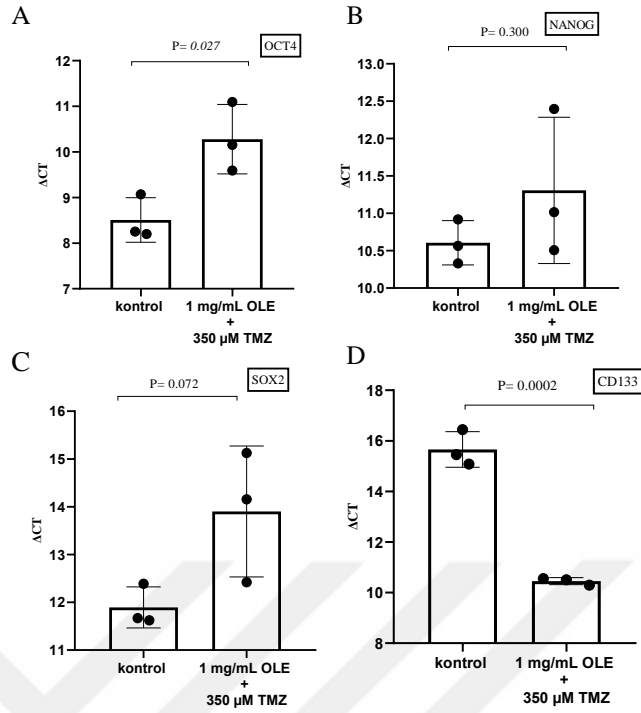
OLE+TMZ kombinasyonlarının CSC biyobelirteçlerine olan etkilerine bakıldığında, 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin muamele edilmeyen U87MG hücrelerine göre kıyaslandığında *OCT4* geninin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (p=0.012; Şekil 80).





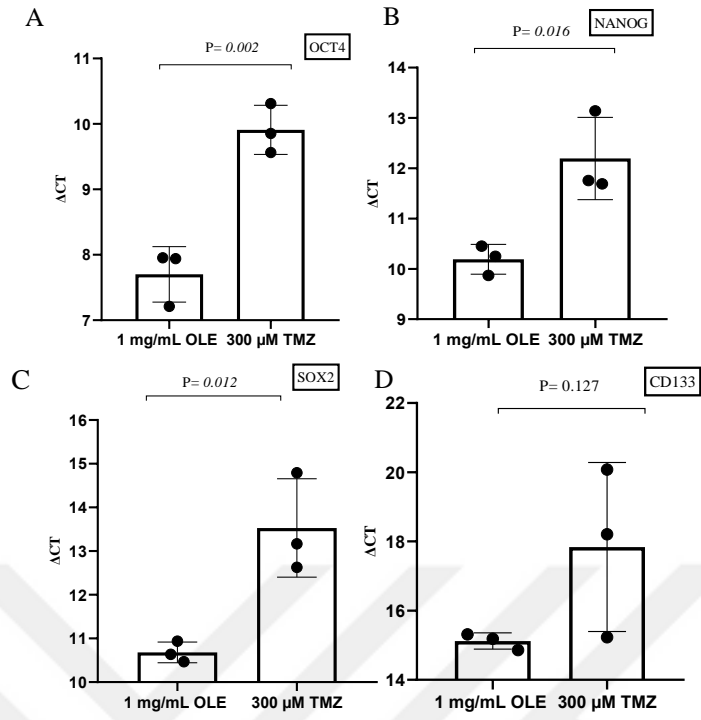
Şekil 80. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerde muamele edilmeyen U87MG hücrelerine göre *OCT4* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış, *CD133* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi (sırasıyla,  $p=0.027$ ,  $p=0.0002$ ; Şekil 81).

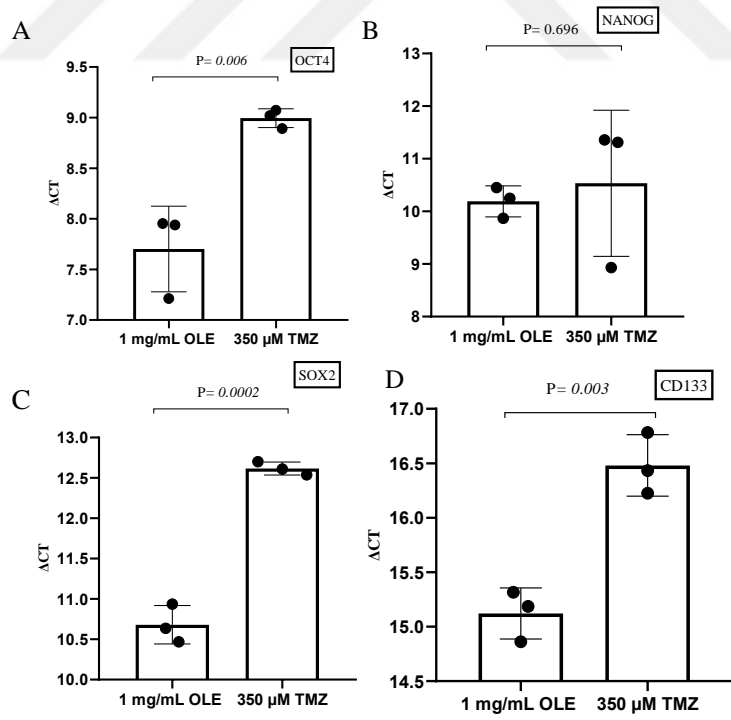


Şekil 81. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

300 µM TMZ muamele edilen hücrelerin 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücreler ile kıyaslandığında *OCT4*, *NANOG* ve *SOX2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla,  $p=0.002$ ,  $p=0.016$ ,  $p=0.012$ ; Şekil 82). 350 µM TMZ muamele edilen hücrelerin 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerle karşılaştırıldığında *OCT4*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla,  $p=0.006$ ,  $p=0.0002$ ,  $p=0.003$ ; Şekil 83). Bu sonuçlar, OLE+TMZ kombinasyonu uygulanan hücrelerde yüksek ekspresyon seviyesi gösteren CSC belirteçlerinin TMZ'den kaynaklı olduğunu göstermektedir.

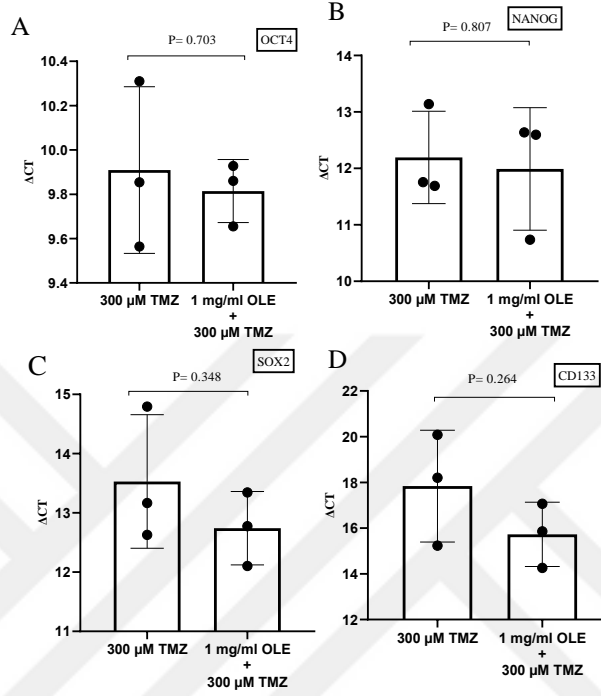


Şekil 82. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile 300 µM TMZ'nin karşılaştırılmalı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.



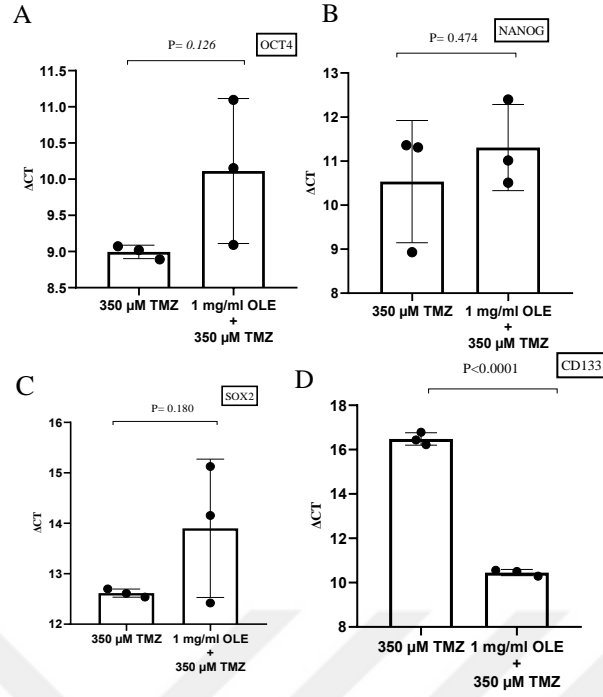
Şekil 83. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile 350 µM TMZ'nin karşılaştırılmalı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen U87MG hücreleri ile 1 mg/ml OLE + 300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinin karşılaştırılmasında Şekil 84’de gösterildiği gibi *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 84. U87MG hücrelerinde 300  $\mu$ M TMZ ile 1 mg/ml OLE +300  $\mu$ M TMZ’nin karşılaştırılmalı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B)*NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

1 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ kombinasyonu ile muamele edilen U87MG hücrelerin karşılaştırılmasında Şekil 85’de gösterildiği gibi *CD133* geninin ekspresyon seviyesinde tek başına 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda düşüş gösterdiği belirlendi ( $p < 0.0001$ ).

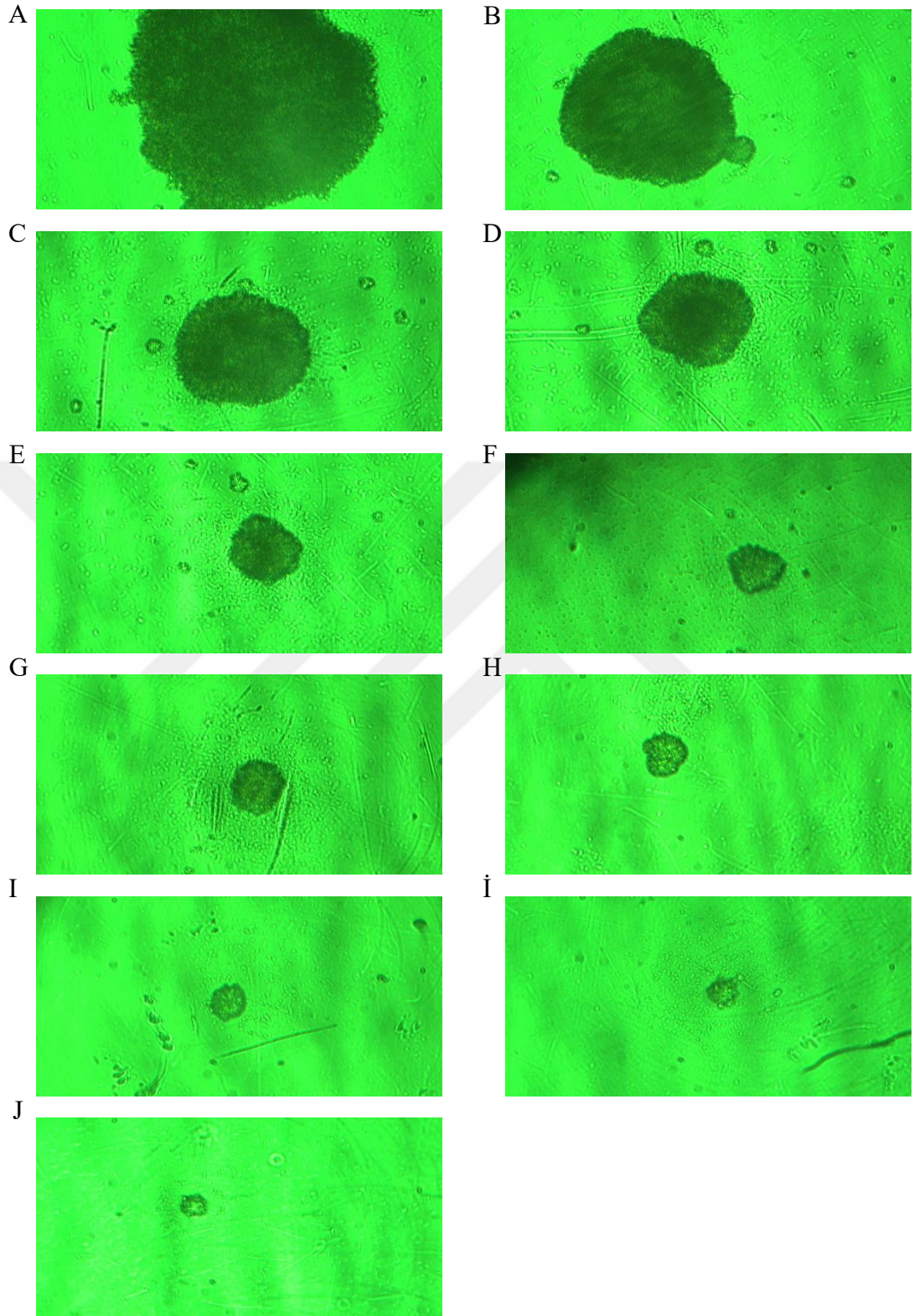


Şekil 85. U87MG hücrelerinde 350 µM TMZ ile 1 mg/ml OLE +350 µM TMZ'nin karşılaştırılmalı CSC biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *OCT4*, (B) *NANOG*, (C) *SOX2* (D) *CD133*. Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi.

## 4.6 GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin 3B Tümör Modeline Etkisinin Belirlenmesi

### 4.6.1 T98G Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin 3B Tümör Modeline Etkisinin Belirlenmesi

3B tümör modelinde en uygun hücre sayısının belirlenmesi için gerçekleştirilen optimizasyon işlemi sonucunda 40 ve 80 hücre sayılarının 3B modeli için uygun olduğu tespit edildi (Şekil 86).



Şekil 86. 3B kültür çalışmasında 24 saat sonunda T98G hücrelerinin farklı hücre sayılarındaki ekimler ile kültüre edilmiş tümör kitlelerinin boyutlarının gösterimi. (A) 40.000 hücre, (B) 20.000 hücre, (C) 10.000 hücre, (D) 5.000 hücre, (E) 2.500 hücre, (F) 1.250 hücre, (G) 625 hücre, (H) 312 hücre, (I) 156 hücre, (İ) 80 hücre, (J) 40 hücre.

OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun T98G hücrelerinde 3B tümör modeli üzerine etkisi değerlendirildiğinde, muamele edilmemiş T98G hücrelerine göre OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde tümör hacminin küçüldüğü gözlemlendi (Tablo 32).



Tablo 32. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun 3B yapıdaki T98G hücrelerinin hacmine etkileri.

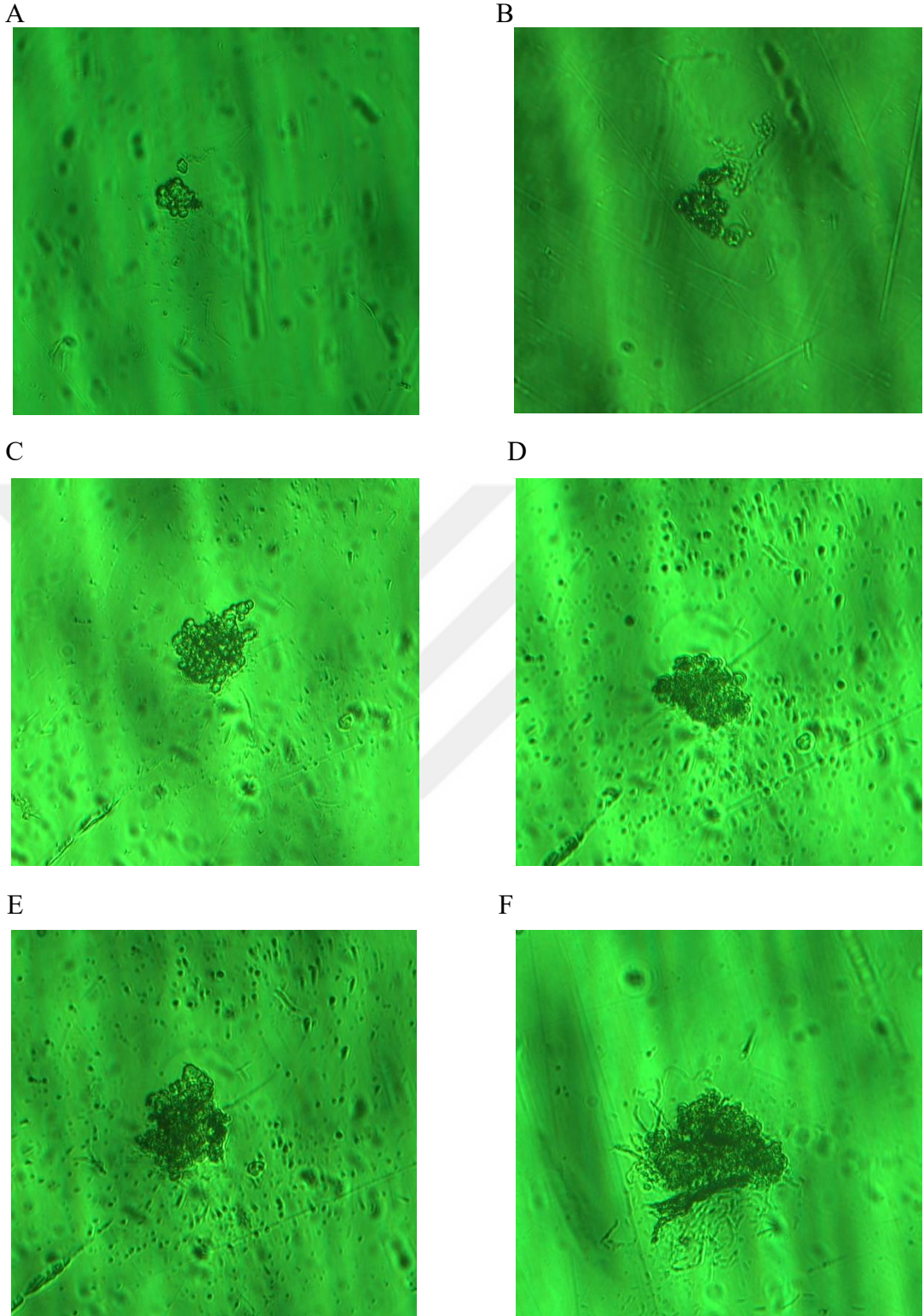
Kontrol							
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	
r1	0,3	0,48	0,4	0,48	0,54	0,8	
r2	0,3	0,43	0,61	0,35	0,8	0,56	
r3	0,2	0,23	0,5	0,4	0,56	1,06	
r4	0,18	0,22	0,48	0,67	0,9	0,54	
r ORTALAMA	0,245	0,34	0,4975	0,475	0,7	0,74	
HACİM	0,0615696	0,1645527	0,5155225	0,4486929	1,4360267	1,6965378	
2 mg/ml OLE							
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	
r1	0,3	0,26	0,26	0,22	0,21	0,24	
r2	0,3	0,24	0,5	0,3	0,13	0,25	
r3	0,2	0,48	0,2	0,31	0,15	0,13	
r4	0,18	0,2	0,25	0,15	0,25	0,2	
r ORTALAMA	0,245	0,295	0,3025	0,245	0,185	0,205	
HACİM	0,0615696	0,1074817	0,1158896	0,0615696	0,0265084	0,0360687	
350 µM TMZ							
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	
r1	0,3	0,57	0,57	0,3	0,52	0,65	
r2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,33	0,42	
r3	0,2	0,68	0,35	0,37	0,37	0,58	
r4	0,18	0,4	0,33	0,4	0,29	0,48	
r ORTALAMA	0,245	0,5375	0,3875	0,3425	0,3775	0,5325	
HACİM	0,0615696	0,6501354	0,2436035	0,1682093	0,2252264	0,6321603	
400 µM TMZ							
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	
r1	0,3	0,5	0,53	0,46	0,39	0,46	
r2	0,3	0,3	0,3	0,33	0,46	0,46	
r3	0,2	0,45	0,3	0,38	0,23	0,36	
r4	0,18	0,28	0,3	0,33	0,33	0,33	
r ORTALAMA	0,245	0,3825	0,3575	0,375	0,3525	0,4025	
HACİM	0,0615696	0,2342948	0,1912919	0,2207813	0,1833774	0,2730021	
2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ							
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	
r1	0,3	0,36	0,4	0,25	0,48	0,46	
r2	0,3	0,46	0,38	0,4	0,25	0,24	
r3	0,2	0,33	0,24	0,31	0,32	0,32	
r4	0,18	0,36	0,22	0,32	0,26	0,28	
r ORTALAMA	0,245	0,3775	0,31	0,32	0,3275	0,325	
HACİM	0,0615696	0,2252264	0,124725	0,1371887	0,1470626	0,1437204	
2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ							
	0h	24h	48h	72h	96h	120h	
r1	0,3	0,48	0,41	0,36	0,42	0,41	
r2	0,3	0,31	0,25	0,41	0,36	0,36	
r3	0,2	0,42	0,42	0,29	0,29	0,25	
r4	0,18	0,18	0,18	0,21	0,13	0,11	
r ORTALAMA	0,245	0,3475	0,315	0,3175	0,3	0,2825	
HACİM	0,0615696	0,1756842	0,1308579	0,1339984	0,11304	0,0943895	

3B modelindeki muamele edilmemiş T98G hücrelerinin hacimleri, 0. saatte 0,0615696, 24. saatte 0,1645527, 48. saatte 0,5155225, 72. saatte 0,4486929, 96. saatte 1,4360267 ve 120. saatte 1,6965378 olarak belirlendi (Şekil 87). 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0615696, 24. saatte 0,1074817, 48. saatte 0,1158896, 72. saatte 0,0615696, 96. saatte 0,0265084 ve 120. saatte 0,0360687 olarak belirlenerek OLE'nin 120. saatin sonunda muamele edilmeyen T98G hücrelerine göre tümör boyutunu 56.3 kat azalttığı tespit edildi ( $p < 0.0001$ , Şekil 88). 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0615696, 24. saatte

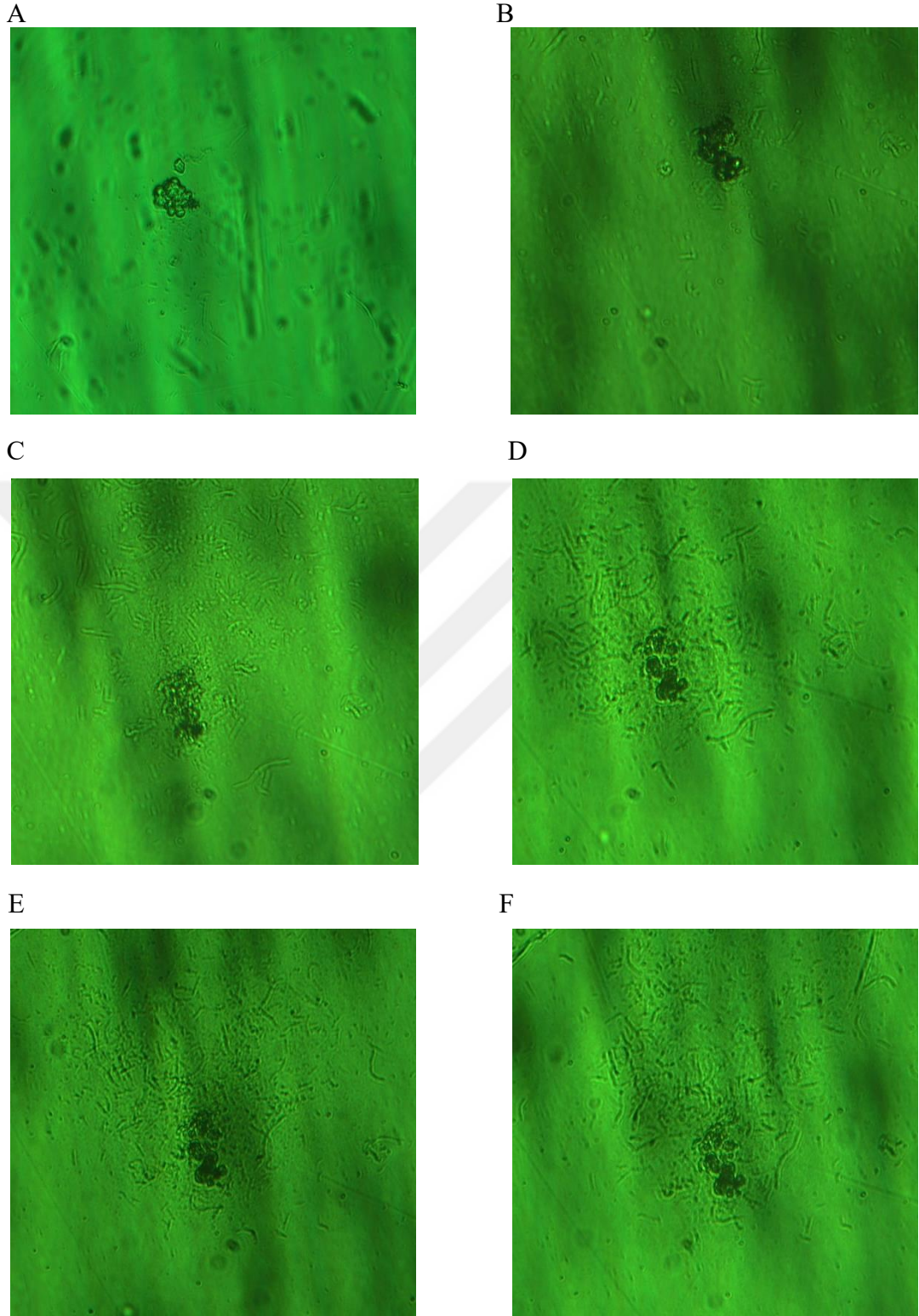


0,6501354, 48. saatte 0,2436035, 72. saatte 0,1682093, 96. saatte 0,2252264 ve 120. saatte 0,6321603 olarak hesaplandı ve 120. saatin sonunda 350  $\mu$ M TMZ'nin muamele edilmemiş T98G hücrelerine göre tümör boyutunu 2.6 kat azalttığı saptandı ( $p < 0.0001$ , Şekil 89). 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0615696, 24. saatte 0,2342948, 48. saatte 0,1912919, 72. saatte 0,2207813, 96. saatte 0,1833774 ve 120. saatte 0,2730021 olduğu görüldü ve 400  $\mu$ M TMZ'nin muamele edilmeyen T98G hücrelerine kıyasla 120. saatin sonunda tümör boyutunu 6.25 kat düşürdüğü belirlendi ( $p < 0.0001$ , Şekil 90).

2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0615696, 24. saatte 0,2252264, 48. saatte 0,124725, 72. saatte 0,1371887, 96. saatte 0,1470626 ve 120. saatte 0,1437204 olarak belirlendi ve 120. saatin sonunda 2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ'nin muamele edilmeyen T98G hücrelerine göre tümör boyutunu 11.8 kat daha düşürdüğü saptandı ( $p < 0.0001$ , Şekil 91). 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0615696, 24. saatte 0,1756842, 48. saatte 0,1308579, 72. saatte 0,1339984, 96. saatte 0,11304 ve 120. saatte 0,0943895 olduğu belirlendi ve 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ'nin muamele edilmemiş T98G hücrelerine kıyasla 120. saatin sonunda tümör boyutunu 18,77 kat düşürdüğü tespit edildi ( $p < 0.0001$ , Şekil 92). Böylece OLE ve TMZ'nin tek başına ve kombinasyonları ile tümör boyutunda ciddi oranda azalma saptandı (Şekil 93, Şekil 94).

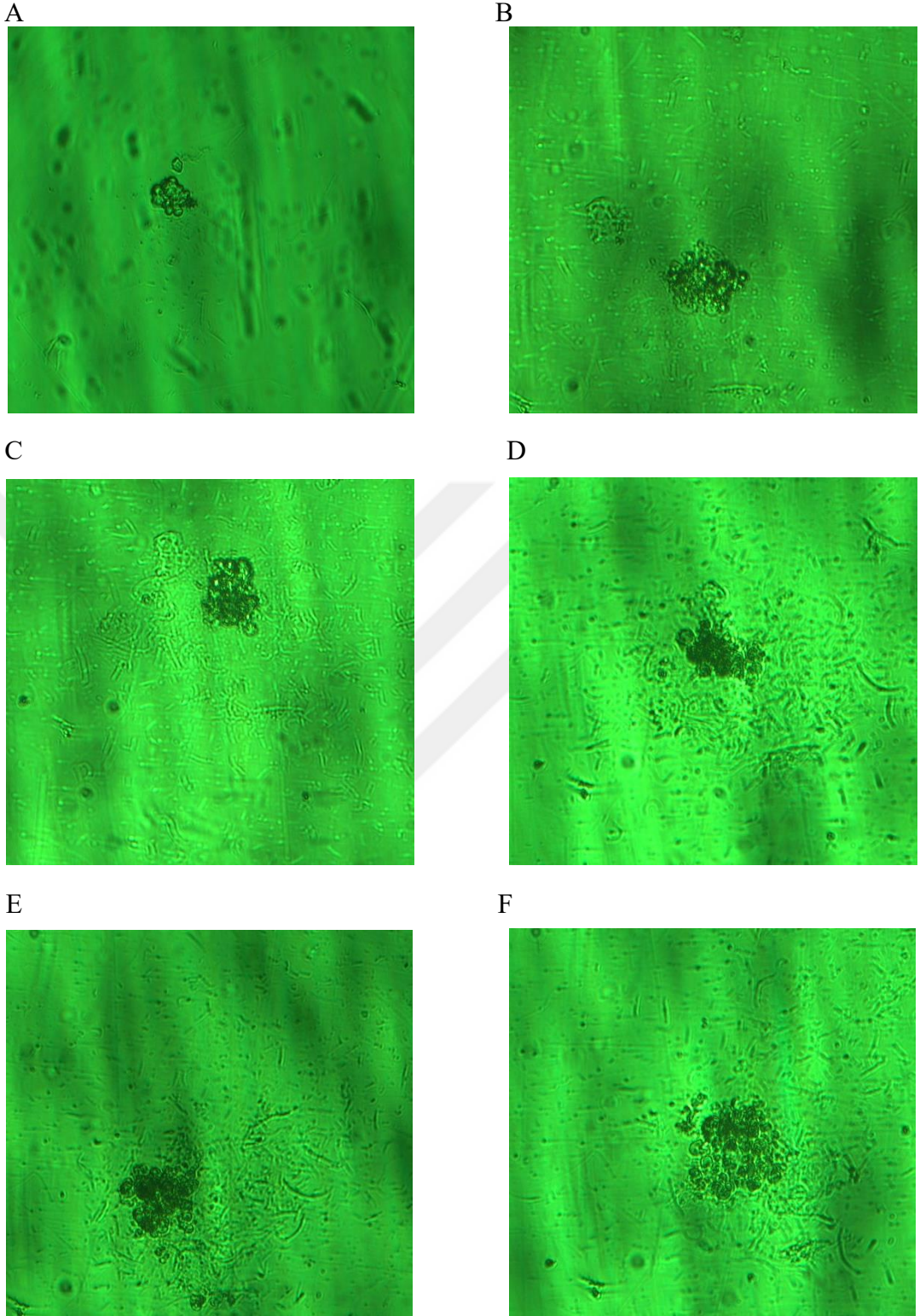


Şekil 87. 3B kültür çalışmasında muamele edilmemiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

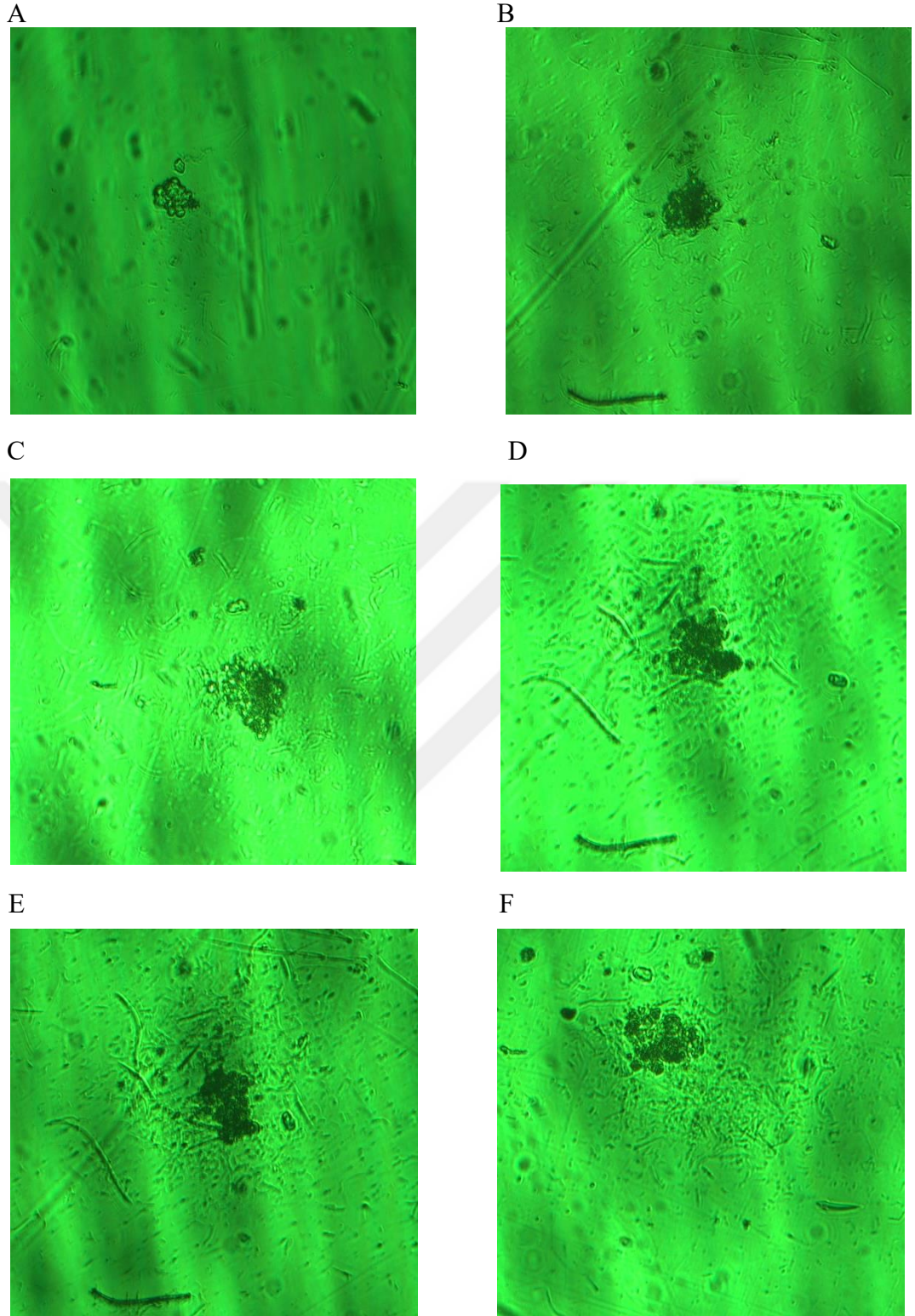


Şekil 88. 3B kültür çalışmasında 2 mg/ml OLE ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



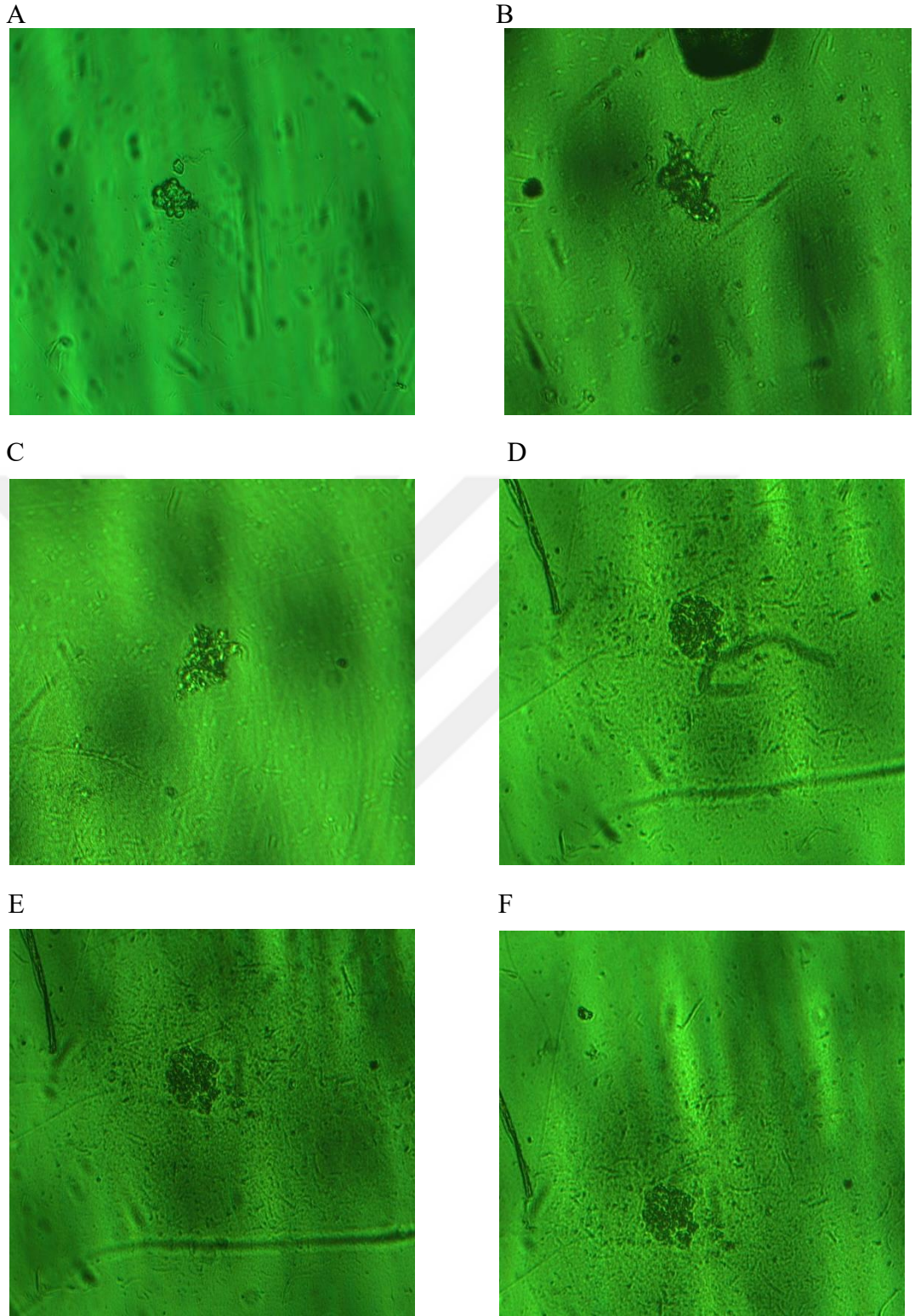


Şekil 89. 3B kültür çalışmasında 350 µM TMZ ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

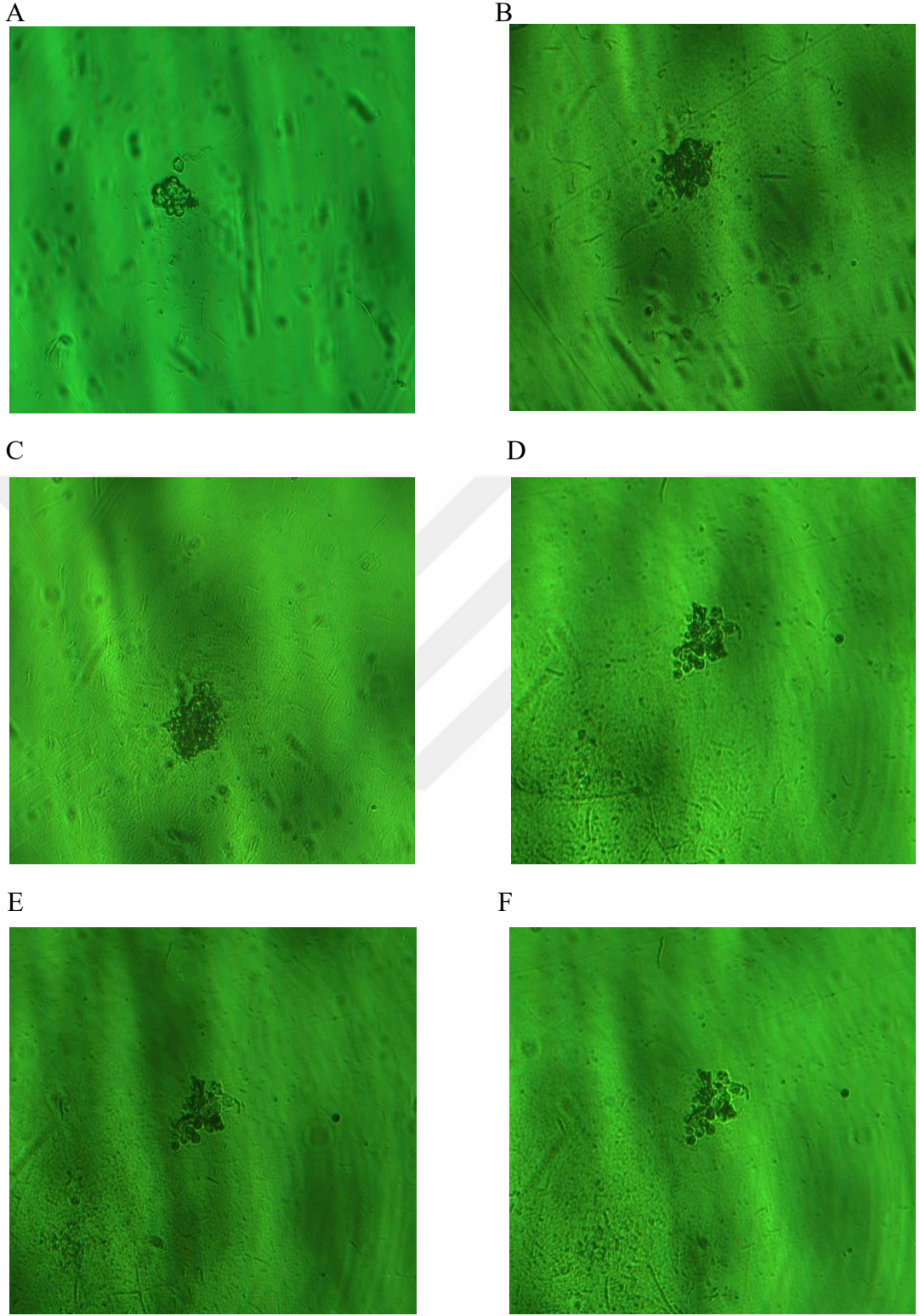


Şekil 90. 3B kültür çalışmasında 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



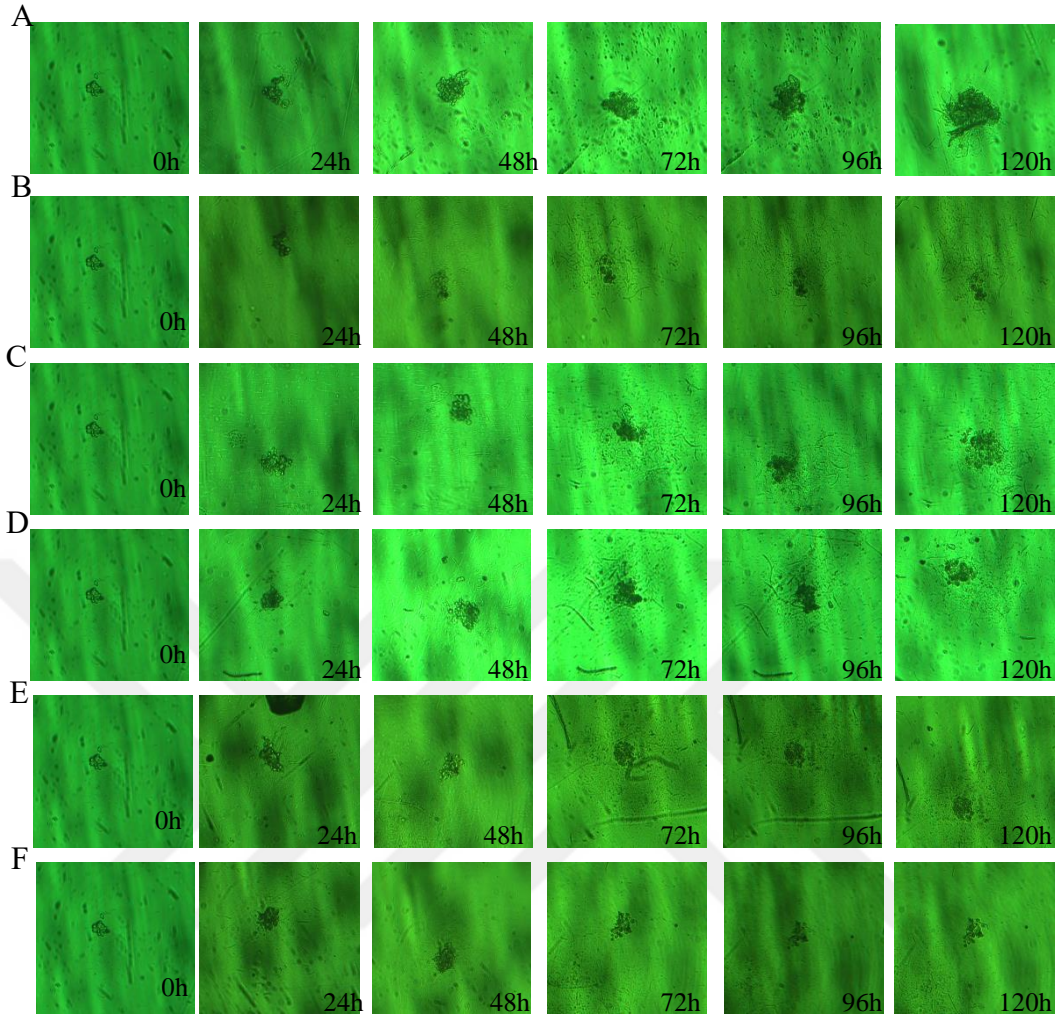


Şekil 91. 3B kültür çalışmasında 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



Şekil 92. 3B kültür çalışmasında 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

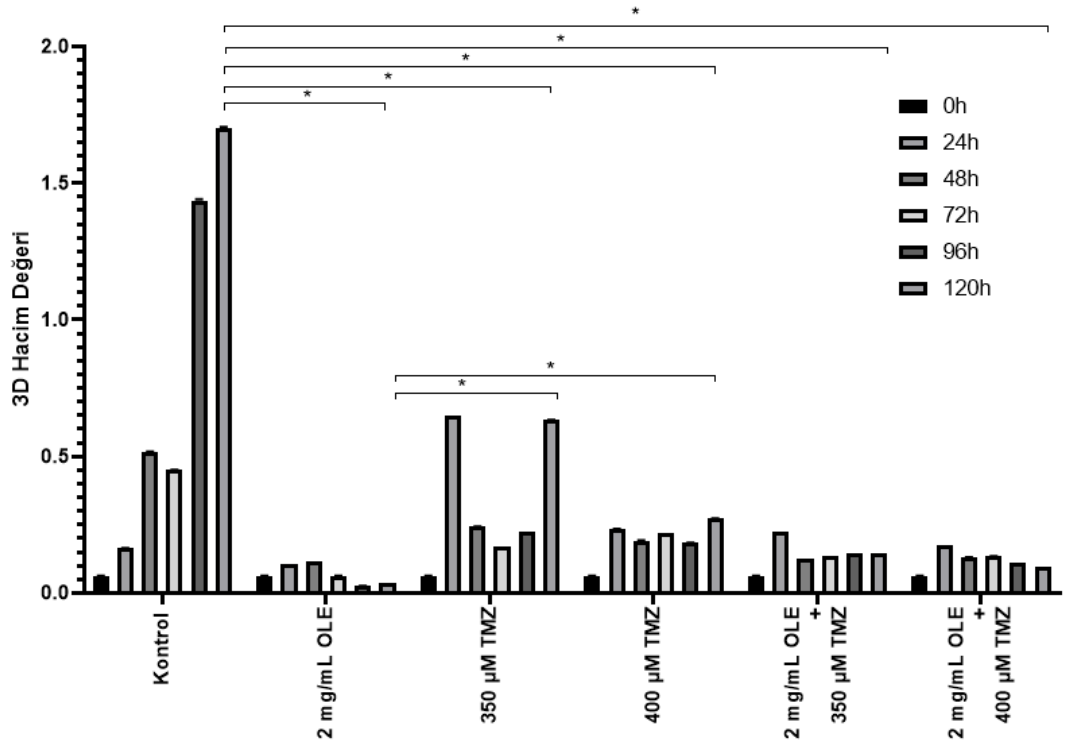




Şekil 93. 3B kültür çalışmasında farklı dozlar ile muamele edilmiş 40 hücre sayılı kültüre edilmiş T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin toplu gösterimi, h: saat. (A) Muamele edilmemiş T98G hücresi, (B) 2 mg/ml OLE, (C) 350 µM TMZ, (D) 400 µM TMZ, (E) 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ (F) 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ.

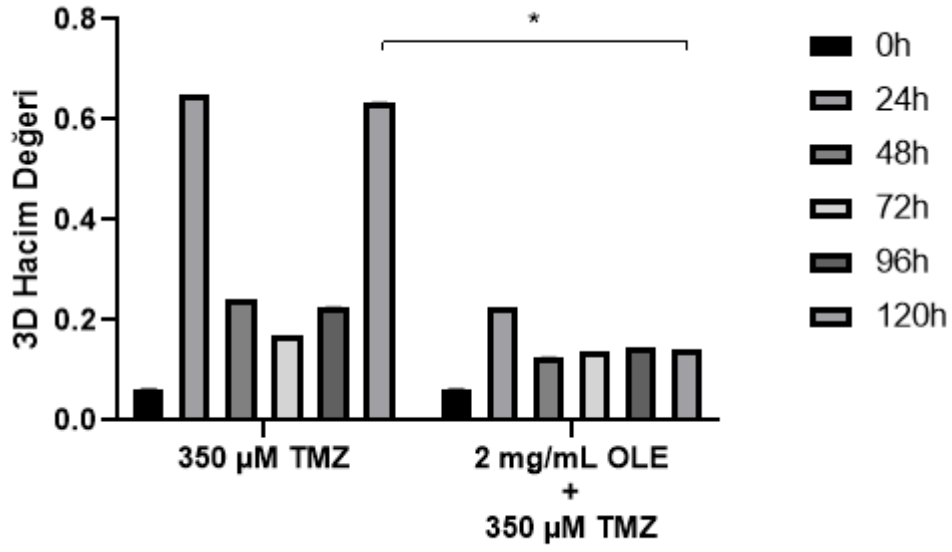
2 mg/ml OLE ile muamele edilen 3B T98G tümör modelinde 24. saatten itibaren muamelesiz hücreye göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ( $p < 0.0001$ , Şekil 94). Aynı zamanda tek başına OLE ile muamele edilen hücrelerin tümör boyutunun, tek başına 350 µM TMZ ve 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin tümör boyutuna göre daha küçük olduğu görüldü ( $p < 0.0001$ , Şekil 94).





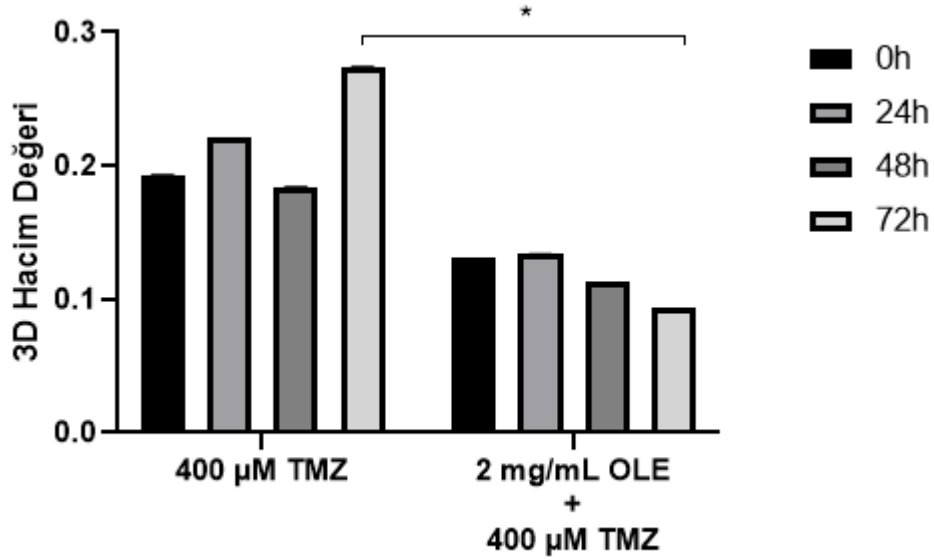
Şekil 94. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun muamele edilmemiş 3B T98G hücrelerine kıyasla tümör boyutuna etkisi (\* p < 0.001, Two-way ANOVA). Kontrol: Muamele edilmemiş T98G hücresi, h: saat.

2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen T98G tümör boyutunun, 120. saat sonunda tek başına 350 µM TMZ ile muamele edilen T98G tümör boyutundan 2.9 kat daha küçük olduğu saptandı (p < 0.0001, Şekil 95).



Şekil 95. 350 µM TMZ ile muamele edilen hücre modelinin, 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücre modeline göre tümör hacminin karşılaştırılması, h: saat (\* p <0.001, Two-way ANOVA).

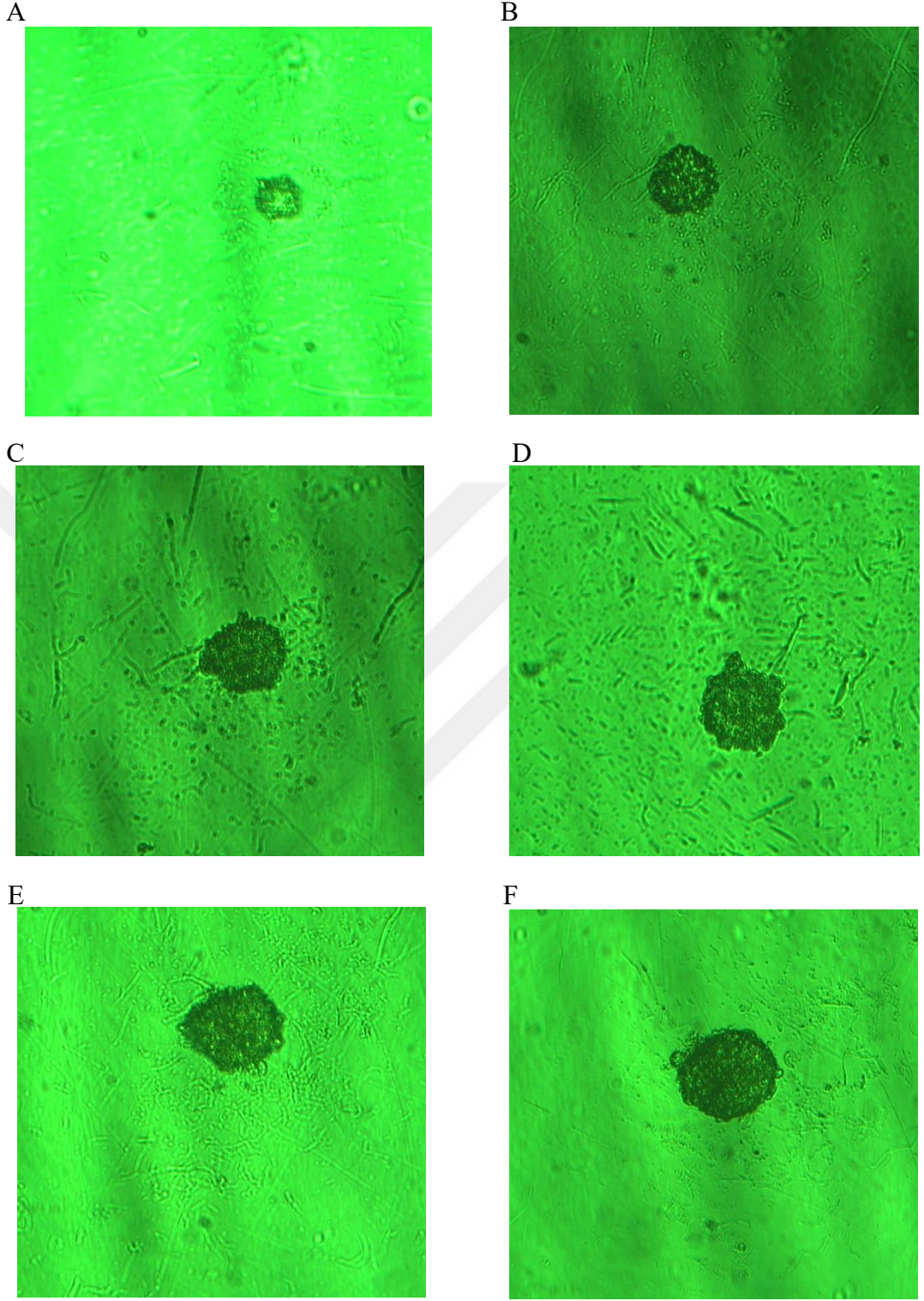
2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen T98G tümör boyutunun, 72. saat sonunda tek başına 400 µM TMZ ile muamele edilen T98G tümör boyutundan 4.4 kat daha küçük olduğu belirlendi (p<0.0001, Şekil 96).



Şekil 96. 400 µM TMZ ile muamele edilen hücre modelinin, 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen hücre modeline göre tümör hacminin karşılaştırılması, h: saat (\* p <0.001, Two-way ANOVA).

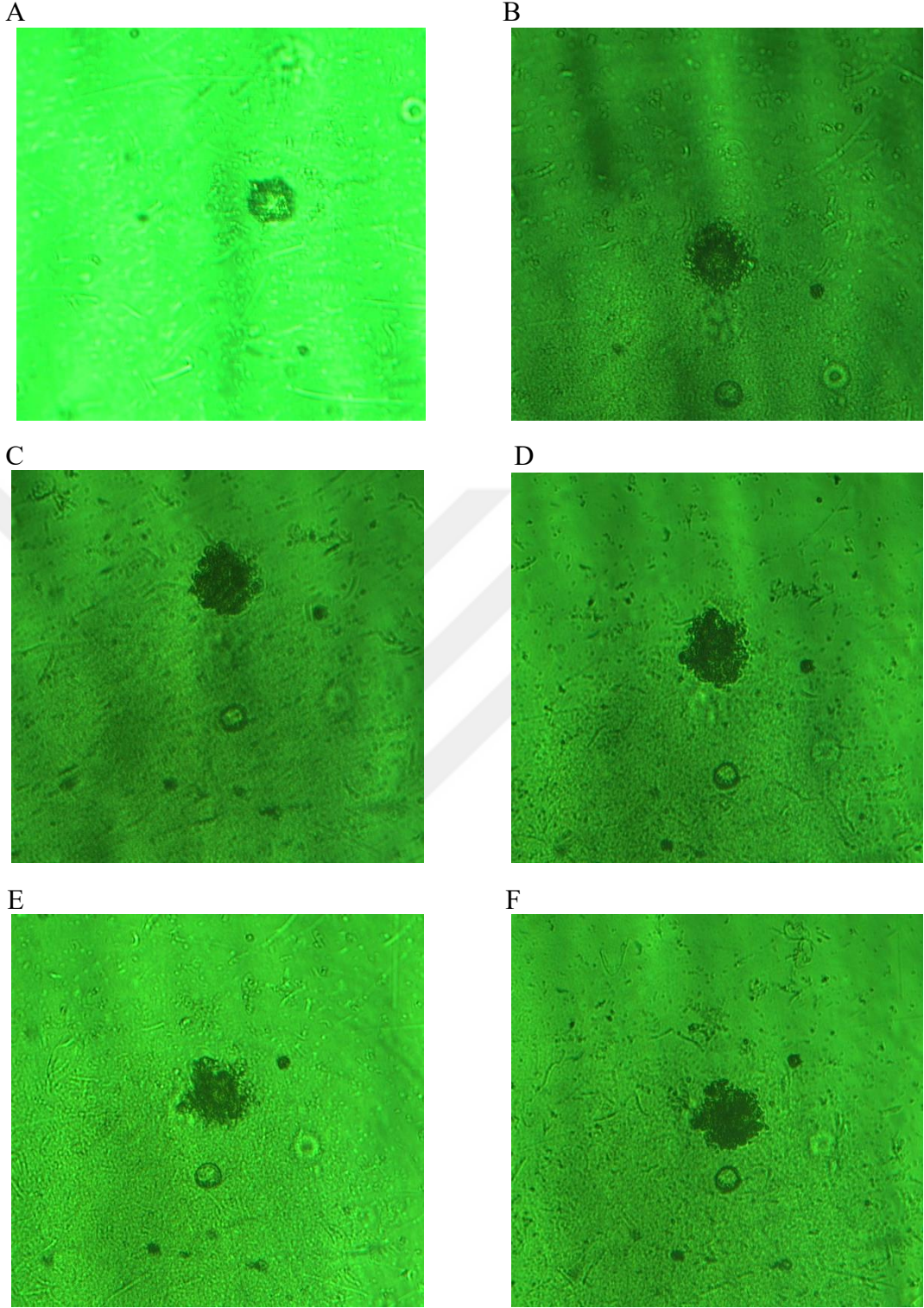
İstatistiksel analizler 40 hücre sayısında yapılmış olup 80 hücre sayılı tümör boyutlarının da farklı dozlardaki ve farklı saatlerdeki görüntüleri alınmıştır. 40 hücre sayısında olduğu gibi tek başına OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonun sonucunda 3B T98G tümör boyutunda küçülme gözlemlendi (Şekil 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103).



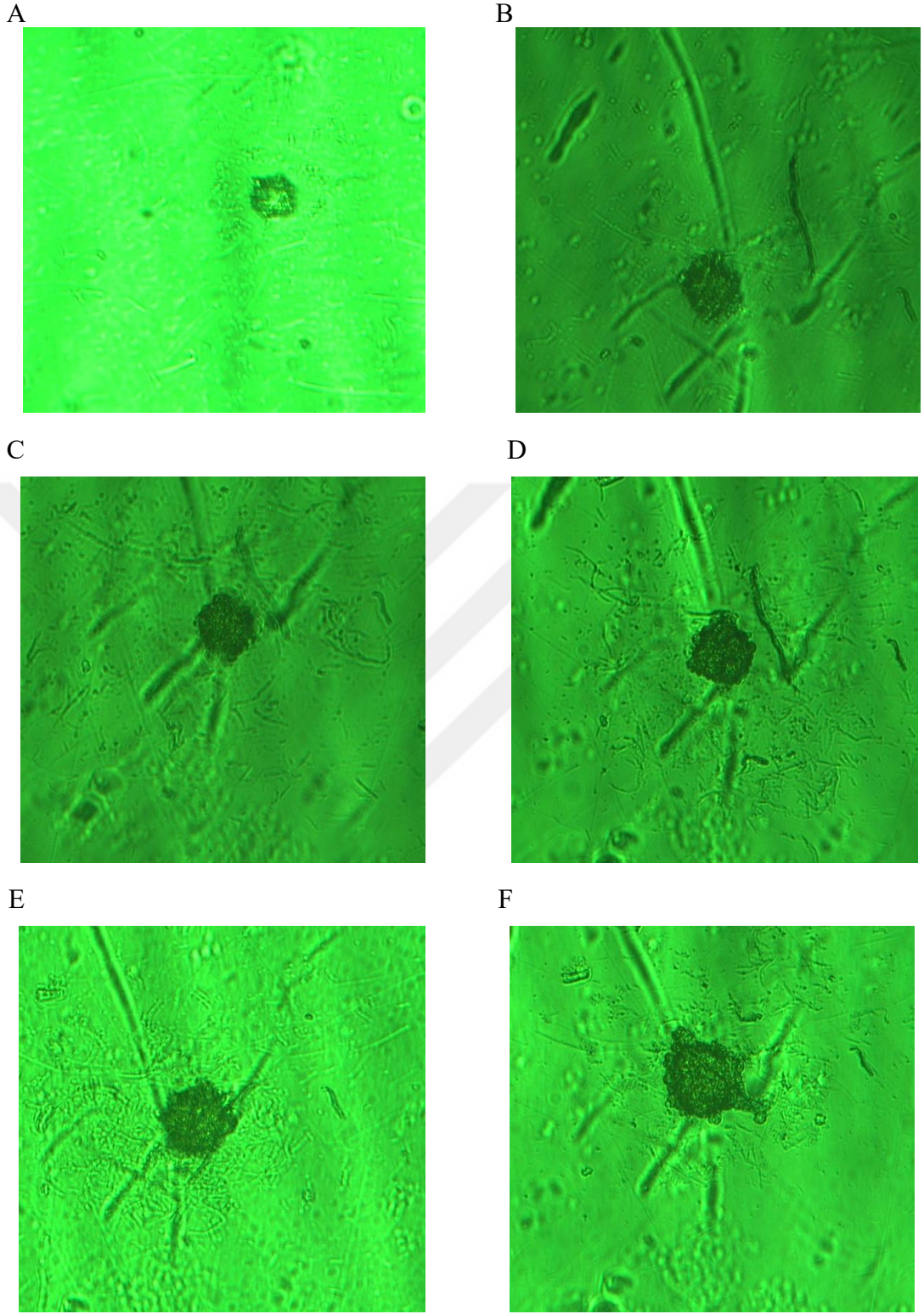


Şekil 97. 3B kültür çalışmasında muamele edilmemiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



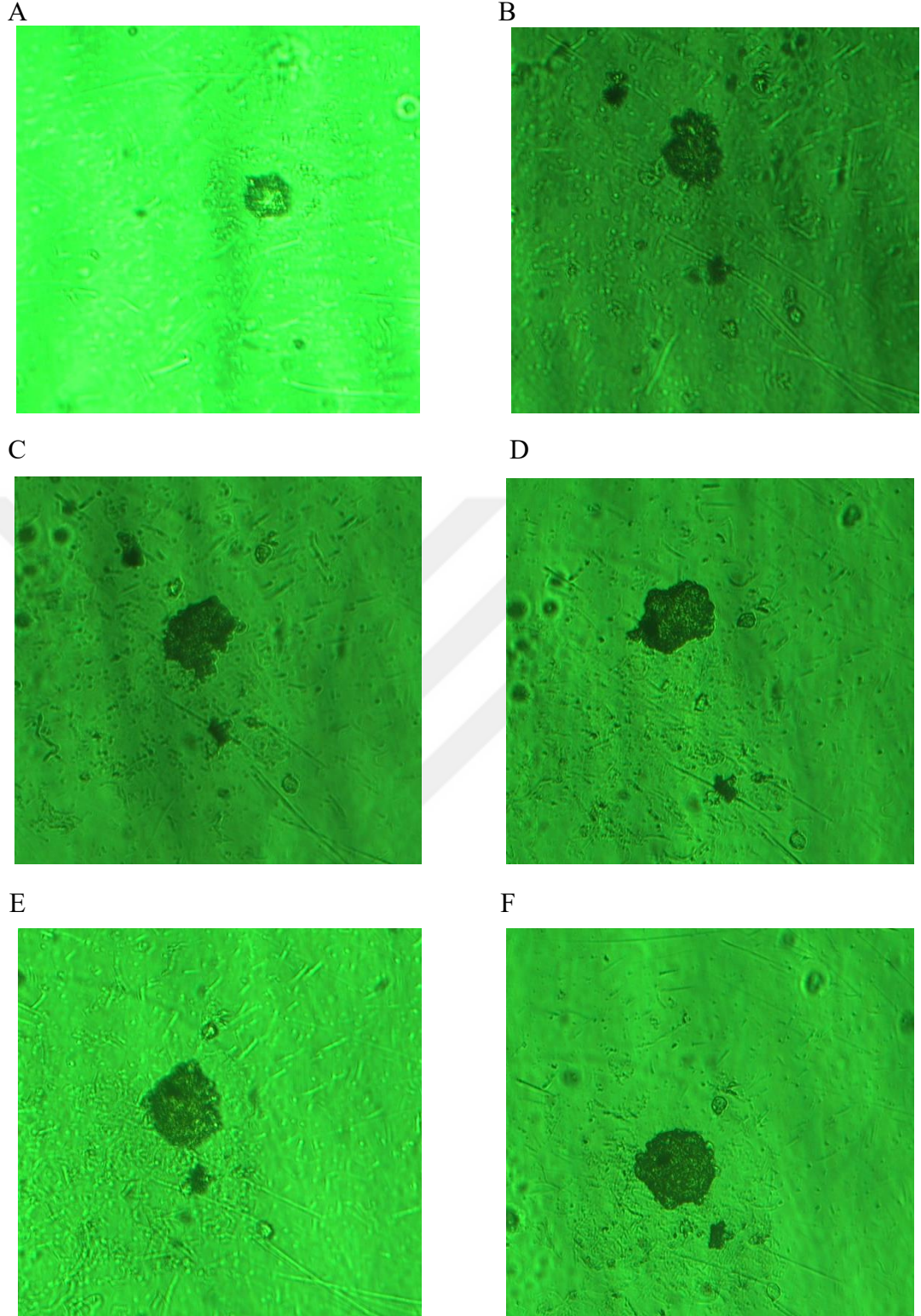


Şekil 98. 3B kültür çalışmasında 2 mg/ml OLE ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

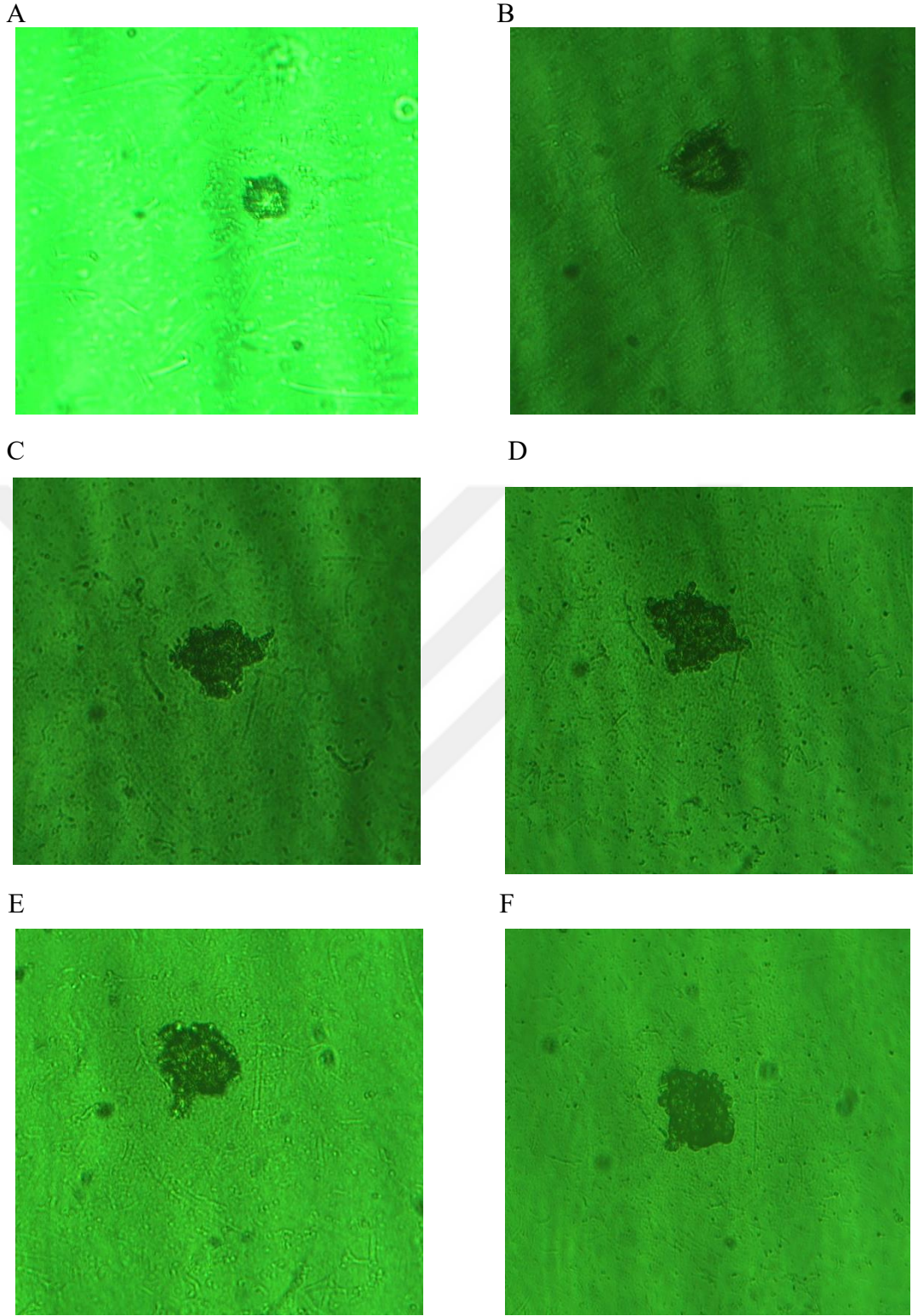


Şekil 99. 3B kültür çalışmasında 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



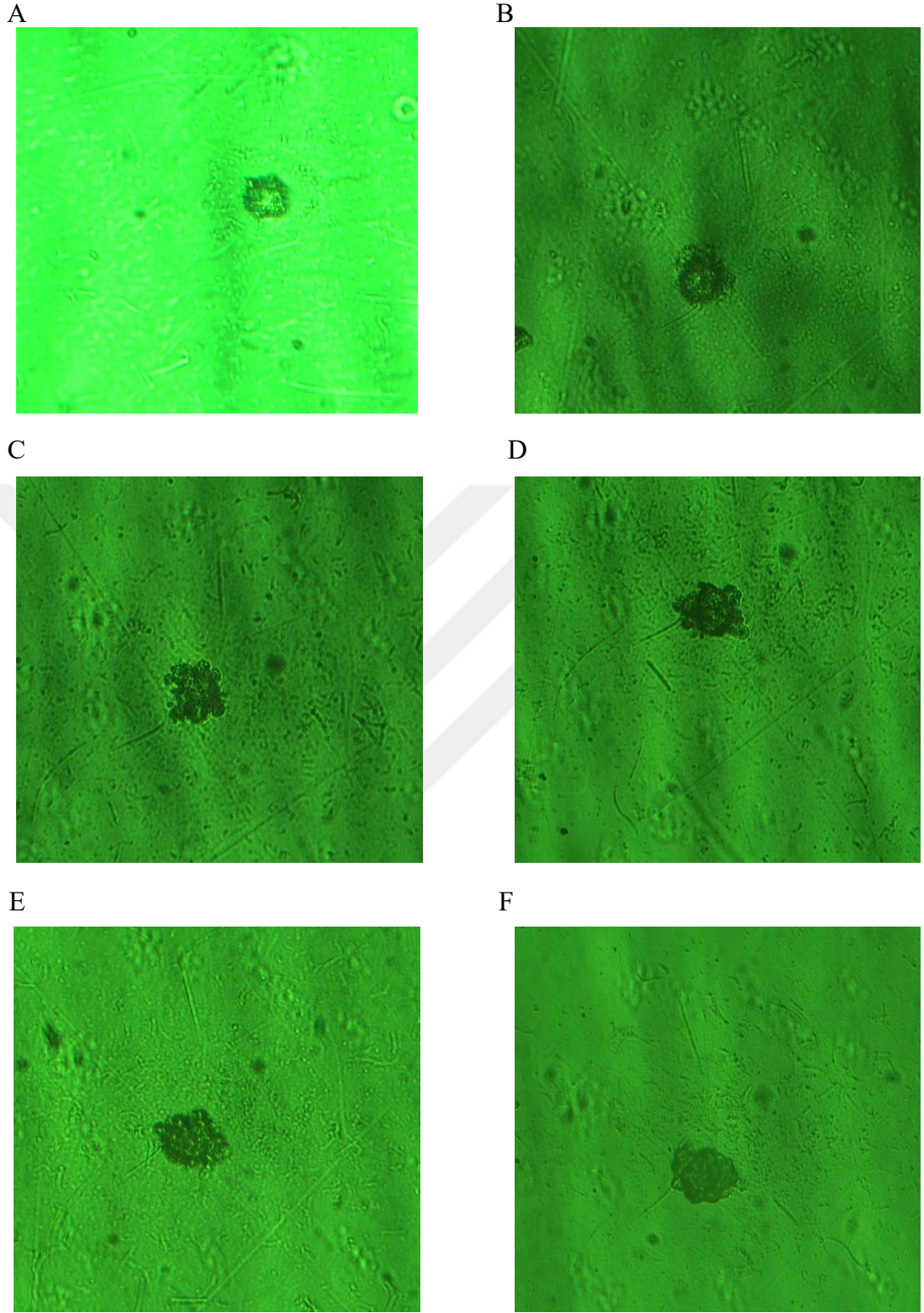


Şekil 100. 3B kültür çalışmasında 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

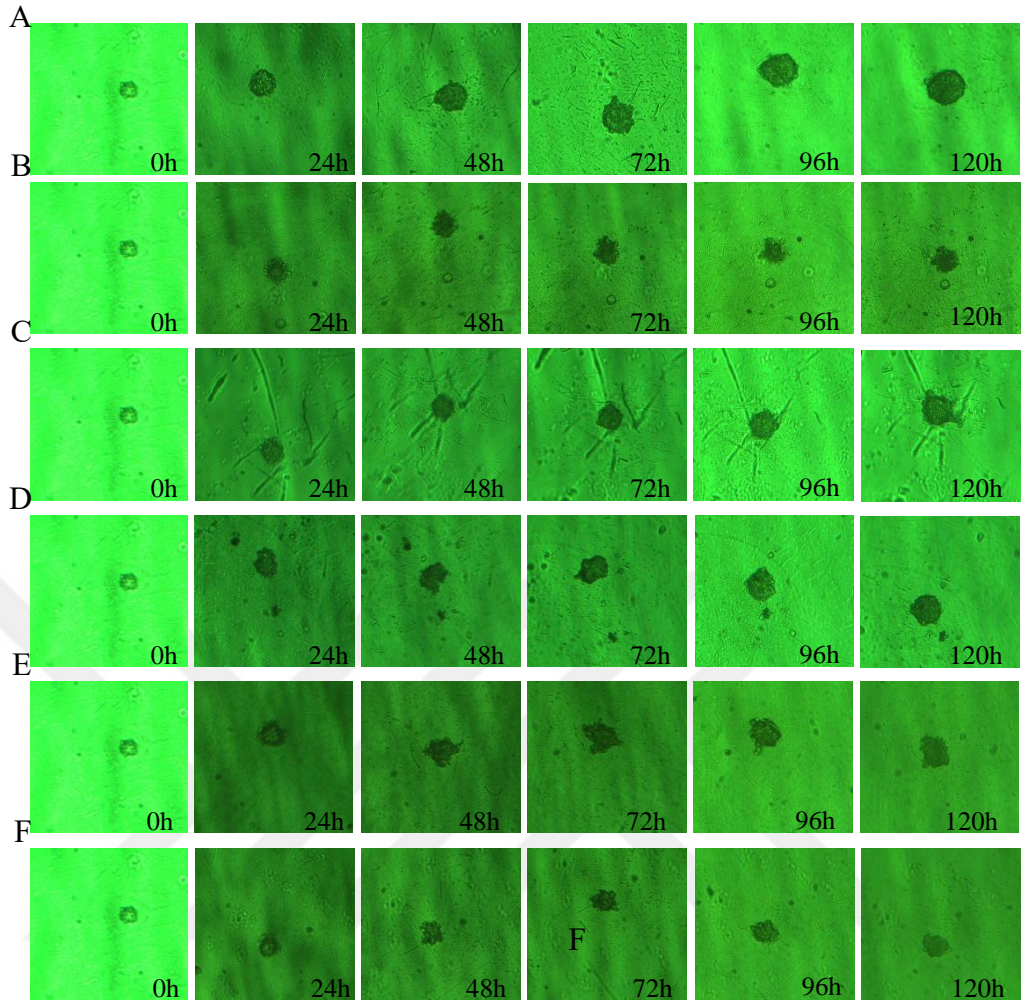


Şekil 101. 3B kültür çalışmasında 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.





Şekil 102. 3B kültür çalışmasında 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



Şekil 103. 3B kültür çalışmasında farklı dozlar ile muamele edilmiş 80 hücre sayılı kültüre edilmiş T98G tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin toplu gösterimi, h: saat. (A) Muamele edilmemiş T98G hücresi, (B) 2 mg/ml OLE, (C) 350  $\mu$ M TMZ, (D) 400  $\mu$ M TMZ, (E) 2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ (F) 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ.

#### 4.6.2 U87MG Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin 3B Tümör Modeline Etkisinin Belirlenmesi

OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun U87MG hücrelerinde 3B tümör modeli üzerine etkisi değerlendirildiğinde, muamele edilmemiş U87MG hücrelerine göre OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerdeki tümör hacminin daha küçük olduğu belirlendi (Tablo 33).

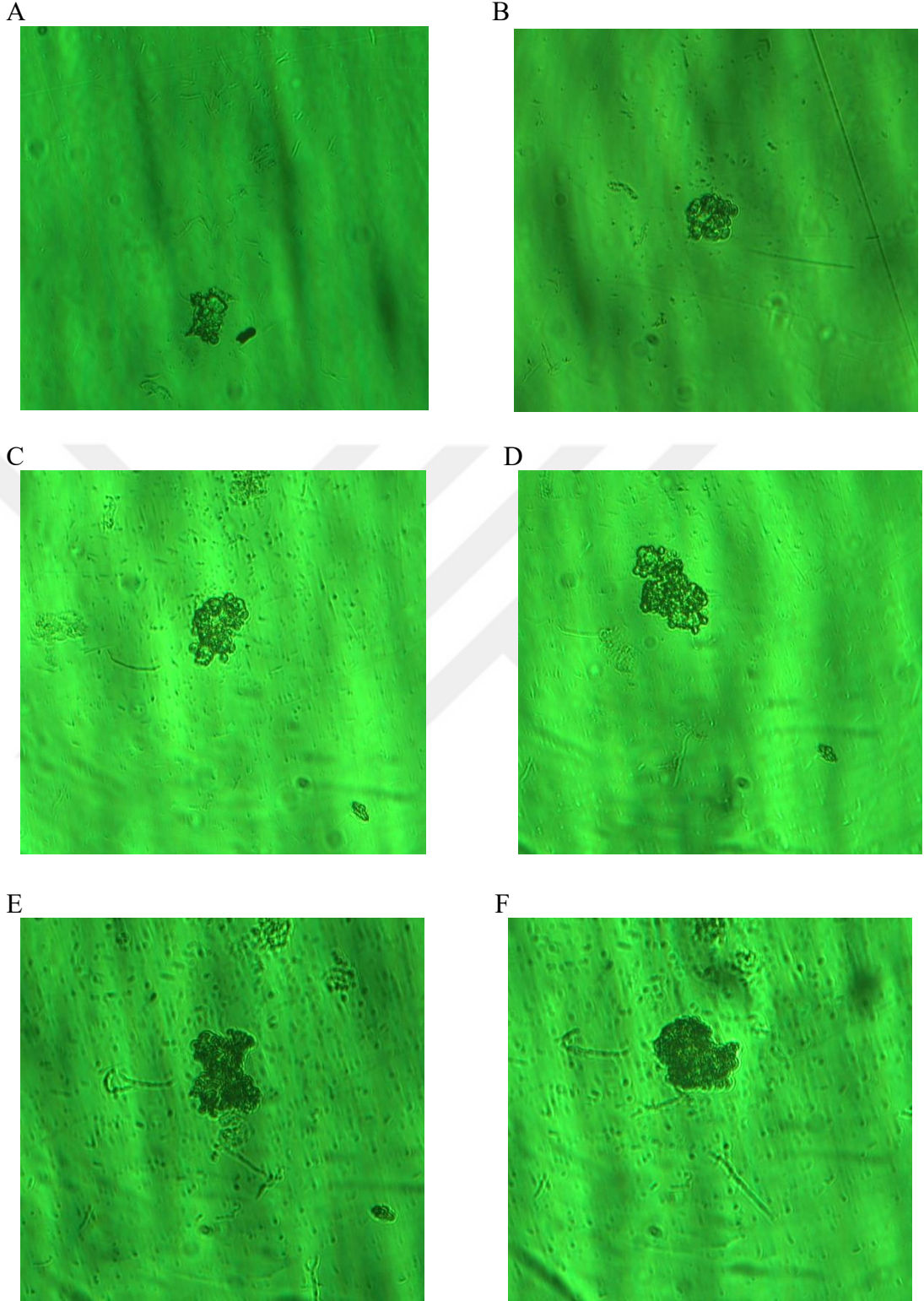
Tablo 33. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun 3B yapıdaki U87MG hücrelerinin hacmine etkileri.

Kontrol						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,24	0,3	0,33	0,6	0,59	0,51
r2	0,27	0,32	0,36	0,33	0,59	0,39
r3	0,31	0,34	0,3	0,49	0,32	0,6
r4	0,24	0,24	0,43	0,54	0,5	0,54
r ORTALAMA	0,265	0,3	0,355	0,49	0,5	0,51
HACİM	0,0779123	0,11304	0,1873068	0,4925571	0,5233333	0,5553655
1 mg/ml OLE						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,24	0,3	0,15	0,41	0,26	0,45
r2	0,27	0,2	0,21	0,21	0,23	0,23
r3	0,31	0,31	0,25	0,27	0,35	0,24
r4	0,24	0,3	0,37	0,26	0,4	0,25
r ORTALAMA	0,265	0,2775	0,245	0,2875	0,31	0,2925
HACİM	0,0779123	0,0894659	0,0615696	0,0994906	0,124725	0,1047722
300 µM TMZ						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,24	0,35	0,25	0,28	0,3	0,34
r2	0,27	0,22	0,41	0,39	0,46	0,3
r3	0,31	0,42	0,23	0,3	0,29	0,46
r4	0,24	0,3	0,4	0,4	0,33	0,33
r ORTALAMA	0,265	0,3225	0,3225	0,3425	0,345	0,3575
HACİM	0,0779123	0,1404292	0,1404292	0,1682093	0,1719197	0,1912919
350 µM TMZ						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,24	0,34	0,34	0,34	0,38	0,47
r2	0,27	0,34	0,27	0,24	0,44	0,44
r3	0,31	0,33	0,24	0,32	0,27	0,32
r4	0,24	0,32	0,34	0,36	0,37	0,36
r ORTALAMA	0,265	0,3325	0,2975	0,315	0,365	0,3975
HACİM	0,0779123	0,1539017	0,1102375	0,1308579	0,2035856	0,262954
1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,24	0,4	0,23	0,23	0,26	0,26
r2	0,27	0,23	0,4	0,36	0,27	0,28
r3	0,31	0,27	0,2	0,26	0,36	0,31
r4	0,24	0,31	0,3	0,4	0,32	0,32
r ORTALAMA	0,265	0,3025	0,2825	0,3125	0,3025	0,2925
HACİM	0,0779123	0,1158896	0,0943895	0,1277669	0,1158896	0,1047722
1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,24	0,19	0,19	0,32	0,3	0,4
r2	0,27	0,21	0,19	0,2	0,31	0,26
r3	0,31	0,33	0,2	0,19	0,2	0,31
r4	0,24	0,22	0,4	0,2	0,31	0,25
r ORTALAMA	0,265	0,2375	0,245	0,2275	0,28	0,305
HACİM	0,0779123	0,0560866	0,0615696	0,0492961	0,0919057	0,1187867

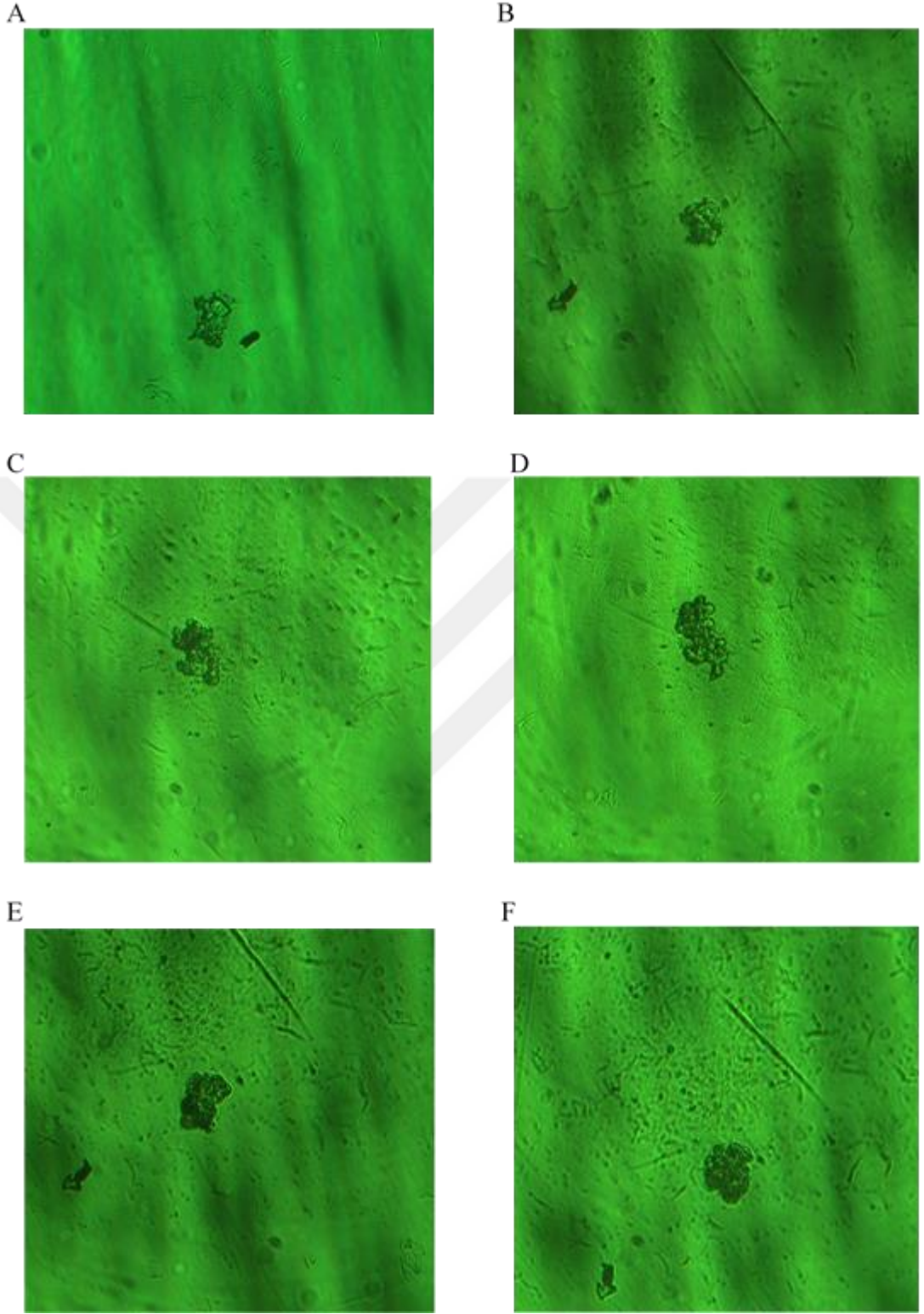
3B modelindeki muamele edilmemiş U87MG hücrelerinin hacimleri, 0. saatte 0,0779123, 24. saatte 0,11304, 48. saatte 0,1873068, 72. saatte 0,4925571, 96. saatte 0,5233333 ve 120. saatte 0,55536552 olarak belirlendi (Şekil 104). U87MG hücrelerinin 1 mg/ml OLE ile muamele edilmesi sonucu hacimlerinin, 0. saatte 0,0779123, 24. saatte 0,0894659, 48. saatte 0,0615696, 72. saatte 0,0994906, 96. saatte 0,124725 ve 120. saatte 0,0360687 olarak belirlendi ve OLE'nin 120. saatin sonunda muamele edilmeyen U87MG hücrelerine göre tümör hacmini 5.3 kat azalttığı tespit edildi ( $p < 0.0001$ , Şekil 105). 300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0779123, 24. saatte 0,1404292, 48. saatte 0,1404292, 72. saatte 0,1682093, 96. saatte 0,1719197 ve 120. saatte 0,1912919 olarak hesaplandı ve 300  $\mu$ M TMZ'nin muamele edilmemiş U87MG hücrelerine göre 120. saatin sonunda tümör boyutunu 2.9 kat azalttığı saptandı ( $p < 0.0001$ , Şekil 106). 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0779123, 24. saatte 0,1539017, 48. saatte 0,1102375, 72. saatte 0,1308579, 96. saatte 0,2035856 ve 120. saatte 0,262954 olarak hesaplandı ve 120. saat sonunda 300  $\mu$ M TMZ'nin muamele edilmemiş U87MG hücrelerine göre tümör boyutunu 2.11 kat azalttığı saptandı ( $p < 0.0001$ , Şekil 107).

1 mg/ml OLE + 300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0779123, 24. saatte 0,1158896, 48. saatte 0,0943895, 72. saatte 0,1277669, 96. saatte 0,1158896 ve 120. saatte 0,1047722 olduğu belirlendi ve 1 mg/ml OLE + 300  $\mu$ M TMZ'nin 120. saatin sonunda muamele edilmeyen U87MG hücrelerine göre tümör boyutunu 5.3 kat daha az olduğu saptandı ( $p < 0.0001$ , Şekil 108). 1 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin hacimleri, 0. saatte 0,0779123, 24. saatte 0,0560866, 48. saatte 0,5077898, 72. saatte 0,0492961, 96. saatte 0,0919057 ve 120. saatte 0,1187867 olduğu belirlendi ve 1 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ'nin muamele edilmemiş U87MG hücrelerine kıyasla 120. saatin sonunda tümör boyutunu 4.7 kat düşürdüğü tespit edildi ( $p < 0.0001$ , Şekil 109). Böylece tek başına OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının tümör boyutunda ciddi oranda azalmaya sebep olduğu tespit edildi (Şekil 110, Şekil 111).



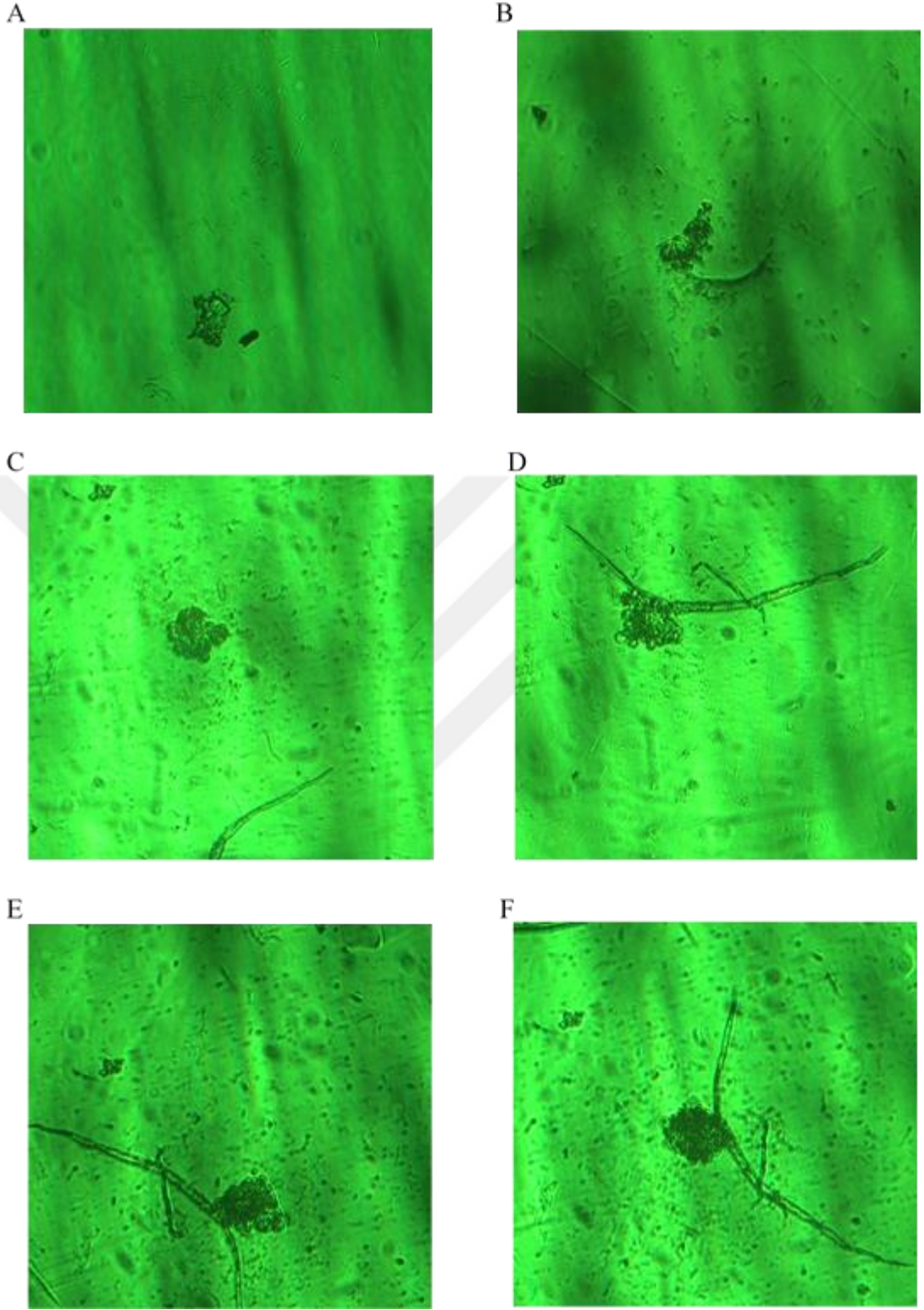


Şekil 104. 3B kültür çalışmasında muamele edilmemiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

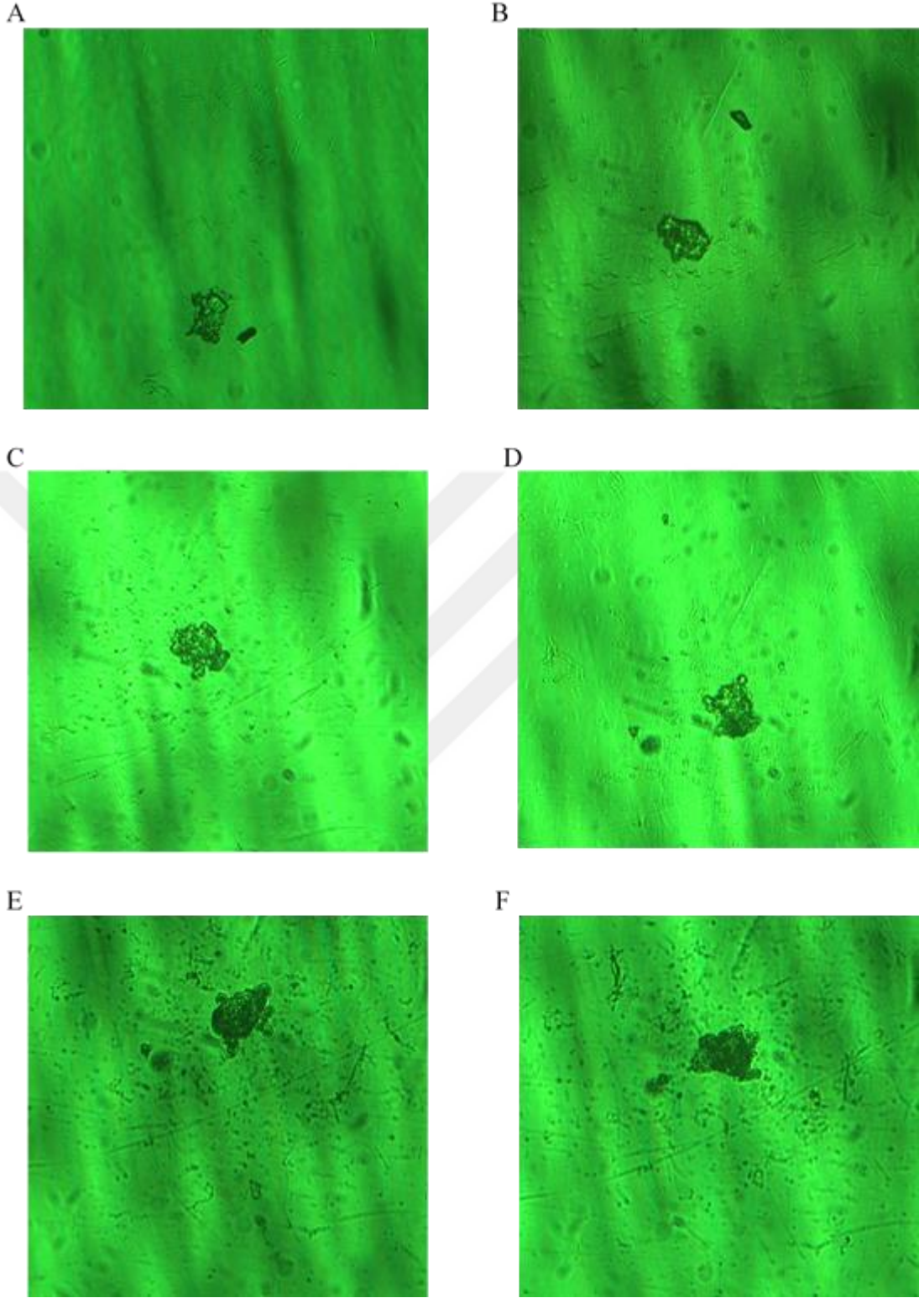


Şekil 105. 3B kültür çalışmasında 1 mg/ml OLE ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



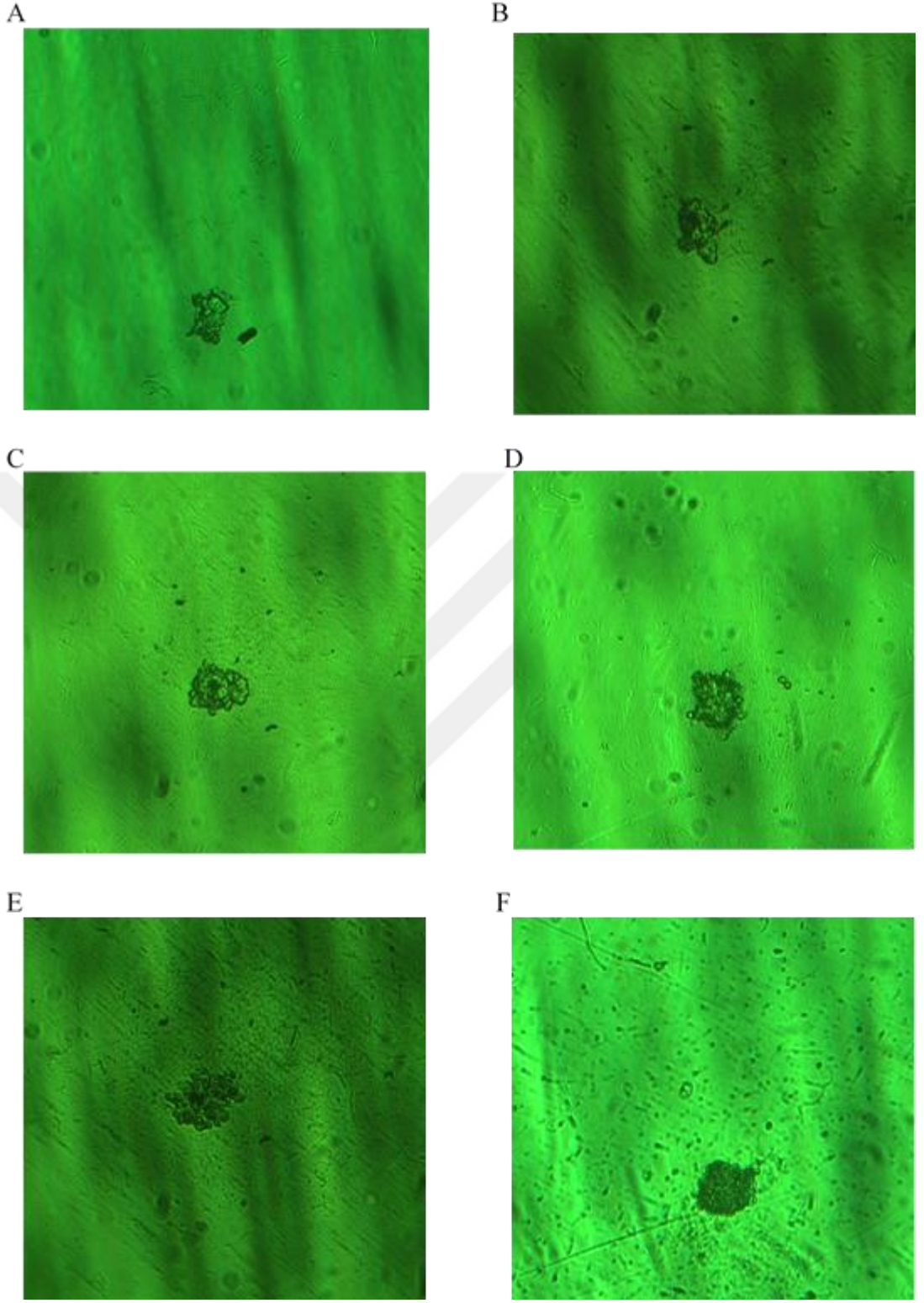


Şekil 106. 3B kültür çalışmasında 300 µM TMZ ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

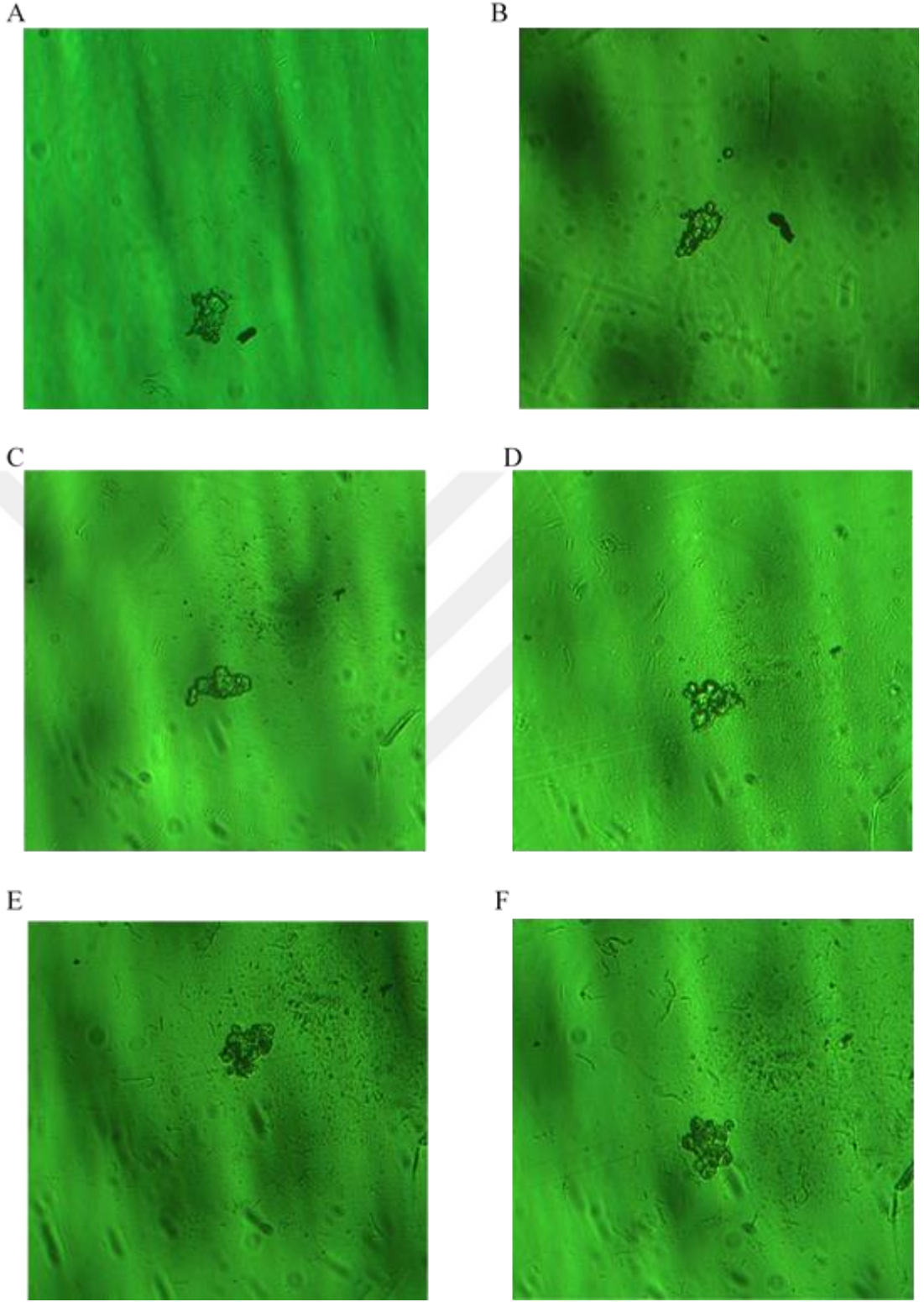


Şekil 107. 3B kültür çalışmasında 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

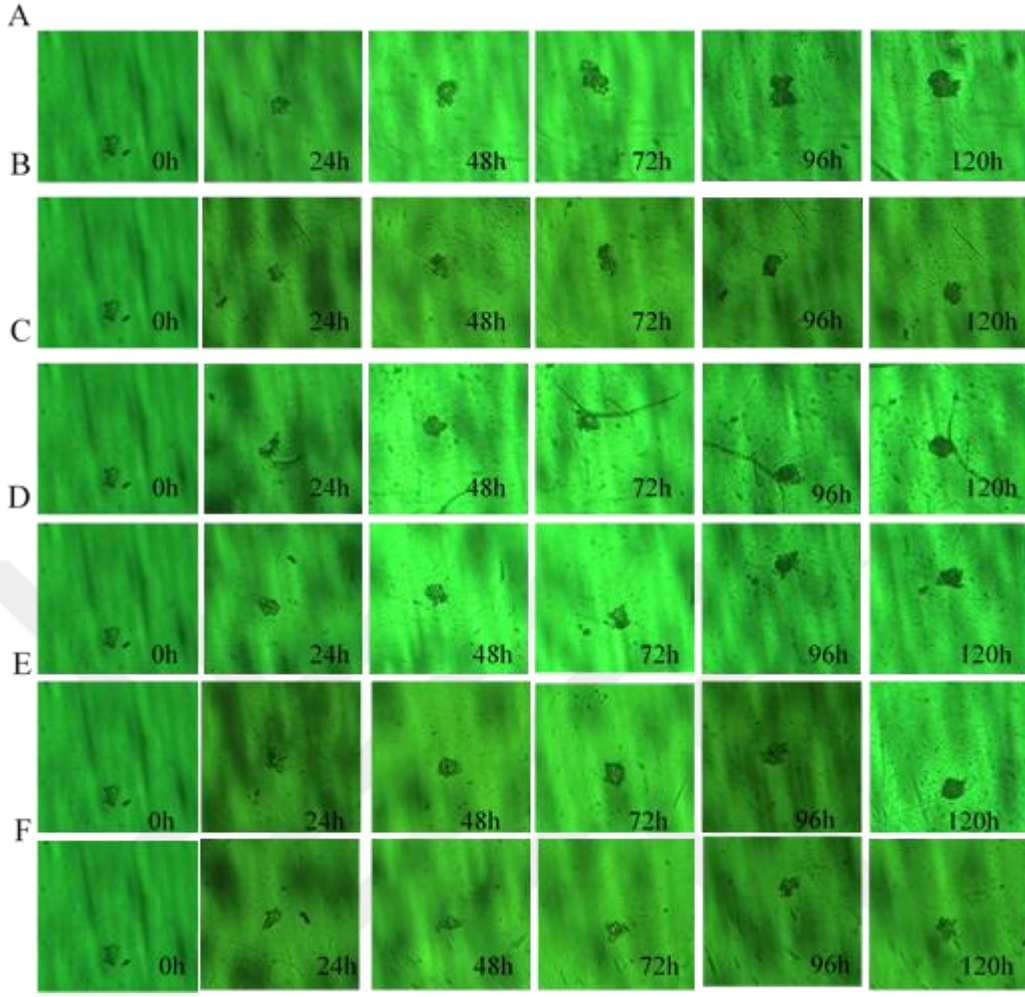




Şekil 108. 3B kültür çalışmasında 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

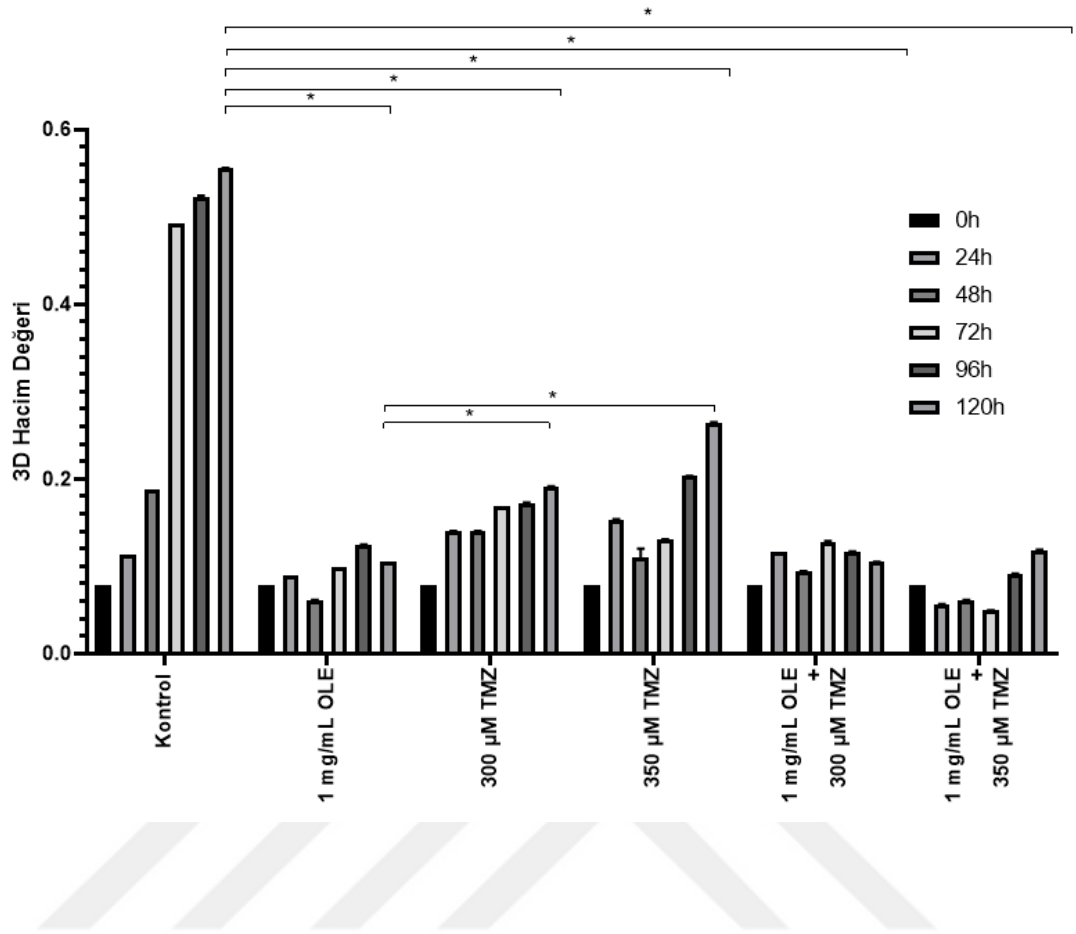


Şekil 109. 3B kültür çalışmasında 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilmiş 40 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



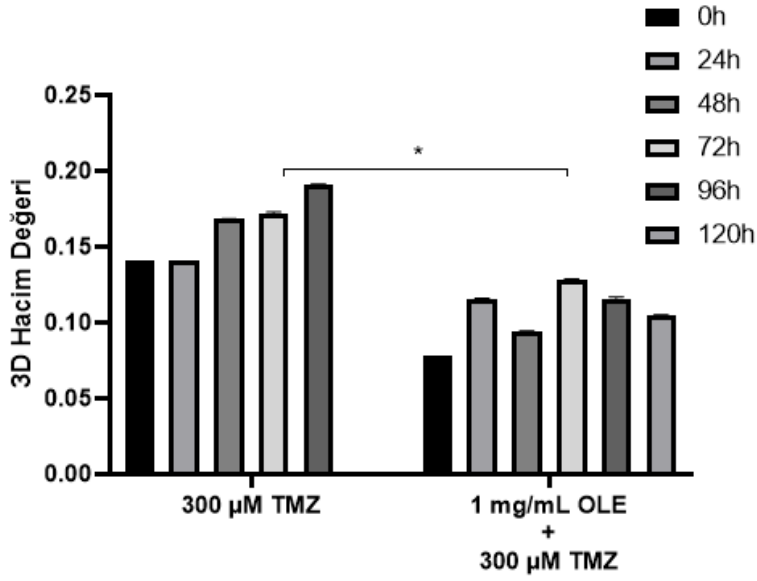
Şekil 110. 3B kültür çalışmasında farklı dozlar ile muamele edilmiş 40 hücre sayılı kültüre edilmiş U87MG tümör kitlerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin toplu gösterimi, h: saat. (A) Muamele edilmemiş U87MG hücresi, (B) 1 mg/ml OLE, (C) 300 µM TMZ, (D) 350 µM TMZ, (E) 1mg/ml OLE + 300 µM TMZ (F) 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ.

1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG 3B tümör modelinde 48. saatten itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ( $p < 0.0001$ , Şekil 111). Aynı zamanda 120. saatte, tek başına OLE ile muamele edilen hücrelerin tümör boyutunun, tek başına 300 µM TMZ ve 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin tümör boyutuna göre daha küçük olduğu görüldü ( $p < 0.0001$ , Şekil 111).



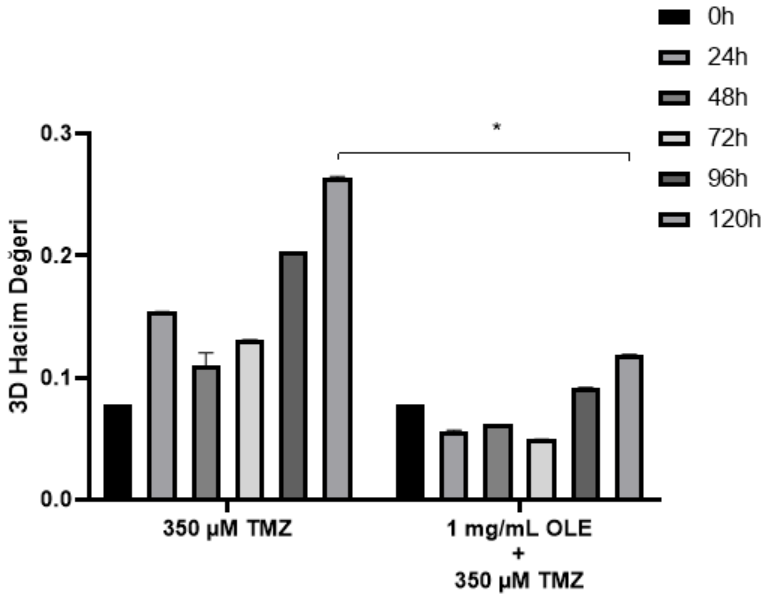
Şekil 111. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun muamele edilmemiş 3B U87MG hücrelerine kıyasla tümör boyutuna etkisi (\* p <0.001, Two-way ANOVA). Kontrol: Muamele edilmemiş U87MG hücresi, h: saat.

1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen U87MG 3B tümör hacminin, 120. saat sonunda tek başına 300 µM TMZ ile muamele edilen U87MG tümör hacminden 1.8 kat daha az olduğu saptandı (p<0.0001, Şekil 112).



Şekil 112. 300 µM TMZ ile muamele edilen hücre modelinin, 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen hücre modeline göre tümör hacminin karşılaştırılması, h: saat (\* p <0.001, Two-way ANOVA).

1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen U87MG 3B tümör hacminin, 120. saatin sonunda tek başına 350 µM TMZ ile muamele edilen U87MG tümör hacminden 2.2 kat daha düşük olduğu tespit edildi (p<0.0001, Şekil 113).

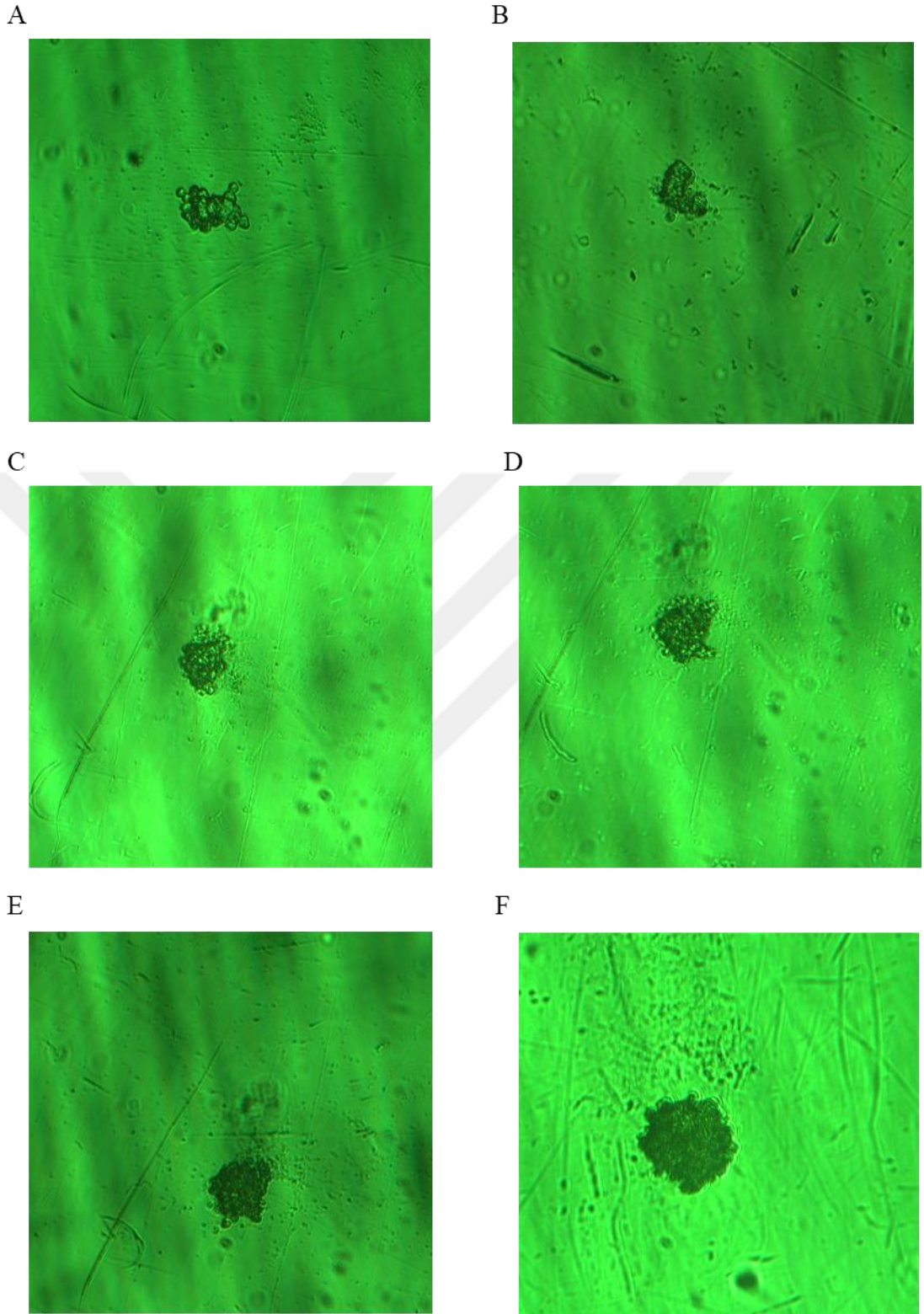


Şekil 113. 350 µM TMZ ile muamele edilen hücre modelinin, 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücre modeline göre tümör hacminin karşılaştırılması, h: saat (\* p <0.001, Two-way ANOVA).



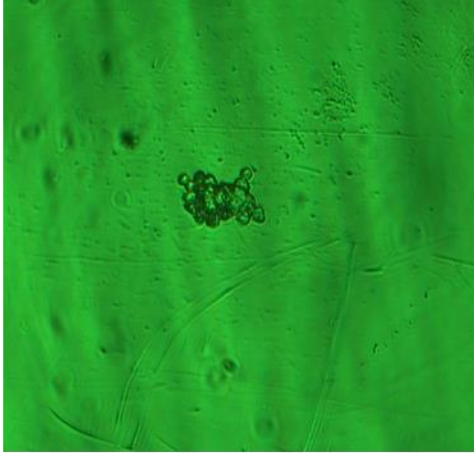
İstatistiksel analizler 40 hücre sayısında yapılmıştır. 80 hücre sayılı U87MG tümör boyutlarının da farklı dozlarda ve farklı saatlerdeki görüntüleri alınmıştır. 40 hücre sayısında olduğu gibi tek başına OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonu ile de 3B T98G tümör boyutunda küçülme gözlemlendi (Şekil 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120).



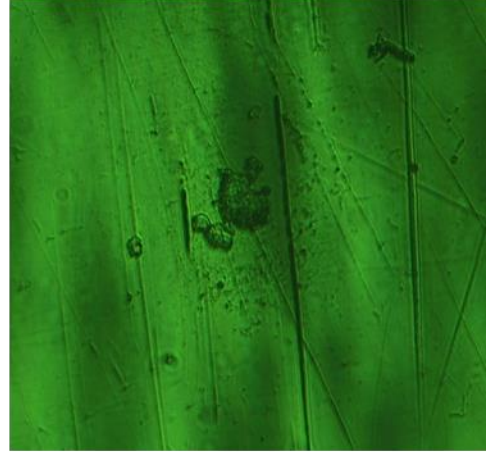


Şekil 114. 3B kültür çalışmasında muamele edilmemiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

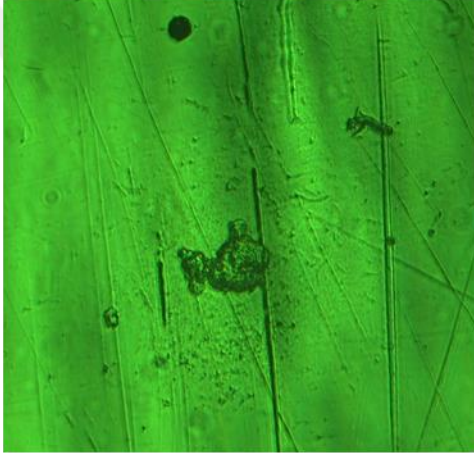
A



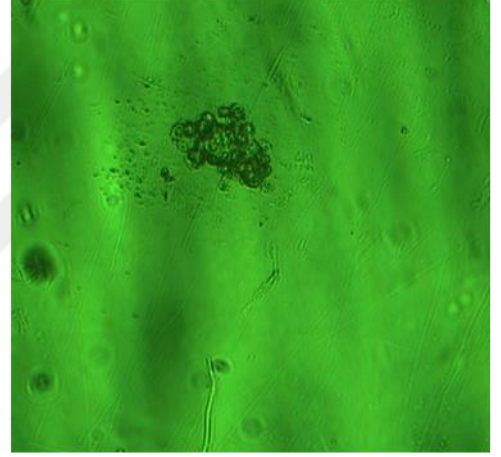
B



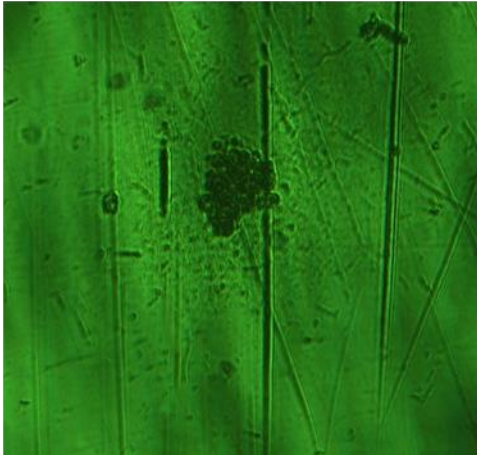
C



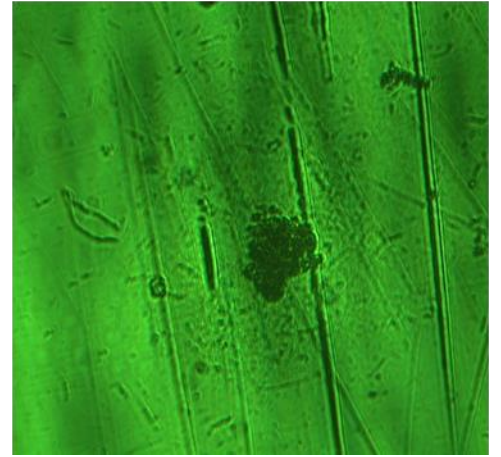
D



E

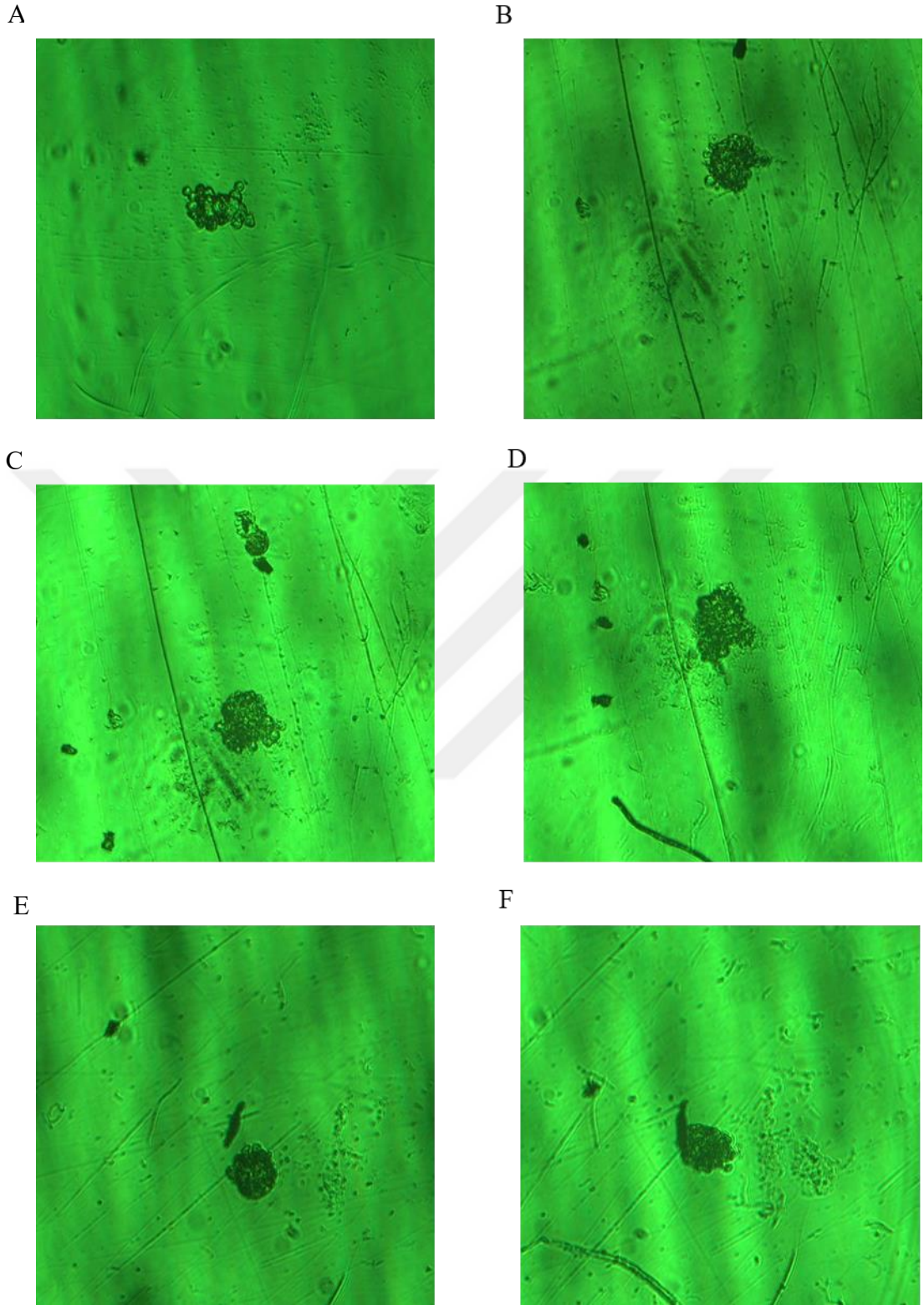


F

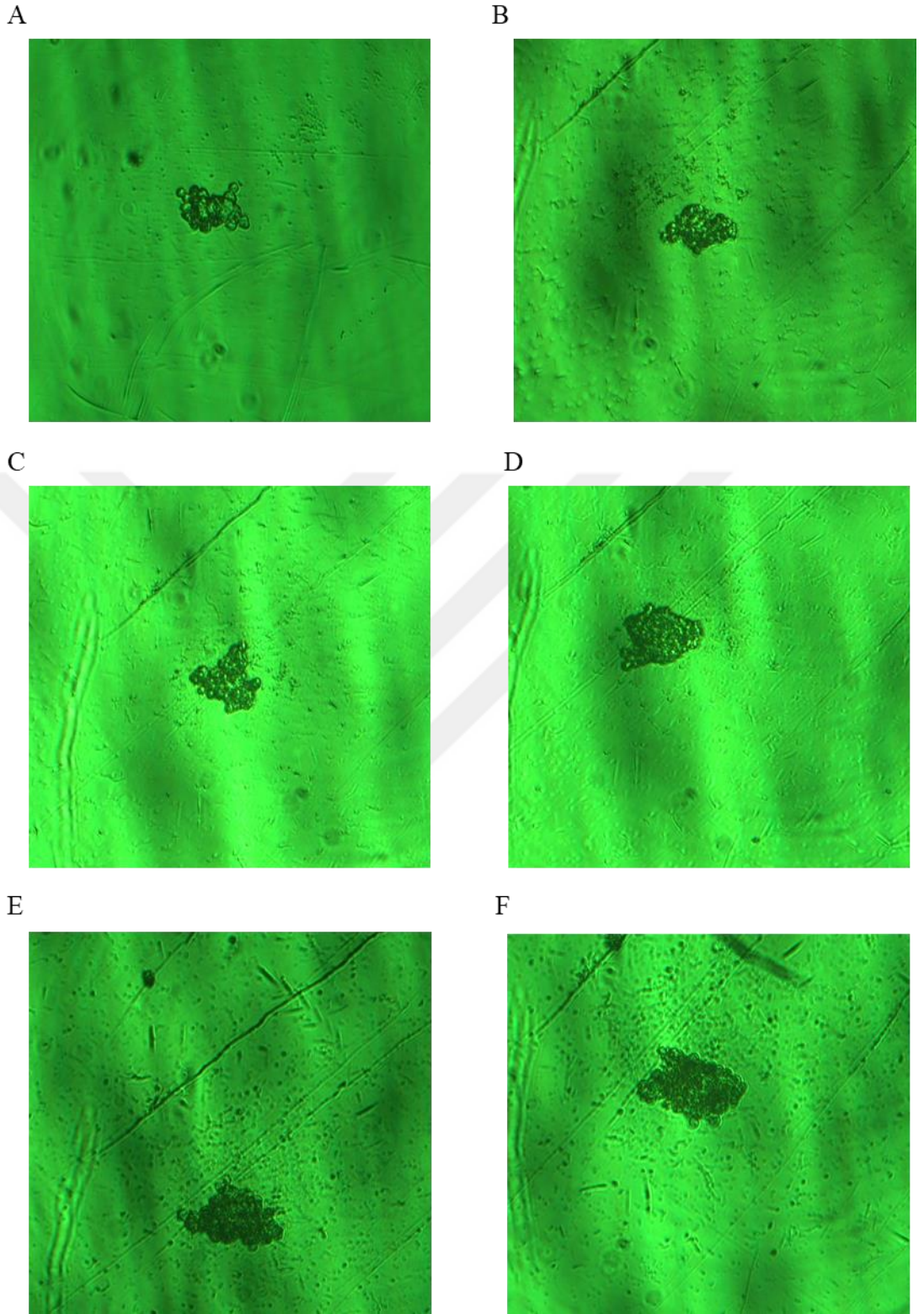


Şekil 115. 3B kültür çalışmasında 1 mg/ml OLE ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



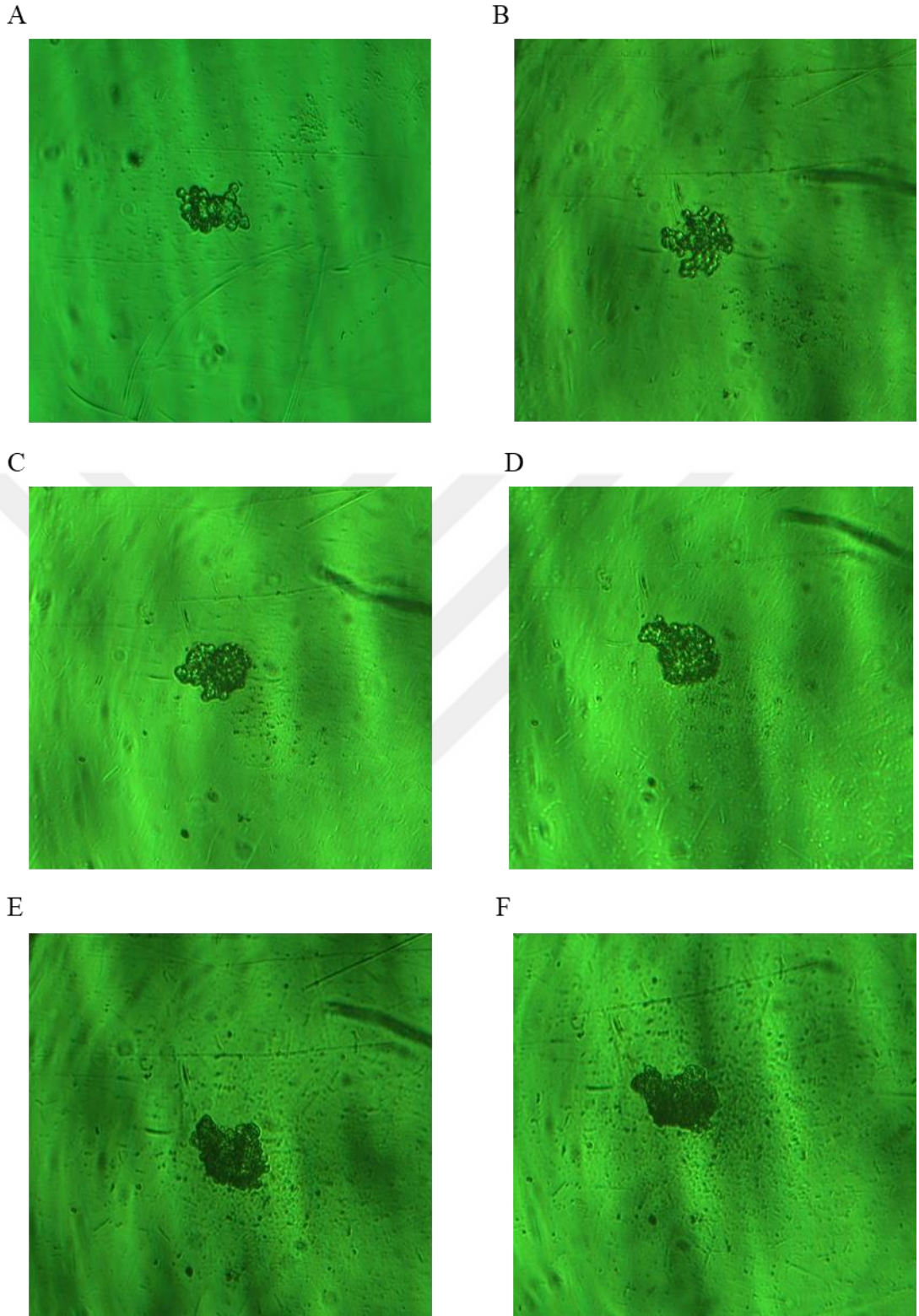


Şekil 116. 3B kültür çalışmasında 300 µM TMZ ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.

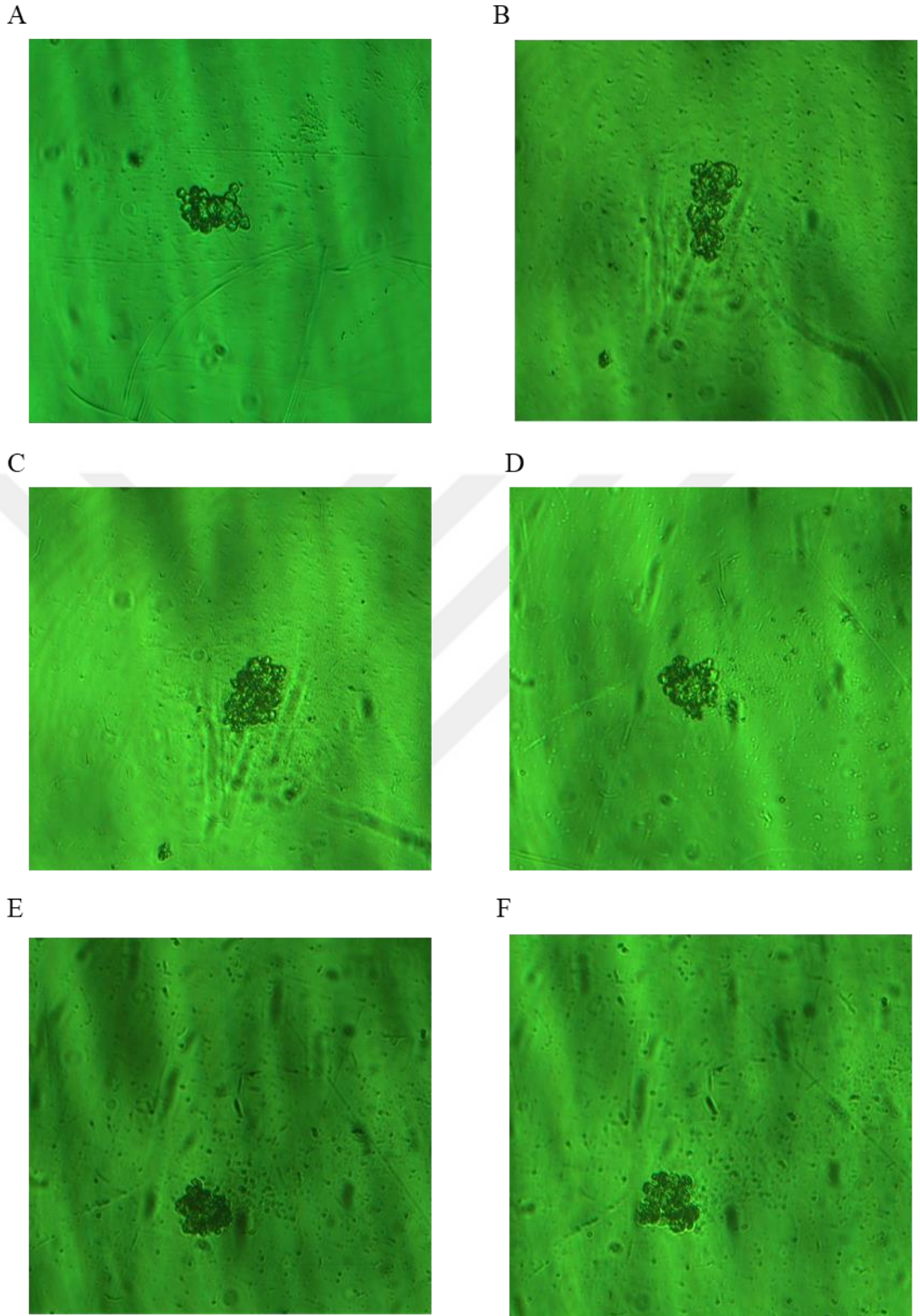


Şekil 117. 3B kültür çalışmasında 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



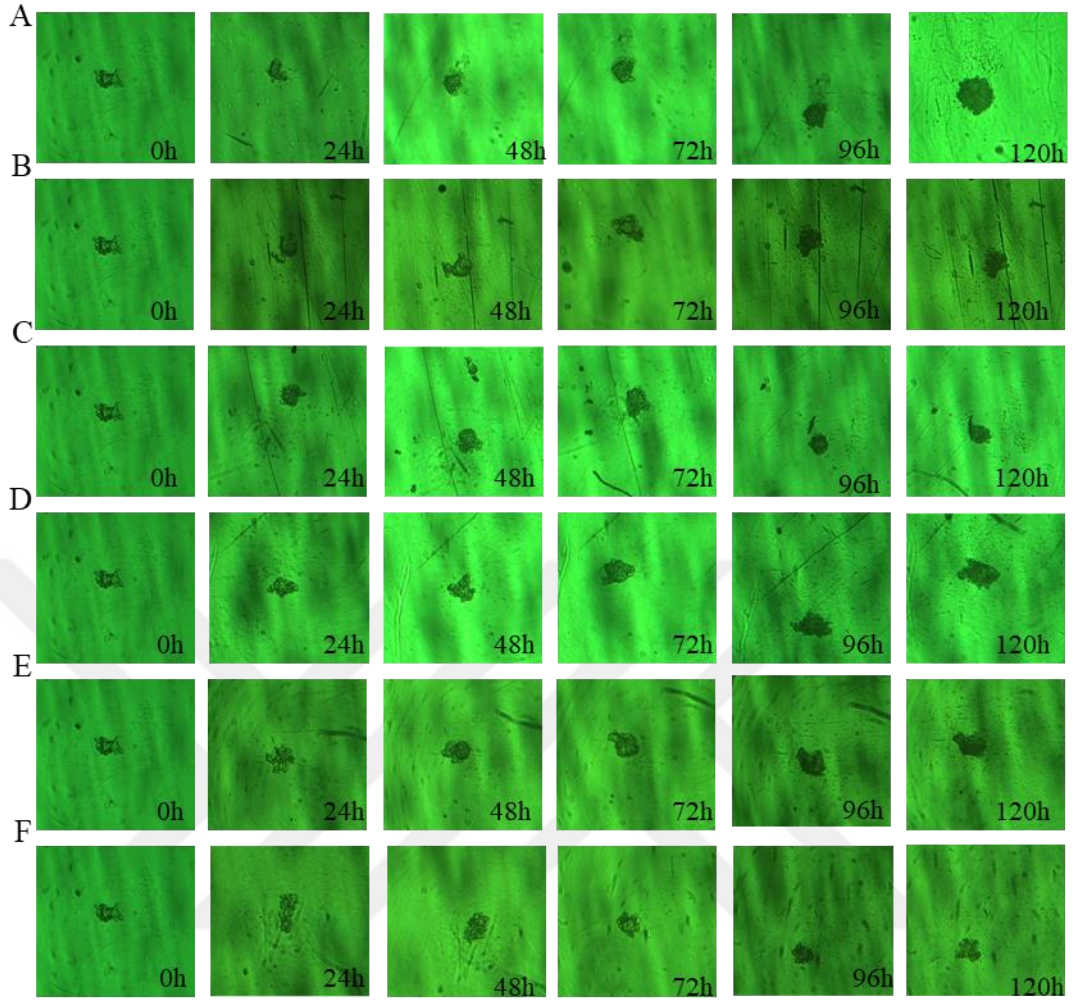


Şekil 118. 3B kültür çalışmasında 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.



Şekil 119. 3B kültür çalışmasında 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilmiş 80 hücre sayısı ile kültüre edilen U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin gösterimi, h: saat. (A) 0h, (B) 24h, (C) 48h, (D) 72h, (E) 96h, (F) 120h.





Şekil 120. 3B kültür çalışmasında farklı dozlar ile muamele edilmiş 80 hücre sayılı kültüre edilmiş U87MG tümör kitlelerinin farklı saatlerdeki büyüklüklerinin toplu gösterimi, h: saat. (A) Muamele edilmemiş U87MG hücresi, (B) 1 mg/ml OLE, (C) 300 µM TMZ, (D) 350 µM TMZ, (E) 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ (F) 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ.

#### 4.7 GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin MDR İle İlişkili Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

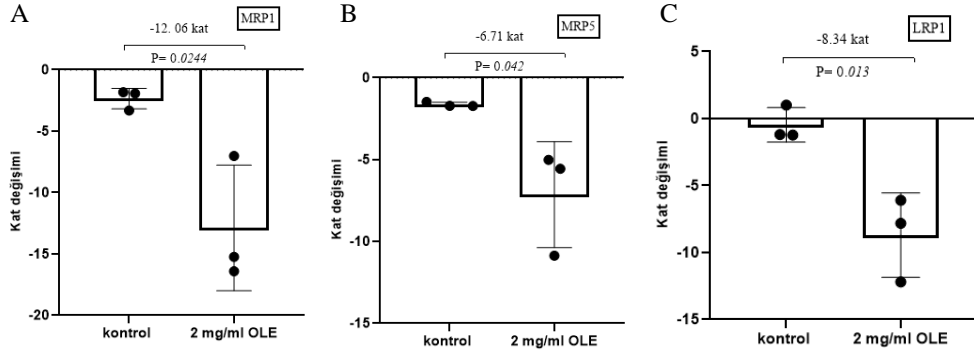
##### 4.7.1 T98G Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin MDR İle İlişkili Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

T98G hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının MDR ile ilişkili *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinde mRNA ekspresyon seviyesine etkisinin tespit edilmesi amacı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 34'de gösterildi.

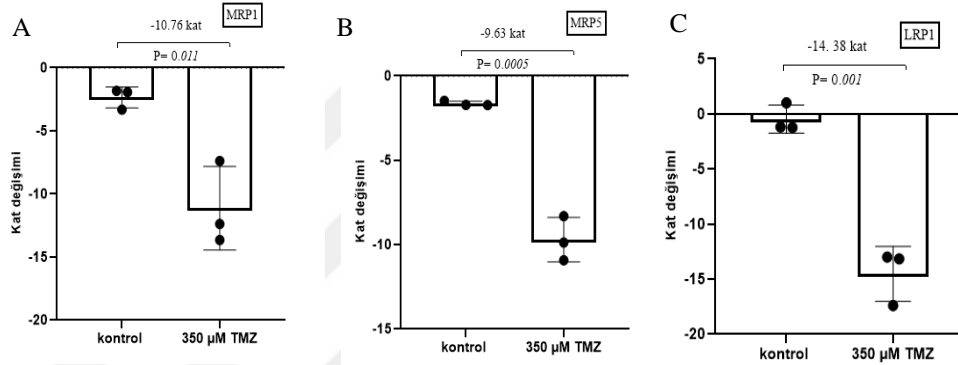
Tablo 34. T98G hücrelerinde MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon değerleri.

	<i>MRP1</i>	<i>MRP5</i>	<i>LRP1</i>
<b>2 mg/ml OLE</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000001	0,00029	0,000402
Kat değişimi	-12.06 kat	-6.71 kat	-8.34 kat
p değeri	<i>p</i> = 0.024*	<i>p</i> =0.042*	<i>p</i> = 0.013*
<b>350 <math>\mu</math>M TMZ</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000001	0,000202	0,000233
Kat değişimi	-10.76 kat	-9.63 kat	-14.38 kat
p değeri	<i>p</i> = 0.011*	<i>p</i> = 0.0005*	<i>p</i> = 0.001*
<b>400 <math>\mu</math>M TMZ</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000002	0,0003	0,000431
Kat değişimi	-6.90 kat	-6.49 kat	-7.76 kat
p değeri	<i>p</i> = 0.005*	<i>p</i> = 0.022*	<i>p</i> = 0.004*
<b>2 mg/ml OLE + 350 <math>\mu</math>M TMZ</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000157	0,002495	0,002651
Kat değişimi	11.49 kat	1.28 kat	-1.26 kat
p değeri	<i>p</i> =0.019*	<i>p</i> =0.065	<i>p</i> =0.893
<b>2 mg/ml OLE + 400 <math>\mu</math>M TMZ</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000038	0,00156	0,001861
Kat değişimi	2.75 kat	1.24 kat	-1.80 kat
p değeri	<i>p</i> =0.025*	<i>p</i> =0.085	<i>p</i> =0.146

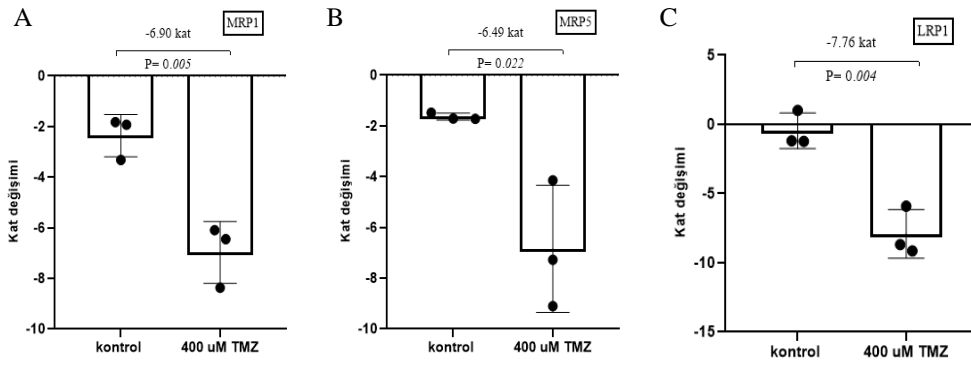
T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz hücreler ile karşılaştırıldığında *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu görüldü (sırasıyla; -12.06 kat *p*=0.024, -6.71 kat *p*=0.042, -8.34 kat *p*=0.013; Şekil 121). 350  $\mu$ M ve 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz U87MG hücrelerine göre OLE’de görüldüğü gibi *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (sırasıyla, 350  $\mu$ M TMZ için; -10.76 kat *p*= 0.011, -9.63 kat *p*= 0.0005, -14.38 kat *p*=0.001; Şekil 122; 400  $\mu$ M TMZ için; -6.90 kat *p*=0.005, -6.49 kat *p*=0.022, -7.76 kat *p*=0.004; Şekil 123).



Şekil 121. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.



Şekil 122. T98G hücrelerinde 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.

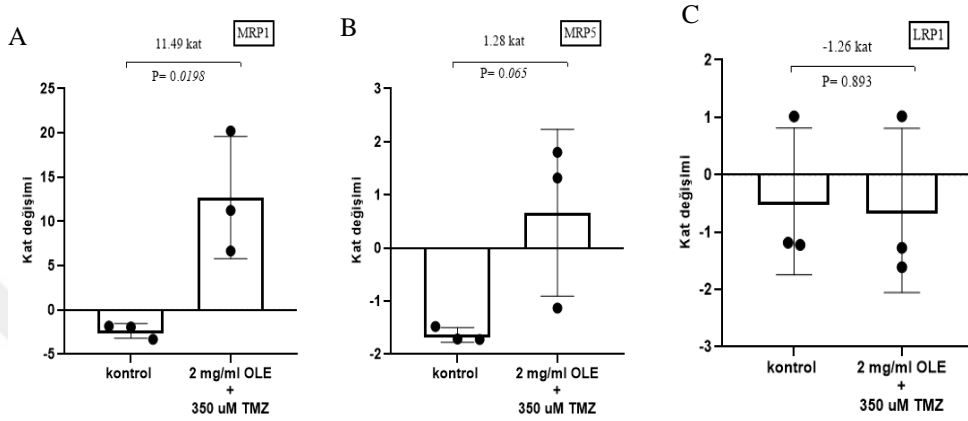


Şekil 123. T98G hücrelerinde 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.

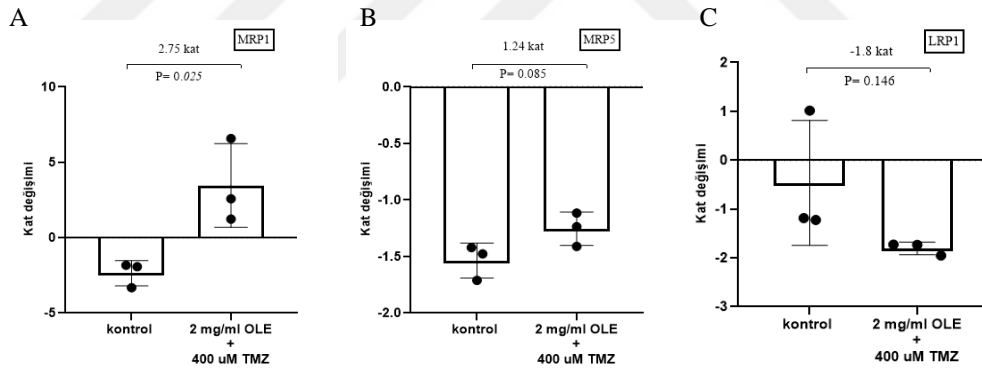
OLE+TMZ kombinasyonlarının MDR ile ilişkili genlere olan etkisi incelendiğinde, 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz T98G hücreleri ile karşılaştırıldığında *MRP1* ve *MRP5* genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış, *LRP1* geninin ekspresyon seviyesinde düşüş gözlemlendi (sırasıyla; 11.49 kat  $p=0.019$ , 1.28 kat  $p=0.065$ , -1.26 kat  $p=0.893$ ; Şekil 124). 2 mg/ml OLE + 400 µM



TMZ ile muamele edilen hücrelerde de aynı şekilde *MRP1* ve *MRP5* genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış, *LRP1* geninin ekspresyon seviyesinde düşüş gözlemlendi (sırasıyla; 2.75 kat  $p=0.025$ , 1.24 kat  $p=0.085$ , -1.80 kat  $p=0.146$ ; Şekil 125).

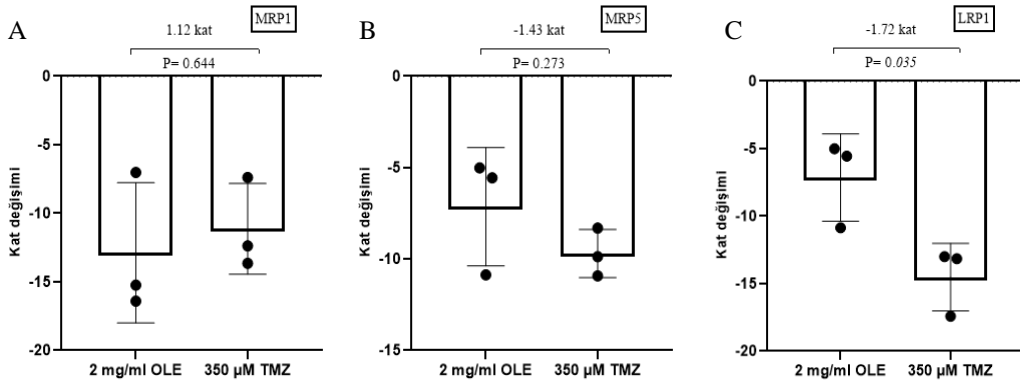


Şekil 124. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.

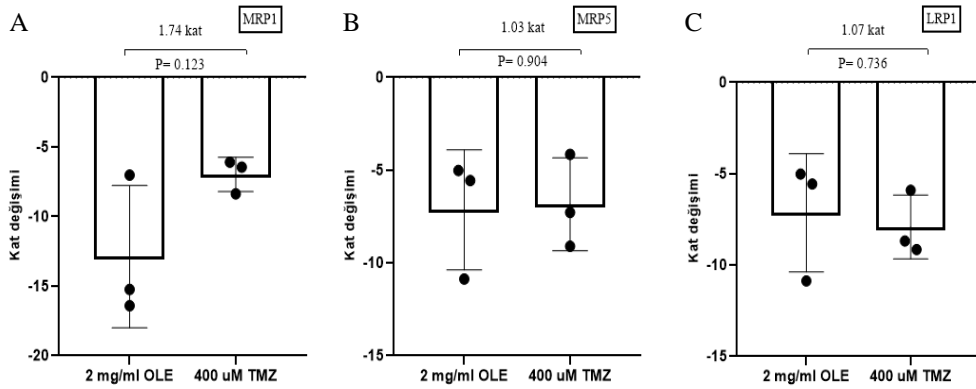


Şekil 125. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.

2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin, 350 µM ve 400 µM TMZ ile muamele edilen hücreler ile karşılaştırılmasında Şekil 126 ve Şekil 127'de gösterildiği gibi *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık saptanamadı. Bu sonuç OLE'nin TMZ'nin düşük ve yüksek dozu ile benzer etki gösterdiğini doğruladı.



Şekil 126. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmalı MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.



Şekil 127. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmalı MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.

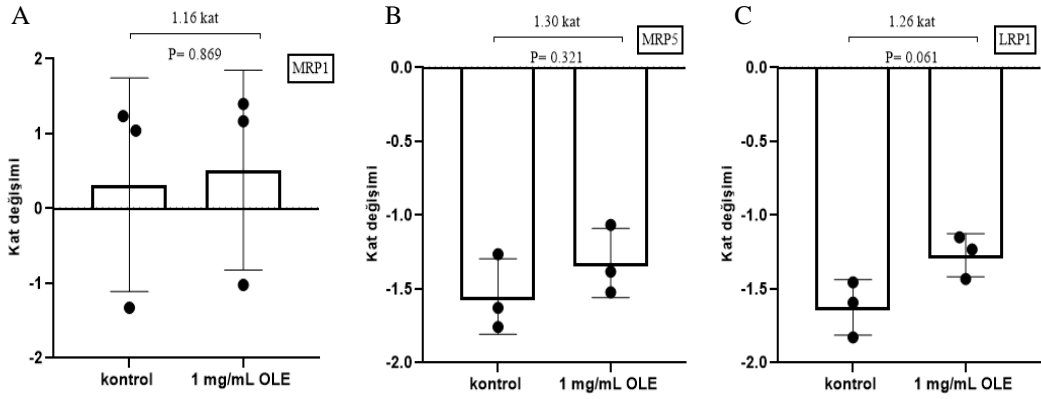
#### 4.7.2 U87MG Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin MDR İle İlişkili Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

U87MG hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının MDR ile ilişkili *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinde mRNA ekspresyon seviyesine etkisinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen veriler Tablo 35'te gösterildi.

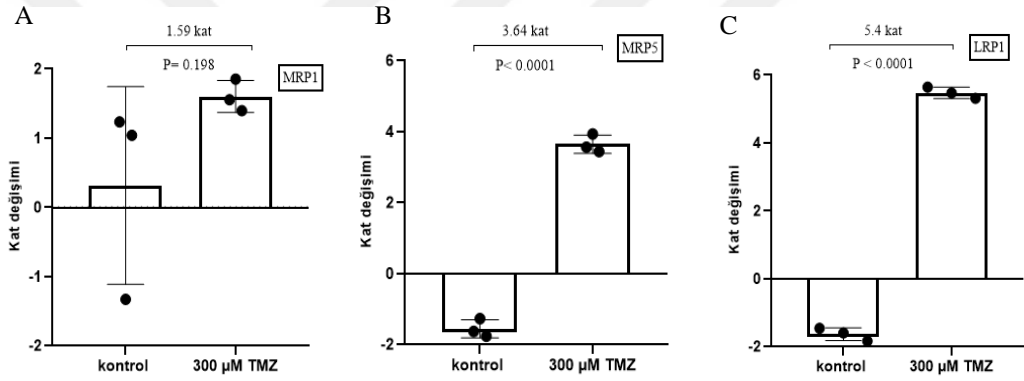
Tablo 35. U87MG hücrelerinde MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon değerleri.

	<i>MRP1</i>	<i>MRP5</i>	<i>LRP1</i>
<b>1 mg/ml OLE</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000018	0,000717	0,002976
Kat değişimi	1.16 kat	1.30 kat	1.26 kat
p değeri	p= 0.869	p= 0.321	p= 0.061
<b>300 <math>\mu</math>M TMZ</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000025	0,00342	0,020632
Kat değişimi	1.59 kat	3.64 kat	5.4 kat
p değeri	p= 0.198	<i>p</i> <0.0001*	<i>p</i> < 0.0001*
<b>350 <math>\mu</math>M TMZ</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000007	0,000727	0,003771
Kat değişimi	-2.15 kat	-1.29 kat	1.00 kat
p değeri	<i>p</i> = 0.040*	p= 0.423	p= 0.070
<b>1 mg/ml OLE + 300 <math>\mu</math>M TMZ</b>			
2 $\Delta$ CT	0,000015	0,001829	0,005742
Kat değişimi	-1.03 kat	1.94 kat	1.52 kat
p değeri	p=0.951	<i>p</i> =0.0006*	p=0.064
<b>1 mg/ml OLE + 350 <math>\mu</math>M TMZ</b>			
2 $\Delta$ CT	0,00002	0,001907	0,006326
Kat değişimi	1.26 kat	2.03 kat	1.67 kat
p değeri	p=0.806	<i>p</i> <0.0001*	<i>p</i> <0.0001*

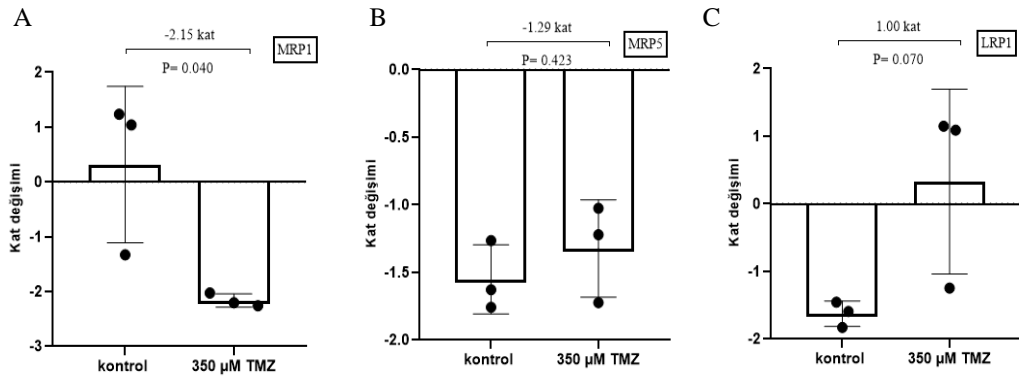
1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerin, doz verilmeyen U87MG hücrelerine kıyasla *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalış veya artış gözlenmedi (sırasıyla, 1.16 kat p=0.869, 1.30 kat p=0.321, 1.26 kat p=0.061; Şekil 128). 300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerin, doz verilmeyen U87MG hücrelerine kıyasla *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (sırasıyla; 3.64 kat p<0.0001, 5.4 kat p< 0.0001; Şekil 129). 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerin ise, doz verilmeyen hücrelere kıyasla *MRP1* geninde anlamlı bir azalış olduğu gözlemlendi (-2.15 kat p=0.040; Şekil 130).



Şekil 128. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz U87MG hücresi.



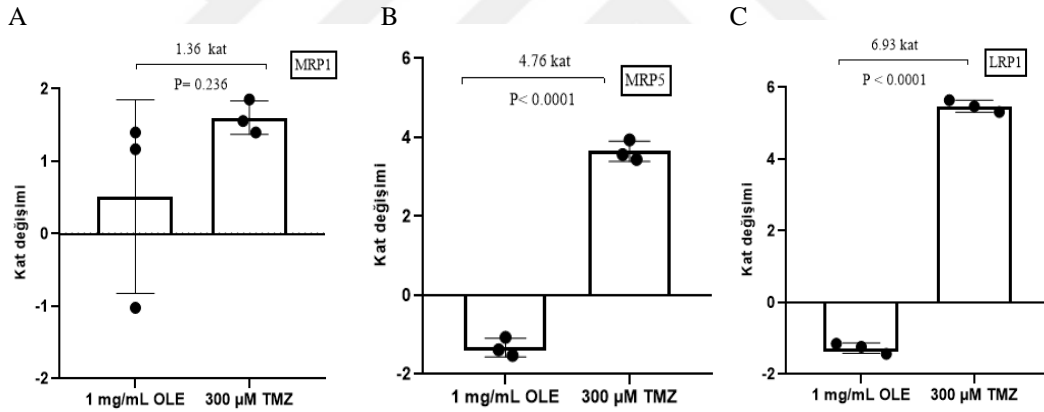
Şekil 129. U87MG hücrelerinde 300 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz U87MG hücresi.



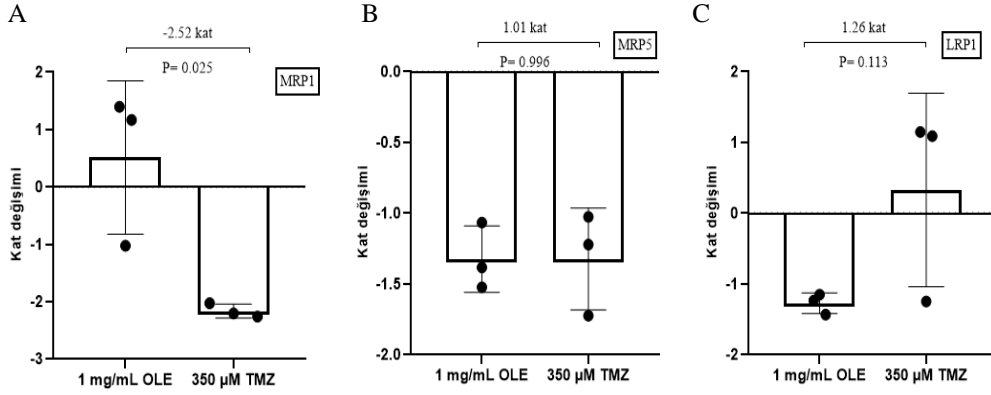
Şekil 130. U87MG hücrelerinde 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz U87MG hücresi.

OLE+TMZ kombinasyonlarının MDR ile ilişkili genlere olan etkisi incelendiğinde, 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz U87MG hücrelerine kıyasla *MRP5* geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlendi (1.94 kat p=0.0006). 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin ise muamelesiz U87MG hücrelerine kıyasla *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla; 2.03 kat p<0.0001, 1.67 kat p<0.0001).

1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücreleri ile 300 µM TMZ muamele edilen U87MG hücrelerinin karşılaştırılmasında, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerde daha az eksprese olduğu tespit edildi (Şekil 131). 1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerinin 300 µM TMZ muamele edilen U87MG hücrelerinin karşılaştırılmasında ise, *LRP1* geninin ekspresyon seviyesinin OLE uygulanan hücrelerde daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 132).



Şekil 131. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile 300 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmalı MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz U87MG hücresi.



Şekil 132. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmalı MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MRP1*, (B) *MRP5*, (C) *LRP1*. Kontrol: Muamelesiz U87MG hücresi.

#### 4.8. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin Hücre Yaşlanması Üzerine Etkileri

##### 4.8.1 T98G Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin Hücre Yaşlanması Üzerine Etkileri

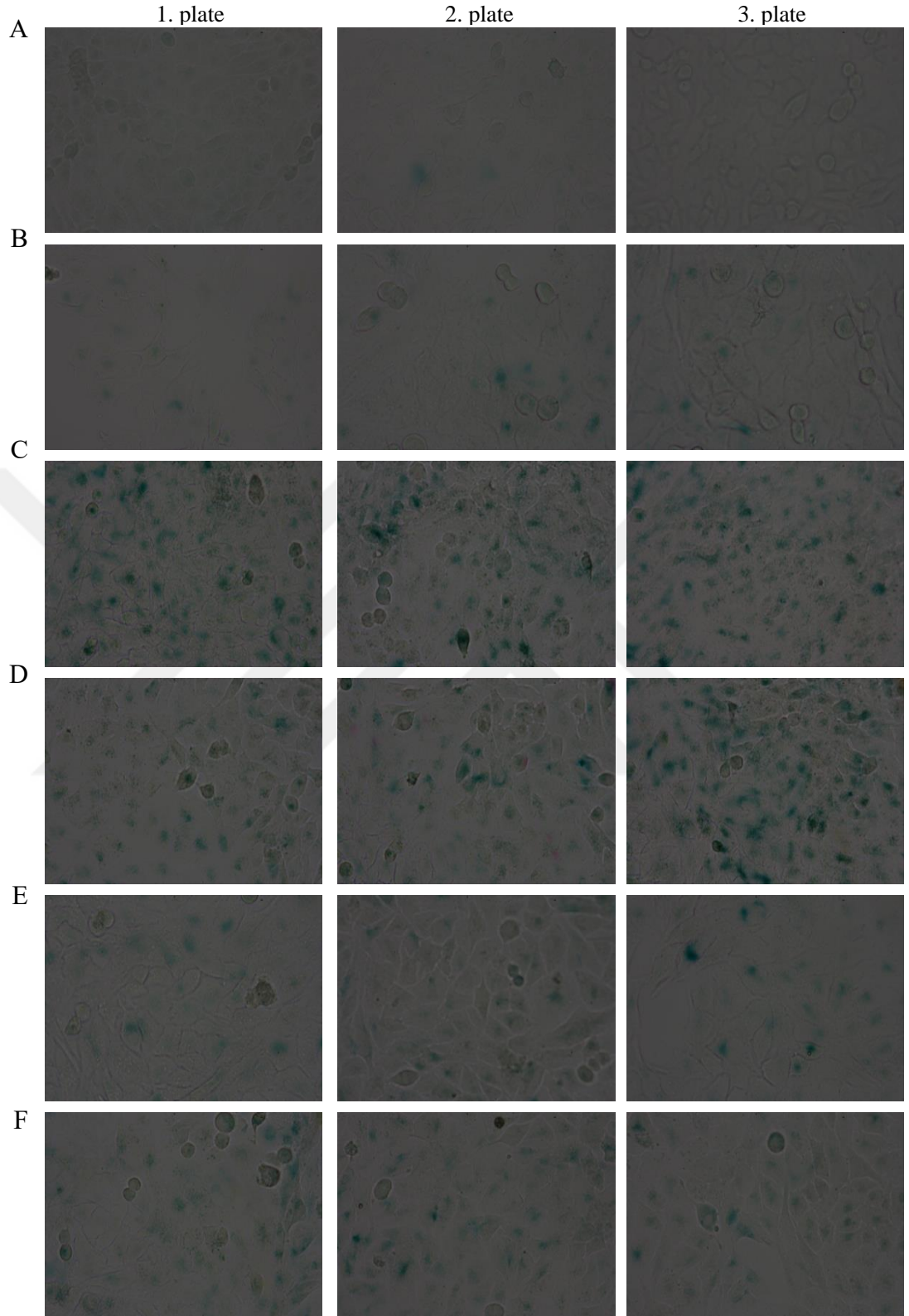
T98G hücreleri için belirlenen etkin OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyon dozlarının hücre yaşlanması üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining deneyi sonucunda, kontrolde (doz verilmeyen) yaşlanan hücre sayısının ortalama 113 hücrede 1 olduğu tespit edildi (%0.8,  $p < 0.0001$ , Tablo 36). T98G için en etkin doz olarak belirlenen 2 mg/ml OLE uygulanan hücrelerde yaşlanan hücre sayısının ortalama 66 hücrede 7 olduğu belirlendi (% 11,  $p < 0.0001$ ). 350 µM ve 400 µM TMZ uygulanan hücrelerde yaşlanan hücre sayısının ise sırasıyla ortalama 105 hücrede 69 (%66,  $p < 0.0001$ ) ve ortalama 106 hücrede 50 (%47,  $p < 0.0001$ ) olarak belirlendi. Sonuçlar doğrultusunda OLE'nin kontrol hücreye göre düşük bir oranda hücre yaşlanma özelliği gösterdiği ancak TMZ'nin iki dozunun da kontrole ve OLE'ye göre yüksek oranda hücreleri yaşlandırdığı belirlendi. (Şekil 133). Kombinasyonlar ile muamele edilen hücrelerde ise, 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ uygulanan hücrelerde ortalama 66 hücrede 17 (%25,  $p < 0.0001$ ), 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ uygulanan hücrelerde ortalama 83 hücrede 25 (%30,  $p < 0.0001$ ) yaşlanan hücre tespit edildi. Böylece OLE+TMZ kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerde yaşlanan hücre sayısının az olması

dolayısıyla TMZ'nin hücreleri yaşlandırma özelliğinin OLE ile azaldığı saptandı ( $p<0.0001$ , Şekil 134).

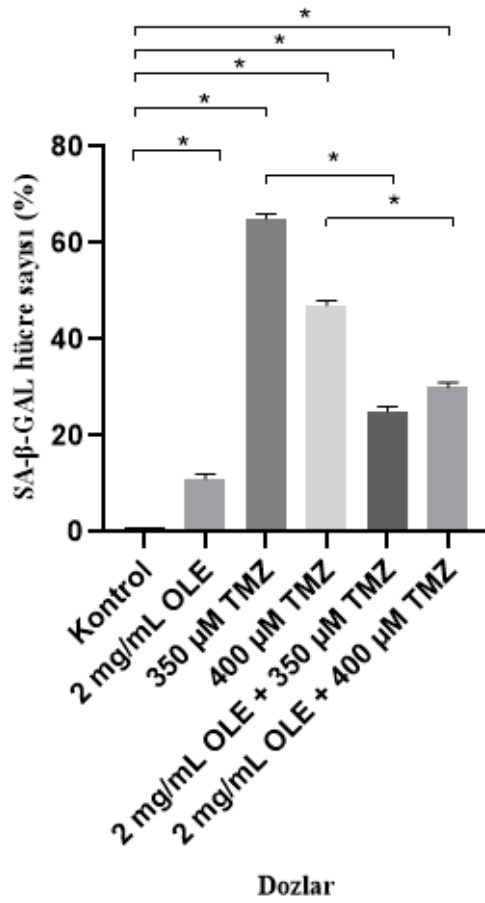
Tablo 36. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun T98G hücrelerinde hücre yaşlanması üzerine etkisi.

	Hücre sayısı (n=3)			Ortalama hücre sayısı	Yaşlanan hücre sayısı (n=3)			Ortalama yaşlanan hücre sayısı (%)
	I	II	III		I	II	III	
Muamele edilmemiş kontrol	121	111	107	113	0	3	0	1 (%0.8)
2 mg/ml OLE	54	67	76	42	7	8	7	7 (%11)
350 $\mu$ M TMZ	101	104	110	105	77	53	77	69 (%66)
400 $\mu$ M TMZ	100	104	115	106	42	33	76	50 (%47)
2 mg/ml OLE + 350 $\mu$ M TMZ	78	94	57	66	15	17	19	17 (%25)
2 mg/ml OLE + 400 $\mu$ M TMZ	75	90	85	83	25	28	22	25 (%30)





Şekil 133. OLE ve TMZ'nin T98G hücrelerinde hücre yaşlanması üzerine etkileri (A) Muamele edilmemiş T98G hücreleri (B) 2 mg/ml OLE (C) 350 µM TMZ (D) 400 µM TMZ (E) 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ (F) 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilmiş T98G hücreleri. (Fotoğraflar 20X ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir).



Şekil 134. T98G hücrelerinde OLE ve TMZ muamelelerinin kontrol ve birbirlerine göre yaşlanma üzerindeki etkilerinin karşılaştırılmaları (\* p <0.0001, bağımsız t test). Kontrol: Muamelesiz T98G hücresi.

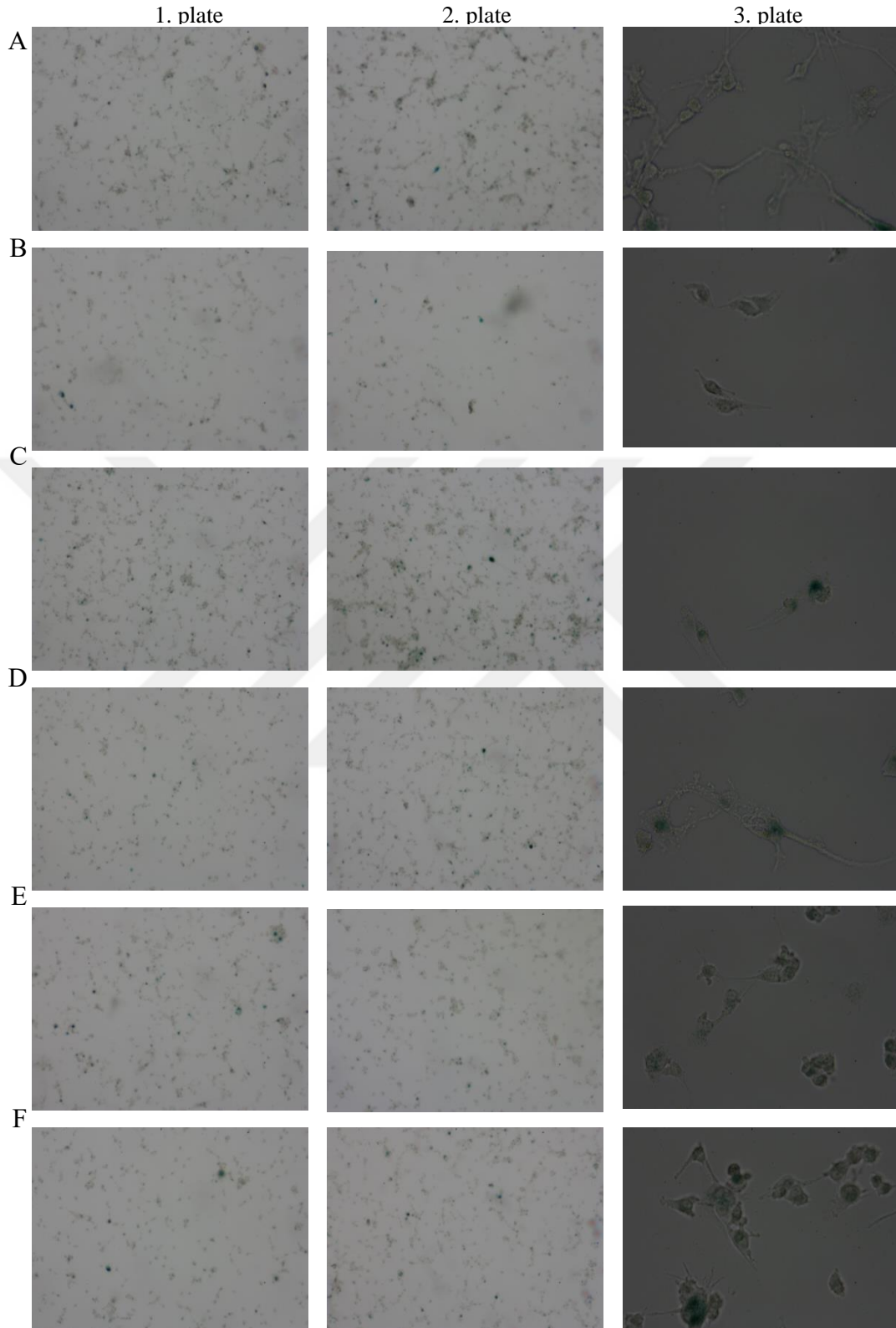
#### 4.8.2. U87MG Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin Hücre Yaşlanması Üzerine Etkileri

U87MG hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyon dozlarının hücre yaşlanması üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan Senescence β-Galactosidase Staining deneyi ile, kontroldeki (doz verilmeyen) hücrelerde, yaşlanan hücre sayısının ortalama 418 hücrede 13 olduğu tespit edildi (%3.1, p<0.0001, Tablo 37). 1 mg/ml OLE uygulanan hücrelerde yaşlanan hücre sayısının ortalama 235 hücrede 12 olduğu belirlendi (%5.1, p<0.0001). 300 µM ve 350 µM TMZ uygulanan hücrelerdeki yaşlanan hücre sayıları ise sırasıyla ortalama 461.5 hücrede 62 (%13.4, p<0.0001) ve ortalama 368.5 hücrede 36 (%9.7, p<0.0001) olarak belirlendi. Sonuçlar, kontrol hücreye kıyasla OLE ve TMZ'nin hücre yaşlanma özelliği gösterdiği belirlendi. (Şekil 135). Kombinasyonlar ile muamele edilen hücrelerde ise, 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ uygulanan hücrelerde ortalama 360.5 hücrede 15 (%4.2, p

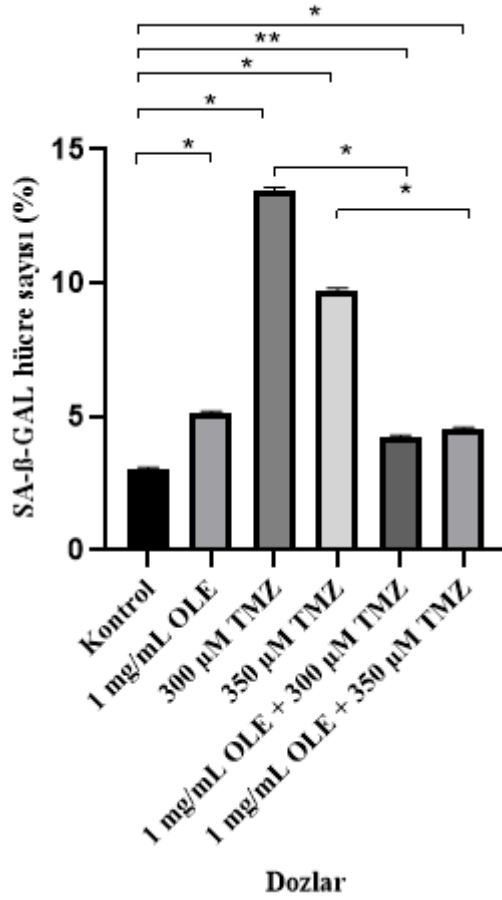
=0.0001), 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ uygulanan hücrelerde ortalama 373 hücrede 17.5 (%4.5, p<0.0001) yaşlanan hücre tespit edildi. Böylece OLE+TMZ kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerde tek başına TMZ ile muamele edilen hücrelere göre daha az yaşlanan hücre sayısının olmasından dolayı TMZ'nin hücreleri yaşlandırma özelliğinin OLE ile azaldığı saptandı (p<0.0001, Şekil 136).

Tablo 37. OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonunun U87MG hücrelerinde hücre yaşlanması üzerine etkisi.

	Hücre sayısı (n=2)		Ortalama hücre sayısı	Yaşlanan hücre sayısı (n=3)		Ortalama yaşlanan hücre sayısı, (%)
	I	II		I	II	
Muamele edilmemiş kontrol	412	424	418	10	16	13 (%3.1)
1 mg/ml OLE	279	191	235	10	14	12 (%5.1)
300 µM TMZ	469	454	461.5	49	75	62 (%13.4)
350 µM TMZ	339	398	368.5	27	45	36 (%9.7)
1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ	391	330	360.5	21	9	15 (%4.2)
1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ	382	364	373	8	27	17.5 (4.5)



Şekil 135. OLE ve TMZ'nin U87MG hücrelerinde hücre yaşlanması üzerine etkileri (A) Muamele edilmemiş U87MG hücreleri (B) 1 mg/ml OLE, (C) 300 µM TMZ, (D) 350 µM TMZ, (E) 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ (F) 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilmiş U87MG hücreleri. (1.ve 2. plateteki fotoğraflar 20X ile 3. platedeki fotoğraflar ise 10X ışık mikroskobu görüntülenmiştir).



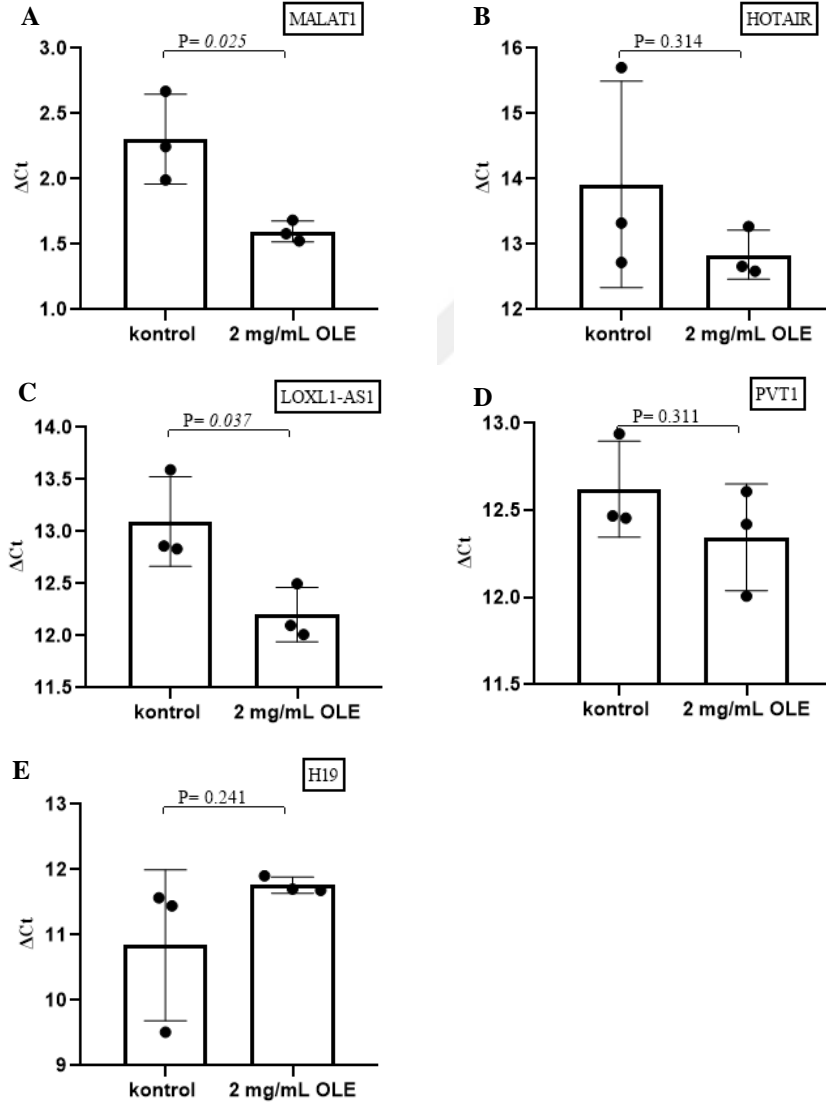
Şekil 136. U87MG hücrelerinde OLE ve TMZ muamelelerinin kontrol ve birbirlerine göre yaşlanma üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı (\* p <0.0001, \*\* p=0.0001, bağımsız t test). Kontrol: Muamelesiz U87MG hücresi.

#### 4.9. GB Hücre Hatlarında OLE ve TMZ'nin Birlikte LncRNA Ekspresyon Profilleri Üzerine Etkileri

##### 4.9.1. T98G Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin Birlikte LncRNA Ekspresyon Profilleri Üzerine Etkileri

T98G hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının MALAT1, HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1 ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkilerinin belirlenmesi amacı ile istatistiksel analizler gerçekleştirildi. Bu analizler doğrultusunda; 2 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G hücrelerinin, muamele edilmeyen T98G hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında

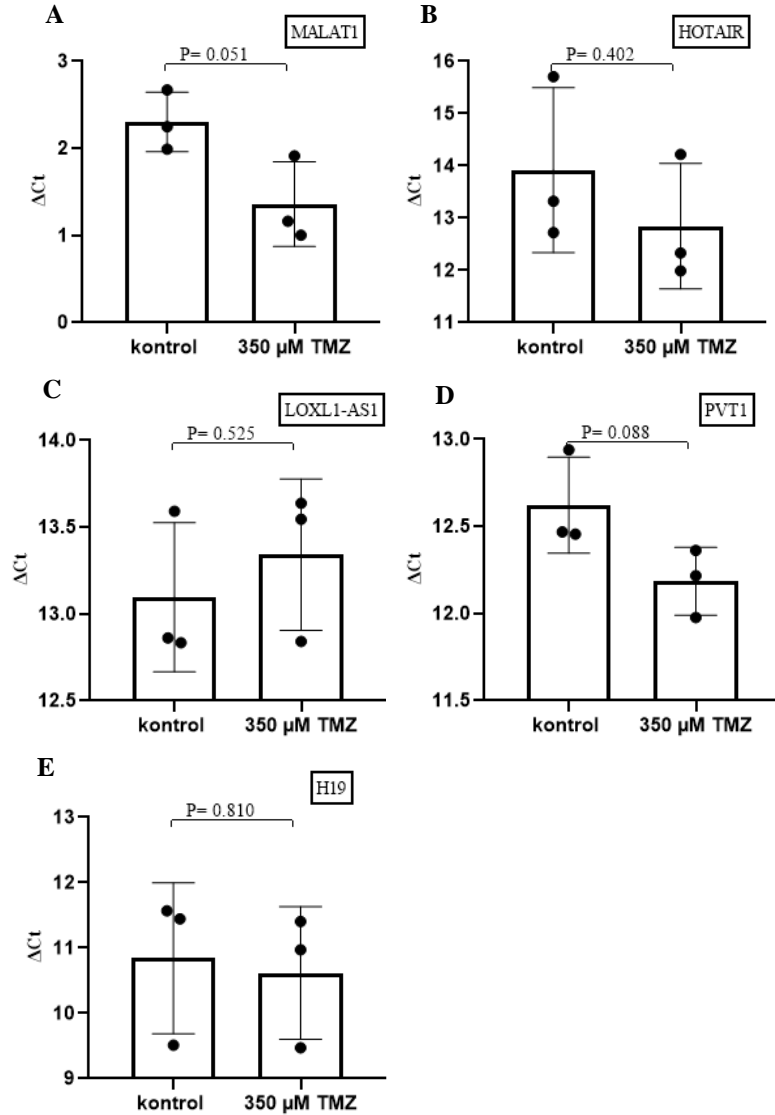
MALAT1 ve LOXL1-AS1 LncRNA'ların ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmakla birlikte, HOTAIR ve PVT1 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan azalma, H19'un ekspresyon seviyesinde ise artma olduğu tespit edildi (sırasıyla;  $p=0.025$ ,  $p=0.037$ ,  $p=0.314$ ,  $p=0.311$ ,  $p=0.241$ ; Şekil 137).



Şekil 137. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) MALAT1, (B) HOTAIR, (C) LOXL1-AS1, (D) PVT1, (E) H19.

350  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerin, muamele edilmeyen T98G hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında MALAT1 HOTAIR ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde azalış gözlemlendi ancak istatistiksel

olarak anlamlılık saptanmadı (sırasıyla;  $p=0.051$ ,  $p=0.402$ ,  $p=0.088$ ,  $p=0.810$ ; Şekil 138).

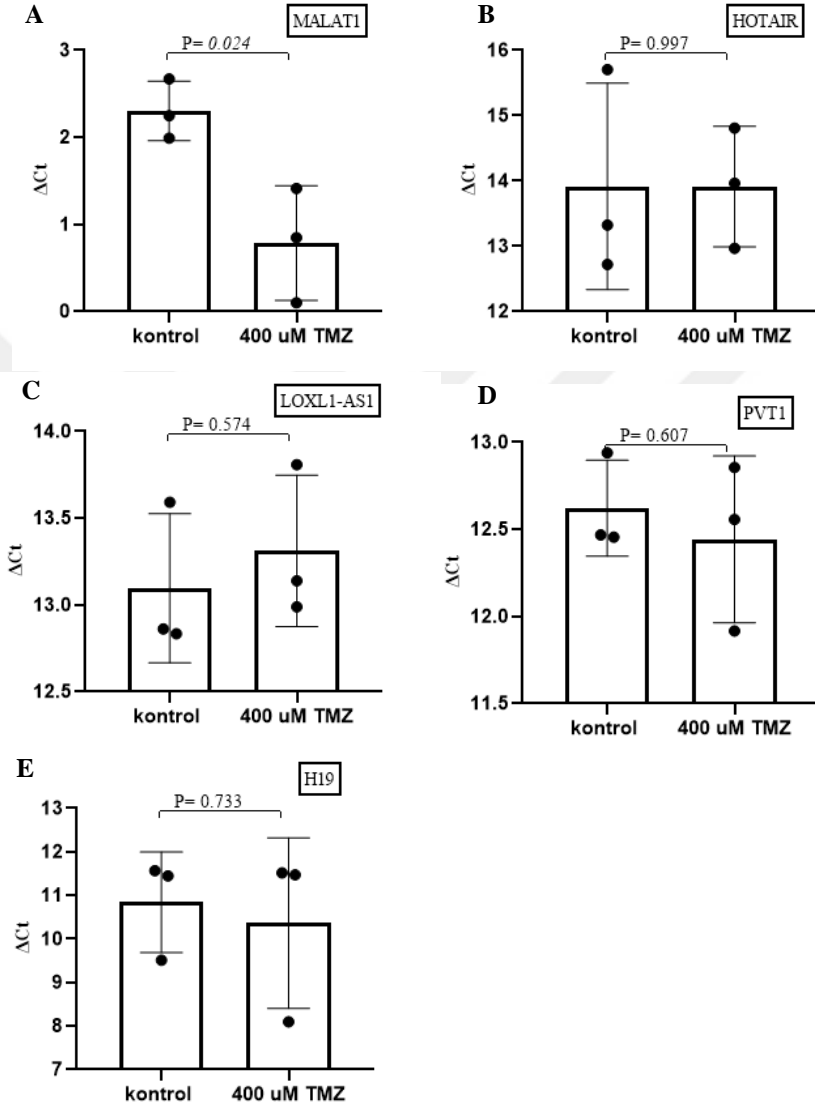


Şekil 138. T98G hücrelerinde 350  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen hücrelerin lncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) MALAT1, (B) HOTAIR, (C) LOXL1-AS1, (D) PVT1, (E) H19.

400  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerin, muamele edilmeyen T98G hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında MALAT1'in ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmakla birlikte HOTAIR, PVT1 ve H19 lncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan azalma görüldü (sırasıyla;  $p=0.024$ ,  $p=0.997$ ,  $p=0.607$ ,



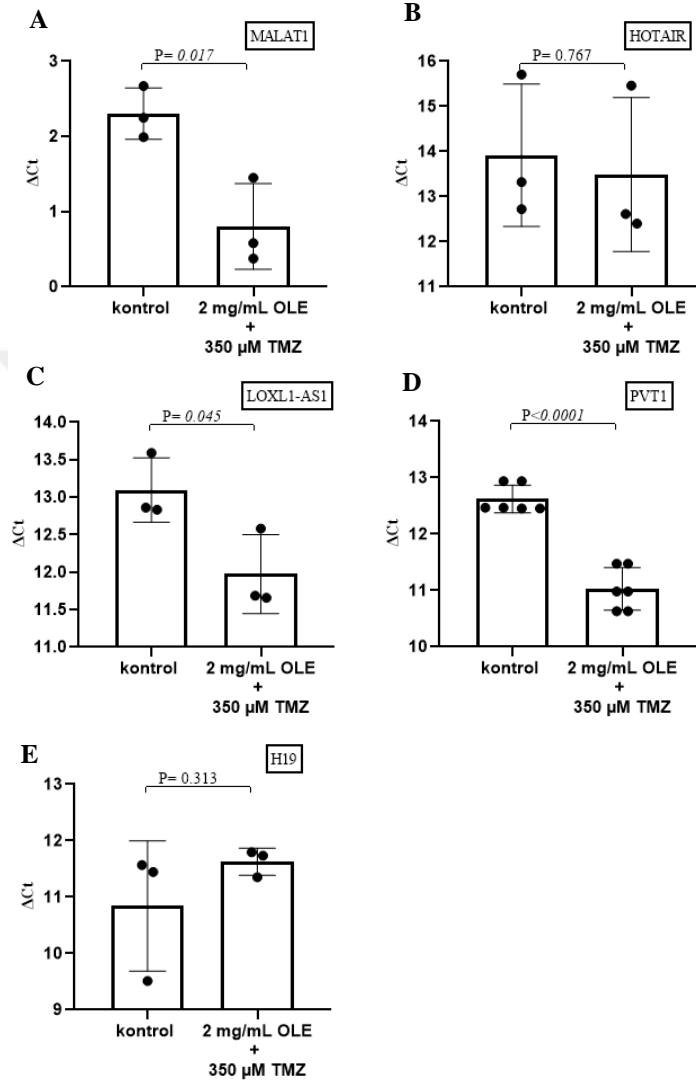
p=0.733; Şekil 133). LOXL1-AS1'in ekspresyon seviyesinde ise artış tespit edildi (p=0.574; Şekil 139).



Şekil 139. T98G hücrelerinde 400  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen hücrelerin LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) MALAT1, (B) HOTAIR, (C) LOXL1-AS1, (D) PVT1, (E) H19.

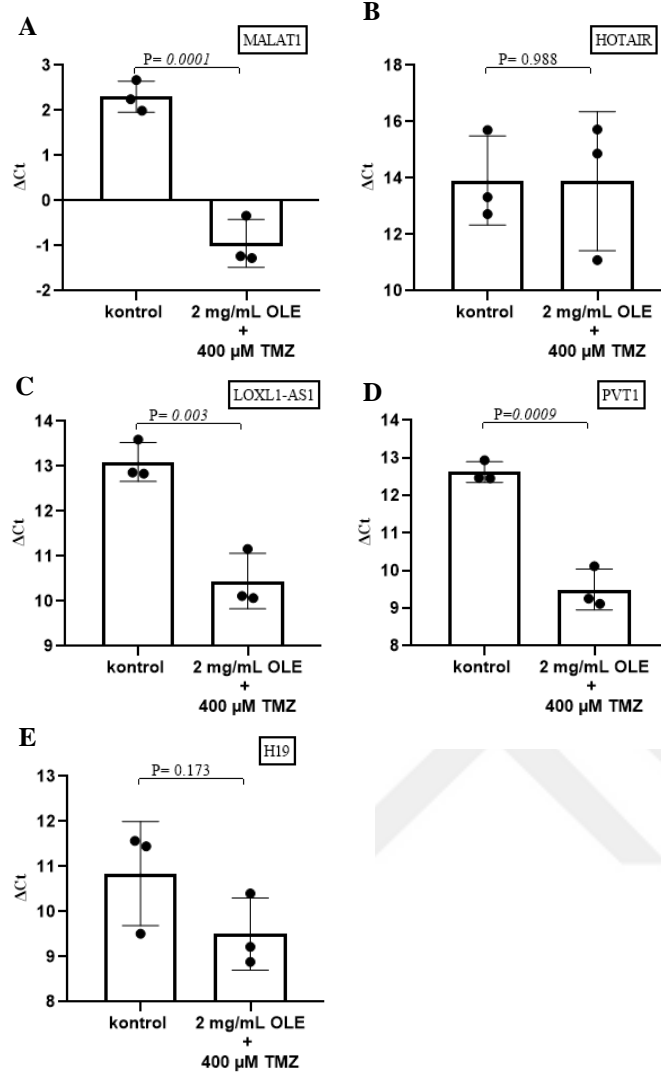
OLE+TMZ kombinasyonlarının LncRNA genlerine olan etkisi incelendiğinde, 2 mg/ml OLE + 350  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinin, muamele edilmeyen T98G hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında MALAT1, LOXL1-AS1 ve PVT1'in ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olmakla birlikte H19 ve HOTAIR'un ekspresyon seviyelerinde

istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan azalış görüldü (sırasıyla;  $p=0.017$ ,  $p=0.045$ ,  $p<0.0001$ ,  $p=0.767$ ,  $p=0.313$ ; Şekil 140).



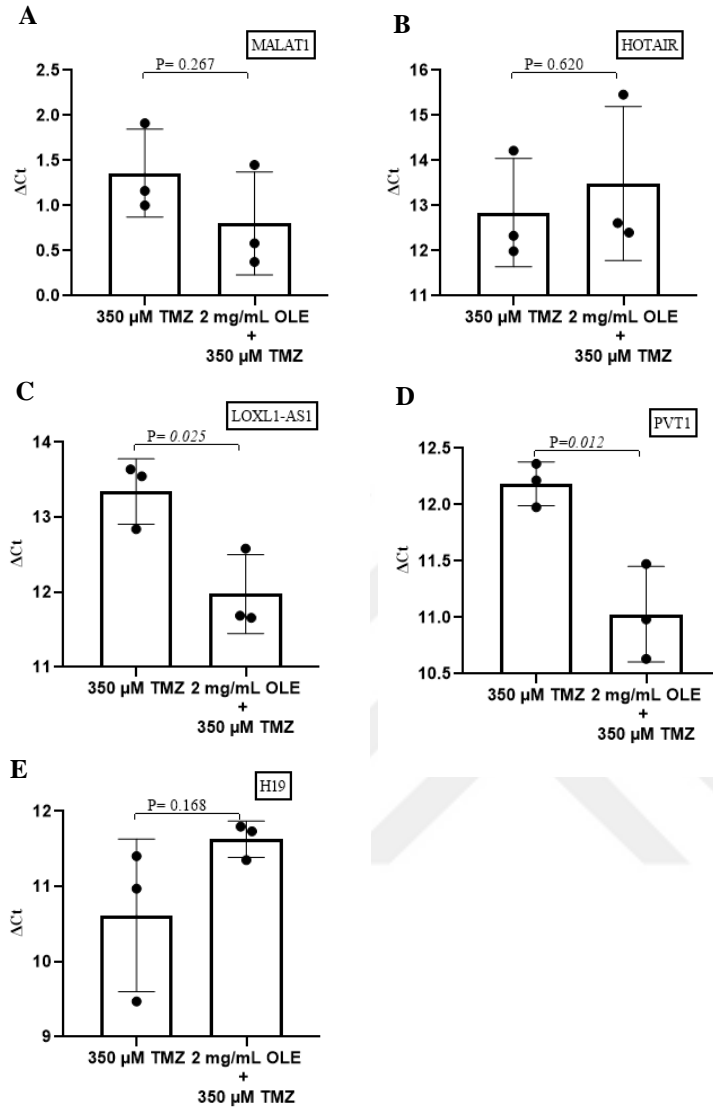
Şekil 140. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin lncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) MALAT1, (B) HOTAIR, (C) LOXL1-AS1, (D) PVT1, (E) H19.

2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinin, muamele edilmeyen T98G hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında MALAT1, LOXL1-AS1 ve PVT1 lncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olmakla birlikte H19'un ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan düşüş gözlemlendi (sırasıyla;  $p=0.0001$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.0009$ ,  $p=0.173$ ; Şekil 141).



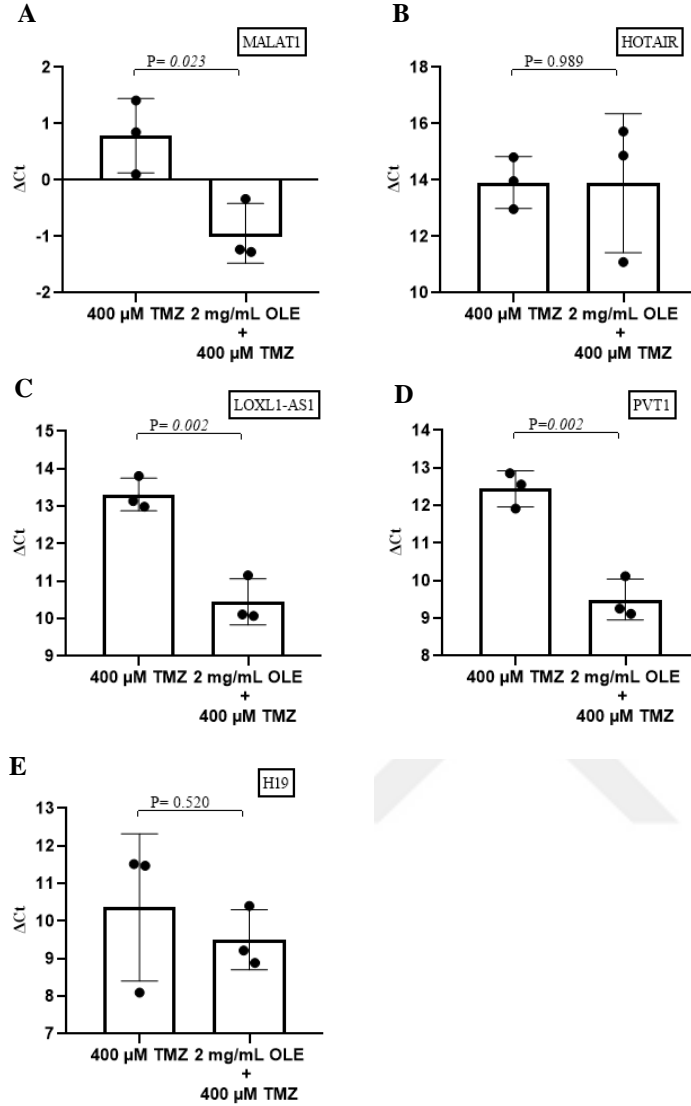
Şekil 141. T98G hücrelerinde 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin lncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) MALAT1, (B) HOTAIR, (C) LOXL1-AS1, (D) PVT1, (E) H19.

350 µM TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinin, 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerin karşılaştırılmasında Şekil 142'de gösterildiği gibi MALAT1, LOXL1-AS1 ve PVT1'in ekspresyon seviyeleri kombinasyon ile muamele edilen hücrelerde daha yüksek miktarda düşüş gözlemlendi (sırasıyla; p=0.267, p=0.025, p=0.012).



Şekil 142. T98G hücrelerinde 350 µM TMZ ile 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmalı LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MALAT1*, (B) *HOTAIR*, (C) *LOXL1-AS1*, (D) *PVT1*, (E) *H19*.

2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ kombinasyonu ile muamele edilen T98G hücrelerinin tek başına 400 µM TMZ verilen hücreler ile karşılaştırılmasında Şekil 143'de gösterildiği gibi *MALAT1*, *LOXL1-AS1* ve *PVT1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde daha yüksek oranda düşüş görüldü (sırasıyla;  $p=0.023$ ,  $p=0.002$ ,  $p=0.002$ ).

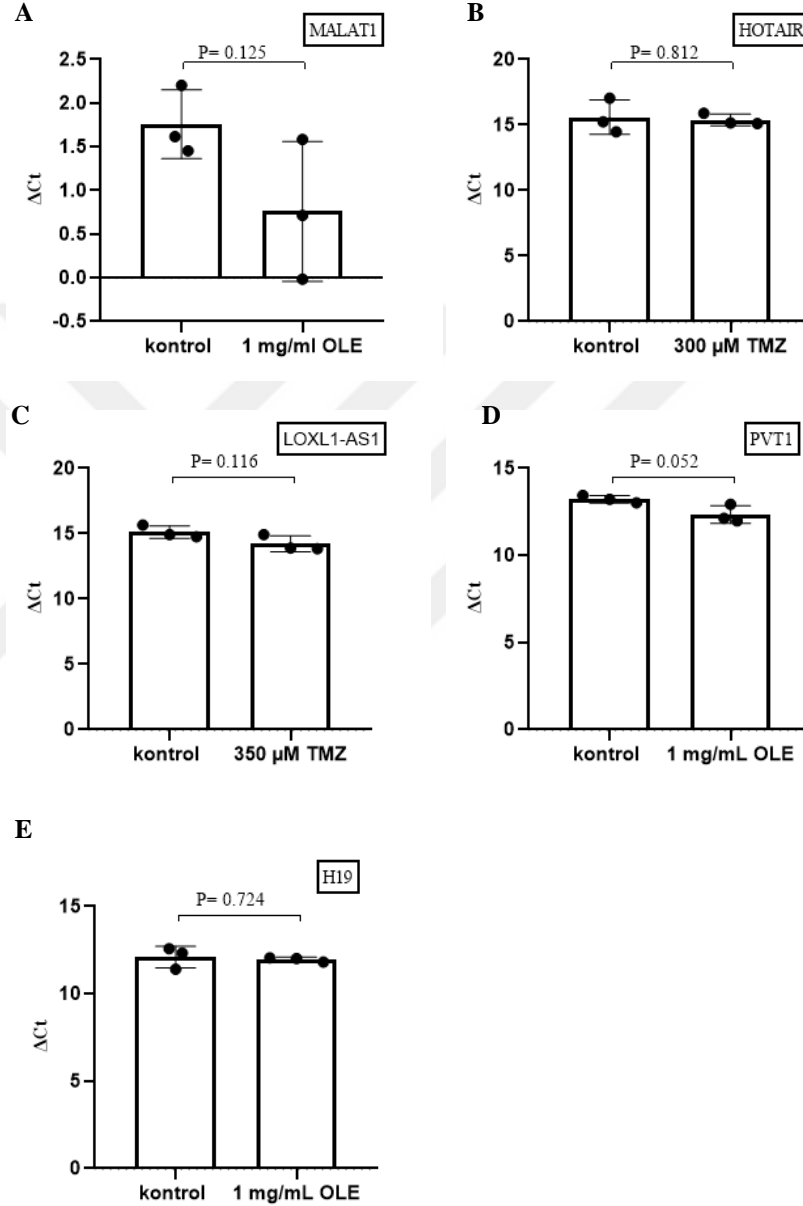


Şekil 143. T98G hücrelerinde 400 µM TMZ ile 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmalı LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MALAT1*, (B) *HOTAIR*, (C) *LOXL1-AS1*, (D) *PVT1*, (E) *H19*.

#### 4.9.2. U87MG Hücrelerinde OLE ve TMZ'nin Birlikte LncRNA Ekspresyon Profilleri Üzerine Etkileri

OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının U87MG hücrelerinde, MALAT1, HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1 ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine olan etkilerinin belirlenmesi amacı ile istatistiksel analizler gerçekleştirildi. Bu analizlerin sonucunda elde edilen veriler ile 1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerinin, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans geniyle standardize

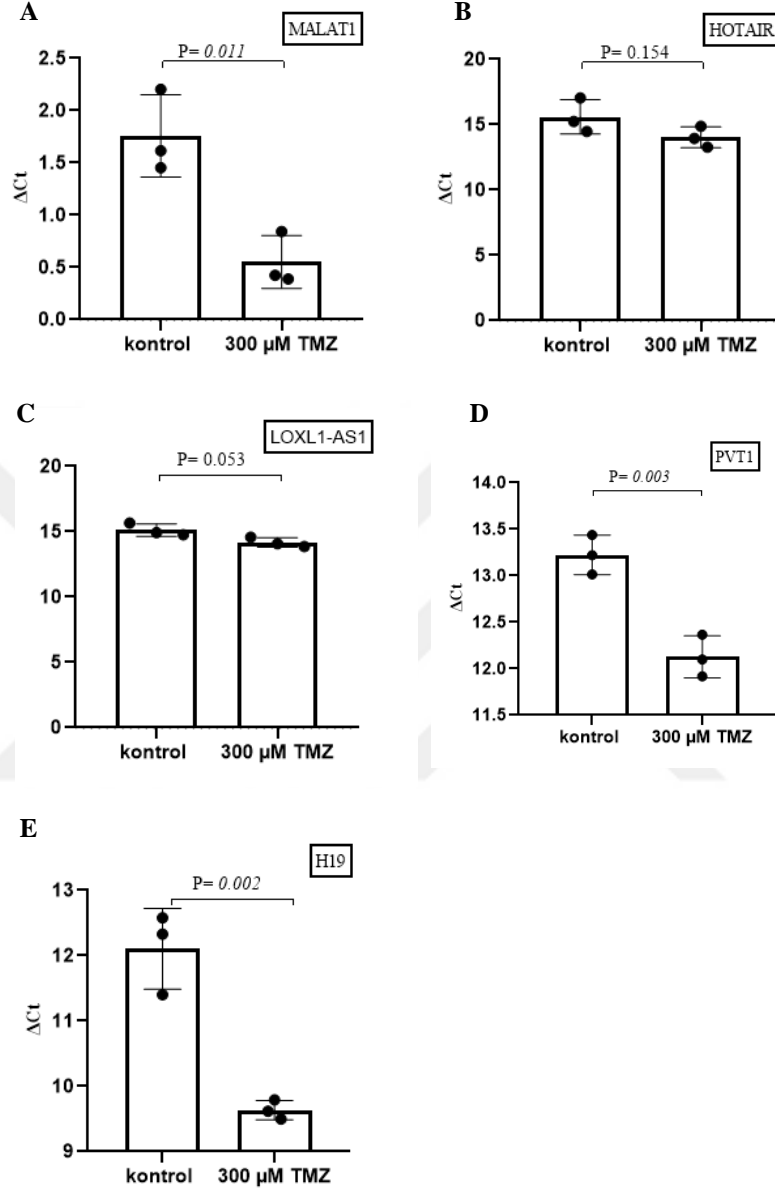
edilerek kıyaslandığında MALAT1, HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1 ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmayan bir azalma tespit edildi (sırasıyla;  $p=0.125$ ,  $p=0.812$ ,  $p=0.116$ ,  $p=0.052$ ,  $p=0.724$ ; Şekil 144).



Şekil 144. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) MALAT1, (B) HOTAIR, (C) LOXL1-AS1, (D) PVT1, (E) H19.

300  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerin, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında MALAT1, PVT1

ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (sırasıyla;  $p=0.011$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.002$ ; Şekil 145).

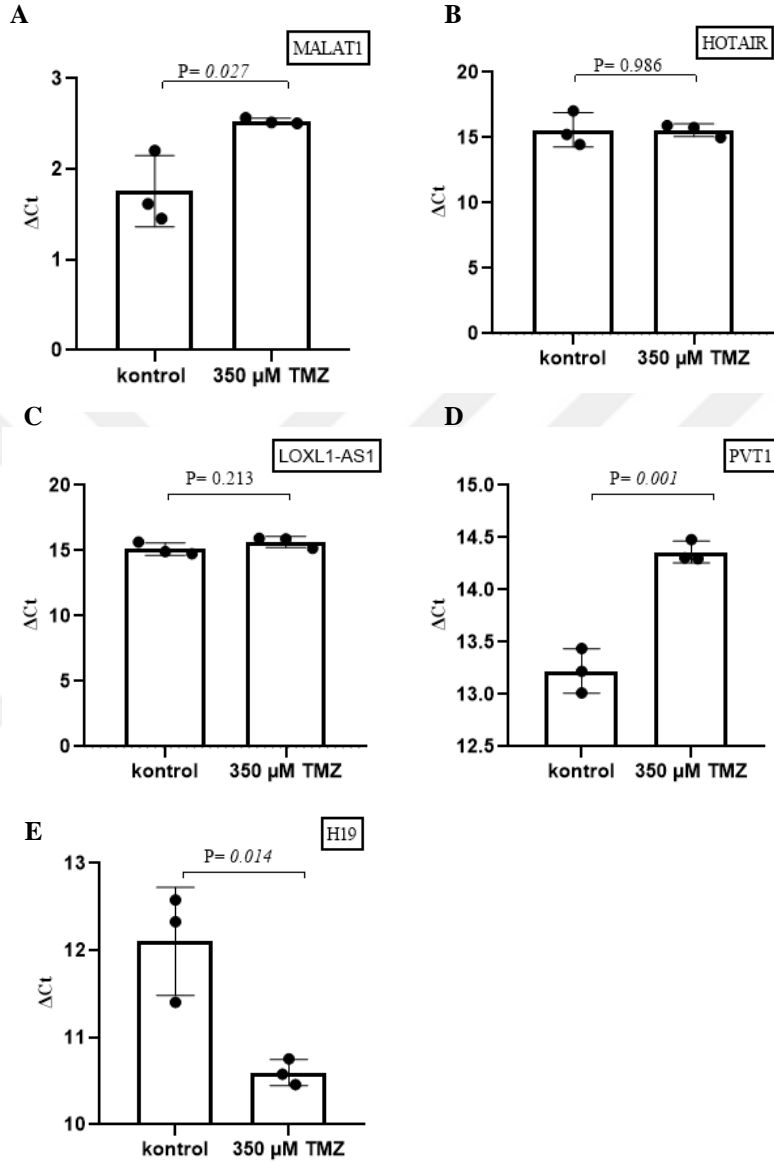


Şekil 145. U87MG hücrelerinde 300  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen hücrelerin LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MALAT1*, (B) *HOTAIR*, (C) *LOXL1-AS1*, (D) *PVT1*, (E) *H19*.

350  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerin, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında H19'un ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ( $p=0.014$ ). Ancak 350  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerin *MALAT1* ve *PVT1* LncRNA'ların



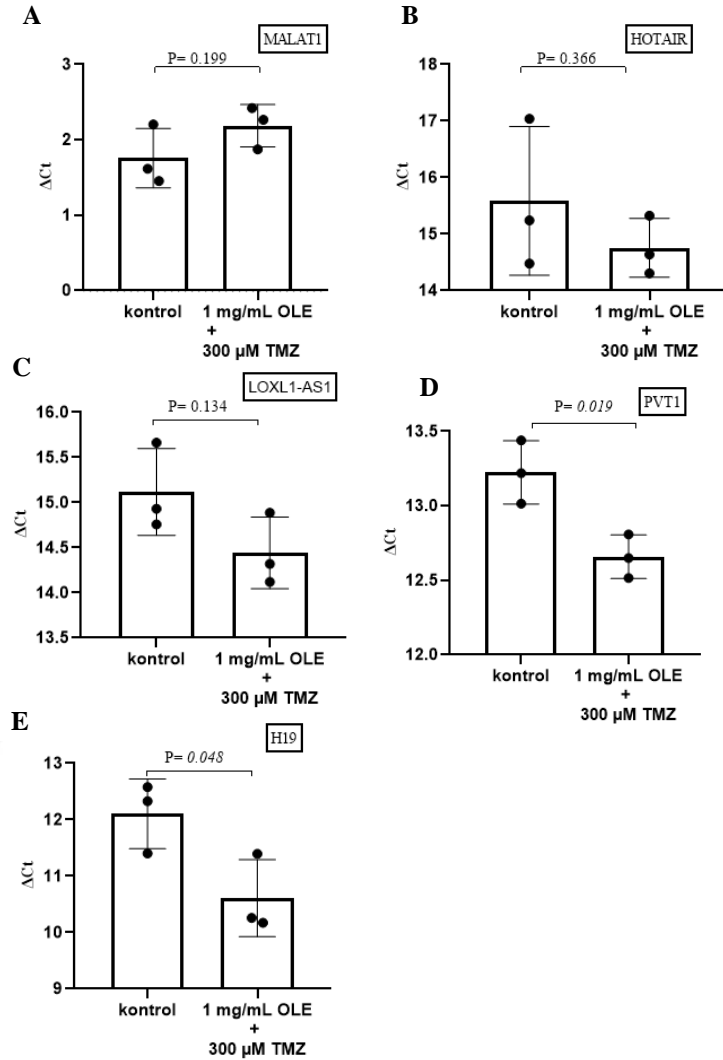
ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (sırasıyla;  $p=0.027$ ,  $p=0.001$ ; Şekil 146).



Şekil 146. U87MG hücrelerinde 350  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen hücrelerin LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MALAT1*, (B) *HOTAIR*, (C) *LOXL1-AS1*, (D) *PVT1*, (E) *H19*.

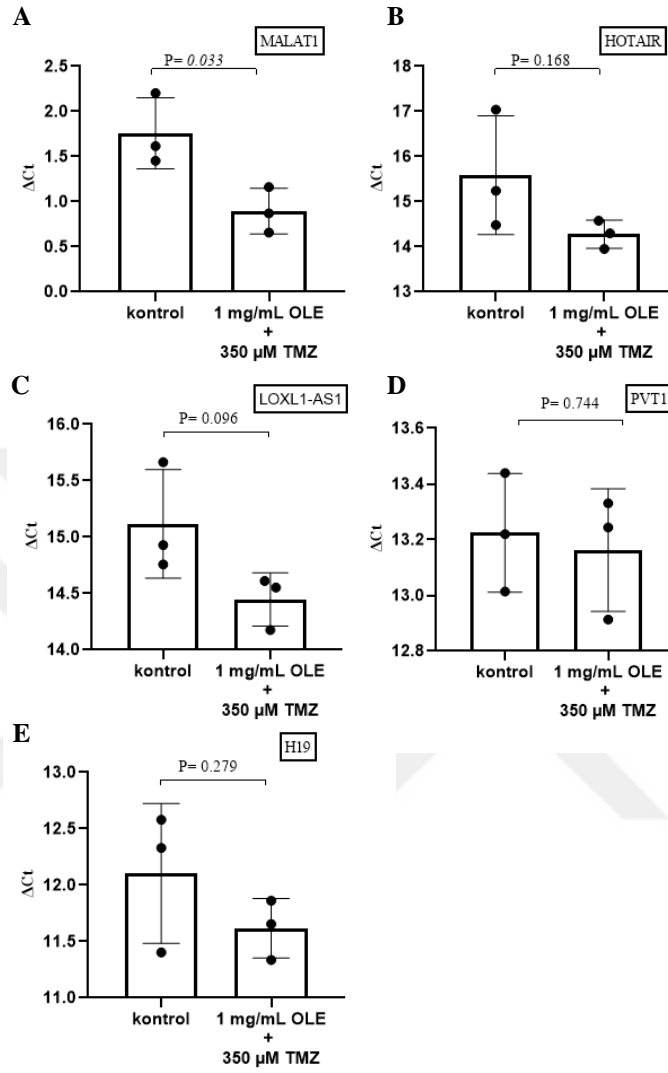
LncRNA'larda OLE+TMZ kombinasyonlarının etkisi incelendiğinde, 1 mg/ml OLE + 300  $\mu M$  TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinin, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında PVT1 ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş

olmakla birlikte HOTAIR ve LOXL1-AS1 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan düşüş, MALAT1'de ise artış gözlemlendi (sırasıyla;  $p=0.019$ ,  $p=0.048$ ,  $p=0.366$ ,  $p=0.134$ ,  $p=0.199$ ; Şekil 147).



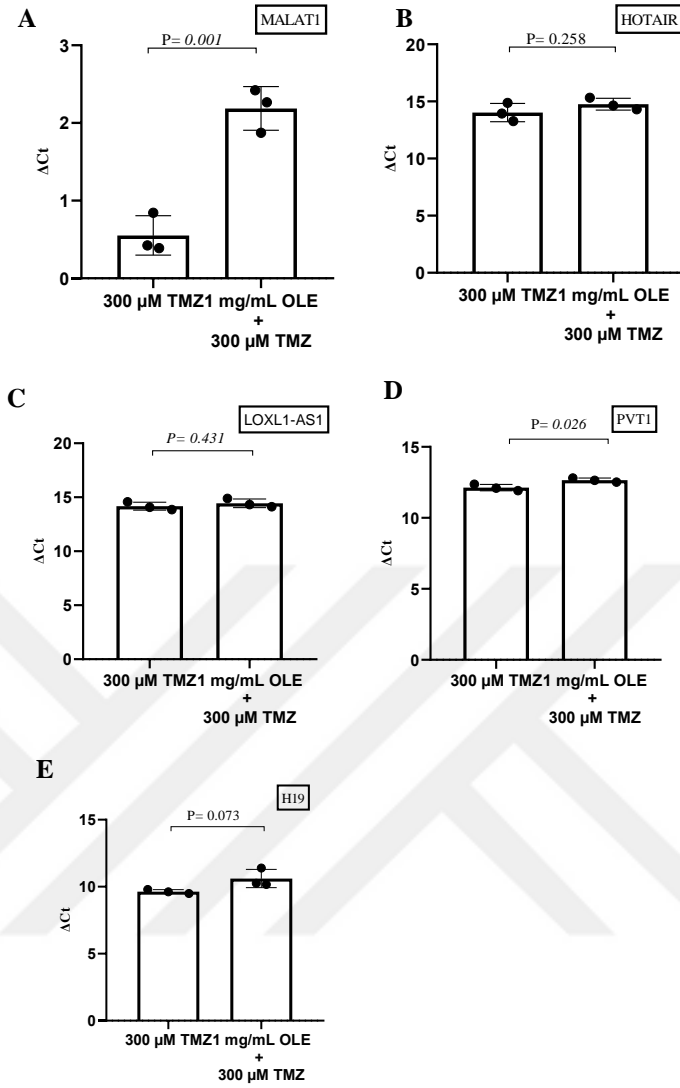
Şekil 147. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) MALAT1, (B) HOTAIR, (C) LOXL1-AS1, (D) PVT1, (E) H19.

1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinin, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek karşılaştırıldığında ise MALAT1'in ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmakla birlikte HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1 ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlıya ulaşamayan bir azalma tespit edildi (sırasıyla;  $p=0.033$ ,  $p=0.168$ ,  $p=0.096$ ,  $p=0.744$ ,  $p=0.279$ ; Şekil 148).



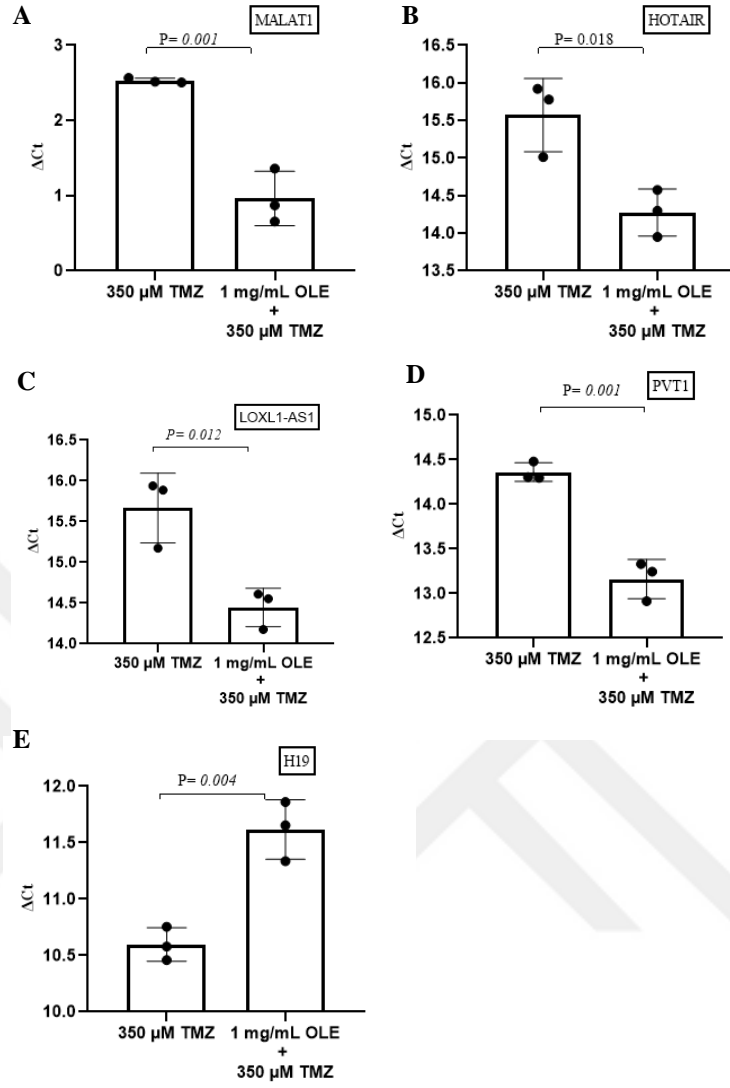
Şekil 148. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) MALAT1, (B) HOTAIR, (C) LOXL1-AS1, (D) PVT1, (E) H19.

1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinin, 300 µM TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerine göre MALAT1 ve PVT1 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda artış gözlemlendi (sırasıyla; p=0.001, p=0.026; Şekil 149).



Şekil 149. T98G hücrelerinde 300 μM TMZ ile 1 mg/ml OLE + 300 μM TMZ ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmalı LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MALAT1*, (B) *HOTAIR*, (C) *LOXL1-AS1*, (D) *PVT1*, (E) *H19*.

1 mg/ml OLE + 350 μM TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinin, 350 μM TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerine göre *MALAT1*, *HOTAIR*, *LOXL1-AS1* ve *PVT1* LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda düşüş, *H19* seviyesinde artış görüldü (sırasıyla;  $p=0.001$ ,  $p=0.018$ ,  $p=0.012$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.004$ ; Şekil 150).



Şekil 150. T98G hücrelerinde 350 μM TMZ ile 1 mg/ml OLE + 350 μM TMZ ile muamele edilen hücrelerin karşılaştırılmalı LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi (A) *MALAT1*, (B) *HOTAIR*, (C) *LOXL1-AS1*, (D) *PVT1*, (E) *H19*.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

GB, yetişkinlerde merkezi sinir sisteminde en sık görülen primer beyin tümör grubudur (Deorah ve ark., 2006). Yenilikçi tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine rağmen, GB'nin prognozu oldukça kötü seyretmektedir (Reardon ve ark., 2012) Yüksek agresif özellik gösteren GB'nin tedavisindeki başarısızlığın en önemli sebeplerinden birisi, kemoterapi ilacı olarak kullanılan TMZ'nin sitotoksik etki göstermesi ve kanser hücrelerinin bu ilaca karşı direnç geliştirmesidir. Bu sebeple, sitotoksik etkisi daha az olan etkinliği yüksek yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda çeşitli kanserlerin tedavisinde terapötik özelliği ortaya konan bitkisel özütlerden yararlanılmakta ve bu sayede kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanılarak ilaçların etkinliğinin artırılması ve kemoterapötik ilaçların sebep olduğu yan etkilerinin azaltılması sağlanmaktadır (Vengoji ve ark., 2018).

*Olea europaea*, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan yüksek anti-oksidan özellik gösteren bir meyvedir. *Olea europaea*'nın yapraklarından elde edilen özüt olan OLE yüksek miktarda sekoiridoid, tripterin ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşenleri içermektedir. Bugüne kadar OLE'nin anti-tümöral özellik gösterdiği çeşitli çalışmada ele alınmış olup, bu bitki özütünün hücreler üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Bartoli ve ark. (2000) sıçanlarda yaptıkları çalışmalarında oleuropeinin kolon tümörlerini, Stark ve ark (2003) ise OLE'nin meme kanseri gelişimini baskıladığını tespit etmişlerdir. OLE'nin GB'lerdeki anti-proliferatif etkisi ilk kez Anabilim Dalı'mızda yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir.

Anabilim Dalı'mızda daha önceden yapılan çalışmalar ile OLE'nin T98G ve U87MG hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etki oluşturduğu ve proliferasyonu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bunun yanında hücrelerin OLE varlığında TMZ ile muamele edildiğinde belirli miRNA'ların ekspresyon seviyelerini anlamlı bir şekilde arttırdığı ve hücreleri ölüme götürdüğü gösterilmiştir (Tunca ve ark., 2012). Aynı zamanda OLE'nin *MGMT*'nin hipermetilasyonunu arttırıldığı ve dolayısıyla TMZ mekanizması için fayda sağlayabileceği belirlenmiştir (Tezcan ve ark., 2017a).

Yapılan bir başka çalışmada, OLE'nin CSC (+) tümörleri üzerinde belirli belirteçlerin ekspresyonlarını azalttığı ve anti-invaziv etki gösterdiği tespit edilmiştir (Tezcan ve ark., 2017b). Ancak OLE'nin glial tümörlerin agresifliğini azaltma ile ilişkili olarak; tümörün EMT, CSC belirteçleri üzerindeki etkileri, MDR'nin kırılması yönündeki etkileri ve özellikle hücresel dönüşümü engelleyen bir tümör baskılanma mekanizması olarak belgelenmiş olan hücre yaşlanmasının üzerine etkileri bilinmemektedir. Ayrıca epigenetik mekanizma ile ilişkili olarak OLE'nin LncRNA'ları üzerine etkileri bilinmemektedir.

Mevcut tez çalışmasında, OLE'nin glial tümörler üzerindeki tedavi edici yönünün, mikroçevrenin etkilerinin daha iyi değerlendirilebilmesine olanak sağlayan ve *in-vivo*'ya benzer fizyolojik özelliklere sahip olan 3B kültür modeli ele alınarak T98G, U87MG hücrelerinin çoğaltılması amaçlanmıştır. Bununla birlikte tümörün agresifliği ile ilişkili olan, EMT belirteçleri (*Twist*, *Snail*, *Zeb1*, *N-kaderin* ve *E-Kaderin* ekspresyonları), CSC belirteçleri (*CD133*, *NANOG*, *SOX2* ve *OCT4* ekspresyonları) ve invazyon özellikleri (koloni oluşumu ve yara iyileşmesi) üzerindeki etkilerinin incelenmesi ve OLE'nin tedavi edici yönü ile ilişkili olarak MDR'nin (*MRP1*, *MRP5*, *LRP1* ekspresyonları) kırılımı ile ilişkisinin ve hücre yaşlanmasının üzerine etkisinin değerlendirilmesi, aynı zamanda OLE'nin son zamanlarda birçok kanserde biyobelirteç olarak kullanılan LncRNA'ların (*MALAT1*, *HOTAIR*, *LOXL1-AS1*, *PVT1*, *H19* ekspresyonları) üzerine etkisinin ortaya konulabilmesi hedeflenmiştir.

TMZ'nin dirençli T98G ve dirençsiz U87MG hücre hatları üzerine etkilerinin gösterildiği çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Kanzawa ve ark., 2003 ve Ryu ve ark., 2012). Aynı zamanda Anabilim Dalı'mızda daha önce yapılan çalışmalar ile literatür ile eş değer olarak TMZ'nin GB hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Kafkasyalı 61 yaşındaki bir erkek hastadan alınmış T98G hücreleri için ve Kafkasyalı 44 yaşındaki bir erkek hastadan alınmış U87MG hücreleri için TMZ'nin lethal dozları, Anabilim Dalı'mızda Gülçin Tezcan'ın doktora tezi kapsamında belirlenmiştir. Yapılan çalışmada TMZ'nin etkin doz ve sürelerini belirlemek için 300  $\mu\text{M}$ , 325  $\mu\text{M}$ , 350  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 450  $\mu\text{M}$  ve 500  $\mu\text{M}$ 'dan oluşan dozları 24 saat boyunca T98G ve U87MG hücrelerine verilmiştir. Sonucunda 24 saatte T98G için 450  $\mu\text{M}$  TMZ'nin, U87MG hücreleri için ise uygulanan tüm dozların lethal olduğu tespit

edilmiştir. Mevcut tez çalışmasında yeni alınan TMZ'nin optimizasyonunun sağlanabilmesi için belirlenen bu dozların göz önüne alınarak yapılan WST-1 analizine göre T98G hücreleri için TMZ'nin 24. saatteki 350 µM ve 400 µM konsantrasyonlarının sırasıyla %28,60, %40,19 canlılık oranıyla, U87MG hücreleri için TMZ'nin 24. saatteki 300 µM ve 350 µM konsantrasyonlarının sırasıyla %51,71, %44,61 canlılık oranları ile ölümcül etki gösteren dozları olarak belirlendi (p<0.001). TMZ'ye karşı dirençli olan T98G hücrelerinde, etkin dozdan sonraki hücre canlılığındaki artışın hücrelerin direnç geliştirmesinden dolayı olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

OLE'nin TMZ'ye dirençli T98G hücreleri ve TMZ'ye direnç göstermeyen U87MG hücrelerindeki etkin dozları, Anabilim Dalı'mızda 2010/07 numaralı BAP projesi kapsamında araştırılmış ve Journal of Cancer Research and Clinical Oncology dergisinde 2012 yılında yayınlanmıştır. Bu kapsamda T98G ve U87MG hücreleri için lethal dozun 24 saatte 1 mg/ml ve 2 mg/ml olduğu belirlenmiştir. Mevcut tez çalışmasında, yeni alınan OLE'nin optimizasyonunun sağlanabilmesi için belirlenen bu dozlar doğrultusunda gerçekleştirilen WST-1 analizine göre T98G hücreleri için OLE'nin 24. saatteki 2 mg/ml konsantrasyonu %42,06 canlılık oranıyla, U87MG hücreleri için ise OLE'nin 24. saatteki 1 mg/ml konsantrasyonunun %49,2 canlılık oranıyla lethal etki gösteren dozları olarak belirlendi. Anabilim Dalı'mızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda belirlenen konsantrasyonlar ile uyumlu olarak OLE'nin iki hücre hattında canlılık oranlarını doz ve zamana bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı belirlenmiştir (p<0.001).

Mevcut projede, OLE'nin, TMZ ile eş zamanlı etkisinin incelenmesi amacıyla daha önceki çalışmalar ışığında, TMZ'nin etkin dozları OLE ile birlikte T98G ve U87MG hücrelerine verilmiştir. OLE'nin TMZ ile eş zamanlı etkisinin değerlendirilmesinde, 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ konsantrasyonunun canlılık oranı %38,57, 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ konsantrasyonlarının canlılık oranı ise %40,27 olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda OLE ve TMZ kombinasyonunun tek başına TMZ'ye göre T98G hücrelerinin canlılığını daha yüksek oranda inhibe ettiği gözlenmiştir. Mevcut çalışmada elde edilen bulgular, OLE'nin TMZ'nin aktivitesine katkı sağladığı yönünde olduğunu daha önceki çalışmalarımıza paralel şekilde göstermiştir. Aynı



zamanda TMZ'ye karşı dirençli olan T98G hücrelerinde, dirençten kaynaklandığı düşünülen etkin dozdan sonraki artışın OLE ile baskılandığı gösterildi.

Evre 4 olarak tanımlanan GB oldukça agresif bir tümördür. Agresifliği ile ilişkili EMT ve CSC belirteçlerinin üzerine yapılan çalışmalar kısıtlı kalmakta, tümörün agresifliği önlenememekte ve dolayısıyla tedaviyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, tümörün agresifliği ile ilişkili belirteçlerin araştırılması, yara iyileşmesi ve koloni oluşumu gibi fonksiyonel analizler ile teyit edilmesi ve böylece agresifliğin baskılanması, yeni tedavi yöntemlerinin şekillendirilmesi gerekmektedir. OLE'nin tek başına ve TMZ ile birlikte T98G ve U87MG hücrelerindeki tümörün agresifliği üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hücrelerin fonksiyonel olarak yara iyileştirme ve koloni oluşturma özellikleri değerlendirildi. T98G hücrelerine 24 saat süresince tek başına OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyon dozlarının verilmesiyle hücrelerin yara iyileştirme özelliklerine etkileri incelendi. Deney sonucunda, muamele edilmeyen T98G hücrelerinde yara alanında %75 oranında kapanma gözlemlendi. 2 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G hücrelerinde ise kapanma oranının korunduğu ve ayrıca yara açıklığının da %8 oranında artış olduğu tespit edildi. Bu durum OLE'nin T98G hücrelerindeki invazyon özelliğini baskıladığını göstermektedir. TMZ için etkin olduğu belirlenen 350 µM ve 400 µM TMZ dozlarının T98G hücrelerindeki yara alanını sırasıyla %3 ve %2 oranında arttırdığı belirlendi ve TMZ ile muamele edilen hücrelerde migrasyon özelliklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu gözlemlendi ( $p < 0.001$ ). T98G hücrelerinde TMZ'nin düşük ve yüksek dozu ile 2 mg/ml OLE'nin birlikte muamele edilmesi sonucunda ise 2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerdeki yara açıklığının %3, 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerdeki ise yara açıklığının %17 arttığı tespit edildi. T98G hücrelerinde OLE ve TMZ'nin birlikte muamele edilmesinin, tek başına TMZ ile muamele edilmesine kıyasla göç yeteneklerinin daha yüksek oranda baskılandığı ve tek başına verilen dozlara göre yara açıklığı kapanma oranının daha az olduğu tespit edildi. Yüksek toksik etki gösteren TMZ'nin, oluşturulan çizik alanının etrafındaki hücreleri yapısını değiştirerek sınırlarını bozduğu ancak OLE'nin oluşturulan çizik alanının sınırlarını koruyarak yara alanını koruduğu ve göç yeteneğini baskıladığı gösterildi. U87MG hücrelerine 24 saat boyunca etkin OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyon dozlarının verilmesiyle hücrelerin yara iyileştirme

özelliklerine etkileri sonucunda, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinde %79 oranında kapanma gözlemlendi. 1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerinde ise yara alanının %15 oranında arttığı gözlemlendi ( $p<0.001$ ). Böylece OLE'nin U87MG hücrelerinin yayılma özelliğini baskıladığını kanıtladı. 300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerin yara açıklığını %3 oranında arttırdığı, 350  $\mu$ M TMZ dozları ile muamele edilen hücrelerin ise yara açıklığını %22 oranında kapattığı gözlemlendi. U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE + 300  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerdeki yara açıklığın %10, 1 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerdeki ise yara açıklığın %28 arttığı tespit edildi. Tek başına OLE'nin, düşük ve yüksek doz TMZ ile muamele edilen hücrelere kıyasla oluşturulan yara açıklığın kapanmasının daha düşük oranda olduğu ve göç yeteneklerinin çok daha fazla baskılandığını belirlendi. Sonuç olarak, OLE'nin T98G ve U87MG hücrelerinin yayılma ve göç yeteneklerini yüksek oranda baskıladığı, kemoterapi ilacı olan TMZ'ye benzer etki göstererek migrasyon hızını azalttığı kanıtlanmıştır. Bunun yanında tek başına TMZ ile muamele edilen hücrelere kıyasla TMZ'nin OLE ile birlikte uygulanmasının sonucunda yara açıklığını daha fazla arttırdığı ve TMZ ile sinerjik etki göstererek hücre göçünü engellediği belirlendi.

Mevcut çalışmada T98G hücrelerinde, OLE'nin tek başına ve TMZ ile birlikte koloni oluşturma yeteneği üzerine etkisi incelendiğinde, 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerde, muamelesiz T98G hücrelerine göre koloni sayılarında azalma olduğu belirlendi ( $p<0.001$ ). 350  $\mu$ M ve 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinin muamele edilmeyen T98G hücrelerine göre koloni sayılarının daha az olduğu tespit edildi. Ancak TMZ ile muamele edilen hücrelerin koloni sayıları ile 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin koloni sayıları karşılaştırıldığında OLE'nin koloni oluşturma yeteneğini tek başına TMZ'ye göre daha çok baskıladığı görüldü. 2 mg/ml OLE ile 400  $\mu$ M TMZ'nin kombinasyonu sonucunda, muamele edilmeyen T98G hücrelerine göre koloni oluşturma yeteneğini azalttığı, ayrıca tek başına 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerdekinden daha az koloni sayısı oluşturduğu saptandı. U87MG hücrelerinde, OLE ve TMZ'nin tek başlarına ve kombinasyonları ile birlikte koloni oluşturma yeteneği üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerde, muamele edilmeyen U87MG hücrelerine göre koloni sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ( $p<0.001$ ). 300

$\mu\text{M}$  ve  $350 \mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen U87MG hücre gruplarının, muamele edilmeyen U87MG hücre gruplarına göre koloni sayılarının daha az olduğu belirlendi ( $p < 0.001$ ).  $300 \mu\text{M}$  ve  $350 \mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücrelerin koloni sayıları,  $1 \text{ mg/ml}$  OLE ile muamele edilen hücrelerin koloni sayıları ile karşılaştırıldığında OLE'nin tek başına koloni oluşturma yeteneğini tek başına TMZ'ye göre daha çok baskıladığı tespit edildi.  $1 \text{ mg/ml}$  OLE +  $350 \mu\text{M}$  ve  $1 \text{ mg/ml}$  OLE +  $400 \mu\text{M}$  TMZ'nin kombinasyonları ile muamele edilen U87MG hücrelerinin, muamele edilmeyen U87MG hücrelerine göre koloni oluşturma yeteneğini baskıladığı, ayrıca tek başına  $300 \mu\text{M}$  ve  $350 \mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücrelerdekinden daha az koloni sayısı oluşturduğu saptandı.

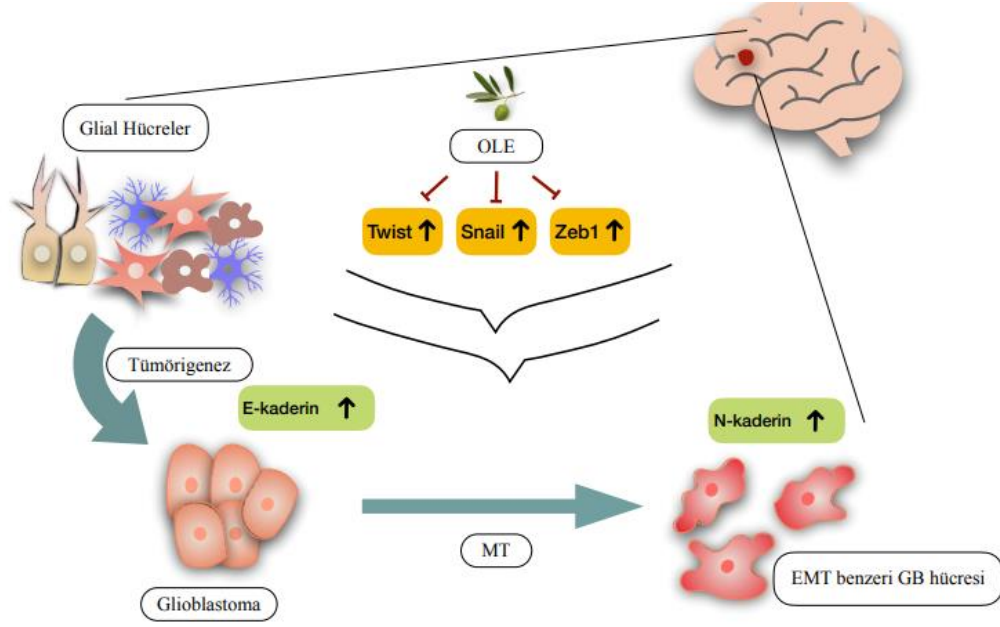
Kanser hücreleri metastaz ve yayılım özelliklerine sahiptir, bu da kansere bağlı ölümlerin asıl nedenini oluşturmaktadır (Brabletz ve ark., 2011). Son yıllarda, EMT mekanizmasının, kanserin yayılmasıyla ve hücrelerin tedaviye direnç geliştirilmesiyle yakından ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Nieto ve ark., 2016). Tümör hücrelerinin EMT'ye yatkınlığı, CSC özelliklerinin ortaya çıkmasıyla oluşmaktadır (Scheel ve Weinberg, 2012).

Kanser hücrelerinin hızla ilerlemesi, hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybedip mezenkimal fenotipine dönüşümü ile ilişkilidir (Kalluri ve Weinberg, 2009). Hücrelerin mezenkimal özellik kazanmaları sürecinde, *Twist*, *Snail* ve *Zeb1* dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörü aracılık etmektedir (Nagaishi ve ark., 2017). Bununla birlikte hücrelerdeki *E-kaderin*'in baskılanması tümör hücrelerinin yayılma ve metastaz yeteneğini ortaya çıkararak EMT sürecini desteklemektedir. EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu, çeşitli kanserlerin agresif seyri ile bağlantılı bulunmuştur (Iser ve ark., 2017). Çeşitli çalışmalar ile EMT'de rol oynayan transkripsiyon faktörlerini düzenleyen gen ve gen ürünleri tanımlanmıştır. Maciaczyk ve ark. (2017) GB'de yüksek ekspresyona sahip *CBF1*'in *in-vitro* olarak düşük oksijene maruz kalmasıyla indüklenebileceğini ve *CBF1* inhibisyonunun *Zeb1*'i inhibe ederek GB'de EMT sürecinin baskılanabileceğini belirlemişlerdir. Srivastava ve ark. (2017), U87MG hücrelerinde *FAT1* geninin inhibisyonu ile *SOX2* ve *OCT4* genleri üzerinden hücrelerdeki aktif EMT'yi inhibe etmişlerdir. Chi ve ark. (2019), GB'de düşük ekspresyona sahip *SALL1* geninin, aşırı eksprese edilmesi ile EMT

sürecinin baskılandığını ve CSC belirteçlerinin ekspresyonunu aşağı yönde düzenleyerek hücre göçünü inhibe ettiğini belirtmişlerdir. EMT ve CSC durumuna karşılık güçlü terapötik hedeflerin geliştirilmesi GB dahil olmak üzere bir çok kanser türünde etkili olabileceği düşünülmektedir. Gu ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, *Celastrus orbiculatus* özütünün, GB hücre hattı U87 ve U251 hücrelerinde *N-kaderin* ve *vimentin* ekspresyonunu düşürerek, *E-kaderin*'in ekspresyonunu ise arttırarak MT mekanizmasıyla ilişkili olarak kanser hücrelerinin yayılmasını ve göçünü inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmada T98G ve U87MG hücrelerinde OLE'nin tek başına ve TMZ ile birlikte tümörün agresifliği üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla EMT ve CSC belirteçleri incelenmiştir. T98G ve U87MG hücrelerinde, OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının EMT belirteçlerinden *E-kaderin*, *N-kaderin*, *Twist*, *Snail* ve *Zeb1* genlerinin mRNA ekspresyon seviyesine etkisi RT-qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. 2 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G hücrelerinde, *Twist*, *Snail*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinin, muamele edilmemiş T98G hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olduğu gözlemlendi (sırasıyla;  $p=0.016$ ,  $p=0.034$ ,  $p=0.015$ ,  $p=0.001$ ). Bu sonuç yara iyileşme deneyini doğrulayarak, OLE'nin hücrelerin göç yeteneklerini, EMT mekanizmasındaki genlerin ekspresyon seviyelerini düşürerek baskılandığını göstermiş oldu. 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerde *Twist*, *Snail*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinin muamele edilmemiş T98G hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha düşük olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla;  $p=0.013$ ,  $p=0.031$ ,  $p=0.004$ ,  $p=0.001$ ). Böylece kemoterapi ilacı olan TMZ ile aynı genlerin ekspresyon seviyesini düşüren OLE'nin TMZ ile benzer etki gösterdiği belirlenmiştir. 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerde *Twist*, *Snail* ve *Zeb1* genlerinin ekspresyon seviyeleri muamele edilmemiş T98G hücrelerine göre istatistiksel olarak daha az olduğu saptanmıştır (sırasıyla;  $p=0.040$ ,  $p=0.023$ ,  $p=0.047$ ). Bu durum OLE'nin tek başına muamele edilmesinin, hücrelerin tek başına TMZ'nin yüksek dozu olan 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilmesine göre daha etkili olabileceğini göstermektedir. 2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ ve 2 mg/ml OLE + 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinde *Twist*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinin muamele edilmemiş T98G hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olduğu belirlenmiştir (2 mg/ml OLE + 350  $\mu$ M TMZ için sırasıyla;

p=0.010, p=0.005, p=0.000; 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ için sırasıyla; p=0.028, p=0.003, p=0.001). Ayrıca tek başına OLE ve TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinde *E-kaderin* seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmezken, OLE+TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde muamelesiz hücrelere göre *E-kaderin* seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlendiği tespit edildi (2 mg/ml OLE + 350 µM TMZ için p=0.043; 2 mg/ml OLE + 400 µM TMZ için p=0.044). Bunun sonucunda yara iyileşme deneyi ile bağlantılı olarak OLE'nin TMZ ile sinerjik etki oluşturarak hücrelerin göç yeteneklerini baskıladığı gösterilmiştir.

U87MG hücrelerinin OLE'nin etkin dozu olarak belirlenen 1 mg/ml OLE ile muamele edilmesi sonucunda, *Twist*, *Snail*, *Zeb1*, *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinin muamele edilmemiş U87MG hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha düşük, *E-kaderin* geninin ekspresyon seviyesinin ise anlamlı seviyede daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla; p=0.010, p=0.026, p=0.026, p=0.017, p=0.020). Böylece OLE'nin yara iyileşme deneyi ile bağlantılı olarak EMT mekanizması ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini etkileyerek hücrelerin yayılma yeteneklerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 151). 300 µM ve 350 µM TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinde OLE'de olduğu gibi muamele edilmemiş U87MG hücrelerine göre *Twist*, *Snail*, *Zeb1*, *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalma, *E-kaderin* geninin ekspresyon seviyesinde ise bir artış tespit edildi (300 µM TMZ için sırasıyla; p=0.009, p=0.017, p=0.020, p=0.015, p=0.018; 350 µM TMZ için sırasıyla; p=0.005, p=0.011, p=0.017, p=0.018, p=0.136). Bu doğrultuda OLE'nin TMZ ile benzer etki gösterdiği tekrardan doğrulanmış oldu. 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ve 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinde *Twist*, *Snail*, *Zeb1* ve *N-kaderin* genlerinin ekspresyon seviyelerinin, muamele edilmemiş U87MG hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olduğu, *E-kaderin* geninin ekspresyon seviyesinin ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Böylece deney sonucunda, yara iyileşme deneyi ile ilişkili olarak OLE'nin tek başına ve TMZ'nin düşük ve yüksek dozu ile sinerjik etki oluşturarak hücrelerin göç yeteneklerini baskıladığı gösterilmiştir.



Şekil 151. OLE'nin MT mekanizması üzerine etkisi.

GB'de yapılan çalışmalar ile GB'nin oluşmasının ve yayılmasının EMT ile ilişkili olarak CSC'lerin de büyük öneme sahip olduğu vurgulanmıştır (Scheel ve Weinberg, 2012). GBCSC hücrelerinin kendi kendini yenileme ve kemoterapi ilaçlarına direnç gösterme özelliği göstermesi nedeniyle GB rekürrensının en önemli sebeplerinden birisi olduğu kabul edilmektedir. CSC belirteçlerinden *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin yüksek ekspresyonu GB'nin agresifliği ile ilişkilidir. Bu nedenle, GB'de CSC'lerin hedeflenmesi GB tedavisi için önemli bir terapötik strateji olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar ile GB'lerde CSC belirteçlerinin ekspresyon seviyelerine etki edilerek GB'lerin yayılmasının ve göç etmesinin engellenebildiği gösterilmiştir. Jeon ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada doğal bitki özütlerinden elde edilen bir bileşik olan BRM270'in, *in-vitro* ve *in-vivo* olarak hücre büyümesini engellediğini ve kök hücre özelliği göstermesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Su ve ark. (2019), Anisomeles indica'nın biyoaktif diterpenoid izolatu olan Ovatodiolid'in kanser hücrelerinin oluşumunu inhibe ettiğini, *CD44*, *CD133*, *SOX2* ve *OCT4*'ün aşağı yönde düzenlenmesini sağladığını belirtmişlerdir. Mevcut çalışmada T98G ve U87MG hücrelerinde, OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının CSC üzerine etkisi, CSC biyobelirteçlerinden *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin mRNA ekspresyon seviyesine etkisi incelenerek belirlenmiştir. 2 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G

hücrelerinin *SOX2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde muamele edilmeyen T98G hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi (sırasıyla;  $p=0.025$ ,  $p=0.044$ ). 350  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinde, muamelesiz T98G hücrelerine göre *CD133* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ( $p=0.003$ ). T98G hücrelerinin 400  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilmesi ile *CD133* geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ( $p=0.001$ ). OLE+TMZ kombinasyonlarının CSC biyobelirteçleri üzerine etkileri incelendiğinde, muamele edilmeyen T98G hücrelerine kıyasla, 2 mg/ml OLE + 350  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücrelerde *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde, 2 mg/ml OLE + 400  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücrelerde *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Tek başına 2 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin tek başına 350  $\mu\text{M}$  TMZ ve 400  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücreler ile kıyaslandığında çoğunlukla OLE'nin CSC belirteçlerini daha yüksek oranda düşürdüğü tespit edildi. 2 mg/ml OLE + 350  $\mu\text{M}$  TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin tek başına 350  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücrelere göre karşılaştırılmasında *NANOG* ve *SOX2* genlerinin ekspresyon seviyelerinin daha düşük olduğu gözlemlendi. 2 mg/ml OLE + 400  $\mu\text{M}$  TMZ kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin tek başına 400  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücrelere göre karşılaştırılmasında *OCT4*, *NANOG* ve *SOX2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edildi. Böylece, OLE ile TMZ'nin birlikte muamele edilmesinin, tek başına TMZ ile muamele edilmesine göre CSC belirteçlerini daha yüksek oranda düşürdüğü belirlendi. U87MG hücrelerinde, 1 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz U87MG hücrelerine göre *SOX2* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ( $p=0.012$ ). 300  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücrelerin, muamelesiz U87MG hücrelerine göre (kontrol) *OCT4* ve *NANOG* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ( $p=0.016$ ,  $p=0.034$ ). 350  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen hücrelerinde, *SOX2* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p=0.016$ ). U87MG hücrelerinde 1 mg/ml OLE'nin CSC belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini düşürdüğü ancak düşük ve yüksek doz TMZ'nin CSC belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini

arttırdığı tespit edildi. 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin muamele edilmeyen U87MG hücreleri ile kıyaslandığında *OCT4* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi (p=0.012). Muamele edilmeyen U87MG hücrelerine göre 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerde *OCT4* geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış, *CD133* geninin ekspresyon seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi (sırasıyla, p=0.0009, p=0.011). Bu sonuçlar doğrultusunda OLE+TMZ kombinasyonları ile muamele edilen hücrelerdeki CSC belirteçlerinin ekspresyon seviyesinde artışın TMZ'den kaynaklandığı görülmektedir. 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ kombinasyonu ile muamele edilen U87MG hücrelerin karşılaştırılmasında *CD133* geninin ekspresyon seviyesinde tek başına 350 µM TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda düşüş gösterdiği belirlendi (p<0.0001). Böylece U87MG hücrelerinde TMZ muamelesiyle artış gösteren CSC genlerinin ekspresyonlarının OLE ile bastırıldığı tespit edildi.

GB hücreleri, hücre kültür çalışmalarında sıklıkla kültür kabı üzerinde *in-vitro* olarak % 20 oksijen gerilimi ile kültüre edilmektedir. Ancak *in-vivo* çalışmalarındaki GB'nin oksijen gerilimi % 0,1 ile %10 arasında değişiklik göstermektedir (Evans ve ark. 2004). Yapılan çalışmalarda bu oksijen geriliminin, GB hücrelerinin *in-vitro* çalışmalarında proliferasyon veya çeşitli hücre fonksiyonları gibi biyolojik özellikleri etkileyebilecek değişikliklere sebep olabileceği düşünülmektedir (Gilkes ve ark. 2014). Belirlenen ilaç adaylarının ve geliştirilen yeni terapötik hedeflerin klinik öncesi testleri, genellikle 2B hücre kültür modellerine veya hayvan çalışmalarına dayanmaktadır. Ancak 2B hücre kültürlerinden elde edilen verilerin son yıllardaki çalışmalar ile kısmen güvenilir olmadığı vurgulanmıştır. Bunun sebebinin 2B hücre modelinde kültüre edilen hücrelerin *in-vivo* ortamını gerçek olarak temsil edemediği yönündedir (Hutchinson ve Kirk, 2011). Ayrıca hayvan çalışmalarının da türler arası farklılıklarından dolayı, kullanılacak ilacın veya terapötik hedefin insanlardaki etkisini belirlemede yetersiz olduğu savunulmuştur (Gilkes ve ark. 2014). 2B olarak kültürlenmiş hücrelerin farklı bir şekilde hücre-hücre etkileşimleri göstermesi nedeniyle tümör biyolojisinin anlaşılmasında 3B kültürlerine ihtiyaç vardır. 3B kültür modelindeki sonuçlar, tümörlerin *in-vivo*'daki özelliklerini yansıtacağından dolayı 2B hücre kültür modellerine göre daha iyi bir alternatif sağlayacaktır. Son zamanlarda, GB için ilaç-



radasyon kombinasyonunun etkisini tespit etmek için polistiren iskelesine dayanan bir 3B hücre kültür modelini kullanılmıştır. Chaicharoenaudomrung ve ark. (2019) U-251 hücrelerinde iki anti-kanser ajanı olan doksorubisin ve kordiyepine verilen yanıtları 2B ve 3B kültür ortamında değerlendirmişler ve çeşitli genlerin ekspresyonlarında farklılıklar saptamışlardır. Bunun yanında 3B ortamda büyüyen hücrelerin, muamele edilen anti-kanser ajanlara, 2B ortamda büyüyen hücrelere göre daha fazla direnç gösterdiğini belirlemişlerdir. Böylece GB hücreleri için 3B kültür ortamlarının, anti-kanser ajan taraması ve ilaca direnç mekanizmalarının keşfi için umut verici bir platform olabileceğini savunmuşlardır. Hesari ve ark., (2018), kurkuminin ve erlotinib'in 3B GB hücre modellerinde etkin olup olmadığını değerlendirmek için U-373 hücrelerini sferoid kültürlerinde tek başına kurkumin ve erlotinib ile kombin şekilde muamele etmişler ve muamele edilmemiş hücreler ile karşılaştırıldığında 7. günün sonra tümör hacminin küçüldüğünü gözlemlemişlerdir. Mevcut çalışmada OLE'nin normal tümör özelliğini yansıtan 3B ortamdaki tümör kitlesine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla, 3B kültür ortamında çoğaltılan T98G ve U87MG hücrelerin üzerine OLE, TMZ ve OLE+TMZ'nin etkin dozları verildi. Muameleli ve muamelesiz hücreler 5. güne kadar her gün aynı saatte görüntülendi. Muamele edilmeyen tümör kitlelerinde her gün belirli oranlarda büyüme olduğu görüldü. OLE ile muamele edilen tümör kitlelerinde 24 saatten itibaren, muamele edilmeyen tümör kitlelerine göre daha küçük oranda büyüme olduğu tespit edildi ve 120. saatin sonunda tümör kitlesinin küçüldüğü saptandı. Aynı zamanda OLE'nin T98G ve U87MG hücrelerinde 3B tümör kitlesini düşük ve yüksek doz TMZ'ye göre daha yüksek oranda küçülttüğü saptanmıştır. Buna ek olarak OLE ile birlikte verilen TMZ dozlarının, tek başına verilen etkin TMZ dozlarına kıyasla, 3B tümör kitlesini 24. saatten itibaren büyümesini inhibe ettiği ve tek başına verilen dozlardan daha yüksek miktarda küçülmeye sebep olduğu tespit edildi.

Kanser hücreleri, genetik bozulmalar ile kendiliğinden veya sonradan kemoterapi ilaçlarına karşı dirençli bir fenotip geliştirebilmektedirler (Lu, Shervington, 2008). Her iki durumda da direnç mekanizması, MDR ile ilişkili genlerin ifadesinde değişiklik yaratmakta ve tedaviye verilen yanıtın değişmesine sebep olmaktadır (Bredel, 2011). GB'lerin tedavisinde kullanılan TMZ ile oral kemoterapi, GB hastalarının sağ kalım sürelerindeki artışa katkı sağlasa da GB hücreleri, TMZ'ye karşı

direnç geliştirebilmektedir ve bu da çok sayıda hastada kemoterapinin başarısız olmasına yol açmaktadır. GB’de MDR’nin baskılanmasına yönelik ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Riedel ve ark. (2016), GB hastalarının tedavisindeki başarısını arttırmak için, multi-kinaz inhibitörü olan sorafenib’i araştırmışlardır. Farklı kanser türlerinde radyo ve kemoterapi duyarlılığını arttıran Sorafenib’in, GB hücre hatlarında TMZ veya kombin olarak tedaviyi geliştiremediği ve bazı hücre hatlarında direnç oluşturduğunu saptamışlardır. Daċevic ve ark., (2013), bir purin nükleosid analogu olan sülfinosin’in küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve GB hücre hatlarında MDR üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda sülfinosin’in *MDR1* ve *VEGF* mRNA’larının ekspresyonunu azaltarak MDR’yi inhibe ettiğini göstermişlerdir. Kanser hücrelerini öldürme potansiyeli olan ve bunun yanında MDR oluşumunu engelleyen anti-kanser ajanlarının tanımlanması, yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesi GB tedavisi için en önemli adımlardan birisidir. Ancak GB’de MDR yıkımı ile ilgili terapötik hedeflerin çalışıldığı makale oldukça sınırlıdır. Mevcut çalışmada, T98G ve U87MG hücrelerinde tek başına OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının MDR ile ilişkili *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyesine etkisi RT-qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. 2 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G hücrelerinde *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyeleri muamele edilmeyen T98G hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük görüldü (sırasıyla;  $p=0.024$ ,  $p=0.042$ ,  $p=0.013$ ). OLE’nin etkisi ile aynı olarak 350  $\mu\text{M}$  ve 400  $\mu\text{M}$  TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinde *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyeleri muamele edilmeyen T98G hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu saptandı (350  $\mu\text{M}$  TMZ için sırasıyla;  $p=0.011$ ,  $p=0.0005$ ,  $p=0.001$ ; 400  $\mu\text{M}$  TMZ için sırasıyla;  $p=0.005$ ,  $p=0.022$ ,  $p=0.004$ ). Böylece tek başına OLE’nin TMZ’nin düşük ve yüksek dozunda MDR genlerinde aynı etkiyi gösterdiği gösterilmiştir. T98G hücrelerinde OLE’nin, TMZ’nin düşük ve yüksek dozu ile kombinasyonu sonrasında ise *MRP1* geninin ekspresyon seviyesinde muamele edilmeyen T98G hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüş olduğu belirlendi (2 mg/ml OLE + 350  $\mu\text{M}$  TMZ için  $p=0.019$ , 2 mg/ml OLE + 400  $\mu\text{M}$  TMZ için  $p=0.025$ ).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının genel stratejisi, cerrahi rezeksiyon sonrası kalan hücrelerin anormal çoğalmasını engellemek için hücreleri

apoptoza götürmektedir. Bunun yanında kemoterapi ilaçlarının bir diğer hedefi apoptoza gitmeyen hücrelerin hücre yaşlanmasını sağlayarak çoğalmasını engellemektedir. Son dönemde yapılan çalışmalar hücre yaşlanmanın, hücrelerde yüksek oranda DNA hasarı ve kromozomal sapma göstermesine sebep olduğunu, böylece düşük dereceli bir enflamasyona yol açabildiğini ve aynı zamanda organizmaların yaşlanmasında ve yaşa bağlı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Yamada ve ark. (2012) Karnitin'in, GB hücrelerinde yaşlanmaya neden olduğunu ve yaşlanmaya neden olan TMZ ile birlikte alternatif bir tedavi oluşturabileceklerini savunmuşlardır. Zmijewska ve ark. (2019) kurkuminin hücre yaşlanmasını azalttığını ve hücre yaşlanmanın sebep olduğu çeşitli hastalıkların ilerlemesini ertelediğini söylemişlerdir. Mevcut çalışmada OLE'nin T98G ve U87MG hücrelerindeki hücre yaşlanması üzerine etkilerinin belirlenmesi amacı ile Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining deneyi gerçekleştirildi. Yaşlanan hücrelerin boyandığı bu deney ile muamele edilmeyen hücrelerde beklentilere paralel şekilde %0.8 oranında boyanma gözlemlendi. OLE ile muamele edilen T98G ve U87MG hücrelerindeki boyanan hücrelerin oranlarının sırasıyla %11, %5 olması, OLE'nin az miktarda hücreleri yaşlandırdığını göstermektedir. T98G hücrelerinde 350  $\mu$ M TMZ ve 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerdeki yaşlanma oranının sırasıyla %66, %47 olması, TMZ'nin yaşlandırma özelliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. U87MG hücrelerinde 300  $\mu$ M TMZ ve 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen hücrelerde yaşlanma oranının sırasıyla %13.4 ve %9.7 olduğu tespit edilmiştir. OLE'den daha yüksek oranda yaşlanma özelliği gösteren TMZ'nin U87MG hücrelerinde de yaşlanmaya sebep olduğu kanıtlanmıştır. OLE ile TMZ'nin iki hücre hattı için de birlikte verilmesi ile hücre yaşlanmasının azaldığı gösterilmiştir. T98G ve U87MG hücrelerinde, OLE'nin kontrol ve TMZ ile muamele edilen hücreye göre oldukça düşük bir oranda hücre yaşlanma özelliği gösterdiği gözlemlenmiştir. Buna ek olarak TMZ'nin düşük ve yüksek dozunun da kontrole ve OLE ile muamele edilmesine göre yüksek oranda hücreleri yaşlandırdığı belirlenmiştir. Böylece OLE'nin TMZ ile birlikte muamele edilmesi, hücrelerdeki yaşlanan hücre sayısının azalmasına ve dolayısıyla TMZ'nin hücreleri yüksek miktarda yaşlandırma özelliğinin OLE ile azaldığı saptandı ( $p < 0.0001$ ).

LncRNA'lar kanser hücrelerinde anormal seviyede eksprese edilmekte ve kanser gelişimi ve ilerlemesi gibi önemli rollerde görev almaktadır (Iyer ve ark. 2015 ve Schmitt ve Chang, 2016). Çeşitli kanserlere özgü spesifik LncRNA'lar keşfedilmiş ve bu LncRNA'ların kanser teşhisi için kullanılabilir biyobelirteç adayları olabileceği düşünülmüştür. GB hücrelerinin yayılması, göç özelliği göstermesi ve tedaviye direnç geliştirmesi ile ilişkili bulunan MALAT1, HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1 ve H19 LncRNA'ların bu tümörde çalışılmasına ve yıkımına ihtiyaç duyulmaktadır. Vassallo ve ark. (2016), WNT inhibitör faktörü 1'in, yeniden ekspresyonu ile WNT sinyalinin zayıflatılmasının sağlandığını ve LncRNA MALAT1'in aşağı yönde düzenlenmesi ile hücre göçünü önlediğini tespit etmişlerdir. Ke ve ark. (2015), hücre kültür çalışması ile LncRNA HOTAIR'in yıkılmasının insan glioma hücrelerinin biyolojik davranışlarını inhibe ettiğini bulmuşlardır. Yang ve ark. (2017), gliomalarda PVT1'in aşağı yönde eksprese edilmesinin, hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini, hücre apoptozunu destekleyeceğini, tümörün ilerlemesini ve göçünü baskılayabileceğini göstermişlerdir. Wang ve ark. (2018), LncRNA LOXL1-AS1'in susturulmasının NF- $\kappa$ B sinyal yoluyla GB'nin agresifliğini bastırıldığını belirlemişlerdir. GB'lerde LncRNA PVT1 ve H19'un inhibisyonunun GB'deki etkileri bilinmemektedir. Beyin tümörlerinde bitkisel özütler ile LncRNA MALAT1, HOTAIR ve LOXL1-AS1'in ekspresyon seviyelerinin düşürüldüğünü gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Mevcut tez çalışmasında T98G ve U87MG hücrelerinde OLE, TMZ ve OLE+TMZ kombinasyonlarının MALAT1, HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1 ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkileri RT-qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. 2 mg/ml OLE ile muamele edilen T98G hücrelerinin, muamele edilmeyen T98G hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında, ilaç direnç mekanizması ile ilişkili olan MALAT1 ve LOXL1-AS1 LncRNA'larının ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi (sırasıyla;  $p=0.025$ ,  $p=0.037$ ). 350  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinde istatistiksel bir anlamlılık gözlenmezken, 400  $\mu$ M TMZ ile muamele edilen T98G hücrelerinde MALAT1'in ekspresyon seviyesinde T98G hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ( $p=0.024$ ). Bu sonuçlar OLE'nin LncRNA'lar üzerinde TMZ'nin iki dozuna göre de daha etkili olduğunu göstermektedir. T98G hücrelerinde OLE'nin TMZ ile birlikte verilmesi ile MALAT1, LOXL1-AS1 ve

PVT1'in ekspresyon seviyelerinde muamele edilmeyen T98G hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Böylece OLE'nin TMZ ile sinerjik etki oluşturarak birçok kanserde etkili olan LncRNA'ların inhibe edilmesine ve GB hücrelerinde TMZ'ye karşı gelişen ilaç direncinin kırılmasına katkı sağladığı belirlenmiştir.

1 mg/ml OLE ile muamele edilen U87MG hücrelerinde, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek kıyaslandığında MALAT1, HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1 ve H19 LncRNA'larının ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmayan bir azalma olduğu belirlendi. U87MG hücrelerinin, 300 µM TMZ ile muamele edilmesi sonucunda, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans genine göre ilaç direnci ile ilişkili MALAT1, invazyon ile ilişkili PVT1 ve H19 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (sırasıyla; p=0.011, p=0.003, p=0.002). Ancak beklenenin aksine 350 µM TMZ ile muamele edilen hücrelerin, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans genine kıyasla H19'un ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi (p=0.014). Ancak istenmeyen bir şekilde MALAT1 ve PVT1 LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. OLE+TMZ kombinasyonlarının belirlenen LncRNA'lar üzerine etkisi incelendiğinde, 1 mg/ml OLE + 300 µM TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinin, PVT1 ve H19 LncRNA'ların baskılanmış ve ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (p=0.019, p=0.048). Ek olarak 1 mg/ml OLE + 350 µM TMZ ile muamele edilen U87MG hücrelerinin, muamele edilmeyen U87MG hücrelerinin referans geniyle standardize edilerek karşılaştırıldığında ise MALAT1'in ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir (p=0.033).

Mevcut çalışma, GB hücre hatlarında, *in-vivo* mimariyi ve mikro çevreyi doğru bir şekilde taklit eden 3B kültür yönteminin kullanılmasıyla OLE'nin anti-tümöral etkinliğinin, tümörün agresifliği ile ilişkili EMT, CSC, koloni oluşturma, yara iyileştirme ve MDR'nin kırılması ve hücre yaşlanması üzerindeki etkisiyle belirlendiği ve bu mekanizmalar ile ilişkili LncRNA'ların ifadeleri üzerine etkili olduğunun gösterildiği ilk çalışma olmuştur.

Mevcut tez çalışması ile;

- OLE'nin glial tümörler üzerindeki tedavi edici yönünün, mikroçevrenin etkilerinin daha iyi değerlendirilebilmesine olanak sağlayan ve *in-vivo*'ya benzer fizyolojik özelliklere sahip olan 3B kültür ile ilk kez ele alınarak T98G, U87MG, HUVEC hücrelerinin çoğaltılması ve proje kapsamında değerlendirilmesi planlanan aşamaların bu hücrelerde analizi gerçekleştirilmiştir.
- OLE'nin, tümörün agresifliği ile ilişkili olan EMT belirteçleri (*Twist, Snail, Zeb1, N-kaderin* ve *E-Kaderin* ekspresyonları), CSC belirteçleri (*CD133, NANOG, SOX2* ve *OCT4* ekspresyonları) ve invazyon özellikleri (koloni oluşumu ve yara iyileşmesi) üzerindeki etkileri ilk kez belirlenmiştir.
- OLE'nin tedavi edici yönü ile ilişkili olarak MDR'nin (*MRP1, MRP5, LRP1* ekspresyonları) kırılımı ile ilişkisi ve hücre yaşlanması üzerine olan etkisi ilk kez değerlendirilmiştir.
- OLE'nin son yıllarda birçok kanserde biyobelirteç olarak kullanılan LncRNA'ların (*MALAT1, HOTAIR, LOXL1-AS1, PVT1, H19* ekspresyonları) üzerine etkisi ilk kez ortaya konmuştur.

Bu kapsamda tez çalışmasından elde edilen veriler ile;

- Türkiye florasında yetişen *Olea europaea*'nın GB ile ilişkili anti-kanser mekanizmaları üzerindeki etkinliği daha iyi anlaşılabilmiştir.
- Hücre kültürlerinde 3B kültür yönteminin kullanılması ile yeni tedavi yöntemlerinin değerlendirmesinde, klinik temsili bir sistem olarak geniş kullanım alanına sahip olabileceği gösterilmiştir.
- OLE'nin GB hücrelerinde EMT'yi azaltarak, invazyonu engelleyerek, koloni oluşumunu azaltarak ve 3B kültür ortamında tümör boyutunu küçülterek tümörlerin agresifliğini azaltma yönündeki etkileri desteklenmiştir. OLE'nin tüm bu tümör agresifliği ile ilişkili süreçlerde TMZ'nin tek başına olan etkinliğini arttırıcı yönde etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.
- OLE'nin GB hücrelerinde, MRP1, MRP5, LRP1 ekspresyonlarını azaltarak, MDR'nin kırılımını sağlaması ile ve TMZ'nin etkinliğini arttırması yönü ve

TMZ ile sinerji gösterme özelliği desteklenmiştir. Ayrıca OLE'nin GB hücrelerinde hücre yaşlanmasını azaltıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir.

- OLE'nin GB hücrelerinde hem tek başına hem de TMZ ile birlikte invazyon ile ilişkili H19 ve PVT1'in, kötü prognoz ile ilişkili HOTAIR'in ve ilaç direnci ile ilişkili MALAT1 ve LOXL1-AS1'in ekspresyonlarını azaltarak epigenetik mekanizmanın en önemli ögelerinden olan LncRNA'lar üzerinde etkili oldukları belirlenmiştir.
- OLE'nin GB tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılabileceği in-vivo deneysel süreçlere geçirilebilecek bir ilaç adayı olduğunu göstermiştir.
- OLE'nin GB tedavisinde daha etkin, yan etkileri daha az ve daha ekonomik tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek nitelikte olduğu belirlenmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- Aasland D, Göttinger L, Hauck L et al (2019) Temozolomide Induces Senescence and Repression of DNA Repair Pathways in Glioblastoma Cells via Activation of ATR-CHK1, p21, and NF- $\kappa$ B. *Cancer Res* 1;79(1):99-113.
- Abal M, Planaguma J, Gil-Moreno A et al (2006) Molecular pathology of endometrial carcinoma: transcriptional signature in endometrioid tumors. *Histol Histopathol* 21:197– 204.
- Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS (2010) mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro Oncol* 12:882–889.
- Aldape K, Zadeh G, Mansouri S et al (2015) Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 129(6):829-48.
- Alal'u-Paz R, Ashour N, Gonz'alez-Corpas A et al (2012) DNAMethylation, HistoneModifications, and Signal Transduction Pathways: A Close Relationship in Malignant Gliomas Pathophysiology Hindawi Publishing Corporation Journal of Signal Transduction Volume 2012: 956958.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA et al (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 361–98: 361–98.
- Arora RS, Altson RD, Eden TO et al (2009) Age-incidence patterns of primary CNS tumors in children, adolescents and adults in England. *Neuro Oncol* 11(4):403–13.
- Arvanitis D, Malliri A, Antoniou D et al (1991) Ras p21 expression in brain tumors: elevated expression in malignant astrocytomas and glioblastomas multiforme. *In Vivo* 5:317–321.
- Baker DJ, Childs BG, Durik M et al (2016) Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T et al (2011) Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.
- Bartoli R, Fernandez-Banares F, Navarro E et al (2000) Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E (2) synthesis. *Gut* 46: 191–199.
- Batista PJ, Chang HY (2013) Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* 152:1298-307.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR et al (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10:687–692.



Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, Ciolko A et al (2019) The Role of Curcumin in the Modulation of Ageing. *Int J Mol Sci* 12;20(5).

Borah A, Raveendran S, Rochani A et al (2015) Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis* 4(11), e177.

Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S et al (2011) The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 30: 770–782.

Bredel M (2011) Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res. Rev* 35, 161–204.

Brown JM, Attardi LD (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat. Rev. Cancer* 5, 231–237.

Burgess R, Jenkins R, Zhang Z (2008) Epigenetic changes in gliomas. *Cancer biology & therapy* 7(9), 1326-1334.

Cai B, Song XQ, Cai JP et al (2014) HOTAIR: A cancer-related long non-coding RNA. *Neoplasma* 61: 379-391.

Cancer Genome Atlas Research Network, 231 Collaborators (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061– 1068.

Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Promjantuek W et al (2019) Fabrication of 3D calcium-alginate scaffolds for human glioblastoma modeling and anticancer drug response evaluation. *J Cell Physiol* doi: 10.1002/jcp.28608.

Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W et al (2005) A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974–1999. *Cancer* 104:2798–06.

Chen JR, Yao Y, Xu HZ et al (2016) Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1/2 Mutations as Prognostic Markers in Patients With Glioblastomas. *Medicine (Baltimore)* 95:e2583.

Chen L, Tweddle DA (2012) p53, SKP2, and DKK3 as MYCN Target Genes and Their Potential Therapeutic Significance. *Front Oncol* 2:173.

Chen Y, Du H, Bao L et al (2018) LncRNA PVT1 promotes ovarian cancer progression by silencing miR-214. *Cancer Biol Med* 15: 238-250.

Chi D, Zhang W, Jia Y et al (2019) Spalt-Like Transcription Factor 1 (SALL1) Gene Expression Inhibits Cell Proliferation and Cell Migration of Human Glioma Cells Through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Med Sci Monit Basic Res* 1;25:128-138.

Cohen A, Holmen S, Colman H (2013) IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13(5): 345.

Connelly JM, Malkin MG (2007) Environmental risk factors for brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7(3):208-14.

- Cragg GM, Newman DJ (2006) Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *J Ethnopharmacol* 22;100(1-2):72-9.
- Crespo I, Vital A.L, Gonzalez-Tablas M et al (2015) Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am. J Pathol* 185:1820-1833.
- Dačević M, Isaković , Podolski-Renić A et al (2013) Purine nucleoside analog--sulfinosine modulates diverse mechanisms of cancer progression in multi-drug resistant cancer cell lines. *PLoS One* 8(1):e54044.
- Dang L, Jin S, Su SM (2010) IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med* 16:387–397.
- De la Iglesia N, Konopka G, Puram SV et al (2008) Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes Dev* 22:449–462.
- De Magalhaes JP, Passos JF (2018) Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech. AgeingDev* 170, 2–9.
- Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA et al (2006) Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus* 20(4):E1.
- Ding C, Yang Z, Lv Z et al (2015) Long non-coding RNA PVT1 is associated with tumor progression and predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Oncol Lett* 9:955–963.
- Discher DE, Janmey P, Wang Y (2005) Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310: 1139–1143.
- Dobes M, Khurana VG, Shadbol TB et al (2011) Increasing incidence of glioblastoma and meningioma, and decreasing incidence of Schwannoma (2000–2008); Findings of a multicentric Australian study. *Surg Neurol In* 2:176.
- Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J et al (2002) Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 21:541–552.
- Duesberg P, Mandrioli D, McCormack A et al (2011) Is carcinogenesis a form of speciation? *cell cycle* 10: 2100-2114.
- Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB et al (2012) Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro Oncol* 14: 246–255.
- Evans SM, Judy KD, Dunphy I et al (2004) Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 10:8177–8184.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J et al (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1(5):2315-9.
- Friedl P, Gilmour D et al (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:445-57.

- Friedl P, Wolf K (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188:11-9.
- Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM et al (1999) Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 155:387–394.
- Fujisawa T, Rubin B, Suzuki A (2012) Cysteamine suppresses invasion, metastasis and prolongs survival by inhibiting matrix metalloproteinases in a mouse model of human pancreatic cancer. *PLoS One* 7:e34437.
- Gausia SK, Markou M, Voulgaris S et al (2009) Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in northwest Greece and study of potential predisposing factors, 2005–2007. *Neuroepidemiology* 33(2):89–95.
- Gertler R, Rosenberg R, Stricker D et al (2004) Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 22:1807– 1814.
- Gielen GH, Gessi M, Hammes J et al (2013) H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: a marker for diffuse highgrade astrocytomas. *Am J Clin Pathol* 139(3):345–9.
- Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D (2014) Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 14:430–439.
- Goligorsky MS, Hirschi K (2016) Stress Induced Premature Senescence of Endothelial and Endothelial Progenitor Cells. *Adv. Pharmacol* 77, 281–306.
- Greenburg G, Hay ED (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95(1):333–339.
- Gros P, Croop J, Housman D (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47: 371–380.
- Gu H, Feng J, Wang H et al (2016) *Celastrus orbiculatus* extract inhibits the migration and invasion of human glioblastoma cells in vitro. *BMC Complement Altern Med* 6;16(1):387.
- Hamburger A, Salmon SE (1997) Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197: 461-3.
- Hamdi HK, Castellon R (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor, *Biochem Biophys Res Commun* 2;334(3):769-78.
- Han J, Talorete TP, Yamada P et al (2009) Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells, *Cytotechnology* 59(1):45-53.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A et al (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296–299.

Hauser MA, Aboobakar IF, Liu Y et al (2015) Genetic variants and cellular stressors associated with exfoliation syndrome modulate promoter activity of a lncRNA within the LOXL1 locus. *Hum. Mol. Genet* 24, 6552–6563.

Hay ED (1968) Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. In: Fleischmajer R, Billingham RE, Eds. *Epithelial-Mesenchymal Interactions*. Williams and Wilkins Baltimore p. 31–55.

Henson JW, Schnitker BL, Correa KM et al (1994) The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol* 36:714–721.

Hesari A, Rezaei M, Rezaei M et al (2018) Effect of curcumin on glioblastoma cells. *J Cell Physiol* 234(7):10281-10288.

Huang EC, McEntee MF, Whelan J (2012) Zylflamend, a combination of herbal extracts, attenuates tumor growth in murine xenograft models of prostate cancer. *Nutr. Cancer* 64 pp. 749-760.

Hurley JB, Simon MI, Teplow DB et al (1984) Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. *Science* 226:860–862.

Huse JT, Holland EC (2010) Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 10:319–331.

Hutchinson L, Kirk R (2011) High drug attrition rates—where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol* 8(4):189–190.

Iliina O, Friedl P (2009) Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci* 122:3203-8.

Interphone Study Group (2010) Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol* 39: 675–694.

Iser IC, Pereira MB, Lenz G et al (2017) The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. *Med Res Rev* 37(2):271-313.

Iyer MK, Niknafs YS, Malik R et al (2015) The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat. Genet* 47, 199–208.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64(2):295–312.

Jeon HY, Kim JK, Ham SW et al (2016) Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype. *Tumour Biol* 37, 5857–5867.

Jeon HY, Park CG, Ham SW et al (2017) BRM270, a Compound from Natural Plant Extracts, Inhibits Glioblastoma Stem Cell Properties and Glioblastoma Recurrence. *J Med Food* 20(9):838-845.

Ji P, Diederichs S, Wang W et al (2003) MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 22: 8031-8041.

Jia P, Cai H, Liu X et al (2016) Long non-coding RNA H19 regulates glioma angiogenesis and the biological behavior of glioma-associated endothelial cells by inhibiting microRNA-29a. *Cancer Lett* 381: 359-369.

Jiang G, Jiang AJ, Xin Y et al (2014) Progression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and temozolomide resistance in cancer research. *Molecular biology reports* 41(10), 6659-6665.

Jiang X, Yan Y, Hu M et al (2016) Increased level of H19 long noncoding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells. *J Neurosurg* 124: 129-136.

Jonkman JE, Cathcart JA, Xu F et al (2014) An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr* 8(5):440-51.

Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest* 119, 1420–1428.

Kanzawa T, Germano IM, Kondo Y et al (2003) Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *Br J Cancer* 922–929.

Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W et al (2018) 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* 14(4): 910–919.

Ke J, Yao YL, Zheng J et al (2015) Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells via modulation of miR-326. *Oncotarget* 8;6(26):21934-49.

Keleş O, Ak S, Bakırel T et al (2001) Türkiye’de yetişen bazı bitkilerin antibakteriyel etkisinin incelenmesi. *Türk J Vet Anim Sci* ©Tubitak 25: 559-565.

Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P et al (2012) K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 124(3):439–47.

Kim YZ (2014) Altered Histone Modifications in Gliomas *Brain Tumor Res Treat* 2(1):7-21.

Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous systems, World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press, Lyon 10-19.

- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW et al (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 61, 215–225.
- Kleihues P, Peter C. Burger et al (1993) The New WHO Classification of Brain Tumours *Brain Pathology* 3: 255-268.
- Kondo Y, Katsushima K, Ohka F et al (2014) Epigenetic dysregulation in glioma *Cancer Sci* 105(4):364.
- Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98:285-94.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387:299–303.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y et al (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 20):3613-22.
- Labuhn M, Jones G, Speel EJM et al (2001) Quantitative real-time PCR does not show selective targeting of p14(ARF) but concomitant inactivation of both p16(INK4A) and p14(ARF) in 105 human primary gliomas. *Oncogene* 20:1103–1109.
- Lasarge CL, Danzer SC (2014) Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation *Front Mol Neurosci* 14;7:18.
- Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE et al (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* 29(12): 1203–1217.
- Lecomte N, Njardarson JT, Nagorny P et al (2011) Emergence of potent inhibitors of metastasis in lung cancer via syntheses based on migrastatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15074-8.
- Lee CH, Jung KW, Yoo H et al (2010) Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *J Korean Neurosurg Soc* 48(2):145–52.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R et al (2006). The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172(7):973–981.
- Li J, Liu H, Ramachandran S et al (2010) Grape seed proanthocyanidins ameliorate Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Chin Med* 38(3):569-84.
- Li M, Zhang Y, Liu Z et al (2007) Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18636–18641.
- Li T, Mo X, Fu L et al (2016) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer. *Oncotarget* 23;7(8):8601-12.

- Li W, Wei W, Zhu S et al (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4(1):16–9.
- Lin AB, McNeely SC, Beckmann RP (2017) Achieving Precision Death with Cell-Cycle Inhibitors that Target DNA Replication and Repair. *Clin. Cancer Res* 23, 3232–3240.
- Lindberg N, Kastemar M, Olofsson T (2009) Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene* 28(23):2266–2275.
- Liu C, Sage JC, Miller MR (2011) Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* 146(2):209–221.
- Liu L, Yang J, Zhu X et al (2016) Long noncoding RNA H19 competitively binds miR-17-5p to regulate YES1 expression in thyroid cancer. *FEBS J* 283: 2326-2339.
- Lopes LC, Oliveira SCB, Oliveira-Brett AM (2013) Temozolomide chemical degradation to 5-aminoimidazole-4-carboxamide – electrochemical study, *J. Electroanal. Chem* 183–189.
- Lu C, Shervington A (2008) Chemoresistance in gliomas. *Mol. Cell. Biochem* 312, 71–80.
- Lu J, Getz G, Miska EA et al (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–838.
- Lu L, Zhang C, Zhu G, et al (2011) Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. *Breast Cancer Res BCR* 13:R56.
- Ma KX, Wang HJ, Li XR et al (2015) Long noncoding RNA MALAT1 associates with the malignant status and poor prognosis in glioma. *Tumour Biol* 36: 3355-3359.
- Maciaczyk D, Picard D, Zhao L et al (2017) CBF1 is clinically prognostic and serves as a target to block cellular invasion and chemoresistance of EMT-like glioblastoma cells. *Br J Cancer* 27;117(1):102-112.
- Mahabir R, Tanino M, Elmansuri A (2014) Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-oncology* 16(5):671–685.
- Maleszewska M, Kaminska B (2013) Is Glioblastoma an Epigenetic Malignancy? *Cancers* 2013, 5, 1120-1139.
- Mao H, Lebrun DG, Yang J (2012) Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancer Invest* 30(1):48-56.
- Martin P, Parkhurst SM (2004) Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131:3021-34.

- Mikula-Pietrasik J, Stryczynski L, Uruski P et al (2018) Pro cancerogenic activity of senescent cells: A case of the peritoneal mesothelium. *Ageing Res. Rev* 43, 1–9.
- Mischel PS, Cloughesy TF (2003) Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol* 13:52–61.
- Mohammadi A, Mansoori B, Goldar S et al (2015) Effects of *Urtica dioica* dichloromethane extract on cell apoptosis and related gene expression in human breast cancer cell line (MDA-MB-468) *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand, France)* 62 pp. 62-67.
- Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW et al (2018) Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene* 37(15):1949-1960.
- Molinari F, Frattini M (2013) Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 3: 326.
- Nagaishi M, Nakata S, Ono Y et al (2017) Tumoral and stromal expression of Slug, ZEB1, and ZEB2 in brain metastasis. *J Clin Neurosci* 46:124-128.
- Nagane M, Huang HJ, Cavenee WK (1999) Causes of drug resistance and novel therapeutic opportunities for the treatment of glioblastoma. *Drug Resist Updat* 2:30-37.
- Nagoshi H, Taki T, Hanamura I et al (2012) Frequent PVT1 rearrangement and novel chimeric genes PVT1-NBEA and PVT1-WWOX occur in multiple myeloma with 8q24 abnormality. *Cancer Res* 72: 4954-4962.
- Naylor RM, Baker DJ, Van Deursen JM (2013) Senescent cells: A novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin. Pharmacol. Ther* 93, 105–116.
- Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA et al (2016) EMT: 2016. *Cell* 166: 21–45.
- Ohgaki H, Kim YH, Steinbach JP (2010) Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes. *Curr Opin Neurol* 23: 583–591.
- Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93-108.
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma *The American Journal of Pathology*, Vol. 170, No.5 American Society for Investigative Pathology *Am J Pathol* 170(5):1445-53.
- Olmez I, Shen W, McDonald H et al (2015) Dedifferentiation of patient- derived glioblastoma multiforme cell lines results in a cancer stem cell-like state with mitogen-independent growth. *J Cell Mol Med* 19:1262–72.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P et al (2013) CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol* 15(Suppl):2ii–56.



Ostrom QT, Gittleman H, Liao P et al (2014) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro Oncol* 16 (Suppl 4): iv1–iv63.

Paget JA, Restall IJ, Daneshmand M et al (2012) Repression of cancer cell senescence by PKC $\delta$ . *Oncogene* 31, 3584–3596.

Pawlowska E, Szczepanska J, Szatkowska M et al (2018) An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme-Role in Pathogenesis and Therapeutic Perspective. *Int J Mol Sci* 17;19(3).

Petersen OW, Ronnovjessen L, Howlett AR (1992) Interaction with basement-membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(19):9064–9068.

Pouliot N PH, Burrows A (2000) Investigating Metastasis Using In Vitro Platforms. *Madame Curie Bioscience Database*. Austin (TX): Landes Bioscience, 2000.

Puck TT, Markus PI (1956) Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med* 103, 653–666.

Puli S, Jain A, Lai JCK et al (2010) Effect of combination treatment of rapamycin and isoflavones on mtor pathway in human glioblastoma (U87) cells *Neurochemical Research* vol. 35, no. 7, pp. 986–993.

Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O et al (2002) Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 21:8404–8413.

Rajan P, McKay RD (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18:3620–3629.

Rakheja D, Medeiros LJ, Bevan S et al (2013) The emerging role of D-2-hydroxyglutarate as an oncometabolite in hematolymphoid and central nervous. *Frontiers in oncology* 3, 169.

Ramalho MJ, Andrade S, Coelho MÁN et al (2019) Biophysical interaction of temozolomide and its active metabolite with biomembrane models: The relevance of drug-membrane interaction for Glioblastoma Multiforme therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 136:156-163.

Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS et al (1995) Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10:2243–2246.

Raveh E, Matouk IJ, Gilon M et al (2015) The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis-a proposed unifying theory. *Mol Cancer* 14: 184.

- Reardon D, Herndon J, Peters K et al (2012) Bevacizumab continuation beyond initial bevacizumab progression among recurrent glioblastoma patients. *Br J Cancer* 107(9):1481–7.
- Régina A, Demeule M, Laplante A et al (2001) Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Rev* 20(1-2):13-25.
- Riedel M, Struve N, Müller-Goebel J et al (2016) Sorafenib inhibits cell growth but fails to enhance radio- and chemosensitivity of glioblastoma cell lines. *Oncotarget* 20;7(38):61988-61995.
- Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P et al (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 120(5):567–584.
- Rincheval V, Renaud F, Lemaire C et al (2002) Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 298, 282–288.
- Rorth P (2009) Collective cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:407-29.
- Ryan D, Robards K (1998) Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123:31–44.
- Ryu CH, Yoon WS, Park, KY et al (2012) Valproic Acid Downregulates the Expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-Resistant Glioma Cells. *J Biomed Biotechnol* 2012:987495.
- Scheel C, Weinberg RA (2012) Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol* 22: 396–403.
- Schmitt AM, Chang HY (2016) Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* 29, 452–463.
- Schmitt R (2017) Senotherapy: Growing old and staying young? *Pflügers Arch* 469, 1051–1059.
- Schneider M, Ströbele S, Nonnenmacher L et al (2016) A paired comparison between glioblastoma “stem cells” and differentiated cells. *Int J Cancer* 138(7):1709–18.
- Schreck KC, Grossman SA (2018) Role of Temozolomide in the Treatment of Cancers Involving the Central Nervous System. *Oncology (Williston Park)* 15;32(11):555-60, 569.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu X-Y et al (2012) Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482:226–31.
- Sciuscio D, Hegi ME (2013) Epigenetics and Brain Cancer. *Emerging Concepts in Neuro-Oncology* pp 21-40.
- Scott CB, Scarantino C, Urtasun R et al (1998) Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes

- for malignant glioma patients: a report using RTOG 90–06, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 40: 51–55.
- Shi Y, Lan F, Matson C et al (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119:941–53.
- Shinojima N, Tada K, Shiraishi S et al (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63:6962–6970.
- Silber JR, Bobola MS, Blank A et al (2012) O 6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1826(1), 71-82.
- Simpson JR, Horton J, Scott C et al (1993) Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG ) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26: 239–244.
- Simpson KJ, Selfors LM, Bui J et al (2008) Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nat Cell Biol* 10:1027-38.
- Singh-Gupta V, Joiner MC, Runyan L et al (2011) Soy isoflavones augment radiation effect by inhibiting APE1/ref-1 DNA repair activity in non-small cell lung cancer *Journal of Thoracic Oncology* vol. 6, no. 4, pp. 688–698.
- Solomon DA, Kim JS, Jean W (2008) Conspirators in a capital crime: co-deletion of p18INK4c and p16INK4a/p14ARF/p15INK4b in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 68:8657–8660.
- Srivastava C, Irshad K, Dikshit B et al (2018) FAT1 modulates EMT and stemness genes expression in hypoxic glioblastoma. *Int J Cancer* 15;142(4):805-812.
- Stark AH, Kossoy G, Zusman I et al (2003) Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rats influences mammary cancer development in female offspring. *Nutr. Cancer* 46: 59–65.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.
- Sturm D, Witt H, Hovestadt V et al (2012) Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 22(4):425–37.
- Su YK, Bamodu OA, Tzeng YM et al (2019) Ovatodiolide inhibits the oncogenicity and cancer stem cell-like phenotype of glioblastoma cells, as well as potentiate the anticancer effect of temozolomide. *Phytomedicine* 19;61:152840.
- Tabera J, Guinda A, Ruiz-Rodriguez A et al (2004) Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves, *J Agric Food Chem* 52(15):4774–4779.

- Takagaki Y, Yamagishi H, Matsuoka R (2012) Factors involved in signal transduction during vertebrate myogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol* 296:187-272.
- Tamimi AF, Juweid M (2017) Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. *Codon Publications* pp 144-153.
- Tamimi AF, Tamimi I, Abdelaziz M et al (2015) Epidemiology of malignant and non-malignant primary brain tumors in Jordan. *Neuroepidemiology* 45:100–8.
- TC Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı (1997) Kanser Bildirimlerinin Değerlendirilmesi 1993-1994, Bizim Büro Basımevi Ankara 3-9.
- Tezcan G, Taskapilioglu MO, Bunca B et al (2017b) *Olea europaea* leaf extract and bevacizumab synergistically exhibit beneficial efficacy upon human glioblastoma cancer stem cells through reducing angiogenesis and invasion in vitro. *Biomed Pharmacother* 90:713-723.
- Tezcan G, Tunca B, Bekar A et al (2014) *Olea europaea* leaf extract improves the treatment response of GBM stem cells by modulating miRNA expression. *Am J Cancer Res* 6;4(5):572-90.
- Tezcan G, Tunca B, Demirci H et al (2017a) *Olea europaea* Leaf Extract Improves the Efficacy of Temozolomide Therapy by Inducing MGMT Methylation and Reducing P53 Expression in Glioblastoma. *Nutr Cancer* 69(6):873-880.
- Thakkar J, Dolecek TA, Horbinski C et al (2014) Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23(10):1985-96.
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6):442–454.
- Thomas SM, DeMarco M, D’Arcangelo G et al (1992) Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* 68:1031–1040.
- Tibbitt MW, Anseth KS (2009) Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 1;103(4):655-63.
- Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Radiat. Res* 14, 213–222.
- Tivnan A, Zakaria Z, O’Leary C et al (2015) Inhibition of multidrug resistance protein 1 (MRP1) improves chemotherapy drug response in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *Front Neurosci* 16;9:218.
- Tortosa A, Ino Y, Odell N et al (2000) Molecular genetics of radiographically defined de novo glioblastoma multiforme. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:544–552.
- Trelstad RL, Hay ED, Revel JD (1967) Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *DevBiol* 16(1):78–106

- Tunca B, Tezcan G, Cecener G et al (2012) *Olea europaea* leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 138:1831–1844.
- Ulitsky I, Bartel DP (2013) lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* 154:26-46.
- Vassallo I, Zinn P, Lai M et al (2016) WIF1 re-expression in glioblastoma inhibits migration through attenuation of non-canonical WNT signaling by downregulating the lincRNA MALAT1. *Oncogene* 35(1):12-21.
- Vedula SR, Ravasio A, Lim CT et al (2013) Collective cell migration: a mechanistic perspective. *Physiology (Bethesda)* 28:370-9.
- Vengoji R, Macha MA, Batra SK et al (2018) Natural products: a hope for glioblastoma patients. *Oncotarget* 9(31):22194-22219.
- Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG (2015) Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification *Ann Transl Med* 3(7):95.
- Virant-Klun I, Ståhlberg A, Kubista M et al (2016) MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans. *Stem Cells Int* 3984937.
- Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S (2010) Role of phytoestrogens in cancer therapy *Planta Medica*, vol. 76, no. 11, pp. 1132–1142.
- Vitorino P, Meyer T (2008) Modular control of endothelial sheet migration. *Genes Dev* 22:3268-81.
- Wan B, Wu HY, Lv DJ et al (2018) Downregulation of lincRNA PVT1 expression inhibits proliferation and migration by regulating p38 expression in prostate cancer. *Oncol Lett* 16: 5160-5166.
- Wang H, Li L, Yin L et al (2018) Silencing lincRNA LOXL1-AS1 attenuates mesenchymal characteristics of glioblastoma via NF- $\kappa$ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 500(2):518-524.
- Wang J, Pan Y, Wu J et al (2016) The association between abnormal long Noncoding RNA MALAT-1 expression and cancer lymph node metastasis: A meta-analysis. *Biomed Res Int* 1823482.
- Weller M, Wick W, Aldape K et al (2015) Glioma. *Nat Rev Dis Primers* 16;1:15017.
- Wirsching HG, Galanis E, Weller M (2016) Glioblastoma. *Handb Clin Neurol* 134:381-97.
- Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH et al (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2965–2969.

- Xiang J, Guo S, Jiang S et al (2016) Silencing of Long Non-coding RNA MALAT1 promotes apoptosis of glioma cells. *J Korean Med Sci* 31: 688-694.
- Xue X, Yang YA, Zhang A et al (2016) LncRNA HOTAIR enhances ER signaling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Oncogene* 35: 2746-55.
- Yamada S, Matsuda R, Nishimura F et al (2012) Carnitine-induced senescence in glioblastoma cells. *Exp Ther Med* 4(1):21-25.
- Yan H, Wu A (2018) FOXO1 is crucial in glioblastoma cell tumorigenesis and regulates the expression of SIRT1 to suppress senescence in the brain. *Mol. Med. Rep* 17, 2535–2542.
- Yang A, Wang H, Yang X (2017) Long non-coding RNA PVT1 indicates a poor prognosis of glioma and promotes cell proliferation and invasion via target EZH2. *Biosci Rep* 15;37(6).
- Yang B, Wei ZY, Wang BQ et al (2018) Down-regulation of the long noncoding RNA-HOX transcript antisense intergenic RNA inhibits the occurrence and progression of glioma. *J Cell Biochem* 119(2):2278-2287.
- Yang H, Ye D, Guan KL (2012) IDH1 and IDH2 Mutations in Tumorigenesis: Mechanistic Insights and Clinical Perspectives. *Clin Cancer Res* 18(20).
- Yang HW, Xing H, Johnson MDA (2015) Major role for microRNAs in glioblastoma cancer stem-like cells. *Arch. Pharm. Res* 38, 423–434.
- Yarrow JC, Totsukawa G, Charras GT et al (2005) Screening for cell migration inhibitors via automated microscopy reveals a Rho-kinase inhibitor. *Chem Biol* 12:385-95.
- Yu C, Wang Y, Li G et al (2018) LncRNA PVT1 promotes malignant progression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cancer* 9: 3593-3602.
- Zeisberg, M, Neilson E (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest* 119:1429–1437.
- Zhang L, Yan Y, Jiang Y et al (2015) The expression of SALL4 in patients with gliomas: high level of SALL4 expression is correlated with poor outcome. *J Neurooncol* 121(2):261–8.
- Zhang Z, Wang S, Liu W (2018) EMT-related long non-coding RNA in hepatocellular carcinoma: a study with TCGA database. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 503, 1530–1536.
- Zhi YH, Song MM, Wang PL et al (2009) Suppression of matrix metalloproteinase-2 via RNA interference inhibits pancreatic carcinoma cell invasiveness and adhesion. *World J Gastroenterol* 15:1072–1078.
- Zhou X, Ren Y, Zhang J et al (2015) HOTAIR is a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget* 6: 8353-8365.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:21–35.



## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

- 2B:** 2 Boyutlu  
**3B:** 3 boyutlu  
**CDK:** Siklin Bağımlı Kinazlar  
**CSC:** Kanser Kök Hücre  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DNA:** Deoksiribo Nükleik asit  
**DNMT:** DNA Metiltransferaz  
**EGFR:** Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü  
**EMT:** Epitelyal Mezenkimal Geçiş  
**FBS:** Fetal Bovine Serum  
**FDA:** U.S. Food and Drug Administration, ABD Gıda ve İlaç İdaresi  
**GB:** Glioblastoma  
**HDAC:** Histon Deasetilaz  
**HOTAIR:** HOX Transkript Antisens RNA  
**HUVEC:** Human Umbilical Vein Endotelial Cells  
**IDH1:** İzositrat dehidrogenaz 1  
**IDH2:** İzositrat dehidrogenaz 2  
**LncRNA:** Uzun Kodlama Yapmayan RNA  
**LOH:** Loss of heterozygosity, Heterozigotluk Kaybı  
**LOXL1-AS1:** LncRNA LOXL1 Antisens RNA 1  
**MALAT1:** Metastaz ile İlişkili Akciğer Adenokarsinom Transkript 1  
**MDM2:** Mouse Double Minute 2  
**MDR:** Çoklu İlaç Direnci  
**MET:** Mezenkimal Epitelyal Geçiş  
**MGMT:** O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase  
**miRNA:** mikroRNA  
**MMR:** Yanlış Eşleşme Onarımı  
**MT:** Mezenkimal Geçiş  
**mTOR:** Rapamisin Protein Kompleksi  
**OLE:** *Olea europaea* Yapraklarından Elde Edilen Özüt  
**P-gp:** P-glikoprotein  
**PI3K/AKT:** Fosfatidilinositol 3-Kinaz  
**PTEN:** Phosphatase ve Tensin  
**RB:** Retinoblastoma  
**RNA:** Ribo Nükleik asit  
**SA-β-gal:** Yaşlanma ile İlişkili β-galaktosidaz  
**TERT:** Telomeraz Reverse Transkriptaz  
**TMZ:** Temozolomid  
**TP53:** Tumor Protein P53  
**WHO:** Dünya Sağlık Örgütü



## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, ders döneminde ve tez çalışmalarım da desteğini benden asla esirgemeyen, bilgilerini her daim benimle paylaşan, her zaman hoşgörölü, sabırlı, kibar ve sevgi dolu olan değerli danışmanım Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya, bilgi ve deneyimlerini sabır ile aktaran, her konuda hoşgörölü yaklaşan sayın hocalarım Prof. Dr. Ünal EGELİ ve Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER' e,

Her adımında yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, güzel kalbiyle bana güç veren, emeklerinin karşılığını ödeyemeyeceğim manevi ablam Araş. Gör. Seçil AKSOY'a, zorlu süreçte yanımda olan tüm dostlarıma ve arkadaşlarıma, aynı zamanda bu yolda her zaman birlik olduğumuz yüksek lisans arkadaşlarım Çağla TEKİN'e, Dilara Kamer ÇOLAK'a, Ecem EFENDİ'ye, Ufuk ÜNAL'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, yardımlarını esirgemeyen Muhammet Nafi CİVAN'a, Tıbbi Biyoloji A.D asistanlarına, öğrencilerine ve tüm çalışanlarına,

Tanıdığım günden itibaren en zor günlerimde yanımda olan, her konuda anlayışlı ve hoşgörölü yaklaşan Osman İlkan ERÇELİK'e

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan, her konuda yanımda olan, bana pes etmemeyi öğreten ve desteklerini her zaman kalbimde hissettiğim Annem, Babam ve Abim başta olmak üzere canım Aileme,

sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından TÜBİTAK 1002-118S799 nolu araştırma projesi kapsamında sağlanan maddi destek için teşekkür ederim.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

25 Şubat 1995 yılında Gebze'de doğdum. İlköğretimimi Canaydın İlköğretim Okulu'nda, Lise öğretimimi Mudanya Sami Evkuran Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2013 yılında Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölümüne yerleştim. 2017 yılında fakülte dördüncüsü olarak mezun olduktan sonra aynı sene Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D'da yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D'da yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

