



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



Olea europaea (ZEYTİN) YAPRAĞI FENOLİK BİLEŞENİ
OLEUROPEİN'İN TEMOZOLOMİD İLE BİRLİKTE HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN GLİOBLASTOMA
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Hilal DEMİRCİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2017

Hilal DEMİRCİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017



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



***Olea europaea* (ZEYTİN) YAPRAĞI FENOLİK BİLEŞENİ
OLEUROPEİN'İN TEMOZOLOMİD İLE BİRLİKTE
HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN GLİOBLASTOMA
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Hilal DEMİRCİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof.Dr. Berrin TUNCA

OUAP(T)-2015/3- ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

BURSA-2017

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum '*Olea europaea* (Zeytin) Yaprağı Fenolik Bileşeni Oleuropein'in Temozolomid ile Birlikte Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin Glioblastoma Hücrelerinde Araştırılması' adlı çalışmanın, 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.


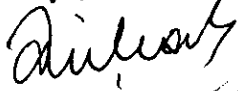



Adı Soyadı
Hilal DEMİRCİ


Tarih ve İmza
05.06.2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hilal DEMİRCİ tarafından hazırlanan *Olea europaea* (Zeytin) Yaprağı Fenolik Bileşeni Oleuropein'in Temozolomid ile Birlikte Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin Glioblastoma Hücrelerinde Araştırılması konulu Yüksek Lisans tezi 12/06/2017 günü, 13:00-14:00 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	Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN	

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


Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

05/06/2017

Adı Soyadı: Hilal DEMİRCİ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: *Olea europaea* (Zeytin) Yaprağı Fenolik Bileşeni Oleuropein'in Temozolomid ile Birlikte Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin Glioblastoma Hücrelerinde 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 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

Dış Kapak
İç Kapak

ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Glioblastoma (GB)	4
2.2. Glioblastoma Epidemiyolojisi	5
2.3. GB oluşumunda etkili olan genetik ve epigenetik faktörler.....	6
2.3.1. Genetik faktörler	6
2.3.1.1. EGFR/ PTEN/ AKT/ mTOR Yolağı	7
2.3.1.2. TP53/MDM2/CDNK2A-P14 ^{ARF} Yolağı	9
2.3.1.3. RB/CDKN2A-p16 ^{ink4a} Yolağı.....	10
2.3.1.4. Heterozigotluk Kaybı (LOH)	12
2.3.1.5. <i>IDH</i> Mutasyonu	12
2.3.1.2. Epigenetik Değişimler	13
2.3.1.2.1. DNA Metilasyonu	14
2.3.1.2.1.1. <i>MGMT</i> Metilasyonu	14
2.3.1.2.2. Histon Modifikasyonları.....	16
2.3.1.2.3. mikroRNA (miRNA) Ekspresyon değişimleri	17
2.4. Kanser Kök Hücre	18
2.5. Glioblastomada Ölüm Yolakları.....	21
2.5.1. Apoptoz	21
2.5.1.1. Apoptozun Düzenlenmesi	22
2.5.1.1.1.Kaspazlar	22

2.5.1.1.2. <i>Bcl-2</i> Gen Ailesi	23
2.5.1.1.3. Apoptotik Protein İnhibitörü	23
2.5.1.1.4. <i>TP53</i> Tümör Baskılayıcı Gen	24
2.5.1.2. Apoptozun Düzenlenmesi	24
2.5.1.2.1. Dış Yolak	24
2.5.1.2.2. İç Yolak	25
2.5.2. Nekroz	27
2.6. GB Tedavisi	29
2.6.1. Temozolomid (TMZ)	29
2.6.2. TMZ'nin kombin tedavi olarak etkisi	31
2.7. GB Tedavisinde Kullanılan Bitkisel Özütler	31
2.7.1 <i>Olea europaea</i> Yaprak Özütü	32
2.7.2. OLEUROPEİN	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereçler	35
3.1.1. Kullanılan demirbaş malzemeler	35
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Hücre kültürü	37
3.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini ve Hücrelerin Özellikleri	37
3.2.1.2. Besiyerlerinin Hazırlanması ve Hücrelerin Üretilmesi	37
3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	38
3.2.1.4. Hücrelerin Stoklanması	38
3.2.1.5. Hücre Sayımı	38
3.2.2. Ana Stokların Hazırlanması ve Konsantrasyonların Belirlenmesi	39
3.2.2.1 TMZ Stoğunun Hazırlanması	39
3.2.2.2. OL Stoğunun Hazırlanması	40
3.2.2.3. OLE' nin ve Stoğunun Hazırlanması	40
3.2.2.4. TMZ, OL ve OLE' nin Kombin Etkisi	41
3.2.3. WST-1 analizi	42
3.2.4. Apoptoz Analizi	42
3.2.5. Akridin-oranj/ Etidyum Bromür (AO/EB) Boyaması	43
3.2.6. Gen Ekspresyon Analizi	44

3.2.6.1. RNA İzolasyonu.....	44
3.2.6.2. cDNA Sentezi	45
3.2.6.3. Apoptoz ve Nekroz Mekanizmaları ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Analizi	45
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	47
4. BULGULAR	48
4.1. Hücrelerde Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	48
4.1.1. TMZ' in Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	48
4.1.1.1. TMZ' in U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	48
4.1.1.2. TMZ' in U138MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	49
4.1.1.3. TMZ' in T98G Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	49
4.1.1.4. TMZ' in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	50
4.1.2. OL' in Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	51
4.1.2.1. OL' in U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	51
4.1.2.2. OL' in U138MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	52
4.1.2.3. OL' in T98G Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi ..	53
4.1.2.4. OL' in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	54
4.1.3. OLE' nin Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi ...	55
4.1.3.1. OLE' nin U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	55
4.1.3.2. OLE' nin U138MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	56
4.1.3.3. OLE' nin T98G Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	57
4.1.3.4. OLE' nin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	58
4.1.4. TMZ, OL ve OLE' nin Hücre Hatları Üzerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	59
4.1.4.1. TMZ, OL ve OLE' nin U87MG Hücrelerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	59

4.1.4.2. TMZ, OL ve OLE' nin U138MG Hücrelerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	60
4.1.4.3. TMZ, OL ve OLE' nin T98G Hücrelerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	61
4.1.4.3. TMZ, OL ve OLE' nin HUVEC Hücrelerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	61
4.2. Hücrelerde Apoptotik Etkinin Belirlenmesi	62
4.2.1. TMZ' in Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	62
4.2.1.1. TMZ' in U87MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	62
4.2.1.2. TMZ' in U138MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	64
4.2.1.3. TMZ' in T98G Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	65
4.2.1.4. TMZ' in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	66
4.2.2.2. OL' in U138MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	69
4.2.2.3. OL' in T98G Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi ..	70
4.2.2.4. OL' in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	71
4.2.3. OLE' nin Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi ...	72
4.2.3.1. OLE' nin U87MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	72
4.2.3.2. OLE' nin U138MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	74
4.2.3.3. OLE' nin T98G Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	75
4.2.3.4. OLE' nin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	76
4.2.4. TMZ, OL ve OLE' nin Hücre Hatları Üzerindeki Kombin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	77
4.2.4.1. TMZ, OL ve OLE' nin U87MG Üzerindeki Kombin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	77
4.2.4.2. TMZ, OL ve OLE' nin U138MG Üzerindeki Kombin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	78

4.2.4.3. TMZ, OL ve OLE' nin U138MG Üzerindeki Kombin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	79
4.2.4.4. TMZ, OL ve OLE' nin Kombin Olarak U138MG Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	80
4.3. Hücrelerde Meydana Gelen Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi.....	81
4.3.1. TMZ' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerindeki Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi	81
4.3.2. OL' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerindeki Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi	85
4.3.3. OLE' nin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerindeki Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi	88
4.3.4. TMZ, OL ve OLE' nin Kombin Olarak U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerindeki Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi	91
4.4. Apoptoz ve Nekroz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerin mRNA Düzeyinde Değişikliklerin Belirlenmesi	93
4.4.1. TMZ' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi	93
4.4.3. OLE' nin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi	107
4.4.4. TMZ (1000 µM)+OL (500 µM) ve TMZ (500 µM)+OLE (500µg/ml) Kombin Tedavinin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi	113
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	120
6. KAYNAKLAR	130
SİMGELER VE KISALTMALAR	140
TEŞEKKÜR	141
ÖZGEÇMİŞ.....	142

TÜRKÇE ÖZET

Primer beyin tümörleri içerisinde en agresif fenotipe sahip Glioblastoma (GB) tedavisinde Temozolomid (TMZ) yaygın olarak kullanılmakta olup, TMZ' ye direnç gösteren mekanizmalar ve hastalığın agresif seyri tedavi etkinliğini kısıtlamaktadır. Günümüzde bitki özütlerinin ve etken maddelerinin farklı kemoterapötik ilaçlarla birlikte kombin tedavi stratejilerine odaklanılmaktadır. Mevcut tez çalışmasında, sitotoksik etkisi bilinen *Olea europea* yaprak özütünün (OLE) bu etkisinin ortaya çıkmasında, içeriğinde yer alan en önemli fenolik bileşen olan oleuropein (OL) rolünün araştırılması ve OL ve OLE' nin tek başlarına ve TMZ ile birlikte GB hücrelerinde (U87MG, U138MG ve T98G) apoptoz ve nekroz ile ilişkili yollarda görevli genlerin ekspresyon seviyelerini etkileme biçimlerini araştırarak OLE' nin GB hücrelerinde neden olduğu ölümün moleküler mekanizmasının açıklanması amaçlanmıştır. TMZ+OL' in kombin olarak uygulanan hücrelerde canlılık oranları, tek başına TMZ uygulanan hücrelere göre daha fazla olmasına rağmen, TMZ+OLE uygulanan hücrelerde, TMZ' in etkinliği artarak TMZ'nin daha düşük dozda etkin olduğu belirlenmiştir. Annexin V analizi ve AO/EB boyaması sonucunda, TMZ+ OL' de daha çok oranda apoptotik ve az oranda nekrotik, TMZ+OLE' de daha az oranda apoptotik ve daha çok oranda nekrotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir. TMZ+OL ve TMZ+OLE uygulanan hücrelerde apoptoz, nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde değişimler değerlendirildiğinde, TMZ+OL uygulanan hücrelerde apoptotik genlerin (CASP9, BID) ekspresyon seviyesinde anlamlı kat değişimleri belirlenmesi ile birlikte TMZ+OLE uygulanan hücrelerde apoptoz (BCL2L11, BID) ve ayrıca nekroz genlerinin (FADD, RIPK1) ekspresyon seviyesinde anlamlı kat değişimleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında TMZ'nin OL ve OLE ile birlikte sitotoksik ve apoptotik etkisi değerlendirildiğinde, TMZ+OL' in antagonist ve TMZ+OLE'nin sinerjik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Temozolomid, glioblastoma, *Olea europaea*, Oleuropein, apoptoz, nekroz

İNGİLİZCE ÖZET

“INVESTIGATION OF THE EFFECT OF OLEUROPEIN, A PHENOLIC COMPONENT OF *Olea europaea* (OLIVE) LEAF IN COMBINATION WITH TEMOZOLOMIDE ON CELL DEATH IN GLIOBLASTOMA CELLS”

Temozolomide (TMZ) is widely used in the treatment of glioblastoma (GB) with the most aggressive phenotypes of primary brain tumors and the mechanism of resistance to TMZ and the aggressive course of the disease limit the effectiveness of treatment. Today, combination treatment strategies of different chemotherapeutic drugs with plant extracts and active ingredients, have been drawn attention. In the present thesis, we aimed to investigate the role of oleuropein (OL), the most important phenolic component in *Olea europaea* leaf extract (OLE), which is known cytotoxic effect and explain the effects of OL or OLE alone with TMZ on molecular mechanism of death pathway by determining the expression levels of genes that potentially play a role in apoptosis and necrosis-related pathway on GB cells (U87MG, U138MG, and T98G). Although the survival rates of cells treated with a combination of TMZ + OL were higher than TMZ alone cells, TMZ+OLE combination by increasing efficacy of TMZ was more effective than just TMZ alone on these cells. As a result of Annexin V analysis and AO / EB staining, TMZ + OL triggered more apoptosis and less necrosis, whereas TMZ+OLE induced less apoptosis and more commonly necrosis were determined. When gene expression changes associated with apoptosis and necrosis were evaluated, a significant fold changes in the expression level of apoptotic genes (*CASP9*, *BID*) in cells treated with TMZ + OL as well as a significant fold changes in the expression level of necrosis genes (*FADD*, *RIPK1*) and apoptosis genes (*BCL2L11*, *BID*) in cells treated with TMZ + OLE were detected. In conclusion, when the cytotoxic and apoptotic effects of TMZ with OL and OLE were evaluated, the antagonistic effect of TMZ + OL and the synergistic effect of TMZ + OLE were determined in the present thesis.

Keywords: Temozolomide, glioblastoma, *Olea europaea*, Oleuropein, apoptosis, necrosis

1. GİRİŞ

Glial tümörler arasında malignant gelişime sahip olan ve beyin tümörlerinin yaklaşık % 12-15' ini oluşturan Glioblastoma (GB), kötü prognoza sahip, merkezi sinir sisteminin en agresif primer beyin tümörüdür (Kanu ve ark., 2009). Astrositik tümörlerin ve gliomların % 50-60' ını, primer beyin tümörünün ise yaklaşık % 50' sini temsil eden GB, Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflandırmasına göre, IV. evre (WHO grade IV) olarak kabul edilmekte olup, histopatolojik olarak hipersellülerite, nekroz, pleomorfik ve vasküler proliferasyon özellikleri göstermektedir (Gudinavičienė ve ark., 2004; Vigneswaran ve ark., 2015). GB tedavisi seçenekleri arasında cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi bulunmasına rağmen, hızlı büyüme özelliği, yüksek metastaz yeteneği, ileri evrede tanı, uygulanan GB tedavilerini başarısız kılmaktadır. Bu nedenle mevcut tedavilere rağmen hastalarda genel sağkalım 2 yılla sınırlıdır.

Günümüzde GB hastalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan temozolomid (TMZ), küçük molekül ağırlıklı (194 Da), oral kullanımda etkin, kan-beyin bariyerini aşabilen ve düşük toksisite profili sergileyen alkilleyici bir ajandır (Friedman ve ark., 2000; Fukushima ve ark., 2009 ; Thomas ve ark., 2012) Ancak GB tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanların sahip olduğu dezavantajlar (toksik etki, ciddi yan etkiler, hücre özgüllüklerinin olmaması vb.) ve *MGMT* promotör bölgesi unmetile olan hastaların TMZ tedavisine beklenildiği şekilde yanıt vermemesi günümüzde kanser tedavisinde alternatif bir tedavi stratejisinin ortaya konulması ihtiyacını gündeme getirmiştir (Jakubowicz-Gil ve ark., 2013; Jiang ve ark.,2014; Silber ve ark., 2012).

Günümüzde bitkiler ve bitkilerden elde edilen bileşikler birçok hastalığın tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olup, bitkilerin antioksidan, anti-inflamatuar ve genetik yolların modülasyonu gibi çeşitli yollarla hastalıkların yönetiminde rol oynadığı bilinmektedir. Kanser tedavilerinde bitkisel özütler ve bitkisel bileşiklerde yapılan çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma mevcut olmakla birlikte, literatürde birçok kemoterapik ajanın bitkisel kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Örneğin, curcumin

(*Curcuma longa*), paklitaksel (*Pacific yew*), kampoateksin (*Camptotheca acuminata*) ve vinkristinin (*Catharanthus roseus*) çeşitli kanser türlerinde etkinliği belirlenen kemoterapik ajanlardır (McLendon ve ark., 2008).

Oleaceae ailesinden olan zeytin ağacının (*Olea europaea*) ve yapraklarının polifenol içeriği nedeni ile antioksidant, anti-inflamatuar, anti-kanser, antimikrobiyal, antiviral, antianjiyogenik, hipoglisemik, hepatik kardiyak ve nörokoruyucu etkiye sahip olduğu literatürde bilinmektedir. (Barbaro ve ark., 2014; Boss ve ark., 2016).

Yapılan çalışmalar sonucunda *Olea europaea* yaprak özütünün (OLE) farklı kanser hücre tipleri (melanoma, lösemi, kolorektal, meme kanseri ve glioblastoma) üzerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğu olup, herhangi bir kemoterapik ajanla kombin tedavi de potansiyel etkisinin belirlendiği kısıtlı çalışma mevcuttur. Tezcan ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada 1 ve 2 mg/ml OLE konsantrasyonları kullanılarak 24 saat sonunda doza bağlı olarak T98G, U138 MG ve U87 MG hücre miktarlarında azalış belirlenmiştir. Ayrıca yapılan Annexin V/FITC ve TUNEL analizleri ile OLE'nin apoptotik ve nekrotik süreçte etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak bu mekanizmaların aydınlatılması için ileri analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Ayrıca OLE içerisinde yüksek miktarda etkin olarak bulunan fenolik bileşik (Oleuropein) OL antikanserojen madde olup, Yao ve ark. (2014) OL ile yaptıkları çalışmada, OL' nin HeLa hücrelerini G2/M fazında tutukladığı ve apoptoz ile ilişkili p53, Bax ve sitokrom c'nin ekspresyon seviyelerindeki artışa neden olduğu belirlenmiştir. Notarnicola ve ark., (2011) OL'nin kolon kanserinin gelişiminde etkim rol oynayan yağ asidi sentezi üzerindeki etkisini belirlemeyi hedeflemiş ve SW620 hücreleri ile yaptıkları çalışmada OL'nin FAS ekspresyonunu azalttığı bulguları elde edilmiştir. Ancak OL' in GB' deki etkileri tam olarak bilinmemekte olup, literatür bilgisi kısıtlıdır.

Mevcut tez çalışmasında, TMZ' in GB hücrelerinde terapötik etkisini arttırmak amacı ile potansiyel anti-kanserojen özelliklerinden dolayı OLE ve OL'un ayrı ayrı ve TMZ ile kombin olarak terapötik etkilerinin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC kontrol hücre hatlarında belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, OL 'un OLE' nin etkilerinin ortaya çıkmasında temel molekül olup olmadığının ve OLE ve

OL'un hücre ölüm yollarındaki moleküler mekanizması üzerinde olan etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında ilk kez GB hücre hatlarında OLE ve OL'un ayrı ayrı ve TMZ ile kombin olarak sitotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* olarak değerlendirilerek GB tedavisinde kullanılan TMZ' in etkinliğini arttırabilme potansiyellerinin belirlenerek, GB' de etkin tedavi sağlayabilecek ilaç araştırmaları için ileri araştırmalara ışık tutacağı düşünölmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glioblastoma (GB)

Glial tümörler arasında diffuz astrositomlar primer beyin tümörlerinin en yaygın tipi olarak bilinmekte olup, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından anaplastik derecelerine göre sınıflara ayrılmıştır (Miller ve Perry 2007; Vigneswaran ve ark., 2015) (Tablo1). Bu gruplar arasında malignant gelişime sahip olan ve beyin tümörlerinin yaklaşık % 12-15'ini oluşturan Glioblastoma (GB); kötü prognoza, genetik ve fenotipik olarak heterojen yapıya sahip, merkezi sinir sisteminin en yaygın ve agresif primer beyin tümörüdür (Kanu ve ark., 2009). Astrositik tümörlerin ve gliomların % 50-60 'ını, primer beyin tümörünün ise yaklaşık % 50'sini temsil eden GB, Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflandırmasına göre, IV. evre (WHO grade IV) olarak kabul edilmekte olup, histopatolojik olarak hipersellülerite, nekroz, pleomorfik ve vasküler proliferasyon özelliklerine sahiptir (Gudinavičienė ve ark., 2004; Vigneswaran ve ark., 2015).

Tablo 1. Diffuz gliomaların WHO 2007 sınıflandırması (Vigneswaran K ve ark., 2015)

Tip	Derece	Tanım	Ort. Yaşam (yıl)
Astrositoma	II	Çevre nöral dokuya infiltratör, anormal hücre sayısında artış görülür, mitoz görülmez	6-8
Oligodendroglioma	II	Beyin yarım kürede korteks ve beyaz maddede oluşur, düşük mitotik aktivite görülür, nekroz görülmez	12
Oligoastrocitoma	II	Astrositik ve oligodendrositik özellikler görülür	3-10
Anaplastik-astrocitoma/ oligodendroglioma	III	Yüksek infiltratör özelliğine sahip tümör hücreleri, artmış mitotik aktivite, nekroz veya vasküler proliferasyon görülmez	3
Glioblastoma	IV	Nekrosis ve mikro-vasküler proliferasyon görülür, yüksek oranda mitoz görülür	1-2

WHO, Dünya Sağlık Örgütü

GB hücreleri sınırları belirsiz, nükleus sitoplazma oranı yüksek, oval veya uzamış şekilli olup sentral veya peri-sentralde çok sayıda genişlemiş hiperkromatik nükleus ile karakterizedir. İnfiltratif büyüme özelliği gösteren bu hücreler, normal dokudan ayırt edilemeyebilir ve hemisferde, beyin sapının subtentorial bölgesinde veya beyincikte yerleşebilirler (Zülgh ve ark., 1969).

GB için uygulanan standart tedavi tümörün cerrahi rezeksiyonu, radyasyon terapisi ve adjuvant kemoterapidir. Ancak diğer diffuz gliomalar ile karşılaştırıldığında, GB'in farklı bölgelerde ek tümör odakları oluşturabilme, hızlı infiltratif büyüme ve metastaz yapma potansiyeli ve tamamen mikroskobik rezeksiyonu başaramadığından dolayı neoplastik hücrelerin kalıntıları hastalığın yeniden nüksetmesine neden olmaktadır (Gudinavičienė ve ark., 2004; Kanu ve ark., 2009) Bu sebepler ile, uygulanan farklı tedavi seçeneklerine rağmen, GB hastalarının ortalama sağkalım süresi yaklaşık 2 yıl ile sınırlı kalmaktadır (Urbańska ve ark., 2014).

2.2. Glioblastoma Epidemiyolojisi

Dünyada her 100.000 erkek veya kadından yaklaşık 6,4' üne beyin tümörü teşhisi konmakta olup Ulusal Kanser Enstitüsüne göre 2017'de bu oran 23.8 olarak beirlenmiştir (Jovčevska ve ark., 2013) (Tablo 2). Bu oran Türkiye'de ise 4.7/100.000'dir (Eser ve ark., 2010; Vigneswaran ve ark., 2015).

Tablo 2. Ulusal Kanser Enstitüsü'ne göre 2017'deki beyin tümörü teşhis edilen yeni vaka sayısı

Kanser Tipi	2017 Yeni Vaka Tahmini	2017 Ölüm Oranı
Meme Kanseri	252,71	40,61
Akciğer Kanseri	222,5	155,87
Prostat kanseri	161,36	26,73
Kolon ve Rektum Kanseri	135,43	50,26
Cilt Kanseri	87,11	9,73
Mesane Kanseri	79,03	16,87
Böbrek Kanseri	63,99	14,4
Beyin Tümörü	23,8	16,7

2.3. GB oluşumunda etkili olan genetik ve epigenetik faktörler

GB, öncü lezyonun oluşup oluşmamasına göre primer ve sekonder olarak iki morfolojik alt tipe ayrılmaktadır. Primer GB öncü lezyona gerek olmadan *de novo* oluşan ve sıklıkla yetişkin insanlarda görülen en yaygın GB tipidir (Miller ve ark.,2007) Sekonder GB ise, astrositom ve anaplastik astrositomun daha malign anaplazi derecesine dönüşümü ile oluşan, öncü lezyona ve histopatolojik olarak teyit edilmesi gereken primer GB'e göre daha genç bireylerde gözlenen GB tipidir (Atli., 2014; Vigneswaran ve ark., 2015) Primer ve sekonder glioblastom histolojik olarak benzer yapıya sahip olmalarına rağmen, genetik değişimleri ve sinyal yolları farklılıklar gösterebilmektedir (Crespo ve ark., 2015; Kleihues ve Ohgaki, 1999).

2.3.1. Genetik faktörler

GB oluşumunda EGFR/PTEN/Akt/mTOR, TP53/MDM2/p14ARF, p16INK4a/RB1 sinyal yolları, IDH1 mutasyonları ve heterozigote kaybı (LOH 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q ve 19q kromozom bölgelerinde görülen) gibi genetik faktörler rol oynamaktadır (Ohgaki ve Kleihues, 2007).

Primer GB'de sıklıkla *EGFR* amplifikasyonu, *p14^{ARF}* nin homozigot delesyonu, *RB1* mutasyon/ homozigot delesyonu, monozomi 10 ve *IDH1* mutasyonu görülmektedir. Primer GB'de özellikle *EGFR* amplifikasyonu sıklıkla belirlenmesine rağmen, diğer etkili genetik bir faktör *TP53* mutasyonudur ve % 30'dan daha az bir oranda belirlenmektedir. Sekonder GB'de ise, primer GB'in aksine, % 65 oranında *TP53* ve *IDH1* mutasyonu tespit edilmektedir. Ayrıca, 19q ve 13q'daki allelik kayıplar, *RB1* geninin promotör hipermetilasyonu sekonder GB'in oluşumunda rol oynayan önemli faktörlerdir. *EGFR* amplifikasyonu, *PTEN* mutasyonu, *p14^{ARF}* delesyonları ise sekonder GB' de daha az oranda görülmektedir (Tablo 3) (Crespo ve ark., 2015; Durmaz ve Vural, 2007; Ohgaki ve Kleihues, 2007).

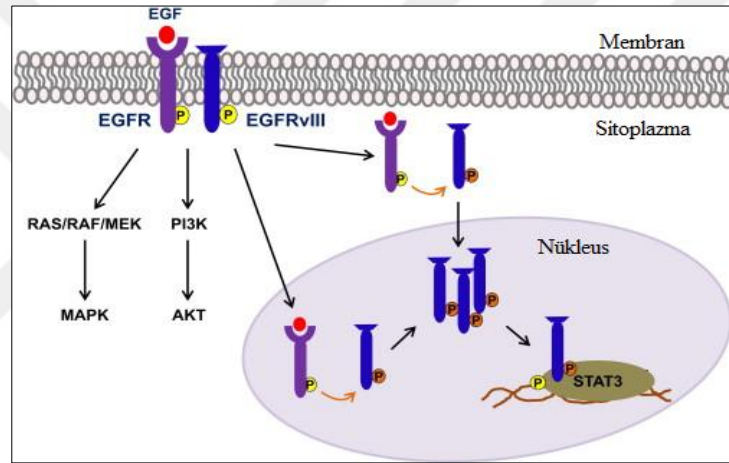
Tablo 3. Primer ve sekonder GB’ de meydana gelen genetik değişimler (Ohgaki ve Kleihues, 2007)

	Primer GB	Sekonder GB
Genetik Değişimler		
<i>TP53</i> mutasyonları	28%	65%
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	36%	8%
<i>PTEN</i> mutasyonu	25%	4%
<i>p16^{INK4a}</i> delesyonu	31%	19%
<i>IDH1</i> mutasyonu	5%	85%
LOH 1p	12%	15%
LOH 10p	47%	8%
LOH 13q	12%	38%
LOH 19q	6%	54%
LOH 22q	41%	82%
Promotör Metilasyonu		
<i>p14^{ARF}</i>	6%	31%
<i>p16^{INK4a}</i>	3%	19%
<i>RBI</i>	14%	43%
<i>MGMT</i>	36%	75%
Ekspresyon Profilleri		
<i>EGFR</i>	63%	10%
<i>TP53</i>	37%	97%

2.3.1.1. EGFR/ PTEN/ AKT/ mTOR Yolağı

Epidermal büyüme faktör (*EGF*) geni 4. kromozom 7q12’ de lokalize olup, epidermal büyüme faktör reseptör (*EGFR*) ve ligandı, merkezi sinir sistemi tipleri ve öncülerinin proliferasyon, migrasyon, farklılaşma sinyallerini düzenlemekte görev almaktadır (Hatanpaa ve ark. 2010; Zadeh ve ark., 2013). Primer GB’de *EGFR* amplifikasyonu, yaklaşık % 40 oranında, *EGFR* overekspresyonu ise % 60 oranında görülürken, sekonder GB’de bu oranlar oldukça düşüktür (% 10). Hücrenin kendini yenilemesine ve klon oluşturmaya neden olan *EGFR* amplifikasyonu ile oluşan tüm primer GB’lerde, yüksek *EGFR* ekspresyonu gözlemlenmesine rağmen, *EGFR* yüksek ekspresyonu ile meydana gelen primer glioblastomanın % 70-90’ında *EGFR* amplifikasyonu belirlenmiştir (Kanu ve ark., 2009; Kleihues ve Ohgaki, 2007; Liffers ve ark., 2015). *EGFR* 7 major mutasyona uğramış varyanta sahip olup, bu varyantların en yaygını GB’in proliferasyon ve migrasyon artışına neden olan EGFR tip III (EGFRvIII) tür (Crespo ve ark., 2015; Hatanpaa ve ark. 2010; Kanu ve ark., 2009)

EGFRvIII ile normal *EGFR*'nin sitoplazmik (sinyal) kısımları aynı olup, her ikisi de sinyal kinetiğini değiştirmede görev alırlar. Ligandın, normal *EGFR*'ye bağlanması sonucunda, reseptörde sırası ile internalizasyon, defosforilasyon, degradasyon olayları oluşarak reseptörün geri dönüşümü gerçekleşir. *EGFRvIII* ekspresyonunun sonucunda ise, oluşan genomik delesyon nedeniyle ekstraselüler bağlanma bölgesini kaybeden reseptör, *EGF*'ye bağlanamaz. Böylece *EGFRvIII*'nin aralıksız tirozin fosforilasyonu *STAT3* sinyalinde artışa yol açarak, hücre membranında mitojenik sinyal oluşumu gerçekleşir (Crespo ve ark., 2015).



Şekil 1. EGFR/PTEN/AKT/mTOR yoluğı (Zadeh ve ark. 2013)

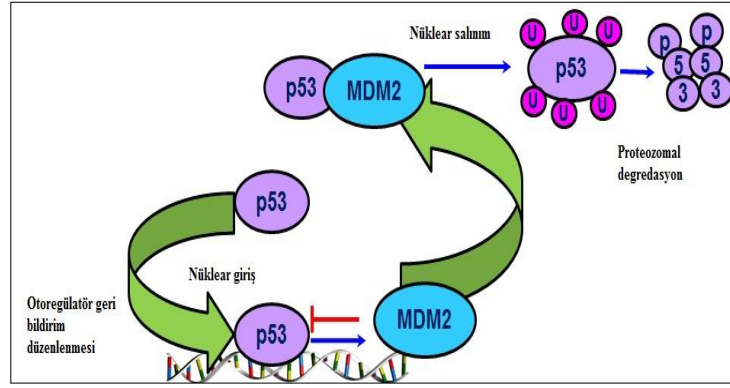
EGFR/PTEN/AKT/mTOR yoluğı, primer GB'in patogeneğinde etkin rol oynayan önemli bir sinyal mekanizmasıdır (Crespo ve ark., 2015; Hatanpaa ve ark., 2010). *EGFR*'nin ekstraselüler kısmına büyüme faktörlerinin bağlanması sonucu, *EGFR* aktive olur ve aktivasyon sonucunda *PI3K* hücre membranına alınarak bir dizi sinyal kaskadı başlar. Bu sinyal kaskadında *PI3K*'nın, fosfatidilinositol-4,5-bifosfatı(PIP_2), fosfatidilinositol-3-4-5 trifosfata fosforillenmesi sonucunda *AKT* aktivasyonunu gerçekleştirir. Sonrasında, *AKT* mTOR1 ve mTOR2 kompleksinden oluşan, efektör molekül *mTOR*'un 3'ucunu aktive ederek, apoptoza dirençli hücrelerin meydana gelmesine neden olmaktadır (Şekil 1) (Crespo ve ark., 2015; Hatanpaa ve ark., 2010; Kanu ve ark., 2009; Zadeh ve ark., 2013).

Protein fosfataz ve 3-fosfoinositol fosfotaz aktivitesinde önemli rol alan ve 10q23.3'te lokalize olan *PTEN* (Fosfotaz ve tensin homoloğu) geni ürünü tirozin fosfatazın katalitik bölgesi ile homoloji gösteren amino terminal kısmı ile, lokal adhezyon kinazını doğrudan defosforile ederek PIP2'nin PIP3'e dönüşümüne engel olmaktadır. Böylece, *PTEN/PI3K* sinyali inhibe olarak hücre çoğalması engellenmektedir (Carrasco-Garcí ve ark.,2014; Koul ve ark., 2008)

2.3.1.2. TP53/MDM2/CDNK2A-P14^{ARF} Yolağı

p53 proteini, tümör baskılayıcı gen olarak bilinen kromozom 17p13.1'de lokalize *TP53* geni tarafından kodlanmaktadır ve hücre siklusunda, DNA hasarına hücre sel yanıtta, hücre ölümünde, anjiyogenezde ve farklılaşmada kritik rol oynadığı bilinmektedir (Crespo ve ark., 2015; Harris, 1996; Ichimura, 2000; Shi ve Gu, 2012). Hücre sel stres koşullarında aktive olan *TP53*, *p21^{WAF2/Cip1}* geni gibi potansiyel efektör genlerin promotörlerinin, transkripsiyonel olarak düzenlenmesinde rol oynayarak, hücre siklusunun G1'de tutulmasını sağlamaktadır. *p21*, 53' ün fonksiyonunda doğrudan etkili olarak p53'ün RB sinyal yolağı ile etkileşiminde de görev almaktadır (Crespo ve ark., 2015, Kanu ve ark, 2009; Kleihues ve Ohgaki, 2007).

p53-spesifik E3 ubiquitin ligaz olan *MDM2* (Murine/Human Double Minute 2) ve p53 arasında geri bildirim söz konusudur (Nag ve ark., 2013) (Şekil 2). Aktivasyon sonucu p53 *MDM2* genini transkribe ederken *MDM2* geni de doğrudan p53'ün N- terminal TAD bölgesine bağlanarak p53'ün aktivasyonunu inhibe eder. Tümör baskılayıcı gen olan *p14^{ARF}* ise, doğrudan *MDM2* ile etkileşime girerek onun E3 ligaz aktivitesini ortadan kaldırır ve bu şekilde p53 aktivitesinin korunmasını sağlar (Chen ve Tweddle, 2012; Manfredi, 2010; Moll ve Petrenko, 2003).



Şekil 2. p53- MDM2 geri besleme ilişkisi (Nag ve ark., 2013)

Glioblastomada, *TP53* mutasyonları yanlış anlamalı mutasyonlar olup, *TP53* geninin 5., 7. ve 8. ekzonlarında yer almaktadır. Ancak, *TP53* mutasyonları GB alt tipleri arasında farklılık göstermektedir. Sekonder GB’de *TP53* mutasyonların yaklaşık % 57’si sıcak sıcak bölge (hotspots) kodonları olan 248 ve 273. kodonlarda gerçekleşmekte olup, primer GB’de mutasyonlar eşit bir şekilde dağılmıştır ve yaklaşık % 17’si 248 ve 273. kodonlarda tespit edilmektedir. Ayrıca, CpG bölgesindeki 5-meC’ nin deaminasyonundan kaynaklanan ve özellikle 248 ve 273. kodonlarda gerçekleşen G:C→A:T transisyonu, sekonder GB’de, primer GB’e göre daha sık görülmektedir (Harris, 1996; Kanu ve ark., 2009; Kleihues ve Ohgaki, 2007).

TP53 mutasyonu veya amplifikasyonu, *MDM2*’ nin aşırı ekspresyonu veya *CDKN2A-p14^{ARF}* kaybı ile p53 sinyal yolağının inaktivasyonuna ve bu nedenle hücrelerde kontrolsüz çoğalmaya neden olmaktadır. *TP53/MDM2/CDKN2A-p14^{ARF}* primer GB’de % 50 olarak gözlemlenmesine rağmen, sekonder GB’de bu oran % 70’den daha fazla belirlenmiştir (Ichimura ve 2000; Kanu ve ark., 2009).

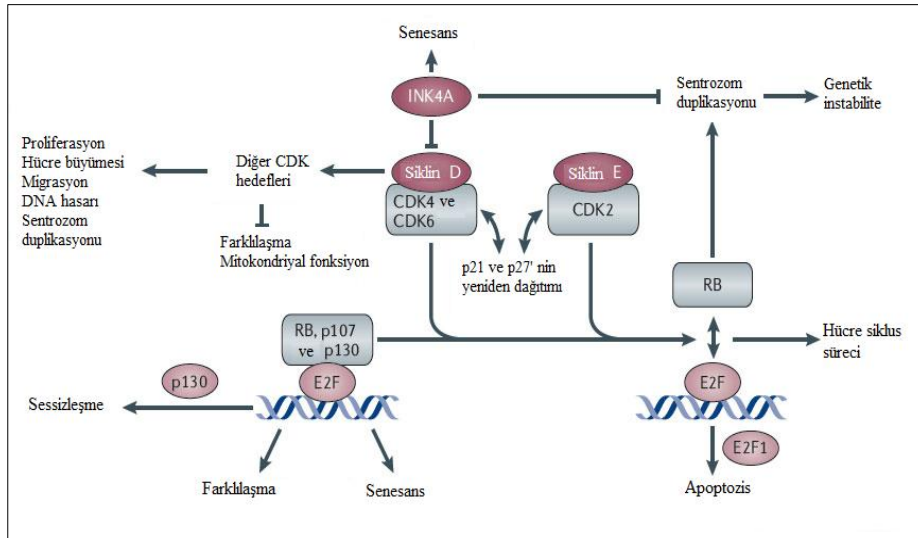
2.3.1.3. RB/CDKN2A-p16^{ink4a} Yolağı

RB1 geni (13q14) tarafından kodlanan RB fosfoproteini, normal koşullarda, hücre siklusu ve DNA replikasyonu gibi mekanizmalarda rol alan birçok genin promotör aktivitesini düzenlemektedir (Bastien ve ark., 2015; Crespo ve ark., 2015) RB proteini, *E2F* transkripsiyon faktörüne bağlanarak, hücre siklusunun G1/S kontrol noktasında durdurulmasında ve genlerin transkripsiyonunun inhibe

edilmesinde rol almaktadır. Prolifere olan hücrelerde büyüme faktörleri, siklin D1'in indüksiyonunu ile CDK4/Siklin D1 kompleksi oluşmasını ve RB proteininin fosforillenecek ve *E2F1*'in aktive olmasına neden olur. Böylelikle hücre siklusunda G1 fazından sırası ile S, G2 ve M fazına geçiş gerçekleşir (Bastien ve ark.,2015; Crespo ve ark., 2015; Gonçalves ve ark., 2013; Musgrove ve ark., 2011) (Şekil 3).

RB1'in aktivasyonunu engelleyen mutasyonlar sonucunda RB ekspresyonunda kayıp veya *CDK1*/Siklin kompleksinin fosforilasyonu ile *E2F1*'in kontrolünde düzensizlik meydana gelmektedir. *E2F1*'deki bu düzensizlik RB yolağının inaktivasyonuna yol açarak, GB oluşumunda rol oynayan birçok gen ve protein değişimine neden olmaktadır (Crespo ve ark., 2015; Gonçalves ve ark., 2013; Kanu ve ark., 2009 ; Serrano, 1997).

9p21'de lokalize olan *p16^{ink4a}*, CDK4/Siklin D kompleksini inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellemektedir. RB sinyal yolağının negatif regülatörleri olan Ink4 ailesi memelilerde 4 üyeye sahiptir (*CDKN2A-p16^{ink4a}*, *CDKN2B-p15^{ink4b}*, *CDKN2C-p18^{ink4c}*, *CDKN2D-p19^{ink4d}*). Benzer biyokimyasal özelliklere sahip bu 4 protein göstermektedirler ve siklin D ile yarışarak siklin/*CDK4/6* kompleksinin oluşumu engellemektedir (Agarwal ve ark., 2013; Serrano, 1997).



Şekil 3. RB sinyal yolağı (Musgrove ve ark., 2011)

RBI geninin promotör metilasyonu sekonder GB' de (% 43), primer GB' den (% 14) daha fazla oranda belirlenmiştir (Bastien ve ark.,2015; Kleihues ve Ohgaki, 2007).

2.3.1.4. Heterozigotluk Kaybı (LOH)

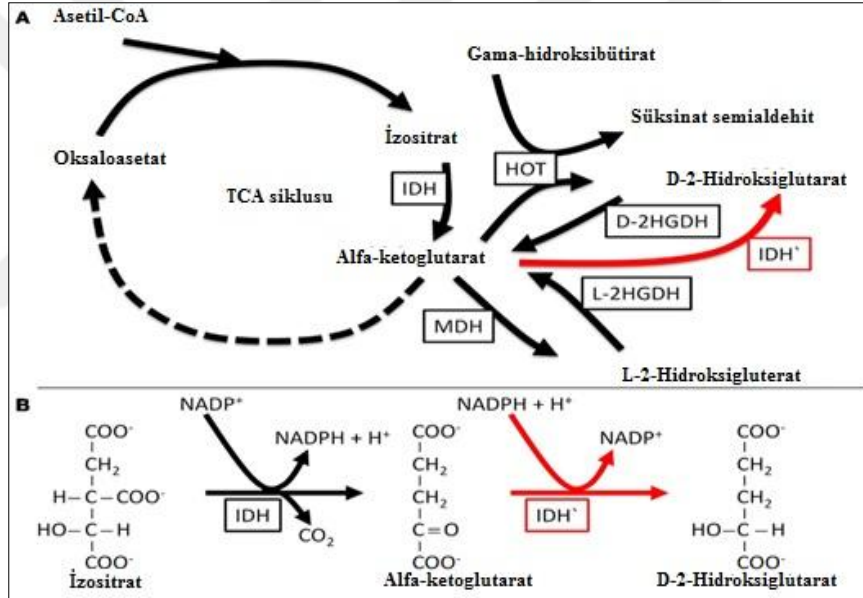
GB'de genetik kayıplar genoma yayılmış durumda olup, kayıpların özellikle 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q ve Y üzerindeki bölgelerde olduğu bilinmektedir (Gresner ve ark.,2007; Kanu ve ark., 2009) GB'de % 30-60 oranında 10. kromozomda heterozigotluk kaybı (LOH) en sık belirlenen genetik değişimdir ve tümör baskılayıcı genleri içeren bu kromozomda oluşabilen en az üç belirgin delesyon bölgesi mevcuttur (10p14-p15, 10q23-24, 10q25-pter). Primer GB' de, çoğunlukla tüm kromozom kayıpları görülürken, sekonder GB' de 10q kısmi kaybı görülmektedir. Tüm GB'de 1p kaybı yaklaşık %31 oranında görülürken, 7q kaybı % 9-12 oranında belirlenmiştir ve 1p/19q kodelesyonu GB'de prognostik öneme sahiptir (Gresner ve ark., 2007 ; Crespo ve ark., 2015; Kleihues ve Ohgaki, 2007)

2q12.3-13.2 ve 22q13.31 küçük delesyonları ile tanımlanmış ve 22q LOH sekonder GB'de (% 82), primer GB'e (% 41) göre daha fazla oranda belirlenmiştir. 22q12.3' teki bölgede oluşan küçük delesyon bölgesi (957kb) insan doku inhibitör metalloproteinaz -3 (*TIMP-3*) genini içermektedir. *TIMP-3* promotör metilasyonu sekonder GB'de sıklıkla görülmektedir. 19q LOH sekonder GB'de (% 54) primer GB'den (% 6) daha sık görülmesine rağmen, 1p ve RB lokusunu içeren 13q LOH sekonder ve primer GB'de benzer oranlarda belirlenmiştir (Crespo ve ark., 2015; Kleihues ve Ohgaki, 2007).

2.3.1.5. IDH Mutasyonu

İzositrat dehidrogenaz (*IDH*) geni tarafından NADP+ bağımlı olarak izositratın α -Ketogutarata dönüşümünde görev alan enzim kodlanmaktadır. İnsanda 3 adet IDH katalitik izoenzimi mevcuttur. IDH1 ve 2 homodimer şeklinde, IDH3 ise 2 α , β ve γ alt birimlerinden oluşan heterotetramer yapıya sahiptirler. IDH1 sitoplazma ve peroksizomda IDH2 ise mitokondride lokalize olarak her ikisi de oksidatif

dekarboksilasyonda görev almaktadırlar (Cohen ve ark., 2013; Dimitrov ve ark., 2015; Dunn ve ark., 2012; Rakheja ve ark., 2013) (Şekil 4). *IDH1/2* mutasyonları sonucunda onkometabolit fonksiyon kazanımı görülmektedir. *IDH1*'de genelde 132. kodonda R132H (CGT→CAT) mutasyonu, astrositik ve oligodendro gliomların % 91'inde saptanmıştır. Diğer mutasyonlar (R132C (CGT→TGT, % 3,6-4,6), R132G (% 0,6-3,8), R132S (% 0,8-2,5) ve R132I (% 0,5-4,4) ise çok daha nadir olarak görülmektedir. *IDH2* mutasyonları içerisinde R172K en sık görülen değişimdir (36-38). *IDH1* mutasyonları primer ve sekonder GB'nin diagnostik ayrımında genetik biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Cohen ve ark., 2013; Rakheja ve ark., 2013; Yang ve ark., 2012).



Şekil 4. IDH ile katalize edilen normal ve neomorfik reaksiyonlar (Rakheja ve ark., 2013)

2.3.1.2. Epigenetik Değişimler

DNA dizisini etkilemeden, gen ekspresyonundaki mitotik kalıcı değişimler epigenetik olarak tanımlamakta ve bu değişimler hücre proliferasyonu, adhezyon, migrasyon ve farklılaşma gibi önemli sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde rol almaktadır. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda GB alt tiplerinin oluşumunda genetik değişimlerin yanı sıra, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve miRNA ekspresyon profillerinde meydana gelen değişimleri gibi epigenetik

süreçlerin etkili olduğu belirtilmiştir (Maleszewska ve Kaminska. 2013; Sciuscio ve Hegi. 2013; Safa ve ark.,2015).

2.3.1.2.1. DNA Metilasyonu

Metilasyon rastgele olmayan, genlerin 5' ucundaki, CpG adalarınca zengin, guaninden önceki sitozinlerde meydana gelen epigenetik düzenlemedir (Allen ve ark., 2015; Rasime, 2015; Earl, 2007) Hücre siklusu, DNA tamiri, hücre-hücre etkileşimi, apoptozis ve anjiyogenez gibi hücreyel süreçlerde etkili olan genlerde promotör bölgelerinin hipermetilasyonu sonucunda sessizleşmeye neden olmaktadır. Metilasyon, 5-adenozilmetionilden DNA'yı metil grubunun transferinin katalizleyen enzim ailesi olan DNA metiltransferaz (DNMTs) aracılığı ile gerçekleşmekte olup, insanda üç temel DNMT mevcuttur: DNMT1, DNMT3a, DNMT3b (Alel'u-Paz ve ark., 2012; Kim, 2014; Maleszewska ve Kaminska, 2013)

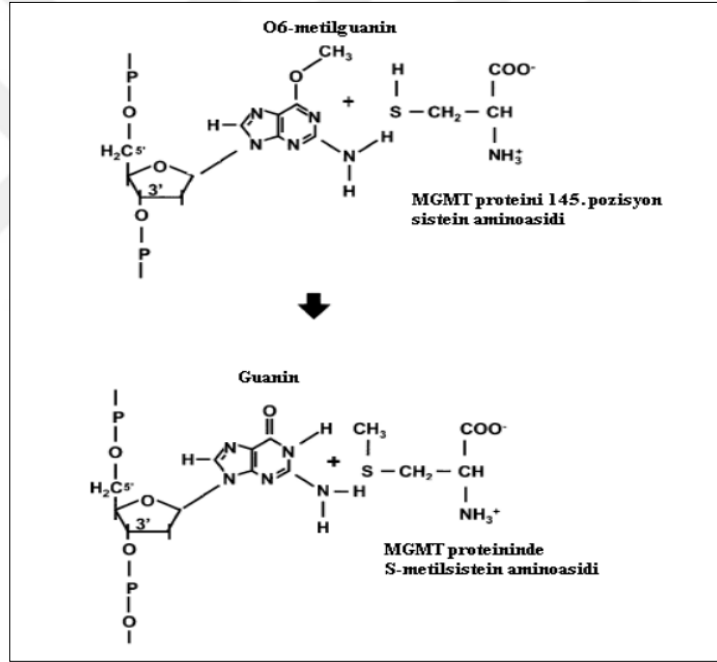
DNA metilasyonu iki şekilde gerçekleşir: hipometilasyon ve hipermetilasyon. GB gelişiminin erken evresinde hipometilasyon önemlidir ve özellikle primer GB'de DNA hipometilasyonu % 85 oranında görülmektedir (Alel'u-Paz ve ark., 2012; Martinez ve Schackert. 2007; Rasime, 2015; Sciuscio ve Hegi, 2013).

CpG adacıklarının promotör hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin (*RBI*, *EMP3*, *RASSF1A* ve *BLU*), hücre siklusu düzenleyici genlerin ($p16^{INK4a}$ ve $p15^{INK4b}$), DNA tamir genlerinin (*MGMT*, *MLH1*), apoptoz ile ilişkili genlerin (*DAPK*, *TIMP3* ve *CDH1*), anjiyogenez ve invazyon ile ilişkili genlerin aktivitesinde değişime neden olarak GB patogeneğinde ve tümörgeneğinde rol almaktadır. Gliomada en iyi bilinen epigenetik değişim O6-metilguanine-DNA metiltransferaz (*MGMT*) kodlayan tamir genindeki promotör hipermetilasyonudur (Martinez ve Schackert, 2007; Rasime, 2015; Sciuscio ve Hegi, 2013).

2.3.1.2.1.1. MGMT Metilasyonu

10q26'de kromozom bölgesinde lokalize olan *MGMT* geni alkilleyici ajanları, guaninin O6-pozisyonundan uzaklaştıran DNA onarım enzimidir. *MGMT* geni, mutasyon, delesyon, yeniden düzenleme ve diğer genetik değişikliklere duyarlı olup *MGMT* metilasyonu yüksek oranda promotör bölge metilasyonu ile

düzenlenmektedir. Promotör bölge metilasyonları *MGMT* ekspresyon seviyesinin azalmasına neden olmaktadır. *MGMT* metilasyon statüsü, alkilleyici ajanlara duyarlılığın belirlenmesinde en önemli biyobelirteçlerden biridir (Maleszewska ve Kaminska, 2013; Rasime, 2015) *MGMT* geni O6-alkilguanin-DNA alkiltransferaz, enzimini kodlayarak, inaktive edici alkil molekülünün uzaklaşmasını sağlar. *MGMT* promotör bölgesindeki CpG adalarının hipermetilasyonu daha düşük *MGMT* gen ekspresyonuna neden olurken, CpG hipometilasyonu yüksek *MGMT* gen ekspresyonuna yol açmaktadır. O6-MGMT, guaninin O6 konumundaki metil grubunu kendi üzerindeki sistein aminoasidine aktararak, alkilleyici ajanın etkisini ortadan kaldırır (Alel'u-Paz ve ark., 2012; Bayram, 2012; Kim, 2014; Safa ve ark.,2015; Sciuscio ve Hegi, 2013)



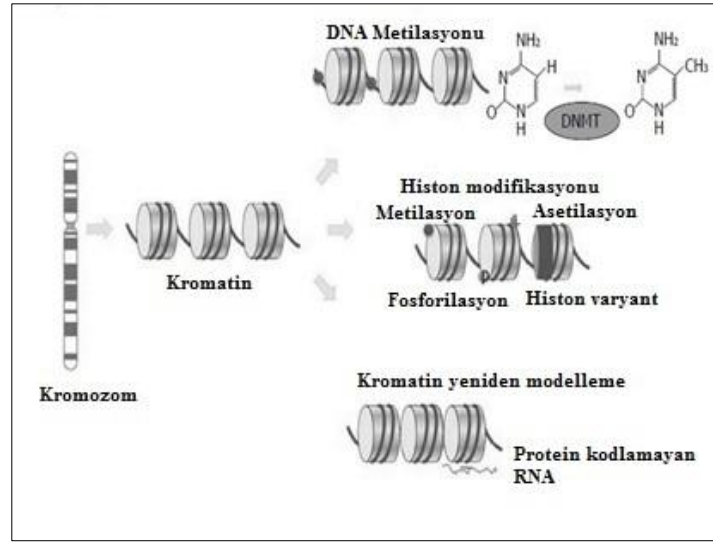
Şekil 5. Alkilasyon ajanların sitotoksik etkisi (Bayram, 2012)

MGMT promotör metilasyonu sekonder GB'de % 75 oranında gözlemlenmesine rağmen, primer GB'de % 36 oranında belirlenmiştir (Martinez ve Schackert, 2007)

2.3.1.2.2. Histon Modifikasyonları

Histon modifikasyonları asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, SUMOasyon, ADP-ribozilasyon olaylarını içermekte olup, farklı histon proteinlerinde, histon rezidülerinde ve histon varyantlarında oluşan diğer temel epigenetik değişimlerdir (Alel'u-Paz ve ark., 2012; Sciuscio ve Hegi, 2013). Histon modifikasyonları DNA onarımı, DNA replikasyonu, alternatif kesilme ve kromozom kondensasyonu gibi süreçlerde rol alan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunun baskılanmasında da görev almaktadır (Kim, 2014; Kondo ve ark., 2014)

Histon metilasyon seviyelerindeki değişimler *HDAC* (*HDAC2*, *HDAC9*), histon demetilaz (*JMJD1A*, *JMJD1B*), histon metiltransferaz (*SET7*, *SETD7*, *MLL3*, *MLL4*) gibi regülatör genlerde mutasyonlar sonucunda meydana gelmektedir. GB'de de HDAC proteinlerinin ekspresyon seviyeleri değişmektedir (Earl, 2007; Kim, 2014; Rasime, 2015; Sciuscio ve Hegi, 2013) (Tablo 4). Promotörlerin CpG adası sessizleşmesi, artan histon H3K9 metilasyonu ve azalan H3K9 asetilasyonu ile karakterize olup kanser gelişimine neden olmaktadır. Histon H3K27 metilasyonu ise, BMI-1'i kodlayan gendeki kopya sayısının değişmesine neden olarak gliomagenesis gelişmesinde rol aldığı belirtilmiştir (Choi ve Lee 2013; Kim, 2014; Kondo ve ark., 2014; Maleszewska ve Kaminska, 2013) (Şekil 6).



Şekil 6. Histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve kromatinin yeniden şekillenmesi (Choi ve Lee 2013)

Tablo 4 . Gliomalarda histon modifikasyonunun başlıca epigenetik değişimi (Kim. 2014)

Histon deasetilaz	Mutasyon
Histon demetilaz	HDAC2,HDAC9
Histon metiltransferaz	JMJD1A,JMJD1B
Ekspresyon düzeyindeki değişim	SET7,SETD7,MLL,MLL3,MLL4
Histon deasetilaz	HDAC1,HDAC2
Gen mutasyonları	
RPR22	Ekspresyon baskılanması
P21	Ekspresyon baskılanması
HOXA9	Ekspresyon artışı

2.3.1.2.3. mikroRNA (miRNA) Ekspresyon değişimleri

miRNA'lar 17-25 nükleotit uzunluğunda transkripsiyon edilmeyen ancak düzenleyici rolü olan küçük kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar onkogenlerin aktivitesini baskılayarak tümör baskılayıcı olarak rol almasına rağmen, tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılayarak onkogen olarak da görev alabildiği bilinmektedir (Burgess ve ark., 2008; Safa ve ark., 2015)

Son çalışmalarda miRNA'ların GB oluşumu süreci ile ilişkili olarak, apoptotik yolda, farklılaşmada, proliferasyonda, migrasyonda ve invazyonda, ilaç dirençliliğinde ve radyasyon direncinde etkin olduğu belirtilmiştir (Burgess ve ark., 2008; Katsushima ve Kondo, 2014;Safa ve ark.,2015).

GB oluşumu ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonunda meydana gelen değişimler (artış/azalış) Şekil 7'de özetlenmiştir (Safa ve ark.,2015).

<u>Tümör aktivitesi</u> (-) miRNA-124 (-) miRNA-34a (-) miRNA-326	<u>Farklılaşma</u> (-) miRNA-17-92 (-) miRNA-541 (-) miRNA-1275 (-) miRNA-137 (-) miRNA-138 (+) miRNA-34a (+) miRNA-124 (+) miRNA-202	<u>Apoptozis</u> (-) miRNA-17-92 (-) miRNA-34a (-) miRNA-451 (+) miRNA-137	<u>Hücre siklusunda ilerleme</u> (-) miRNA-34a (-) miRNA-125b (-) miRNA-451 (-) miRNA-128 (-) miRNA-146a
<u>İnvazyon/Migrasyon</u> (+) miRNA-125b (-) miRNA-124 (-) miRNA-34a (-) miRNA-326 (-) miRNA-204 (-) miRNA-128 (-) miRNA-218 (-) miRNA-302-362	<u>Kendini Yenileme</u> (+) miRNA-204 (-) miRNA-134 (-) miRNA-34a (-) miRNA-302-362	<u>Kök hücre olma özelliği</u> (+) miRNA-9/9 (+) miRNA-18 (-) miRNA-34a (-) miRNA-124 (-) miRNA-137 (-) miRNA-128 (-) miRNA-146a	<u>Çoğalma</u> (-) miRNA-125b (-) miRNA-451 (-) miRNA-128 (-) miRNA-146a (-) miRNA-17-92 (+) miRNA-34a (+) miRNA-137 (-) miRNA-146a

Şekil 7. Glioblastomalarda belirlenen miRNA'lar (Safa ve ark.,2015)

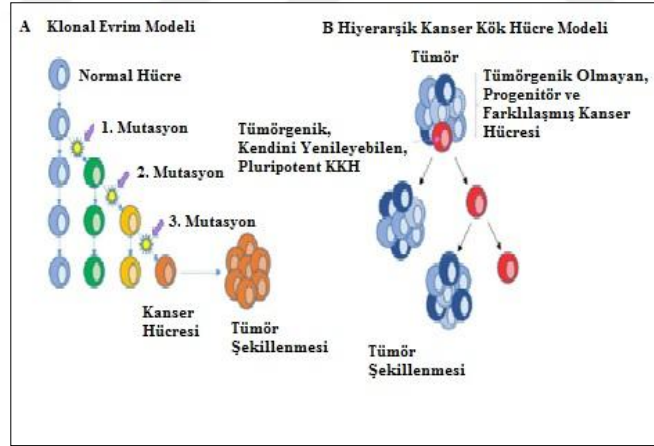
2.4. Kanser Kök Hücre

Hem solid tümörlerin hem de hematopoietik malignansilerin oluşum modelleri kanser hücrelerinin alt grubu olan ve tümör oluşumunu yeniden başlatan bir grup hücrenin varlığını kanıtlamaktadır. Kanser kök hücre veya yayılan hücreler olarak da bilinen bu hücreler, kendini yenileme, anormal farklılaşma, tümörogenezi başlatma göç edebilme özelliklerine sahiptirler (Altaner, 2008; Kalkan, 2015; Persano ve ark., 2013; Wang ve ark., 2013) (Tablo 5). İnsan kortikal glial tümörlerdeki kök hücreler ilk olarak 2002 de keşfedilmiş olup malignant gliomada bulunan bu hücreler glioblastoma kanser kök hücreleri (GSC) olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler multipotent nöral kök hücreler ile benzer olup, nöron, astrosit ve oligodendrosit içermektedirler (Cruceu ve ark., 2013; Huang ve ark., 2010; Safa ve ark., 2016; Wang ve ark., 2013)

Tablo 5.Glioblastoma ve normal kök hücre özelliklerinin karşılaştırılması (Kalkan, 2015)

	Normal Kök Hücre	Glioblastoma Kök Hücre
Kendini yenileme	+	+
Farklılaşma	+	+
Niş'e özgü mikroçevre şartları	+	+
Multipotent	+	+
İnvazyon	-	+
İmmun yanıt	-	+
Hareket yeteneği	+	+

Kanser kök hücre oluşumunda klonal evölüsyon ve hiyerarşik model rol oynar. Evölüsyon modelde, normal hücrelerde kümülatif genetik mutasyonlar ile özdeş kanser hücreler oluşur ve her birinde aynı tümörjenik potansiyel mevcuttur. Ancak hiyerarşik modelde, kanser kök hücreler pluripotent olup kendini yenileme özelliğine sahip hücrelerden oluştuğu için tümör oluşumunu başlatma, sürdürme ve çoğalma potansiyeline sahiptirler (Bradshaw ve ark., 2016; Chen ve ark.,2012; Kalkan, 2015; Lathia ve ark., 2017)



Şekil 8.Karsinogenezis oluşum modelleri (Bradshaw ve ark., 2016)

Glioblastoma tümörlerinin oluşumu, gelişmesi, invazyonu ve tedaviye direnç süreçlerinde kök hücrelerin önemli rol oynadığı bilinmekte ve GSC'lerin varlığı ile ilişkili olarak birçok farklı biyobelirteç tanımlanmıştır (Kalkan, 2015; Lathia ve ark., 2017). Bu biyobelirteçler hücresel lokalizasyonlara göre katogerize edilmiş olup, bunlar: hücre yüzey biyobelirteci (CD133, CD15, A2B5, and L1CAM), iskelet proteinleri (nestin), transripsiyonel faktörler (Sox2, Nanog, and Oct3/4),

posttransripsiyonel faktörler (Musashi 1) ve transkripsiyonel baskılayıcılardır (Bmi1 and Ezh2) (Bradshaw ve ark., 2016; Jhanwar-Uniyal ve ark., 2015; Safa ve ark., 2016) (Tablo 6)

Tablo 6. Glioblastoma ile ilişkili hücre yüzey belirteçleri (Jhanwar-Uniyal ve ark.,2015)

	Tip	Kök Hücre Düzenlenmesi
CD133	Yüzey glikoproteini	Agresif tümör ve farklılaşma ile pozitif ilişkili
L1CAM	Adezyon molekülü	Nöral hücre büyümesi,CD133-pozitif glioma hücrelerinin hayatta kalmalarında ve GSC'nin radyoterapi direncinde etkin
CD44	Hücre yüzey belirteci	Agresif tümör ve farklılaşma ile pozitif ilişkili ,Id1 ile endotelial kök hücre nişinde lokalize
A2B5	Yüzey Glikozit	Agresif tümör ve farklılaşma ile pozitif ilişkili
ID1	Transkripsiyonel düzenleyici	Kendini yenilemeyi düzenler
CD15	Hücre yüzey proteini	CD133-negatif tümörlerde zengin olarak bulunur
Integrin α 6	Transmembran reseptör	Kendini yenilemeyi, çoğalmayı ve tümör şekillenmesini düzenler

Kanser kök hücre biyolojisinde en önemli konulardan biri, fenotipleri sürdüreceği sinyal yollarının tanımlanmasıdır. GSC'lerin, GB'deki varlığı anjiogenezisi arttırıcı, kemoterapi ve radyoterapiye dirençli fenotipi ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle kök hücre oluşumunda etkin moleküler sinyal yollarının aydınlatılması GCS'lerin tedaviye yanıtında daha etkin sonuçların elde edilmesinde büyük öneme sahiptir (Chen ve ark., 2012) Shh, Notch, Wnt and BMI1 gibi sinyal yollarının GCS fenotipinin oluşumunda rol oynadığını ortaya koymuştur (Borah ve ark.,2015; Cruceru ve ark., 2013) (Tablo 7)

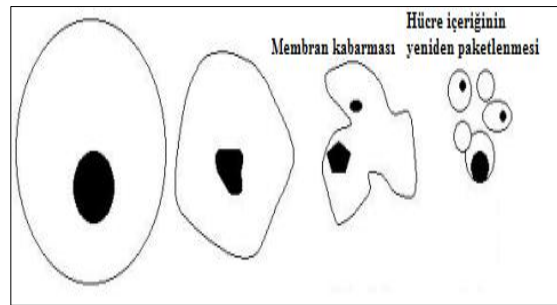
Tablo 7. Glioblastoma oluşumu ile ilişkili anahtar moleküller (Cruceu ve ark., 2013)

Molekül	Rolü	Tümör genezise katkısı
Bmi-1 (Ploikomb kompleks protein)	Nöral ve hematopoietik kök hücrelerin çoğalmasında etkin olup, progenitör özelliği içermez.	Kanser kök hücrelerin fonksiyonu için gereklidir. Beyin tümörlerinde aşırı eksprese olur.
Notch1 (Nörogenik lokus notch homolog protein 1)	NSC olgunlaşması ve NSC fonksiyonunun sürdürülmesinde etkindir.	Epigenetik susturucular ile birlikte malignan tümör özelliğini artırır.
Shh (sonik hedgehog protein)	NSC ve GSC nin çoğalmasında görev alır.	Gliomada Shh yolağını aktive eder
Ptch (Protein Patched homolog 1)	NSC ve GSC nin çoğalmasında görev alır.	Astrositoma, oligodendrogliomda ve GB de yüksek miktarda eksprese olur.
Gli1, Gli2, Gli3	Shh ve Wnt yolağı bileşenidir.	GLI1, astrositoma, oligodendrogliomda ve GB de eksprese olur.
Sox2 (Transkripsiyon faktör)	NSC ve öncülerinin çoğalmasında ve fonksiyonunda etkindir.	Malignan glioma ve pediatrik beyin tümörlerinde eksprese olur.
Beta-katenin (Katenin beta 1)	NSC/progenitör hücre çoğalmasında rol oynar.	Glioma ve medulloblastomalarda mutasyona uğrar.
STAT3 (Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü)	Sinir sistemi ve kök hücre gelişiminde etkindir.	Aktif STAT3 GCS popülasyonu sunar.

2.5. Glioblastomada Ölüm Yolakları

2.5.1. Apoptoz

Apoptozis, gelişim ve yaşlanma sırasında dokulardaki hücre popülasyonu dengesini koruyan, immun reaksiyonlarında ve hücrenin zarar görmesi durumunda savunmada görev alan etkin bir mekanizmadır. Apoptoz, hücre büzülmesi, plazma membranlarının kabarması, organel bütünlüğünün korunması, yoğunlaşma ve DNA fragmentasyonu ile karakterize olup hücrenin fagositoza gitmesini sağlayan bir ölüm yolağıdır ve bu nedenle bir intihar program olarak çalışmaktadır. (Elmore, 2007; Favalaro ve ark., 2012; Orrenius ve ark., 2011; Ulukaya, 2001; Wu ve ark., 2001) (Şekil 9).



Şekil 9. Apoptotik hücre oluşumu (Ulukaya, 2001)

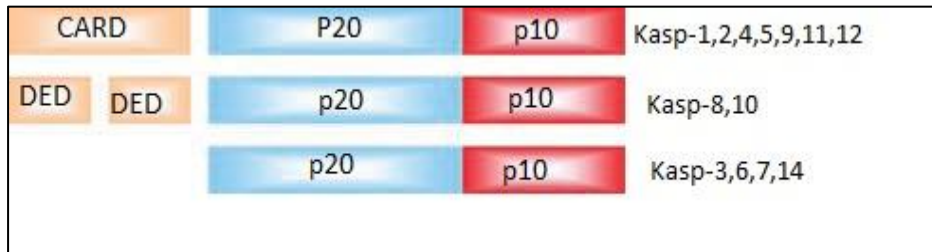
Apoptotik süreç gelişimi, hücre döngüsü, embriyonik gelişim, farklılaşma, homeostazinin sağlanması, immun sistem tarafından hasarlı hücrelerin

uzaklaştırılmasına rol oynamaktadır. Bu nedenle apoptotik program düzensizliği ve işlev bozukluğu, başta kanser, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın gelişiminde kritik öneme sahiptir (Su ve ark., 2015; Wu ve ark., 2001).

2.5.1.1. Apoptozun Düzenlenmesi

2.5.1.1.1. Kaspazlar

Kaspazlar aspartat bağımlı sistein proteazlar olup, apoptozis veya programlı hücre ölümü, nekrozis ve inflamasyonda önemli rol oynamaktadır. Birçok hücrede kaspazlar inaktif proenzim (p20 büyük altbirim, p10 küçük altbirim) formu şeklinde eksprese edilmekte ve prokaspazlara aktive olarak bir dizi protein kaskadını başlatmaktadır (Favaloro ve ark., 2012; Hongmei, 2012; Rastogi ve ark., 2009). Ancak bazı prokaspazlar kendileri de aktive olabilmektedir. Bir kaskadın diğer kaskadları aktive ettiği proteolitik kaskadda, apoptotik sinyal yolağı oluşarak hücrede apoptozis gerçekleşmektedir. Kaspazlar proteinleri aspartik asit rezidülerine parçalamaktadır. Ancak farklı kaspazların amino asitleri tanınması konusunda farklı spesifikiteyi mevcuttur. Kaspazlar başlatıcı kaspazlar (kaspaz 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12) , efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) olarak sınıflandırılmaktadır. Başlatıcı kaspazlar adaptör molekülün üst kısmı ile etkileşimde olan ölüm efektör kısmı (DED) veya kaspaz temin kısmı (CARD) içeren protein-protein etkileşimli motif içermektedir (Li ve Yuan. 2008; Hongmei. 2012; Rastogi ve ark., 2009; Wu ve ark., 2001) (Şekil 10).



Şekil 10. Memeli kaspazlarının yapısı (Li ve Yuan. 2008)

2.5.1.1.2. Bcl-2 Gen Ailesi

BCL-2 ailesi proteinleri apoptotik olayları düzenlemede etkin rol alan ve 4 yaygın BCL-2 homoloji domainine sahip protein ailesidir. Bu nedenle taşıdıkları domaine göre alt sınıflara ayrılmakta olup, antiapoptotik proteinler (BCL2, BCL-XL, MCL-1) bütün bu 4 domaine sahiptir (BCL-2 homoloji domaini 1-4). Bu proteinler içerdikleri hidrofobik karboksi terminal kısım içerir ve bu kısım proteinlerin mitokondri dış membranına, nükleusa ve ER'ye bağlanabilmektedirler (Favaloro ve ark., 2012; Indran ve ark., 2011; Orrenius ve ark., 2011; Tsujimoto, 1997). BCL2 ve BCL-XL adenin nükleotit translokaz veya voltaj bağımlı anyon kanalı gibi mitokondriyal proteinleri ile etkileşime girerek hücreleri apoptozisten korumaktadır. Bcl2 ailesinin ikinci grubu BCL-2 homoloji domaini 1, 2 ve 3 içeren BAX ve BAK proteinlerini kapsamaktadır. BAX fizyolojik koşullarda sitozolde bulunur ve pro-apoptotiktir. BAX, mitokondriye transloke olduğunda apoptotik işlev görebilen protein olduğu için BID gibi diğer proapoptotik proteinlerle homodimerize ve heterodimerize olarak mitokondriyel por geçirgenliği değişmesine neden olur ve böylece sitokrom c gibi apoptotik faktörler salınmasını sağlamaktadır. Üçüncü grup, BCL-2 homoloji domaini 3 içeren BIM, BAD, NAXA ve PUMA proteinleridir. Bu proteinler anti apoptotik proteinleri etkilerini nötralize ederler. Örneğin, BIM, PUMA ve BAD, BCL ve BCL-XL ile heterodimerize olarak anti-apoptotik proteinlerin aktivitelerini engellemektedir (Favaloro ve ark., 2012; Hongmei, 2012; Indran ve ark., 2011; Orrenius ve ark., 2011; Wu ve ark., 2001)

2.5.1.1.3. Apoptotik Protein İnhibitörü

Pro ve anti-apoptotik proteinlerin aktivitesi hücrelerin yaşam ve ölüm arasındaki dengeyi sağlamaktadır. Bu nedenle, memelilerde 8 tane bulunan apoptoz inhibitör ailesi (IAPs) bu dengenin sağlanmasında önemli rol almaktadır. IAP'ler apoptozda hem iç hem de dış yolda rol almaktadır. IAP'lerden en iyi tanımlanmış XIAP, apoptotik kaskadı engelleyerek kaspazların doğrudan inhibisyonuna neden olmaktadır (Indran ve ark., 2011; Orrenius ve ark., 2011). IAP'lerin aktivitesi mitokondriyel aktivatör kaspazlar (smac/DIABLO) tarafından düzenlenmektedir.

Smac/DIABLO mitokondride bulunan ancak apoptotik sinyal varlığında proteolitik olarak parçalanarak, BAX/BAK kanalı veya dış mitokondriyal membranda BID aracılığı ile sitozole salınmaktadır. Böylece Smac/DIABLO kaspazları IAP'lerin inhibisyonunu engelleyerek apoptozun aktivasyonunda rol almaktadır (Favaloro ve ark., 2012; Indran ve ark., 2011; Orrenius ve ark., 2011)

2.5.1.1.4. TP53 Tümör Baskılayıcı Gen

TP53 geni, hücrede hasar olduğunda hücre siklusunun durdurulmasında ve apoptozun indüklenmesinde rol almaktadır. DNA hasarı, onkogen aktivasyonu, ATM ve ATR gibi kinazlar *TP53*'ü fosforilleyerek aktive olmasını sağlamaktadır. Böylece, normalde *TP53* ile etkileşimde bulunan *MDM2*'nin *TP53*'ten ayrılmasına neden olur. Bu şekilde aktive olan *TP53* DNA'sı zarar görmüş hücrenin onarılana kadar hücre siklusunun G1 evresinde hücrenin tutulmasını sağlar. Ancak zarar tamir edilemeyecek derecede ise, *TP53* apoptozun başlamasını uyarır. *TP53* apoptozun aktivitesini transkripsiyon bağımlı ve transkripsiyon bağımsız olacak şekilde düzenlemektedir (Indran ve ark., 2011; Wu ve ark., 2001) Transkripsiyon bağımlı yolda TP53, PUMA, BAX ve BID gibi hücre içi ölüm sinyal yolağında rol alan proteinlerin ekspresyon seviyelerinde artışa neden olarak erken hücre dışı sinyal yolağında etkin CD95 ve DR5 reseptörlerinin düzenlenmesinde görev almaktadır. Transkripsiyon bağımsız yolda ise p53 BCL2, BCL-XL ile etkileşime girerek BAX ve BID'in mitokondriden salınımını gerçekleştirir. BAX salınımı ile mitokondriyal membran permeabilizasyonu gerçekleşir ve böylece mitokondriden sitokrom c salınması sonucu hücrelerde apoptotik ölüme neden olmaktadır (Favaloro ve ark., 2012, Hongmei, 2012; Indran ve ark., 2011)

2.5.1.2. Apoptozun Düzenlenmesi

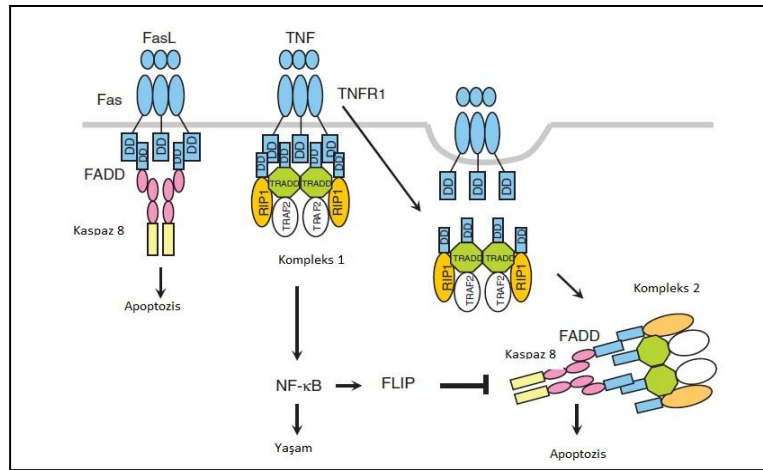
Apoptoz ölüm yolağının aktive olmasında temelde ölüm yolağı (dış yolak) ve mitokondri aracılı yolak (iç yolak) rol almaktadır.

2.5.1.2.1. Dış Yolak

Ölüm reseptörleri Tip I transmembran protein ailesinden olup, ekstraselüler kısmı sistince zengin kısım içerirken sitoplazmik kısmı 'ölüm domaini' olarak bilinen yaklaşık 80 amino asitten oluşan protein-protein etkileşim modülü

içermektedir. Bu ölüm reseptörleri, ölüm sinyalini hücre yüzeyinden, hücre içi sinyal yollarına iletmede rol almaktadır. Ölüm reseptörü ailesi üyeleri: Tümör nekrozis faktör reseptör 1 (*DR1*, *CD120a*, *P55* ve *P60* olarak da bilinen *TNFR1*), *FAS* (*DR2*, *APO-1* veya *CD95*), *DR3* (*APO-3*, *LARD*, *TRAMP* veya *WSLI*), TNF-aracılı apoptozis indükleyici ligand reseptör 1 (*DR4* veya *APO-2* olarak bilinen *TRAILR1*), *TRAILR2* (*DR5*, *KILLER* veya *TRICK2*), *DR6* ve ektodisplazin A reseptör (*EDAR*)’dür (Elmore, 2007; Rastogi ve ark., 2009).

FAS/FASR yolağında, Fas ligandının FAS reseptörüne bağlanmasında ve TNF-A/TNFR1 yolağında ise TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanmasında FADD adaptör proteini görev almaktadır. FADD sonrasında prokaspaz-8 ile etkileşime geçerek ölüm indükleyici sinyal kompleksi olan DISC’in oluşmasına ve prokaspaz-8’in otokatalitik aktivitesinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Böylece aktive olan apoptoziste kaspaz-8’in aktivasyonu kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi alt kısımdaki kaspazların aktive olmasını sağlayarak apoptozisin işleyişi sağlanmaktadır (Elmore, 2007; Favaloro ve ark., 2012; Li ve Yuan, 2008; Rastogi ve ark., 2009; Orrenius ve ark., 2011) (Şekil 11).



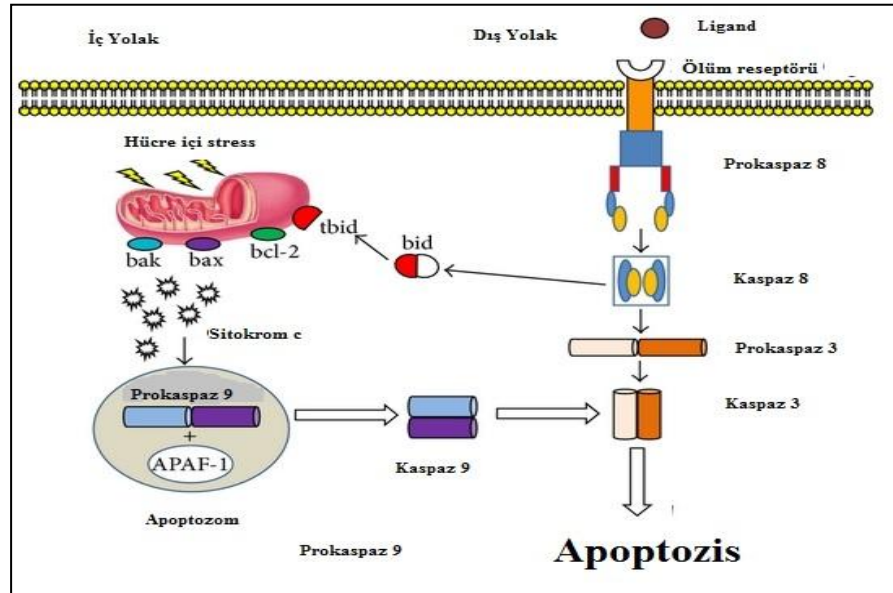
Şekil 11. Dış yolak (Li ve Yuan, 2008)

2.5.1.2.2. İç Yolak

Mitokondri aracılı ölüm yolağı reseptör aracılı olmayıp radyasyon, serbest radikal ve viral enfeksiyon gibi faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu etmenler

mitokondri membranının geçirgenliğinin değişimine yol açmaktadır. Böylece mitokondriyal transmembran potansiyel kaybı ve pro-apoptotik proteinlerin salınımı gerçekleşmektedir. Salınan proteinler iki grupta sınıflandırılır. Birinci grup proteinler sitokrom-c ve SMAC-DIABLO'dur. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive etmede kritik rol oynarlar. Sitokrom-c apoptozomu oluşturan APAF-1 ve prokaspaz-9'un aktivitesinde önemlidir. Prokaspaz-9'un proteolitik yıkımı ile aktifleşen kaspaz-9 hücrede apoptozun gerçekleşmesine neden olmaktadır. SMAC-DIABLO apoptozu inhibe eden IAP faktörünü baskılayarak apoptozu indüklemektedir (Elmore, 2007; Li ve Yuan, 2008; Rastogi ve ark., 2009; Indran ve ark., 2011) (Şekil 12).

İkinci proapoptik protein grubunu oluşturan apoptozis indükleyici faktör ve endonükleaz G geç apoptoz sırasında mitokondriden salınmaktadır. Apoptozis indükleyici faktör salınımını takiben nükleusa geçmektedir ve DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır. Apoptozis indükleyici faktör ve endonükleaz G kaspaz bağımsız yolda görev almaktadır (Favaloro ve ark., 2012; Orrenius ve ark., 2011; Rastogi ve ark., 2009)

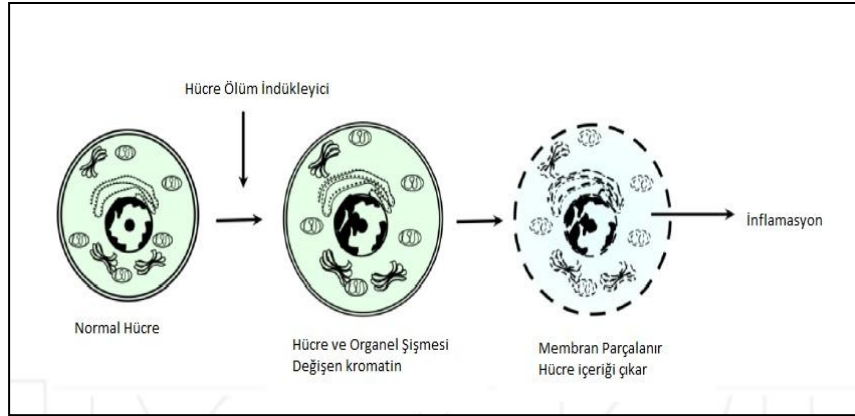


Şekil 12. İç yolak (Li ve Yuan. 2008)

2.5.2. Nekroz

Ekstrem koşullar altında membran ve sitozol tahribatı ile hücre ve dokularda ölüm gerçekleşebilir. Plazma membranının, sitoplazmik yapıların ve nükleusun hızla yıkılmasını takiben gelişen hücre tahribatı olan nekroz olarak adlandırılan pasif ve düzenlenmemiş ölüm yolağını göstermektedir. Nekrotik hücre ölümü, virüs, bakteri, protozoa, immun savunma, doğal öldürücüler, sitokinler, nitrik oksit, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi fizyolojik ve patolojik koşullar tarafından indüklenmektedir (Proskuryakov ve ark., 2002; Zong ve Thompson, 2017).

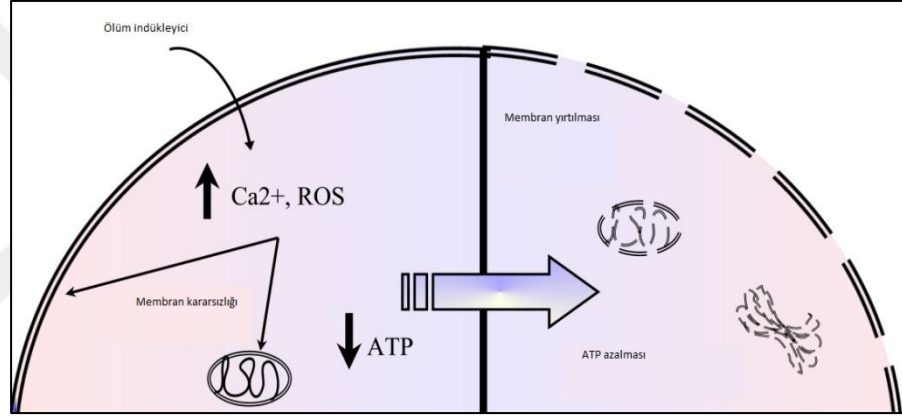
Nekrotik hücre ölümü hücre membranının şişmesi, kromatin yoğunlaşması ve düzensiz DNA degradasyonu ile karakterizedir. Sitoplazmik membranların ve organellerin genişlemesi, plazma membranının parçalanarak hücre içeriğinin dışarı çıkmasına neden olmaktadır. Apoptozun aksine, intraselüler bileşenlerin dışarıya çıkması komşu hücelere zarar vermektedir. Nekrozda fagositoz görülmeyip hücre membran bütünlüğünün bozulmasından dolayı inflamatuvar ve otoimmun reaksiyonlar gerçekleşmektedir (Escobar ve ark., 2015; Vanlangenakke ve ark., 2008) (Şekil 13).



Şekil 13. Nekrozun morfolojik özellikleri (Escobar ve ark., 2015)

ROS mitokondriler tarafından normal bir süreç olarak oluşturulan ROS hücrede patolojik koşullar altında da nekroza yol açmaktadır. Nekroz boyunca ROS ve hücre içi kalsiyum miktarı artmaktadır ve bu nedenle hücre membran geçirgenliğini etkileyebilir. Hücrede kalsiyum seviyesi endoplazmik retikulum tarafından düzenlenmektedir. Hücre kalsiyum seviyesinde meydana gelen değişim,

birçok farklılaşmaya yol açmaktadır. Örneğin, kalsiyum seviyesinin artması farklı mitokondriyal fonksiyonları etkileyerek ROS oluşumunu arttırmaktadır. Kalsiyum seviyesi arttığında mitokondri iç membran bütünlüğü zarar görerek hücre nekrotik ölüme gitmektedir. Mitokondride oluşan bu durum sitozolik kalsiyum seviyelerinin değişmesine ve farklı tip proteazların aktive olmasını sağlamaktadır. Kalpainler hücre içi sistein proteazlar olup, sitozoldeki kalsiyum seviyesi arttığında aktive olmaktadır. Kalpainler aktive olduğunda, lizozomal membrana zarar vererek katepsin B ve L 'nin salınımına neden olarak hücre membran bütünlüğünün bozulmasına ve hücre içeriğinin hücre dışına salınmasına neden olur (Escobar ve ark., 2015; Proskuryakov ve ark., 2002; Zong ve Thompson, 2017) (Şekil 14).



Şekil 14. Nekroz sürecinde hücrede biyokimyasal değişim (Escobar ve ark., 2015)

ROS dışında, TNF reseptörleri ve bu ailenin diğer reseptörleri (FAS, TRAIL) ve DNA'nın doğrudan (radyasyon, antikanser ilacı) ya da dolaylı (oksidatif stres) olarak zarar görmesi de nekroza neden olan diğer faktörlerdir. DNA'nın hasarı ile oluşan DNA tek zincir kırıkları Poli ADP-riboz polimerazın aktive olmasına neden olmaktadır. Poli ADP-riboz polimeraz sırası ile NAD⁺'in katalizasyonunu sağlayarak NAD⁺'in nikotinamid ve poli ADP-riboz hidrolizine neden olmaktadır. Bu süreç hücrelerde ATP kaybına yol açtığı için hücrenin enerji noksanlığından dolayı nekroza gitmesine sebep olmaktadır (Proskuryakov ve ark., 2002; Vanlangenakke ve ark., 2008)

Nekroz kontrol edilemeyen ölüm yolağı olarak bilinmesine rağmen son yıllarda programlanabilir nekroz tipi, nekroptosis hücre içi apoptotik sinyal yolağı

inhibe olduğunda ortaya çıkmaktadır. Hücrenin şişmesi, organellerde parçalanma ve membran bütünlüğünün bozulması gibi nekroz morfolojisi ile karakterize olup, otofajinin bu aktivasyona eşlik etmesi ile sonuçlanır (Feoktistova ve Leverkus, 2014). Fas/CD95, TNFR1, TRAIL-R gibi ölüm domain reseptörleri kaspaz inhibisyonları varlığı sonucunda nekroza yol açar. Reseptör aktivasyonu ile reseptör etkileşim proteinler (*RIP1* ve *RIPK3*) aktive olur. Böylece, *RIP1* ve *RIPK3* mitokondriyi direkt aktive ederek veya NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile indirekt olarak etkileyip nekrozu indüklemekte rol oynarlar. Ayrıca nekrotik uyarı PARP' in aktive olmasına neden olarak kalpain (Ca⁺⁺ ile aktive olan kaspaz proteaz ailesi üyesi) aktivasyonunu sağlar. Kalpain aktivasyonu ile RIP kinazların aktivasyonu ya da PAR polimerazlar yoluyla nekroza gerçekleşir. Ayrıca PAR polimeraz ve kalpain, AIF salınımını sağlayarak nekrotik hücrelerin indüklenmesini sağlar.

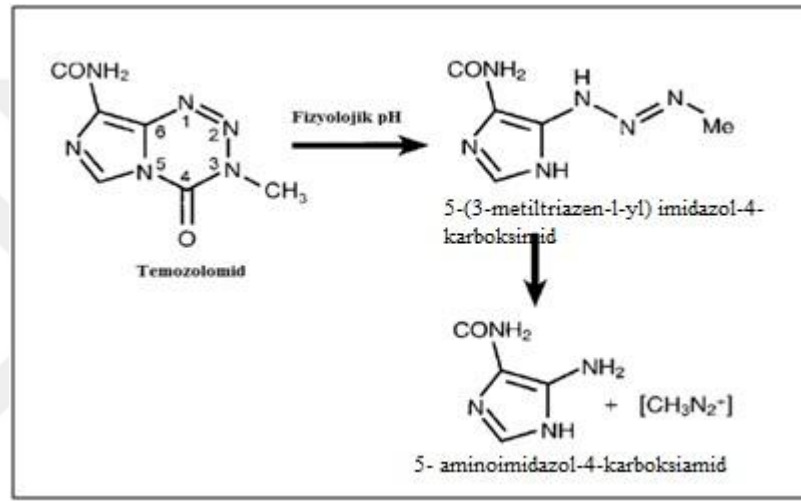
2.6. GB Tedavisi

GB için uygulanan standart tedavi tümörün cerrahi rezeksiyonu, radyasyon terapisi ve adjuvant kemoterapidir. Cerrahi rezeksiyonun hedefi nörolojik harabiyet vermeden tümörün tamamen çıkartılmasıdır. Ancak GB'in infiltratif özelliğinden dolayı tümörün tamamen rezeksiyonu her zaman gerçekleştirilemese de yapılan cerrahinin genişliği hastanın sağkalımını arttırmaktadır. Aynı zamanda cerrahinin genişliği daha sonra uygulanacak tedavi sonuçlarını etkileyen önemli bir faktördür. Cerrahi sonrası infiltratör hücrelerinin çoğalmasını engellemek veya cerrahiye uygun olmayan hastaların tümör çapını küçültmek amacı ile radyoterapi uygulanmaktadır. GB tedavisinde yaygın olarak prokarbazin ya da karmustin kullanılmakta olup, son yıllarda ikinci kuşak alkilleyici ilaç olan temozolamid, GB tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve diğer ilaçlar kadar etkin olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra temozolomid ile birlikte kombin tedaviler de uygulanmaktadır (Ramirez ve ark., 2013; Young ve ark., 2015; Weathers ve Gilbert, 2014).

2.6.1. Temozolomid (TMZ)

2001'de Faz II ve akabinde Faz III çalışmaları tamamlanarak günümüzde GB hastalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan temozolomid (TMZ), küçük

molekül ağırlıklı (194 Da), oral kullanımda etkin, kan-beyin bariyerini aşabilen ve düşük toksisite profili sergileyen alkilleyici bir ajandır. Lipofilik ön ilaç olan TMZ fizyolojik pH'da hızla 5-(3-metiltriazen-1-yl) imidazol-4-karboksimid'e dönüşmekte ve 5-(3-metiltriazen-1-yl) imidazol-4-karboksimid, metildiazonyum katyonu ve 5-aminoimidazol-4-karboksiamid'e yıkılmaktadır. Metildiazonyum katyonları, metil grupların DNA ya transfer olmasında rol oynayarak, guaninin O6 pozisyonuna metil grupları eklenmektedir (Thomas ve ark., 2012; Friedman ve ark., 2000; Fukushima ve ark., 2009) (Şekil 15).



Şekil 15. TMZ'nin kimyasal yapısı (Friedman ve ark., 2000)

TMZ'nin GB hastalarında etkinliği O6-metil guanine-DNA metil transferaz gen ifadesine göre farklılık göstermektedir. DNA tamir mekanizmasında görevli olan MGMT, guaninin O6 pozisyonundan metil gruplarını uzaklaştırarak hastanın TMZ gibi alkali ajanlara karşı direnç göstermesine yol açmaktadır. Bu nedenle, MGMT'nin metilasyon yoluyla transkripsiyonel olarak sessizleşmesi hastanın TMZ tedavisine iyi cevap vermesinde belirleyici rol oynamaktadır. Ancak, *MGMT* geni metile olmayan bazı hastaların TMZ tedavisine beklenildiği şekilde yanıt vermediğinin belirlendiği farklı çalışmalar literatürde mevcuttur ve bu dirence neden olan mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir (Christmann ve ark., 2011; Jiang ve ark., 2014; Silber ve ark., 2012)

2.6.2. TMZ'nin kombin tedavi olarak etkisi

GB tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi uygulanmasına rağmen, GB'in hızlı infiltratif büyüme özelliği ve yüksek metastaz yapma potansiyelinden dolayı mevcut tedavi yöntemleri GB tedavisinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda kombin ilaç tedavi stratejilerine odaklanılmaktadır.

İlaç-ilaç etkileşiminin değerlendirilmesi tıpta önemli bir yer almasına rağmen, kombin tedavide kullanılacak kemoterapik ajanların seçimi tıbbi endikasyonlara neden olduğu için dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır. Kombin tedavi uygulanan kemoterapik ajanların dozunu ve toksisitesini azaltmak, terapötik etkiyi sinerjik etkileşim ile maksimuma çıkarmak ve ilaç direncini en aza indirmek amacı ile kullanılmakta olup antikanser tedavisinin terapötik etkinliğinin artmasında oldukça önemlidir. Kombin tedavide kullanılan ajanların sinerjik veya antagonist etkiye sahip olabileceği gibi ilaç kombinasyonu arasında hiçbir etki olmadığı durumlarda ortaya çıkabilir. Bu nedenle kombin tedavide kullanılacak ilacın seçimi ve birbirleri ile etkileşimlerinin belirlenmesi etkin bir tedavi stratejisi olarak geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken temel noktaları oluşturmaktadır (Ramirez ve ark., 2013; Young ve ark., 2015; Weathers ve Gilbert, 2014)

2.7. GB Tedavisinde Kullanılan Bitkisel Özütlar

Bitkiler ve bunların bileşenleri antik çağlardan beri kullanılmakta olup bitkilerin antioksidan, anti-inflamatuar ve genetik yolların modülasyonu gibi çeşitli yollarla hastalıkların yönetiminde rol oynadığı bilinmektedir. Sentetik ilaçlara dayalı mevcut tedavi şekli etkili olmakla birlikte birçok yan etki de göstermektedir. Bu nedenle hastalığın gelişimini ve ilerlemesini kontrol etmek için daha güvenli ve etkili ilaçlar gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan doğal ürünler, herhangi bir komplikasyon olmaksızın hücrel ve moleküler aktivitelerin düzenlenmesi yoluyla kanseri önlemede rol aldığı bilinmektedir.

Kanser tedavisinde kullanılan mevcut tedavi yöntemlerinin sahip olduğu dezavantajlar (toksik etki, ciddi yan etkiler, hücre özgüllüklerinin olmaması vb.)

günümüzde kanser tedavisinde alternatif bir tedavi stratejisinin ortaya konulması ihtiyacını gündeme getirmiştir. Bu nedenle kemoterapik ajanlarla birlikte kombin tedavi stratejisi olarak çeşitli tıbbi bitkilerin ve bileşenlerinin etkilerinin araştırılması üzerine araştırmalarda önem kazanmıştır (Jakubowicz-Gil ve ark., 2013; Yin ve ark., 2014).

GB hastalarına uygulanan radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi rezeksiyona rağmen hastaların sağkalım süresinin kısa olması nedeni ile GB'e farklı bitkisel bileşenlerle yanıt aranmaktadır. Bu nedenle GB üzerinde çeşitli bitkisel özütler denenerek, farklı kanser hücre hatlarında olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Boss ve ark., 2016; Han ve ark.2009; Tutino ve ark., 2012)

2.7.1 *Olea europaea* Yaprak Özütü

Özellikle Mediterranean bölgede üretilen *Oleaceae* ailesinden olan zeytin ağacının (*Olea europaea*) ve yapraklarının polifenol içeriği nedeni ile antioksidant, anti-inflamatuar, anti-kanser, antimikrobiyal, antiviral, antianjiyogenik, hipoglisemik, hepatik kardiyak ve nörokoruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Barbaro ve ark., 2014; Boss ve ark., 2016)

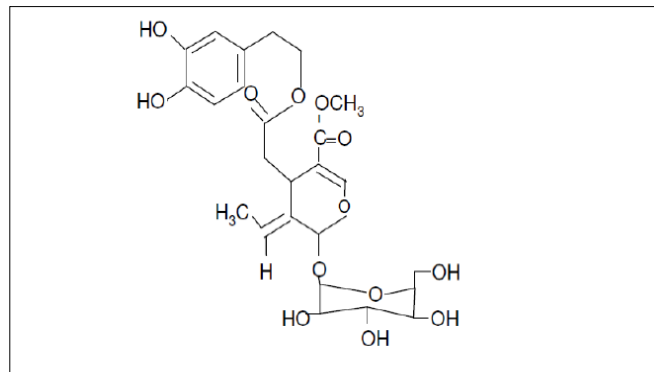
Zeytin yapraklarının bileşimi köken aldığı ağaca, iklim koşullarına, nem içeriğine ve toprak bileşimine bağlı olup esasen 5 farklı fenolik bileşik içermektedir: Oleuropeosides (oleuropein and verbascoside), Flavones (luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside, diosmetin-7-glucoside luteolin, and diosmetin), Flavonols (rutin), Flavan-3-ols (catechin), Substituted phenols (tyrosol, hydroxytyrosol, vanillin, vanillic acid, and caffeic acid) (Boss ve ark., 2016; Sabry, 2014).

Yapılan çalışmalar sonucunda OLE'nin farklı kanser hücre tipleri (melanoma, lösemi, kolorektal, meme kanseri ve glioblastoma) üzerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bouallagui ve ark., Hidroksitirazol ve Oleuropein bakımından zengin olan OLE'nin MCF-7 hücre hattındaki anti-tümöral etkisinin belirlenmesini hedeflenmiş ve analiz sonuçlarına göre konsantrasyon artışına bağlı olarak Pin1(peptidil-prolil cis-trans izomeraz) ekspresyonunun azalmasını ve bunu takiben G1 anahtar protein siklin D1'in düşmesini sağlayarak hücreleri G0 / G1

evresinde durdurduğu belirlenmiştir. Reyes FJ ve ark., OLE'nin yapısında yüksek oranda bulunduğu bilinen maslinik asitin, ve Caco-2 kolon kanseri hücresini G0 / G1 evresinde tuttuğu ve kaspaz-3 aktivasyonu ile hücresini apoptozise götüşdüğu belirlenmiştir. Ayrıca anabilim dalımız tarafından gerçekleştirilen çalışmada, farklı özelliklere sahip üç farklı GB hücre hattında OLE'nin etkisi araştırılmış olup, bunun sonucunda GB hücresini üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Tezcan ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada 1 ve 2 mg/ml OLE konsantrasyonları kullanılarak T98G, U138MG ve U87MG hücresindeki sitotoksik etkisi 24 saat sonunda analiz edilmiştir. Analiz sonucunda doza bağlı olarak T98G, U138MG ve U87MG hücre miktarlarında azalış belirlenmiştir. Böylelikle OLE'nin apoptotik ve nekrotik süreçte etkili olduğu belirlenmiştir ancak bu mekanizmaların aydınlatılması için ileri anaizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.7.2. Oleuropein

Zeytin yağı ve yaprakları içerisinde en etkin anti-tümör aktivitesi gösteren bileşenlerin oleuropein, elenolik asit ve hidroksitriosolün heterozidik esteri olduğu belirlenmiştir (Acquaviva ve ark., 2012; Marchetti ve ark., 2015; Martınez-Martos ve ark., 2015; Yıldız ve Uylaşer, 2010) (şekil 16).



şekil 16. Oleuropeinin kimyasal yapısı (Yıldız ve Uylaşer, 2010)

Jie Yao1 ve ark., Oleuropein ile yaptıkları çalışmada, OL' nin HeLa hücresini G2/M fazında tutukladığı ve apoptoz ile ilişkili p53, Bax ve sitokrom

c'nin artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Maria Notarnicola ve ark., OL'nin kolon kanserinin gelişiminde etkim rol oynayan yağ asidi sentezi üzerindeki etkisini belirlemeyi hedeflemiş ve SW620 hücreleri ile yaptıkları çalışmada OL'nin FAS ekspresyonunu azalttığı bulguları elde edilmiştir.

Mevcut tez kapsamında;

Ülkemizin doğal zenginliklerinden biri olan *Olea europaea* (Zeytin) yapraklarından elde edilen, OLE'nin içeriğinde yüksek oranda bulunan OL'un ve GB tedavisinde alkilleyici ajan olarak kullanılan TMZ'nin ayrı ayrı ve kombinlerinin TMZ'ye farklı direnç gösteren U87MG, U138MG ve T98G ile normal hücre hattı olan HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücreleri) üzerinde OLE ile karşılaştırmalı şekilde doza ve zamana bağlı olarak in vitro hücre proliferasyonu ve ölüm biçimi üzerinde olan etkilerinin araştırılması,

GB hücre hatlarında OLE ve OL' in tek başına ve TMZ ile kombin olarak nekroz ve apoptoz ile ilişkili gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin analiz edilerek hücrelerdeki sitotoksik ve apoptotik etkiye sebep olan moleküler yollarda rol oynayan genler üzerine etkilerinin araştırılması,

Böylece GB'de güncel tedavi yaklaşımı olarak kullanılan TMZ'nin, OL ve OLE kombinleri ile birlikte GB hücrelerindeki terapötik etkisini artırılma potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan demirbaş malzemeler

- -150°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -80°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -20°C derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- Buzdolabı (Samsung, Türkiye)
- Santrifüj (Nüve NF 800, Türkiye)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- Shaking İnkubatör (JSR, Kore)
- Orbital Shaker (Cleaver Scientific, Birleşik Krallık)
- Thermal Cycler (T100, Biorad, Kaliforniya, ABD)
- Hassas terazi (A&D Company, Japonya)
- Hassas terazi (Radwag, ABD)
- UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD)
- Class II Laminer kabin (Labogene, Danimarka)
- CO2 inkübatör (Panasonic, Japonya)
- Işık mikroskop (Olympus, Japonya)
- ELISA okuyucu (Tecan, İsviçre)
- Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
- UV kabin (BIOSAN)
- Light Cycler (LC) 480 II (Roche, İsviçre)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 4.5 g/L,with L-glutamin,without sodium pyruvate (500 ml) (Gibco)
- Fetal bovin serum (FBS), Origin Australia (500 ml) (Capricorn)
- Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Thermo Fisher)
- Trypsin-EDTA (%0.25, pH-range 7.0 - 7.6, 2.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red) (Sigma-Aldrich)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), (1x) (Capricorn)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Purity \geq % 99.90) (Sigma Aldrich)
- Trypan Blue solution (0.4%, liquid) (Sigma Aldrich)
- 2-Mercaptoethanol (Purity \geq % 99.90) (Sigma Aldrich)
- Gluteraldehit (GA) (% 25) (Sigma Aldrich)
- Ethyl alcohol (Purity \geq % 99.95) (Sigma Aldrich)
- WST-1 Cell Proliferation Reagent (25ml) (Abcam)
- Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit (100 test) (Merck Millipore)
- Akridin orange (ZnCl₂) (250 ml) (Sigma Aldrich)
- Ethidium Bromide (EtBr) (10 mg/mL) (Thermo Fisher)
- RNA izolasyon kiti (200 reaksiyon) (Macherey-Nagel)
- cDNA sentez kiti (200 reaksiyon)
- RT² qPCR Primer Assay
- Syber Green
- Oleuropein (50mg) (Purity \geq %98) (Sigma Aldrich)
- Temozolomide (100mg) (Purity \geq %98) (Sigma Aldrich)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini ve Hücrelerin Özellikleri

Mevcut tez çalışmasında, TMZ, OL ve OLE' nin tek başına veya kombin etkilerinin GB hücresi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, TMZ'ye farklı derecede dirence sahip insan GB hücre hatları, T98G, U-87 MG ve U-138 MG ve kontrol olarak Human Umbilical Vein Endotelial Cells (HUVEC) hücre hattı kullanıldı. GB hücre hatlarından U87MG, Kafkasya ırkından 44 yaşındaki erkek bireyden elde edilmiş olup, TMZ' ye duyarlı, *MGMT*-metile, epitelyal morfolojiye sahip, fosfataz tensin homolog (*PTEN*) ve siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A (*CDKN2A*) mutasyonu içermektedir [http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr]. TMZ' ye dirençli, T98G hücre hattı, fibroblast benzeri yapıya sahip olup, Kafkasya ırkından 61 yaşındaki erkek bireyden elde edilmiştir. *MGMT* metilasyonu bakımından heterozigot olan T98G hücreleri *CDKN2A* ve *TP53* mutasyonu içerir [http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr]. TMZ' ye yüksek oranda dirençli olan *MGMT*-unmetile U138MG hücreleri Kafkasya ırkından 47 yaşındaki erkek bireyden elde edilmiş olup, *PTEN*, *TP53* ve *CDKN2A* mutasyonları içerir (Tezcan ve ark.,2014). Tüm hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC, ABD)'den sağlandı ve -150°C'de saklandı.

3.2.1.2. Besiyerlerinin Hazırlanması ve Hücrelerin Üretilmesi

T98G, U-87 MG, U-138 MG ve HUVEC hücreleri %10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri içerisinde kültüre edildi. Hücrelerinin çoğaltılması amacıyla -150°C'de kriyo tüplerde stoklanan hücreler 15 ml falkonlara aktarılarak üzerine DMEM ilave edildi ve hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısımları dökülerek her bir pellet içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25cm²'lik flasklara alındı ve 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde inkübe edildi.

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklardaki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında, flasklar içerisindeki besiyeri pipet yardımı ile uzaklaştırılarak, hücre yüzeyleri fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Ardından hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılabilmesi için her bir flaskın boyutu ile orantılı olacak şekilde hücrelere 1X Tripsin-EDTA (%0.025 trypsin/ 1mM EDTA) solüsyonu eklenerek 3-5 dakika 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonra flasklara besiyeri eklenerek hücre süspansiyonları 15 ml'lik falkonlara alındı ve 1200 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelletleri üzerine besiyeri eklendi ve hücreler, hücre yoğunluklarına göre flasklara bölünerek 37°C'de % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde kültüre edildi.

3.2.1.4. Hücrelerin Stoklanması

% 80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler yüzeyden Tripsin-EDTA ile kaldırılarak, 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra pellet üzerine 100 µl DMSO ve 900 µl hücre medyumunu aktararak her bir örnek kriyo tüp içerisinde -20 °C'ye kaldırıldı. 3-4 saat sonra kriyo tüpler -150°C' lik derin dondurucuya yerleştirilerek, stoklama işlemi tamamlandı. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde çözündürülüp yeniden kültüre edilecek şekilde kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.1.5. Hücre Sayımı

Hücre sayımı, deney optimizasyonu açısından belirleyici faktör olup, deneylerde canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesi amacı ile Tripan mavisi (% 0,4 lük) boyası kullanıldı. Tripan mavisi negatif yüklü bir boya olup, hücre membranı zarar görmeyen (canlı) hücreler içerisine girmez. Ancak, hücre membranı zarar görmüş (ölü) hücreler tripan mavisini absorbe ederek mikroskop altında mavi renkte gözlenmektedirler. Böylece, Thoma lamında canlı ve ölü hücrelerin sayımı yapılarak canlı hücrelerin istenilen miktarda ekimine olanak sağlanmaktadır.

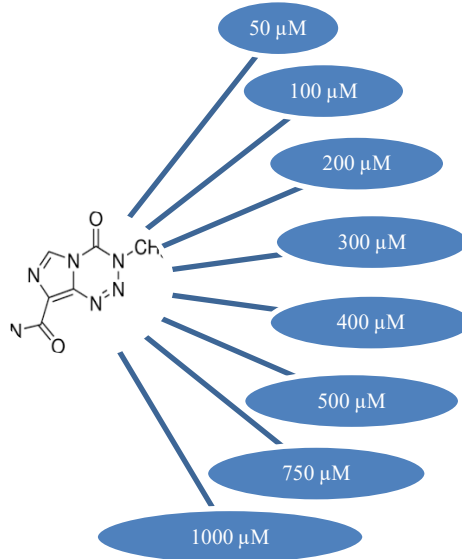
Bu işlem için öncelikle flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve ardından hücreler 1 kez PBS ile yıkandı. Hücreler yüzeyden Trypsin-EDTA ile kaldırılarak, 1200 rpm' de 5dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak, pellet üzerine 1ml besiyeri eklendi. Örnekler Trypan mavisi 1,5 ml'lik ependorfta, 1:1 oranında hazırlarak, Thoma lamına aktarıldı. Thoma lamının alt ve üst bölümünde bulunan 16 küçük karede hücre sayımı yapıldı ve sayılan canlı hücre sayısının ortalaması alınarak 1 ml' deki hücre sayısı belirlendi.

$$1 \text{ ml' deki hücre sayısı} = \text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

3.2.2. Ana Stokların Hazırlanması ve Konsantrasyonların Belirlenmesi

3.2.2.1 TMZ Stoğunun Hazırlanması

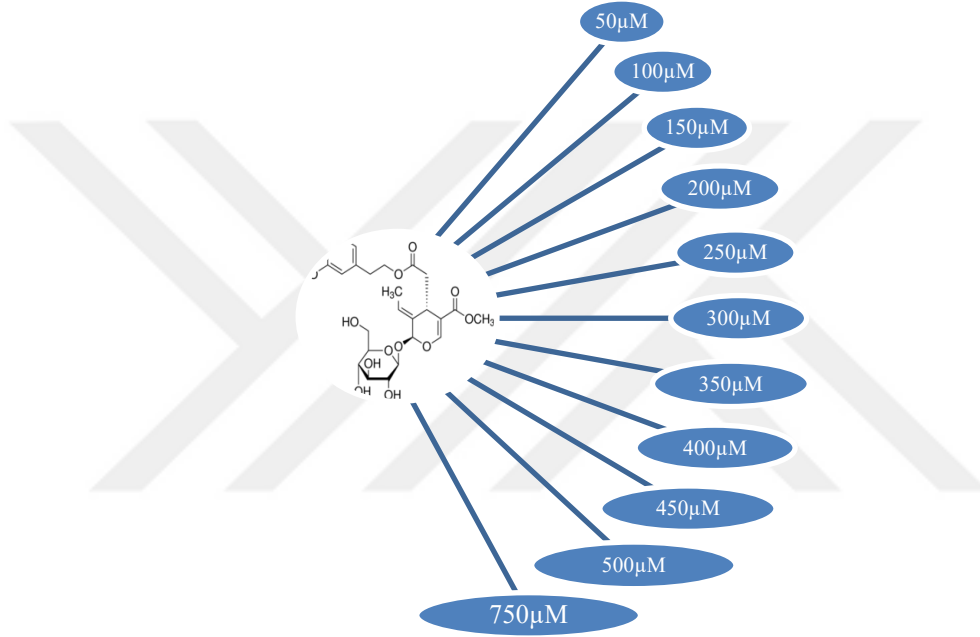
TMZ' in stok solüsyonu 10 mg/ml DMSO (0,051 M) içerisinde çözülerek ana stok solüsyonu hazırlandı ve steril ortamda hazırlanan stok solüsyon -20°C ' de saklandı. Literatür taraması sonucunda gerekli dilüsyonların gerçekleştirilmesi ile TMZ' in WST-1 deneyleri için konsantrasyon aralığı belirlendi (Markiewicz-Żukowska R. ve ark., 2013) (Şekil 17).



Şekil 17. TMZ' in çalışılması planlanan konsantrasyonları.

3.2.2.2. OL Stoğunun Hazırlanması

OL stok solüsyonu 1 mg/ml dH₂O (0,185 M) çözülerek hazırlandı ve oluşturulan stok solüsyon steril ortamda 0,22 µm'lık steril filtrelerden geçirilerek -20°C'de saklandı. Literatür taraması sonucunda gerekli dilüsyonların gerçekleştirilmesi ile OL' in WST-1 deneyleri için konsantrasyon aralığı belirlendi (Liu M ve ark., 2009, Yao J ve ark.,2014)(Şekil 18).

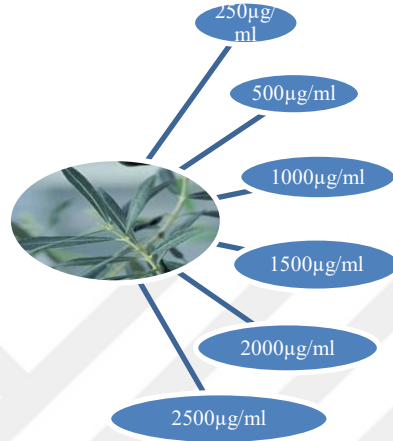


Şekil 18. OL' in çalışılması planlanan konsantrasyonları.

3.2.2.3. OLE' nin ve Stoğunun Hazırlanması

OLE özütü bölümümüzde daha önceden gerçekleştirilen “Bitki özütlerinin anti-tümöral özelliklerinin glioblastom kök hücrelerinde araştırılması” tezi kapsamında Kale Naturel firmasından temin edilmiştir. İlgili firma tarafından OLE (05.06.2007, 10-00014-00015-0) Balıkesir, Edremit bölgesinden Şubat ayında toplanmış olup, %15 OL içermektedir. Toplanan yapraklar bir ay boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında kurutulmuş bitki değirmeninde toz şekline getirildi ve % 80 etanolde oda sıcaklığında bekletildi. Etanolü uçurmak için Spray Dryer sistemi kullanılarak düşük sıcaklıkta (<55°C) alkolün uçması sağlandı.

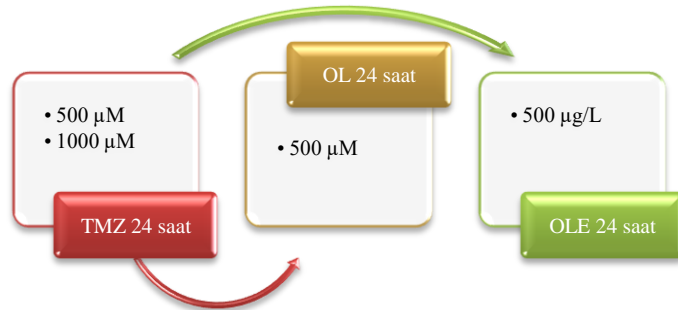
OLE Stok solüsyonu 1g/ml olacak şekilde toz haline getirilen OLE dH₂O ile çözülerek hazırlandı ve oluşturulan stok solüsyon steril ortamda 0,22 µm'lık steril filtrelerden geçirilerek -20°C'de saklandı. Literatür taraması sonucunda gerekli dilüsyonların gerçekleştirilmesi ile OLE' nin WST-1 deneyleri için konsantrasyon aralığı belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19. OLE' nin çalışılması planlanan konsantrasyonları.

3.2.2.4. TMZ, OL ve OLE' nin Kombin Etkisi

TMZ, OL ve OLE' nin hücrelerdeki kombin etkisinin belirlenmesi amacıyla TMZ, OL ve OLE' nin hücrelerde sitotoksik etkisinin belirlendiği WST-1 analizlerine göre, TMZ için 500 µM ve 1000 µM, OL için 500 µM ve OLE için 500 µg/ml'ın (24 saat) en etkin olduğu zaman dilimlerinde kombin etkisinin araştırılmasına karar verildi (Şekil 20).



Şekil 20. TMZ, OL ve OLE' nin kombin etkisinin belirlenmesi.

3.2.3. WST-1 analizi

WST-1, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz aracılığı ile tetrazolium tuzlarının, formazan tuzlarına ayrıştırılmasına dayanan spektrofotometrik ve kolorimetrik bir test olup, ölçülen absorbans değeri doğrudan canlı hücre sayısı ile ilişkilidir. T98G, U-87 MG ve U-138 MG ve HUVEC hücre hatları için 96 kuyulu hücre kültürü plakalarının her bir kuyusuna 2×10^4 hücre olacak şekilde toplam hacmi 100 μ l olan hücre süspansiyonları ekildi. Ekim yapılan hücreler 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra Şekil 17-20' de belirtilen konsantrasyonlarda TMZ, OL, OLE, TMZ+OL ve TMZ+OLE doz uygulamaları yapıldı. Belirlenen saatler sonunda (24, 48 ve 72 saat) hücreler inkübatörden alınıp her bir kuyuya 10 μ l WST-1 boyası eklenerek, 1-4 saat boyunca 37°C ' de %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir her bir plate 460-650 nm absorbans aralığında TriStar² S LB 942 Modular Monochromator Multimode Reader spektrofotometre cihazında analiz edildi. Sonuçlar, bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları ifade edildi.

3.2.4. Apoptoz Analizi

T98G, U-87 MG ve U-138 MG ve HUVEC hücrelerinde TMZ, OL, OLE ve kombin etkilerinin apoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla MuseTM Annexin V & Dead Cell Kit kullanıldı ve işlemler bu kit prosedürüne göre gerçekleştirildi. Bu yöntem, apoptoz mekanizmasının tetiklenmesi ile, hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfatidilserin hücre membran dış yüzeyine yerleşmesi sonucunda Anneksin V boyasının, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine spesifik olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Böylece, apoptotik hücrelerin analiz edilmesinde kullanılan temel bir yöntemdir. Bu yöntem apoptotik yola giren ancak membran bütünlüklerini kaybetmemiş erken apoptotik hücrelerin yanı sıra Anneksin-V ile ikinci boya olarak propidyum iyodür veya 7-AAD boyasının birlikte kullanılması ile geç apoptotik ve nekrotik hücrelerinde eş zamanlı olarak analiz edilmesine olanak sağlamaktadır.

T98G, U-87 MG ve U-138 MG ve HUVEC hücrelerinde TMZ, OL, OLE, TMZ+OL ve TMZ+OLE' nin apoptotik etkisinin belirlenmesi amacı ile 6 kuyulu plakaların her bir kuyusuna 1×10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücreler 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra, belirlenen konsantrasyonlarda TMZ, OL, OLE, TMZ+OL ve TMZ+OLE uygulandı ve plakalar tekrardan inkübatöre yerleştirildi. Akabinde, TMZ, OL, OLE ve kombin etkisinin maksimum belirlendiği zaman dilimlerinin sonunda hücreler Trypsin-EDTA ile kaldırılıp 1200 rpm' de 5dk santrifüj edildi. Elde edilen pellet PBS 2 kez ile yıkandıktan sonra süspansiyon halindeki hücrelerin her biri için 100 μL Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit boyası eklendi ve örnekler 30 dk karanlıkta bekletildi. İnkübasyon süreleri sonunda her bir örnek Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analiz edildi ve tüm deneyler 3'er kez tekrar edildi.

3.2.5. Akridin-oranj/ Etidyum Bromür (AO/EB) Boyaması

Floresan boya özelliğine sahip akridin oranj (AO) hem canlı hem de canlı olmayan hücreler tarafından absorbe edilmekte olup RNA veya DNA'ya bağlanabilmektedir. Bağlanma akridin molekülleri ile nükleik asit baz çiftleri arasındaki elektrostatik etkileşim ile sonuçlanır. Bu etkileşim ile hücreler 530 nm dalga boyunda (yesil floresan) görünür hale gelebilir. Etidyum bromür ise yalnızca ölü hücreler tarafından absorbe olup, DNA'ya interkalasyon ile kırmızı floresan yaymaktadır. Boyama işlemi gerçekleştirildikten canlı hücre, erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve nekrotik hücreler analiz edilebilir.

T98G, U-87 MG ve U-138 MG ve HUVEC hücrelerinde TMZ, OL, OLE, TMZ+OL ve TMZ+OLE' nin apoptotik etkisinin görüntülenmesi amacıyla 6 kuyulu plakaların her bir kuyusuna her bir hücre grubu için 5×10^5 hücre ekimi yapıldıktan sonra hücreler 37°C ve % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Hücreler inkübasyon sonunda TMZ için 72 saat süre ile, OL, OLE, TMZ+OL ve TMZ+OLE için ise 24 saat süre ile Şekil 17-20' de belirtilen konsantrasyonlarda muamele edildi. Daha sonra % 4 paraformaldehit fiske edilen hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Her bir 6'lı plaka içerisine akridin oranj (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve etidyum bromür (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) karışımı eklenerek 30 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edildi ve sonrasında hücreler

2 kez PBS ile yıkanarak EVOS Floid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile görüntülendi.

3.2.6. Gen Ekspresyon Analizi

3.2.6.1. RNA İzolasyonu

TMZ, OL, OLE, TMZ+OL ve TMZ+OLE uygulanan T98G, U-87 MG ve U-138 MG ve HUVEC hücrelerinde RNA izolasyonun gerçekleştirilmesi amacıyla, 25 cm²'lik flaskların her birine 1x10⁶ hücre olacak şekilde hücreler ekildikten 24 saat sonra belirlenen konsantrasyon ve süre boyunca TMZ, OL, OLE, TMZ+OL ve TMZ+OLE ile inkübe edildi. Sonrasında hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldıktan sonra, 1200 rpm' de 5dk santrifüj edildi ve NucleoSpin® RNA Kit kullanılarak hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kit prosedürüne göre, elde edilen pellet üzerine 350 µl Buffer RA1 ve 3.5 µl β-merkaptotanol eklenerek karışım 15sn vortekslendi ve mor filtreli tüplere aktararak 11000 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Filtre uzaklaştırılarak toplama tüpündeki kısma 350 µl %70' lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Karışım mavi fitreli tüpe aktararak 11000 rpm'de 30sn santrifüj edildi. Daha sonra toplama tüpü uzaklaştırıldı ve filtre üzerine 350 µl MDB Buffer eklenerek 11000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Filtre yeni bir toplama tüpüne alındıktan sonra filtre üzerine 10 µl rDNAse ve 90 µl Reaksiyon Buffer eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra filtreye 200 µl AW2 Buffer eklendi ve 11000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Ardından toplama tüpü uzaklaştırıldı ve filtre üzerinde 600 µl Buffer RA3 eklendi ve 11000g' de 30 sn santrifüj edildi ve toplama tüpü yeniden değiştirilerek filtre üzerine 250 µl Buffer RA3 eklendi ve 11000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 11000 rpm'de 2 dk boş olarak santrifüj edildi. Bu işlemin ardından alt kısma ependorf tüpü yerleştirildi ve filtre üzerine 30 µl nükleaz free su eklendi ve oda ısısında 10 dk bekletildi. Ardından 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek örnekler -80 °C'ye kaldırıldı. Elde edilen RNA'ların kalite ve konsantrasyonları, 260/280 nm dalga boyundaki optik dansiteleri UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) ölçüldü.

3.2.6.2. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi First Strand cDNA Synthesis (Biolabs) kit içeriğine uygun olarak Tablo 8-9' da belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Bu işlem öncesinde tüm RNA konsantrasyonları 1 µg' a eşitlendi. İşlem sonrası cDNA'lar analizler gerçekleştirilene kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 8. cDNA sentezlemek amacıyla hazırlanan PCR karışımı

Total RNA	1–6 µl (10 ng–1 µg)
d(T) ₂₃ VN (50 µM)	2 µl
nuclease-free H ₂ O	variable
Primer mix	2 µl
Total Hacim	8µl
Oluşturulan karışım 5dk 70°C'de denatüre edildi ve ardından enzim karışımı eklendi.	
M-MuLV Reaction Mix	10 µl
M-MuLV Enzyme Mix	2 µl
Toplam Hacim	12 µl

Tablo 9. cDNA sentezlemesi için PCR koşulları

25°C	5dk
42°C	1saat
80°C	5 dk
+4°C	∞

3.2.6.3. Apoptoz ve Nekroz Mekanizmaları ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Analizi

Elde edilen cDNA örneklerinden apoptoz ve nekroz mekanizmaları ile ilişkili belirlenen 20 farklı genin ekspresyon analizi gerçekleştirildi (Tablo 10). Bu işlem için RT² SYBR® Green qPCR Assay ve Mastermix (Qiagen) kullanıldı. Uygulanan RT-PCR karışımı ve PCR koşulları sırası ile Tablo 11 ve Tablo 12' de belirtildi ve Light Cycler (LC) 480 II (Roche, İsviçre) sisteminde analiz edildi.

Elde edilen veriler “RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5.” (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) web tabanlı programda $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile değerlendirildi.

Tablo 10. Apoptoz ve nekroz ile ilişkili mRNA ekspresyon seviyesinde değişimlerin analiz edileceği genlerin listesi

Sembol	Gen Kodu	Görevi
ACTB	Hs.52064	Aktin beta. Referans gen.
BCL2	Hs.150749	Hücre ölümünü regüle eder.
AIFM1	Hs.424932	Apoptozis indükleyici faktör.
CASP9	Hs.329502	Apoptozis aktivasyonunu düzenler.
RIPK3	Hs.268551	Reseptör etkileşen protein kinaz 3. Programlanmış nekrozda görev alır.
CASP3	Hs.141125	Kaspaz 8 ve kaspaz 9 ile etkileşime geçerek apoptozisi sağlar.
PARP1	Hs.177766	Mitokondriyal proapoptotik protein olan apoptozu indükleyici faktörün (AIF) serbest bırakılmasını tetikler.
CFLAR	Hs.731912	CASP8 ve FADD benzeri apoptozis düzenleyicisi. Kaspaz 8 aktivasyonunu inhibe eder.
FADD	Hs.86131	Ölüm domaini içeren Fas ilişkili protein.
CASP8	Hs.599762	Dış apoptoziste rol oynayan önemli sistein proteazdır.
BCL2L11	Hs.469654	Apoptozis indükleyici BCL2- benzeri protein 11.
TNF	Hs.241570	Apoptotik ve nekrotik yolda rol oynar.
BID	Hs.591054	Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesidir.
FAS	Hs.244139	Nekroz ve apoptoziste rol oynar.
TNFRSF1A	Hs.279594	TNF ailesi üyesi 11 apoptozis ve enflamasyonda rol oynar.
BAK1	Hs.485139	BCL2 Antagonist/Killer 1, apoptozisi indükler.
BAX	Hs.624291	Bcl 2 ilişkili X protein apoptozisi aktive eder.
BCL2L1	Hs.516966	Apoptozisi baskılar.
RIPK1	Hs.519842	Reseptör etkileşen protein kinaz 1. Programlanmış nekrozda görev alır.
TP53	Hs.740601	Apoptozisi indükler.

Tablo 11. mRNA ekspresyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması

Hacim/reaksiyon	
RT ² SYBR® Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	1 µl
RT ² qPCR Primer Assay	1 µl
RNase-free water	10,5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo12. mRNA ekspresyonu için RT-PCR koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre
Denatürasyon	95°C	10 dk
Amplifikasyon	95°C	15sn
(45 döngü)	60°C	1dk

3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmelerin tümü GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arası farklılıklar tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA- PostHoc Tukey) ile tespit edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

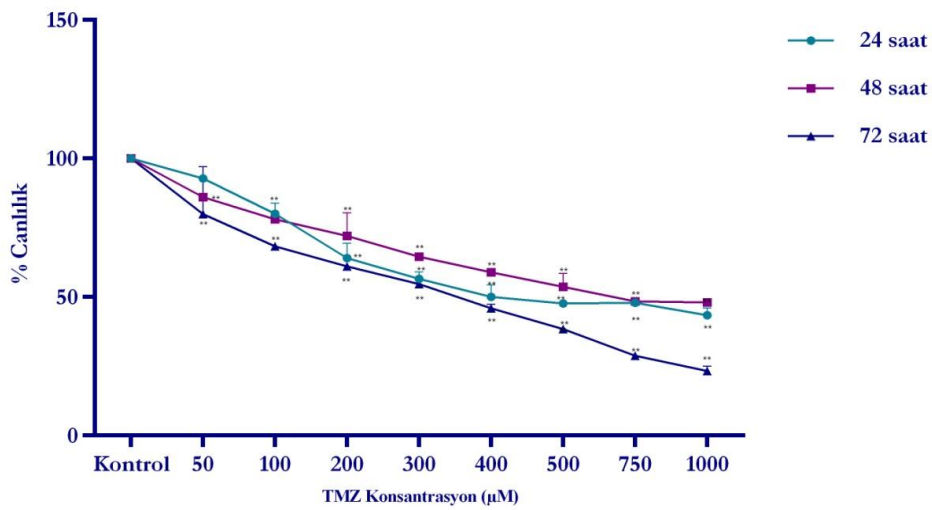
4.1. Hücrelerde Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

4.1.1. TMZ' in Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.1.1. TMZ' in U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

TMZ' in U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi doza ve zamana bağlı olarak WST-1 analizi belirlenerek elde edilen sonuçlar Şekil 21' de sunuldu.

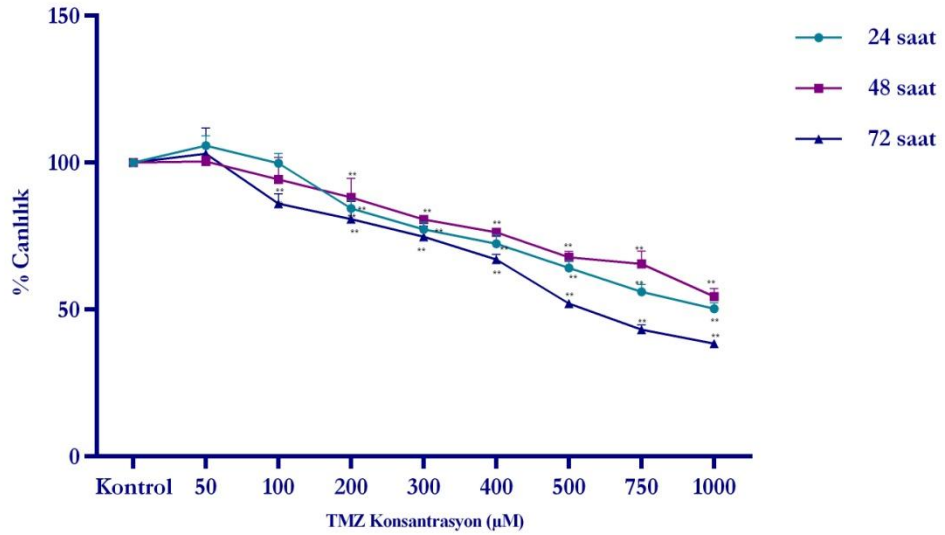
TMZ' in 24. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, minimum doz (50 μ M) TMZ uygulanan U87MG hücrelerinde canlılık oranı % 92,8 belirlenmesine rağmen maksimum doz (1000 μ M) uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 43,5' e azaldığı analiz edildi ($p<0,01$). 48. saatte 50 μ M uygulanan U87MG hücrelerinde canlılık oranı % 86,0 iken, 1000 μ M TMZ uygulandığında canlılık oranının % 48,0' e azaldığı tespit edildi ($p<0,01$). 72. saat sonunda ise minimum dozda canlılık oranı % 79,9 iken, maksimum dozda canlılık oranının % 23,3' e istatistiksel olarak anlamlı azaldığı belirlendi ($p<0,01$). 24, 48 ve 72 saatte 500 μ M TMZ uygulanan U87MG hücrelerinde canlılık oranları sırası ile % 47,7; % 53,7 ve % 38,5 olarak analiz edildi.



Şekil 21. U87MG hücrelerinde TMZ' in 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

4.1.1.2. TMZ' in U138MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

U138MG hücrelerinde TMZ' in sitotoksik etkisi analiz edildiğinde, 24. saatte minimum dozda (50 μ M) canlılık oranı % 105,9 iken, maksimum doz (1000 μ M) uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 50,3' e azaldığı belirlendi ($p<0,01$). 48. saatte ve 72. saatte TMZ' in sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde ise 50 μ M uygulanan U138MG hücrelerinde canlılık oranı sırası ile % 100,4 ve % 103,1 iken, 1000 μ M TMZ uygulandığında canlılık oranının % 54,4 ve % 38,5' e azaldığı tespit edildi ve bu oranın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,01$). 24, 48 ve 72 saat süre ile 500 μ M TMZ uygulanan U138MG hücrelerinde canlılık oranları sırası ile % 64,1; % 67,8 ve % 52,0 olarak belirlendi (Şekil 22).

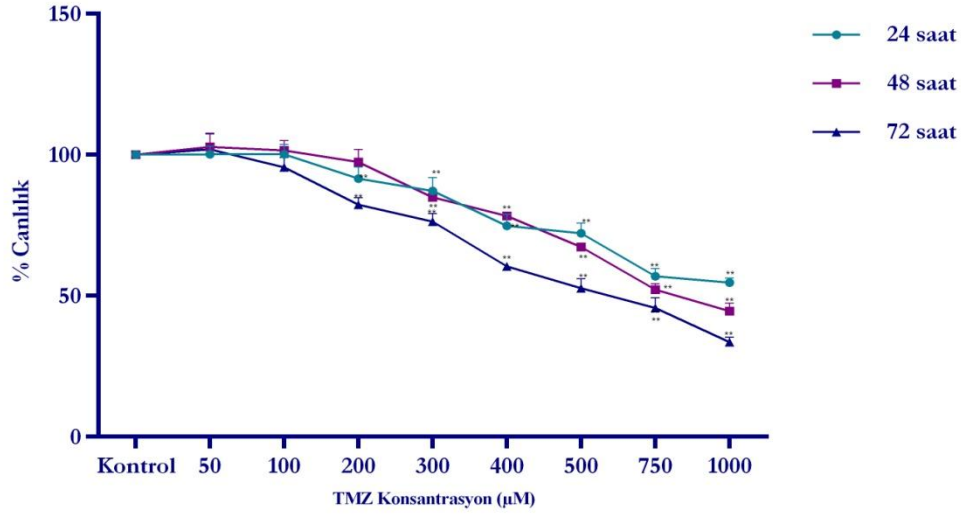


Şekil 22. U138MG hücrelerinde TMZ' in 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

4.1.1.3. TMZ' in T98G Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

T98G hücrelerinde TMZ' in sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 23), 24. saatte minimum dozda (50 μ M) canlılık oranı % 100,2 iken, maksimum doz (1000 μ M) uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 54,7' ye azaldığı belirlendi ($p<0,01$). 48. saatte, 50 μ M TMZ uygulanan T98G hücrelerinde canlılık oranı % 102,8 iken, 1000 μ M TMZ uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 44,5' e azaldığı

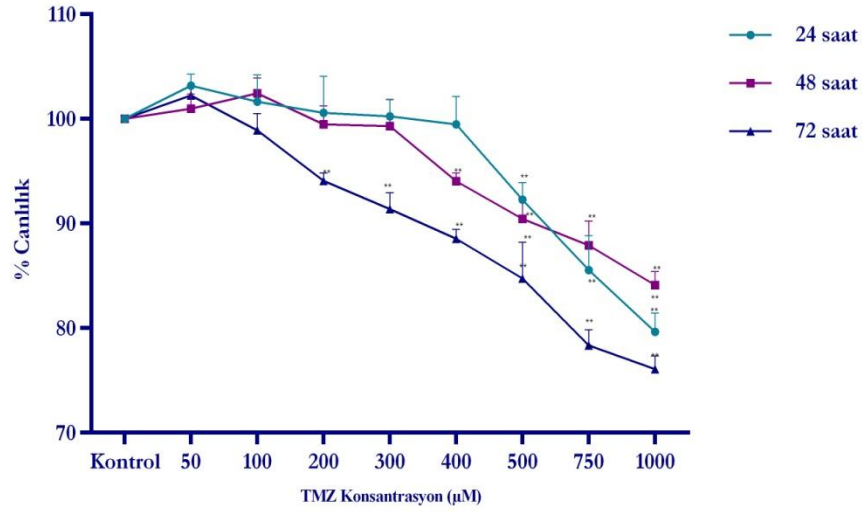
analiz edildi ($p<0,01$). 72. saat sonunda ise minimum dozda canlılık oranı % 101,9 iken, maksimum dozda canlılık oranının % 33,6' ya azaldığı tespit edildi ($p<0,01$). 24, 48 ve 72 saat süre ile 500 μM TMZ uygulanan T98G hücrelerinde canlılık oranları sırası ile % 72,1; % 67,4 ve % 52,7 olarak belirlendi ($p<0,01$).



Şekil 23. T98G hücrelerinde TMZ' in 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

4.1.1.4. TMZ' in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

HUVEC hücrelerinde TMZ' in sitotoksik etkisi incelendiğinde (Şekil 24), 24., 48. ve 72. saatte minimum doz (50 μM) uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırası ile % 103,2; % 101,0 ve % 102,3 iken, maksimum doz (1000 μM) uygulandığında canlılık oranının % 79,7; % 84,1 ve % 76,1 azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu analiz edildi ($p<0,01$). 24, 48 ve 72 saat süre ile 500 μM TMZ uygulanan HUVEC hücrelerinde canlılık oranları sırası ile % 92,3; % 90,4 ve % 84,7 olarak belirlendi ($p<0,01$).



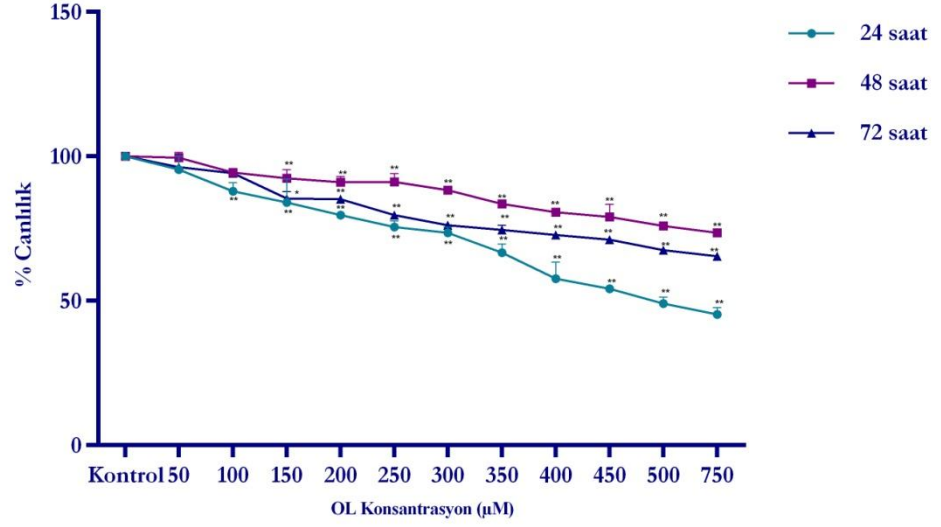
Şekil 24. HUVEC hücrelerinde TMZ' in 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

4.1.2. OL' in Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.2.1. OL' in U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

OL' in U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi doza ve zamana bağlı olarak WST-1 analizi ile gerçekleştirilerek elde edilen bulgular Şekil 25'de sunuldu.

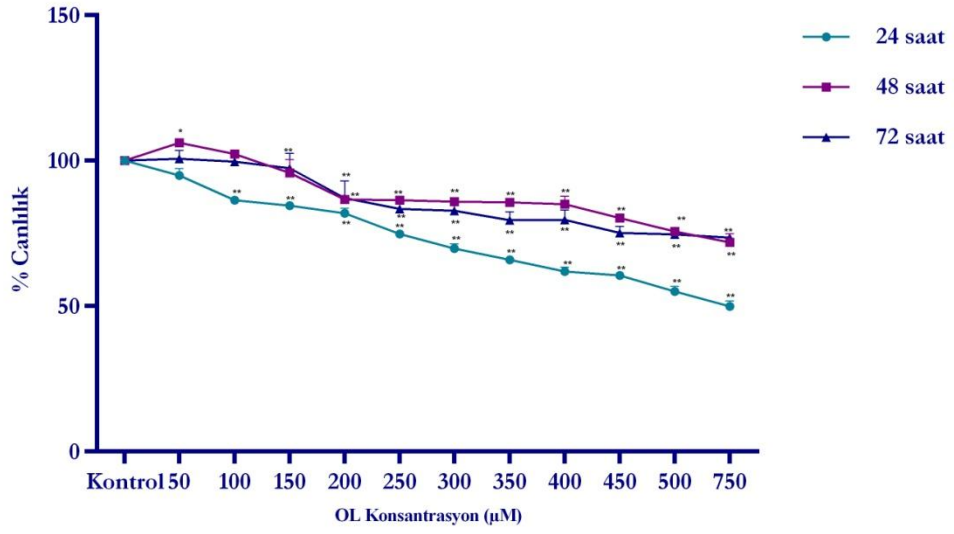
U87MG hücrelerinde OL' in sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 24. saatte minimum dozda (50 µM) canlılık oranının % 95,4 olduğu analiz edilmesine rağmen, maksimum doz (750 µM) uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 45,4' e azaldığı belirlendi (p<0.01). 48. Saatte 50 µM uygulanan U87MG hücrelerinde canlılık oranı % 99,6 iken, 750 µM OL uygulanan hücrelerde canlılık oranın % 73,5' e azaldığı tespit edildi (p<0.01). 72. saat sonunda ise, minimum dozda canlılık oranı %96,4 iken, maksimum dozda canlılık oranının % 65,4' e istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edildi (p<0.01). 24, 48 ve 72 saat süre ile 250 µM ve 500 µM OL uygulanan U87MG hücrelerinde canlılık oranları 250 µM OL için sırası ile % 75,5; % 92,2; % 79,7 ve 500 µM için sırasıyla % 49,1; % 75,9; % 67,5 olarak belirlendi (p<0,01).



Şekil 25. U87MG hücrelerinde OL' in 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

4.1.2.2. OL' in U138MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

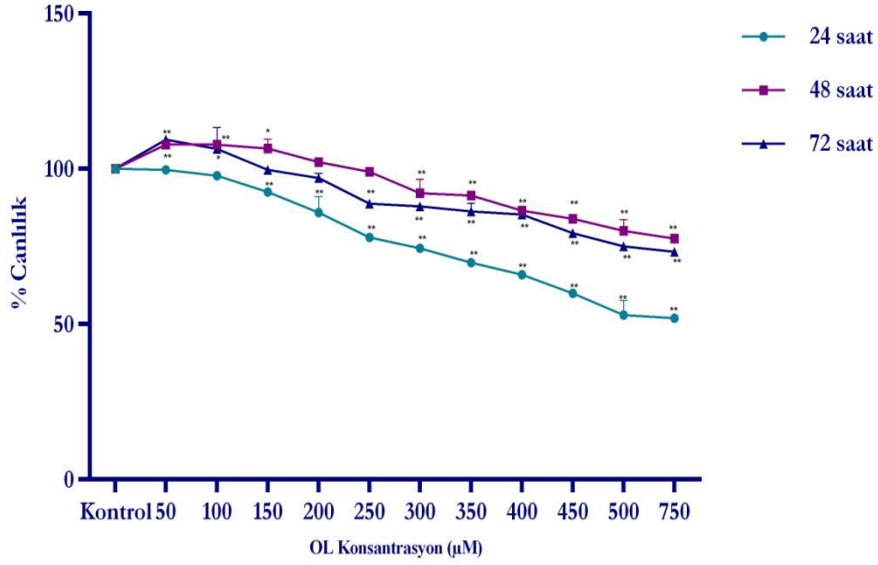
U138MG hücrelerinde OL' in sitotoksik etkisi analiz edildiğinde (Şekil 26), 24. saatte minimum doz (50 µM) uygulanan hücrelerde canlılık oranı % 94,9 iken, maksimum doz (750 µM) uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 49,9' e azaldığı belirlendi. 48. saatte ve 72. saatte OL' in sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde ise, 50 µM uygulanan U138MG hücrelerinde canlılık oranı sırası ile % 106,2 ve % 100,7 iken, 750 µM OL uygulanan hücrelerde canlılık oranının sırası ile % 71,9 ve % 73,5' e azaldığı tespit edildi ve bu oranın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0,01). 24, 48 ve 72 saat süre ile 250 µM ve 500 µM OL uygulanan U138MG hücrelerinde canlılık oranları 250 µM OL için sırası ile % 74,8; % 86,4; % 83,4 ve 500 µM için sırasıyla % 55,1; % 75,7 ve % 74,7 olarak belirlendi (p<0,01).



Şekil 26. U138MG hücrelerinde OL' in 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0.05, **p<0.01).

4.1.2.3. OL' in T98G Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

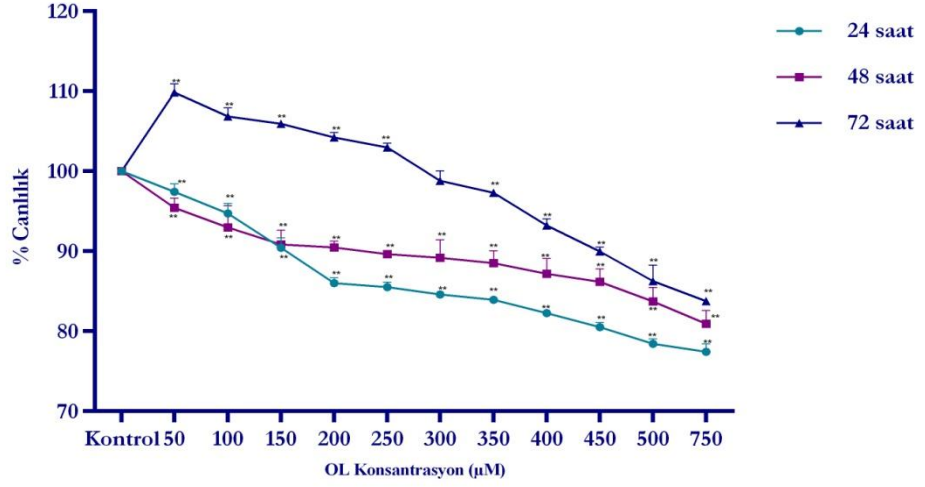
T98G hücrelerinde OL' in sitotoksik etkisi incelendiğinde (Şekil 27), 24., 48. ve 72. saatte minimum doz (50 µM) uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırası ile % 99,7; % 107,8; % 109,5 iken, maksimum doz (750 µM) uygulandığında canlılık oranının % 52,0; % 77,6 ve % 73,3 azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu analiz edildi (p<0.01). 24 saat süre ile 250 µM ve 500 µM OL uygulanan T98G hücrelerinde canlılık oranları 250 µM OL için sırası ile % 77,9 ve 500 µM için sırasıyla % 52,9 olarak belirlendi (p<0.01).



Şekil 27. T98G hücrelerinde OL' in 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0.05, **p<0.01).

4.1.2.4. OL' in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

HUVEC hücrelerinde OL' in sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 28), 24. saatte minimum doz (50 µM) uygulanan hücrelerde canlılık oranı % 97,4 iken, maksimum doz (750 µM) uygulandığında canlılık oranının % 77,5 azaldığı belirlendi (p<0.01). 48. saatte ise 50 µM OL uygulanan HUVEC hücrelerinde canlılık oranı % 95,4 iken, 750 µM OL uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 80,9 azaldığı analiz edildi (p<0.01). 72. saat sonunda ise minimum dozda canlılık oranı % 109,8 iken, maksimum dozda canlılık oranının % 83,8'e azaldığı tespit edildi (p<0.01). 24, 48 ve 72 saat süre ile 500 µM OL uygulanan HUVEC hücrelerinde canlılık oranları sırası ile % 78,4; % 83,7 ve % 86,3 olarak belirlendi (p<0,01). 24 saat süre ile 250 µM ve 500 µM OL uygulanan HUVEC hücrelerinde canlılık oranları 250 µM OL için ile % 85,5 ve 500 µM için % 78,4 olarak belirlendi (p<0,01).



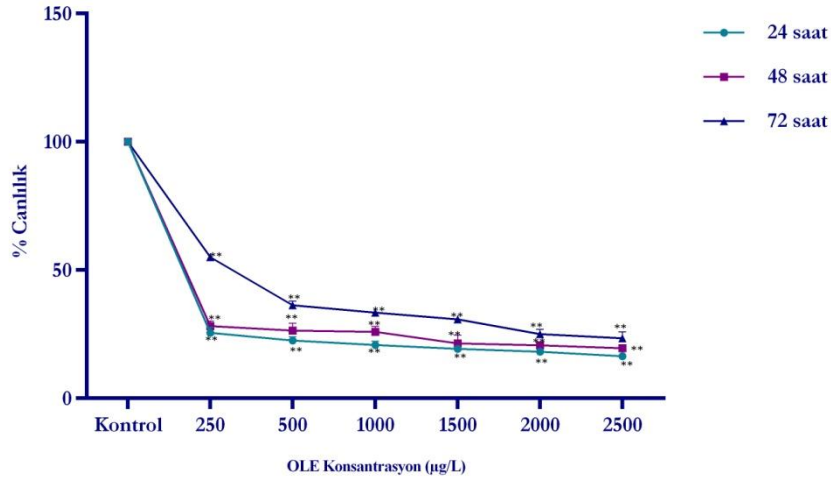
Şekil 28. HUVEC hücrelerinde OL' in 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

4.1.3. OLE' nin Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.3.1. OLE' nin U87MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

OLE' nin U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi doza ve zamana bağlı olarak WST-1 analizi belirlenerek elde edilen sonuçlar Şekil 29'de sunuldu.

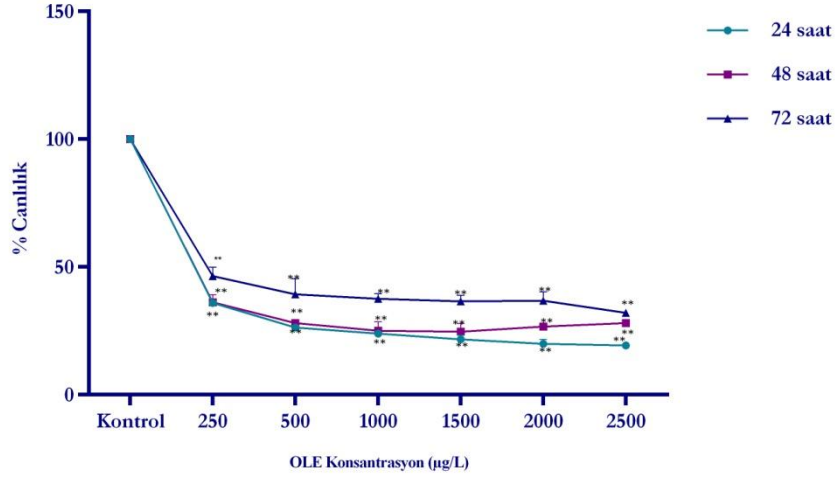
OLE' nin 24. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, minimum doz (250 µg/mL) uygulanan U87MG hücrelerinde canlılık oranı %25,6 olarak belirlenmesine rağmen, maksimum doz (2500 µg/mL) uygulanan hücrelerde canlılık oranının %16,5 azaldığı belirlendi (p<0,01). 48. saatte 250 µg/mL uygulanan U87MG hücrelerinde canlılık oranı %28,2 iken, 2500 µg/mL OLE uygulanan hücrelerde canlılık oranının %19,6'a azaldığı tespit edildi (p<0,01). 72. saat sonunda ise OLE' nin U87MG hücrelerinde sitotoksik etkisi incelendiğinde ise minimum dozda canlılık oranı %55,1 iken, maksimum dozda canlılık oranının %23,4 istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edildi (p<0,01). 24 saat süre ile 500 µg/mL, 1000 µg/mL ve 2000 µg/mL OLE uygulanan U87MG hücrelerinde canlılık oranları sırası ile %22,5; %20,9; %18,2 için belirlendi (p<0,01).



Şekil 29. U87MG hücrelerinde OLE' nin 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

4.1.3.2. OLE' nin U138MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

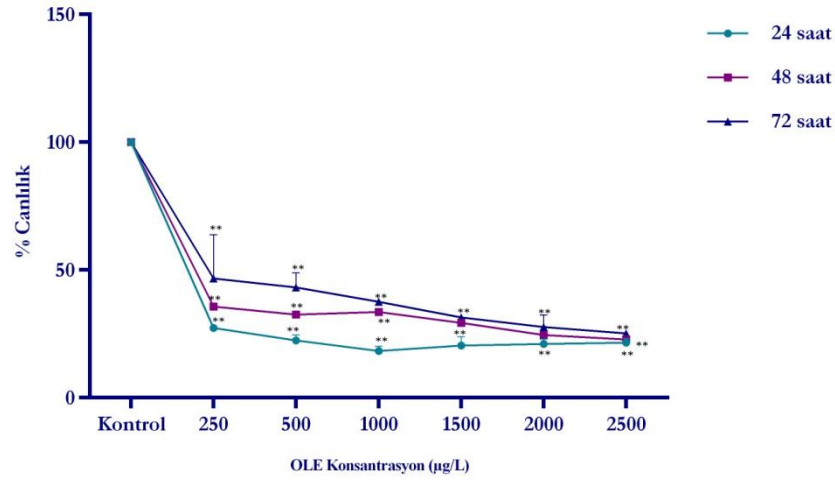
OLE' nin 24. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 30), minimum doz (250 µg/mL) uygulanan U138MG hücrelerinde canlılık oranı % 35,98 olarak belirlenmesine rağmen, maksimum doz (2500 µg/mL) uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 19,3' e azaldığı belirlendi (p<0,01). 48. saatte 250 µg/mL uygulanan U138MG hücrelerinde canlılık oranı % 36,2 iken, 2500 µg/mL OLE uygulanan hücrelerde ise canlılık oranı % 28,1 olduğu tespit edildi (p<0,01). 72. saat sonunda ise, OLE' nin U138MG hücrelerinde sitotoksik etkisi incelendiğinde minimum dozda canlılık oranı % 46,4 iken, maksimum dozda ise canlılık oranının % 32,1 istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edildi (p<0,01). 24 saat süre ile 500 µg/mL, 1000 µg/mL ve 2000 µg/mL OLE uygulanan U138MG hücrelerinde canlılık oranları sırası ile %26,3; %23,9; %19,19 olarak belirlendi (p<0,01).



Şekil 25. U138MG hücrelerinde OLE' nin 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

4.1.3.3. OLE' nin T98G Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

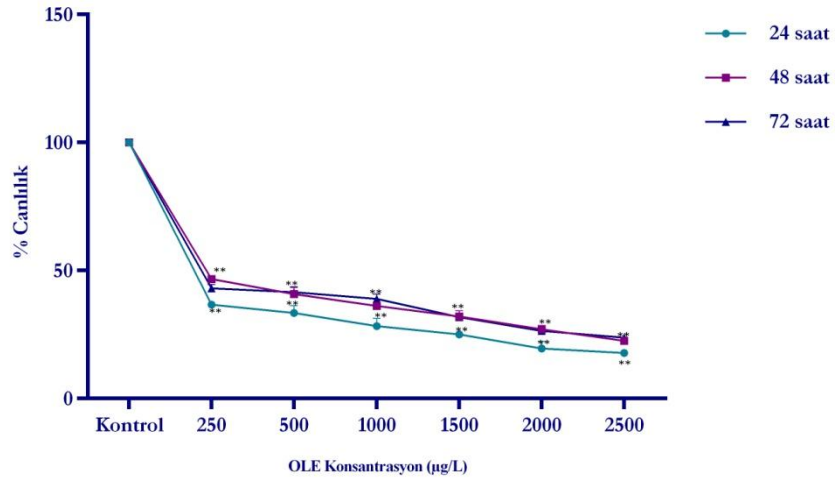
OLE' nin 24. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 31), minimum doz (250 µg/mL) uygulanan T98G hücrelerinde canlılık oranı % 27,3 olarak belirlenmesine rağmen, maksimum doz (2500 µg/mL) uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 21,6 olduğu belirlendi (p<0,01). 48. saatte 250 µg/mL uygulanan T98G hücrelerinde canlılık oranı % 35,7 iken, 2500 µg/mL OLE uygulandığında canlılık oranının % 22,8'e azaldığı tespit edildi (p<0,01). 72. saat sonunda ise, OLE' nin T98G hücrelerinde sitotoksik etkisi incelendiğinde minimum dozda canlılık oranı % 46,7 iken, maksimum dozda canlılık oranının % 25,1'e istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edildi (p<0,01). 24 saat süre ile 500 µg/mL 1000 µg/mL ve 2000 µg/mL OLE uygulanan T98G hücrelerinde canlılık oranları sırası ile %22,5; %18,3; %21,0 olarak belirlendi (p<0,01).



Şekil 31. T98G hücrelerinde OLE' nin 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0.05, **p<0.01).

4.1.3.4. OLE' nin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

OLE' nin 24. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 32), minimum doz (250 µg/mL) uygulanan HUVEC hücrelerinde canlılık oranı % 36,7 olarak belirlenmesine rağmen, maksimum doz (2500 µg/mL) uygulanan hücrelerde canlılık oranının % 17,9' a azaldığı belirlendi (p<0,01). 48. saatte 250 µg/mL uygulanan HUVEC hücrelerinde canlılık oranı % 46,7 iken, 2500 µg/mL OLE uygulandığında canlılık oranının % 22,6' ya azaldığı tespit edildi (p<0,01). 72. saat sonunda ise, OLE' nin HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkisi incelendiğinde minimum dozda canlılık oranı % 43,1 iken, maksimum dozda canlılık oranının % 23,8' e istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edildi (p<0.01).). 24 saat süre ile 500 µg/mL, 1000 µg/mL ve 2000 µg/mL OLE uygulanan HUVEC hücrelerinde canlılık oranları sırası ile %33,4; %28,3; %19,5 olarak belirlendi (p<0.01).

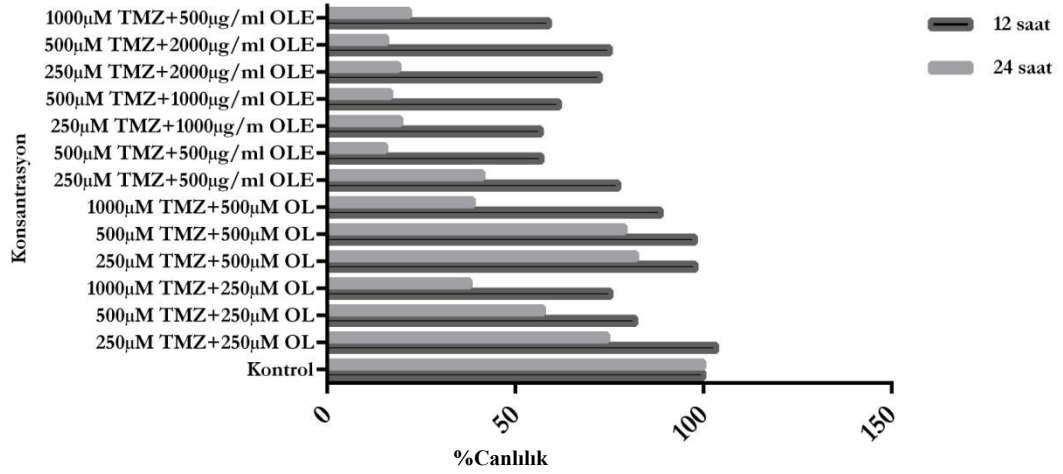


Şekil 32. HUVEC hücrelerinde OLE' nin 24, 48 ve 72. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

4.1.4. TMZ, OL ve OLE' nin Hücre Hatları Üzerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.4.1. TMZ, OL ve OLE' nin U87MG Hücrelerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

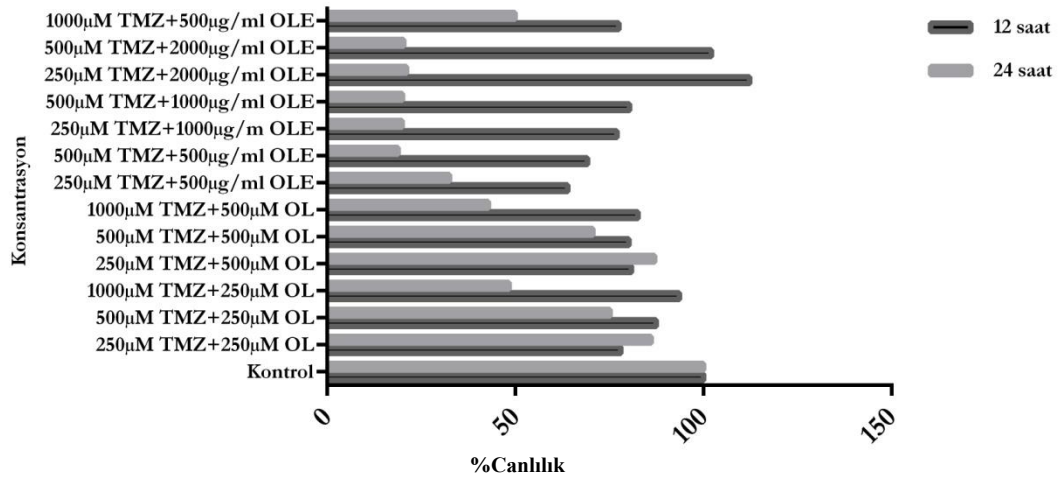
TMZ, OL ve OLE' nin U87MG üzerinde kombin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 32), 1000 µM TMZ+500 µM OL uygulanan hücrelerde 24. saatteki canlılık oranı % 38,7 olarak belirlenmesine rağmen, 500 µM TMZ+500µg/mL OLE uygulanan hücrelerde canlılık oranı % 36,6 olarak belirlendi (p<0,01).



Şekil 32. U87MG hücrelerinde TMZ, OL ve OLE' nin 12 ve 24 saatte kombin sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0.05, **p<0.01).

4.1.4.2. TMZ, OL ve OLE' nin U138MG Hücrelerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

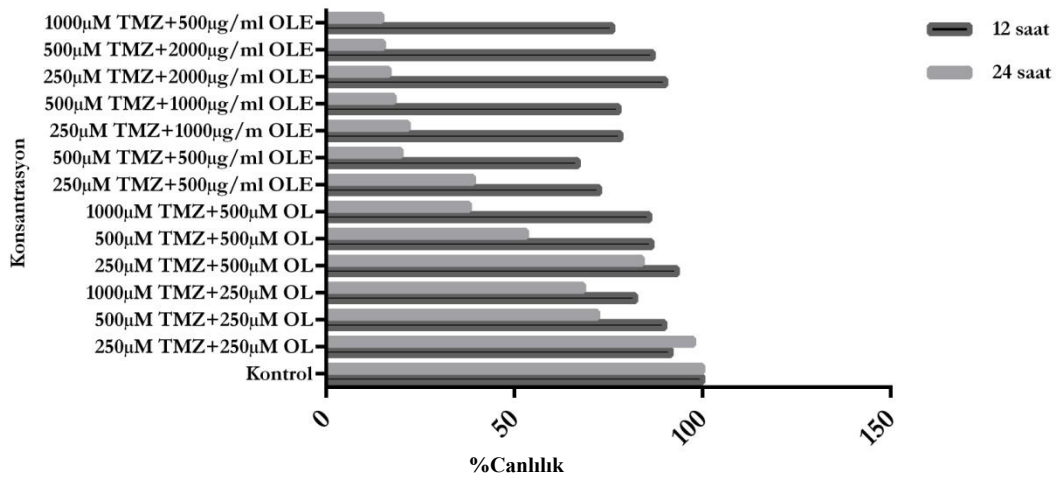
TMZ, OL ve OLE' nin U138MG hücrelerinde kombin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 33), 1000 µM TMZ+500 µM OL uygulanan hücrelerde 24. saatteki canlılık oranı % 63,1 olarak belirlenmesine rağmen, TMZ 500 µM+OLE 500µg/mL uygulanan hücrelerde canlılık oranı % 37,3 olarak belirlendi (p<0.01).



Şekil 33. U138MG hücrelerinde TMZ, OL ve OLE' nin 12 ve 24 saatte kombin sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

4.1.4.3. TMZ, OL ve OLE' nin T98G Hücrelerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

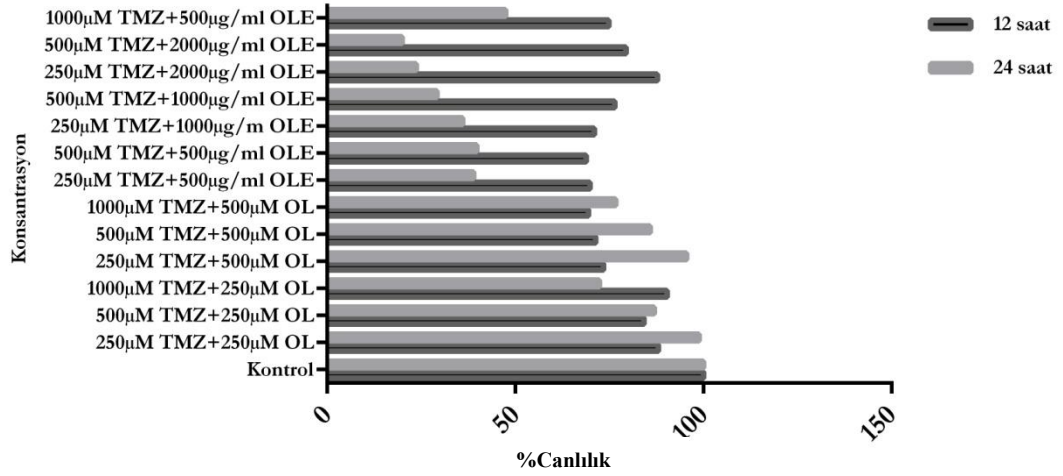
TMZ, OL ve OLE' nin T98G hücrelerinde kombin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 34), 1000 µM TMZ+500 µM OL uygulanan hücrelerde 24. saatteki canlılık oranı % 38,0 olarak belirlenmesine rağmen, 500 µM TMZ+500µg/mL OLE uygulanan hücrelerde canlılık oranı % 19,8 olarak belirlendi (p<0.01).



Şekil 34. T98G hücrelerinde TMZ, OL ve OLE' nin 12 ve 24 saatte kombin sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

4.1.4.3. TMZ, OL ve OLE' nin HUVEC Hücrelerinde Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

TMZ, OL ve OLE' nin HUVEC hücrelerinde kombin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 34), 1000 µM TMZ + 500 µM OL uygulanan hücrelerde 24. saatteki canlılık oranı % 51,9 olarak belirlenmesine rağmen, 500 µM TMZ+500µg/mL OLE uygulanan hücrelerde canlılık oranı % 53,8 olarak belirlendi (p<0,01).



Şekil 34. HUVEC hücrelerinde TMZ, OL ve OLE' nin 12 ve 24 saatte kombin sitotoksik etkisinin belirlenmesi (*p<0,05, **p<0,01).

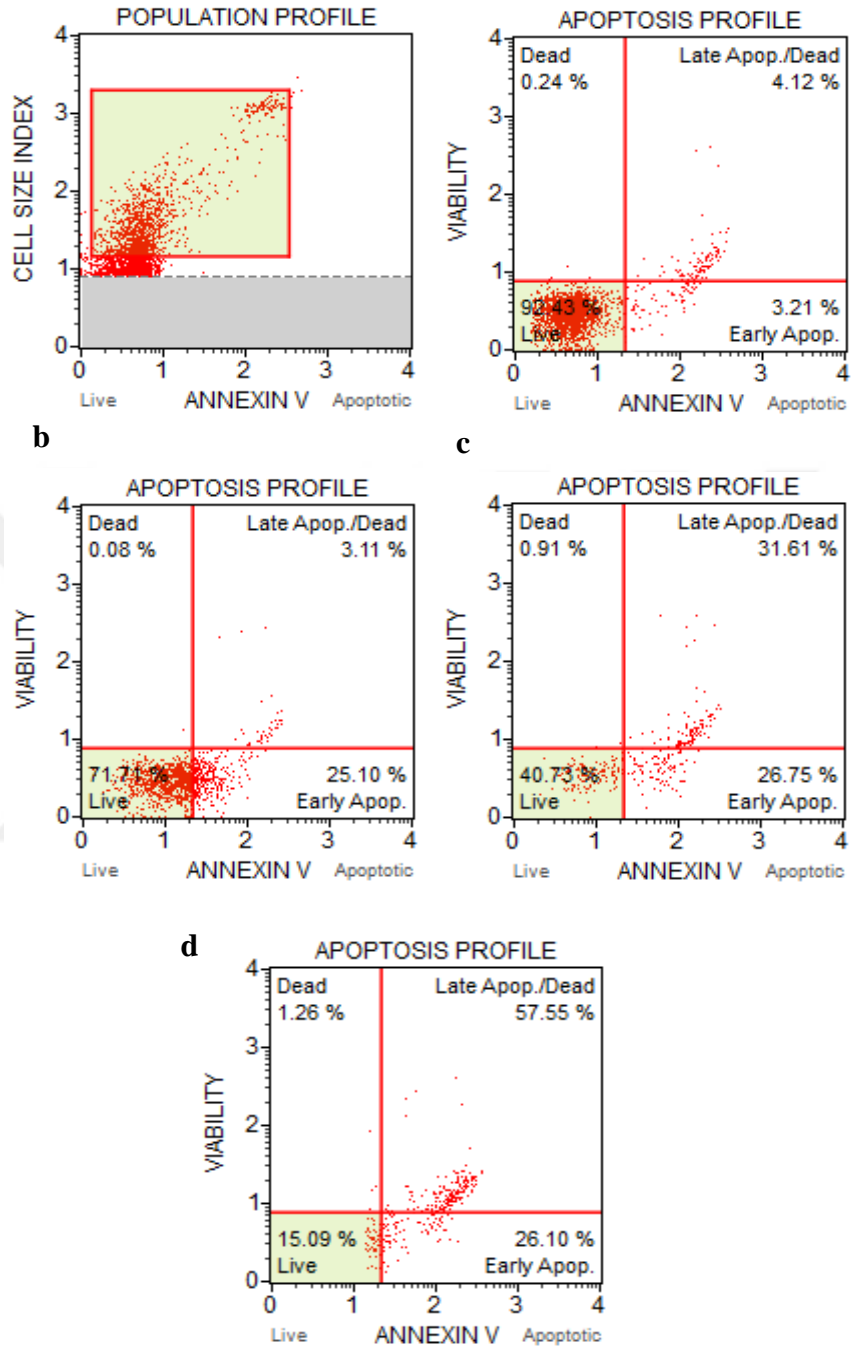
4.2. Hücrelerde Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

4.2.1. TMZ' in Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

4.2.1.1. TMZ' in U87MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik etkinin belirlenmesi için WST-1 sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda 72. saat sonunda 250, 500, 1000 µM TMZ' in apoptotik etkisi Annexin V analizi ile değerlendirildi ve elde edilen veriler Şekil 35' de sunuldu.

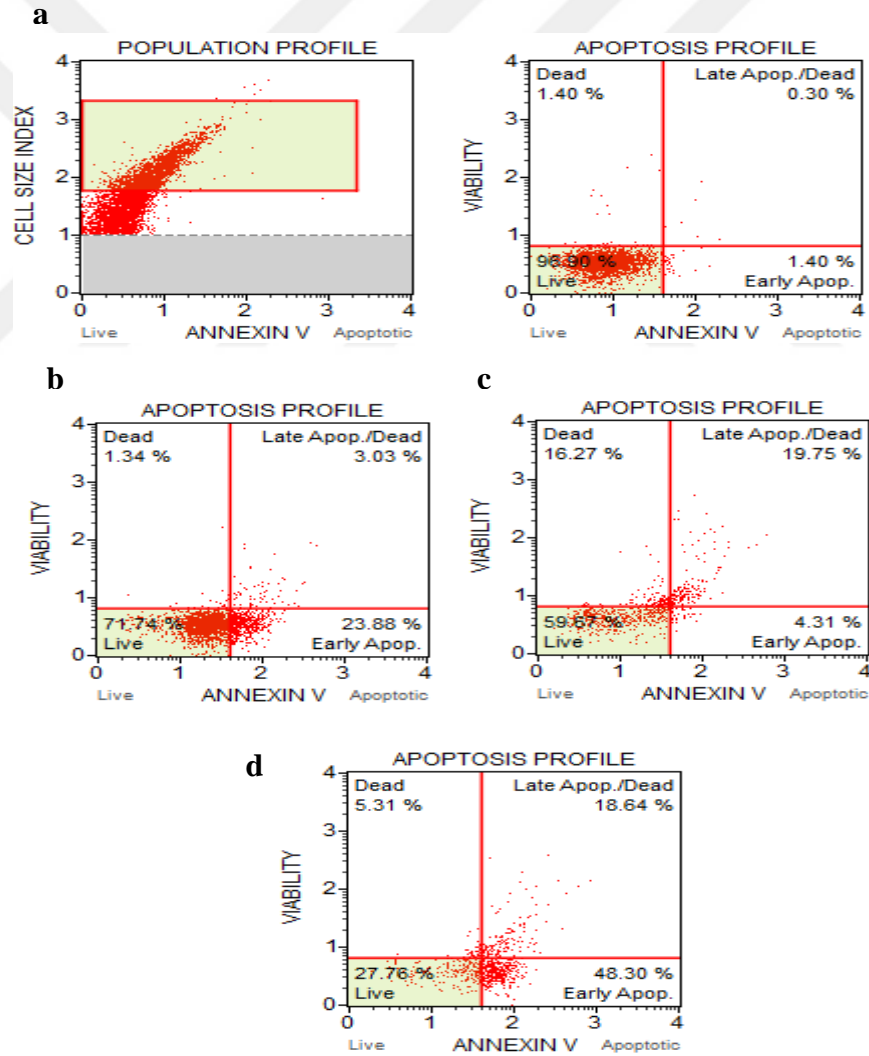
U87MG hücrelerinde TMZ' in apoptotik etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 250 µM TMZ uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %25,1; %3,11; %0,08 iken, 500 µM TMZ uygulandığında sırasıyla %26,75; %31,61 ve %0,91 olarak belirlendi. 1000 µM TMZ uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %26,1; %57,55 ve %1,26 olarak analiz edildi.



Şekil 35. U87MG hücrelerinde TMZ' in apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 250 μ M, (c) 500 μ M ve (d) 1000 μ M.

4.2.1.2. TMZ' in U138MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

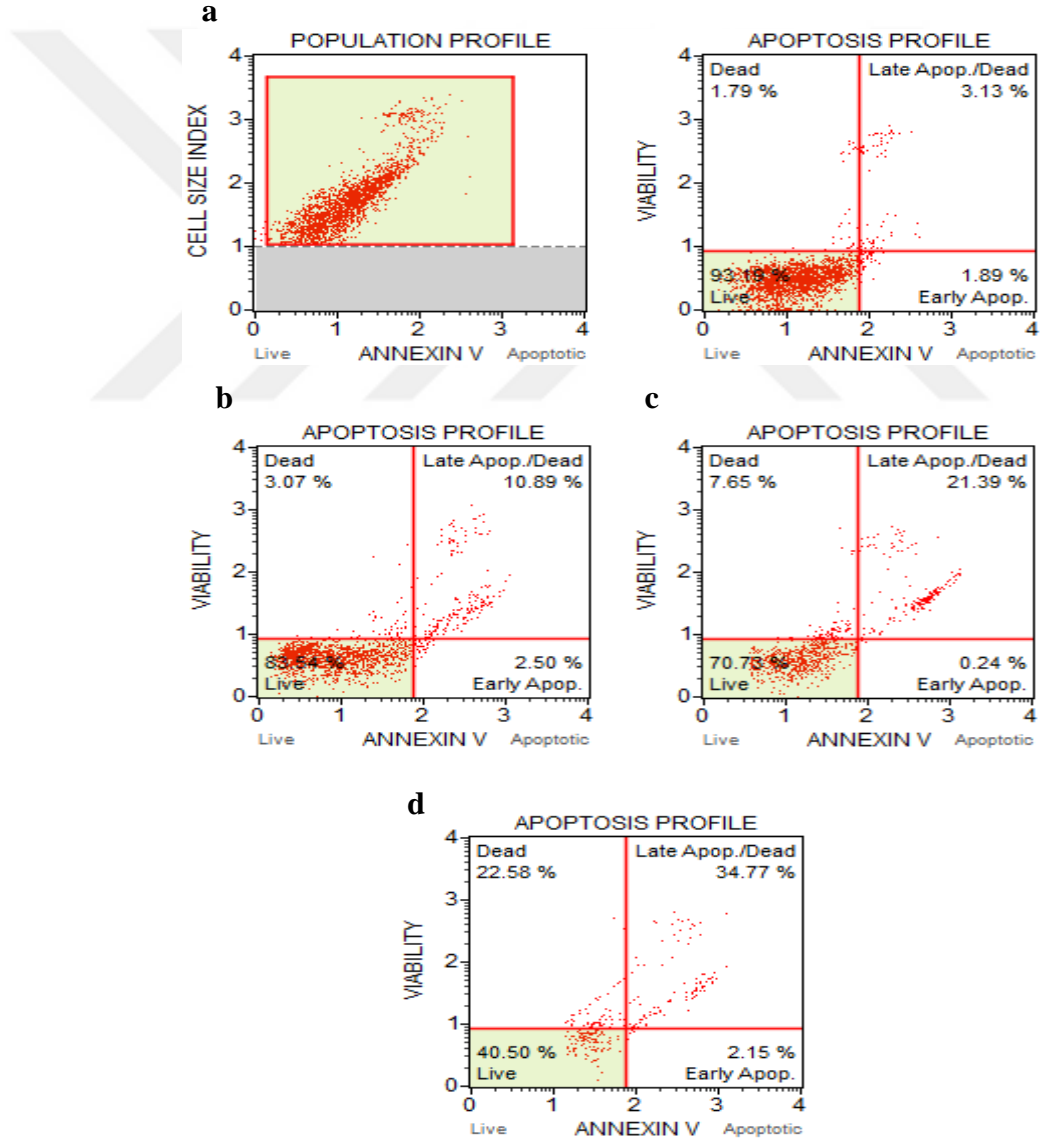
U138MG hücrelerinde apoptotik etki 72 saat sonunda TMZ konsantrasyonları için 250, 500, 1000 μM olacak şekilde analiz edilerek Şekil 36'da sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 250 μM TMZ uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %23,88; %3,03; %1,34 iken, 500 μM TMZ uygulandığında sırasıyla %4,31; %19,75 ve %16,27 olarak belirlendi. 1000 μM TMZ uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %48,30; %18,64 ve %5,31 olarak analiz edildi.



Şekil 36. U138MG hücrelerinde TMZ' in apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 250 μM , (c) 500 μM ve (d) 1000 μM .

4.2.1.3. TMZ' in T98G Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

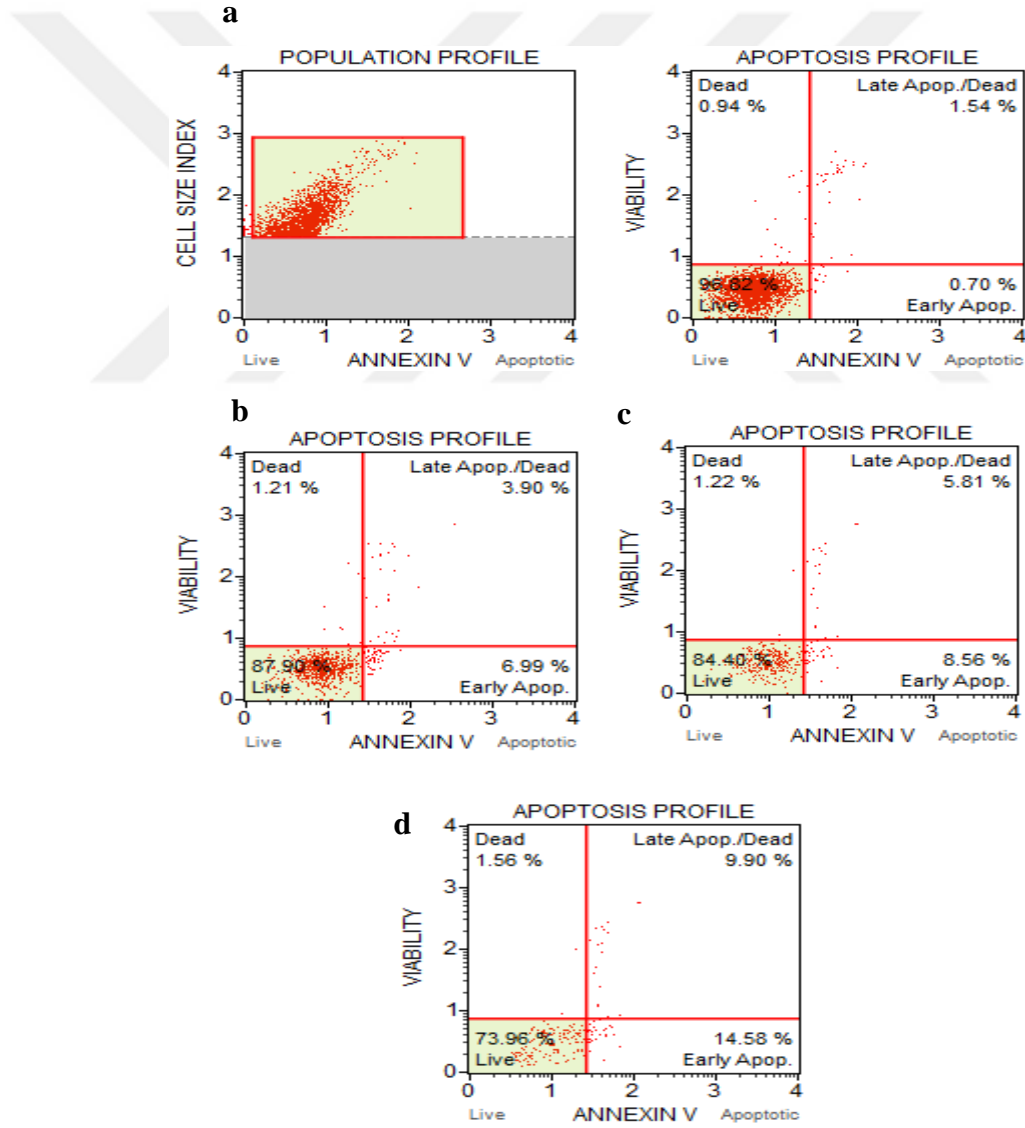
TMZ konsantrasyonları için 250, 500, 1000 μM olacak şekilde T98G hücrelerindeki apoptotik etki 72 saat sonunda analiz edilerek Şekil 37'de sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 250 μM TMZ uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %2,5; %10,89; %3,07 iken, 500 μM TMZ uygulandığında sırasıyla %0,24; %21,39 ve %7,65 olarak belirlendi. 1000 μM TMZ uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %2,15; %34,77 ve %22,58 olarak analiz edildi.



Şekil 37. T98 hücrelerinde TMZ' in apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 250 μM , (c) 500 μM ve (d) 1000 μM .

4.2.1.4. TMZ' in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

HUVEC hücrelerinde apoptotik etki 250, 500, 1000 μM TMZ konsantrasyonlarında 72 saat sonunda analiz edilerek Şekil 38'te sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 250 μM TMZ uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %6,99; %3,9; %1,21 iken, 500 μM TMZ uygulandığında sırasıyla %8,56; %5,81 ve %1,22 olarak belirlendi. 1000 μM TMZ uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %14,58, %9,9 ve %1,56 olarak analiz edildi.



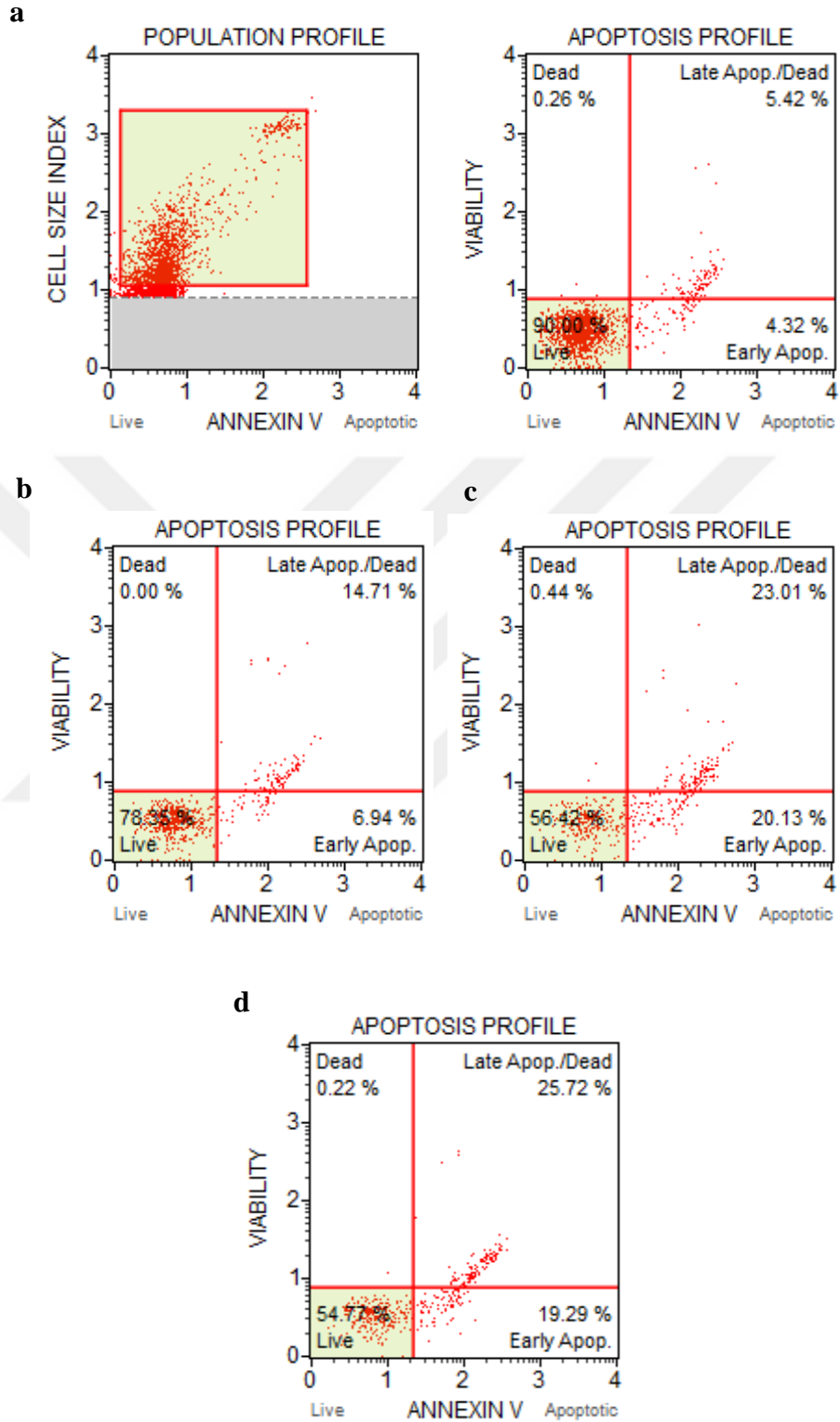
Şekil 38. HUVEC hücrelerinde TMZ' in apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 250 μM , (c) 500 μM ve (d) 1000 μM .

4.2.2. OL' in Hücree Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

4.2.2.1. OL' in U87MG Hücreeeri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

U87MG hücreeeri üzerindeki apoptotik etkinin belirlenmesi için WST-1 sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda 24. saat sonunda 250, 500, 750 µM OL' in apoptotik etkisi Annexin V analizi ile değerlendirildi ve elde edilen veriler Şekil 39'da sunuldu.

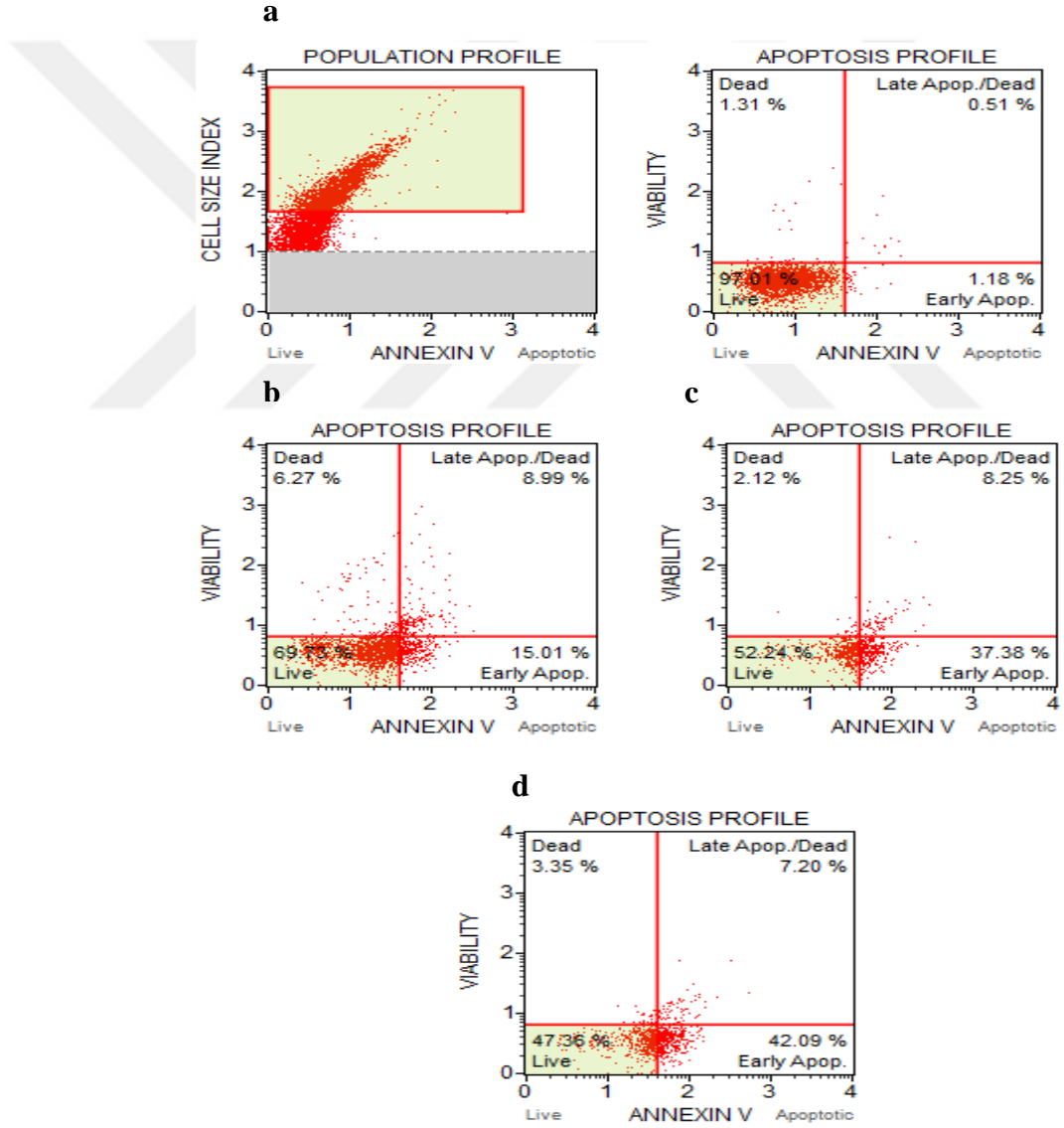
U87MG hücreeerinde 250, 500 ve 750 µM OL' in apoptotik etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 250 µM OL uygulanan hücreeerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %6,94; %14,71; %0 iken, 500 µM OL uygulandığında sırasıyla %20,13; %23,01 ve %0,44 olarak belirlendi. 750 µM OL uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %19,29; %25,72 ve %0,22 olarak analiz edildi.



Şekil 39. U87MG hücrelerinde OL' in apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 250 μ M, (c) 500 μ M ve (d) 750 μ M.

4.2.2.2. OL' in U138MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

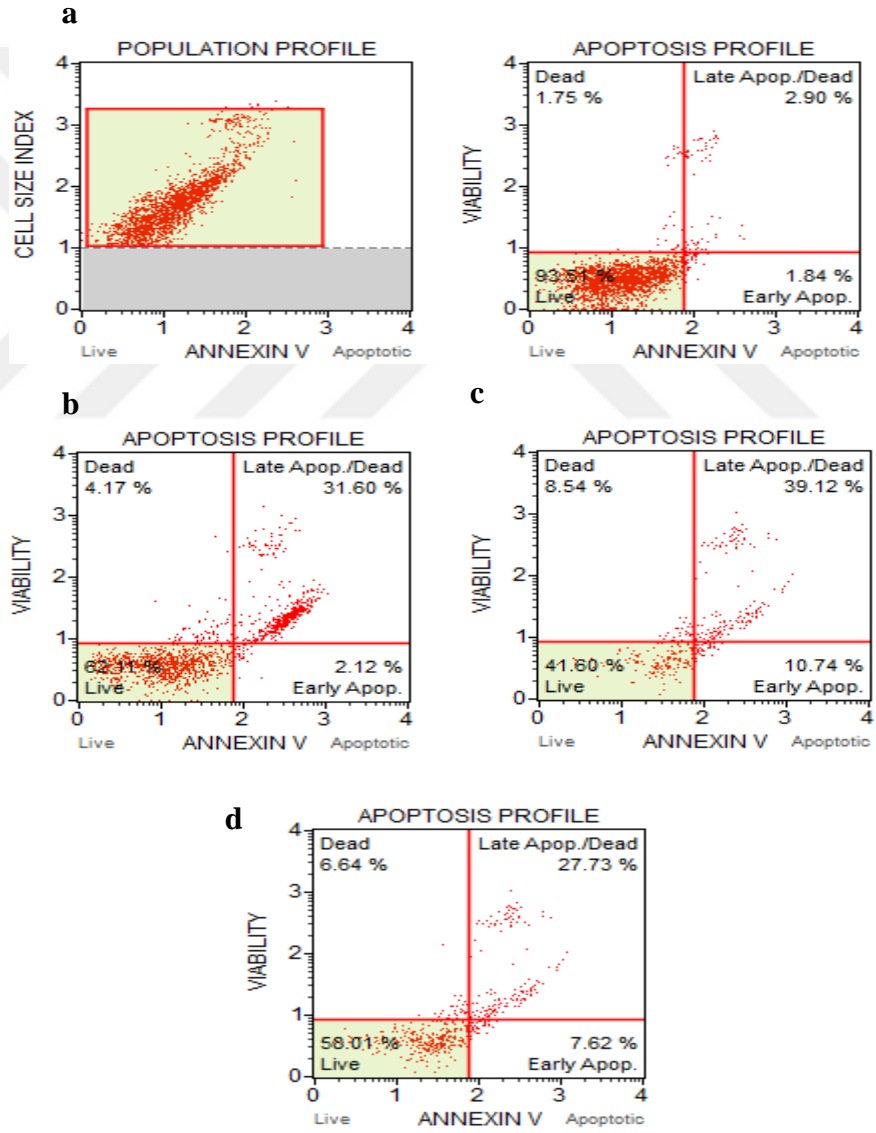
OL' in 24. saat sonunda 250, 500, 750 μM OL konsantrasyonu olacak şekilde U138MG hücrelerindeki apoptotik etkisi Şekil 40'de sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 250 μM OL uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %15,01; %8,99; %6,27 iken, 500 μM OL uygulandığında sırasıyla %37,38; %8,25 ve %2,12 olarak belirlendi. 750 μM OL uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %42,09; %7,20 ve %3,35 olarak analiz edildi.



Şekil 40. U138MG hücrelerinde OL' in apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 250 μM , (c) 500 μM ve (d) 750 μM .

4.2.2.3. OL' in T98G Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

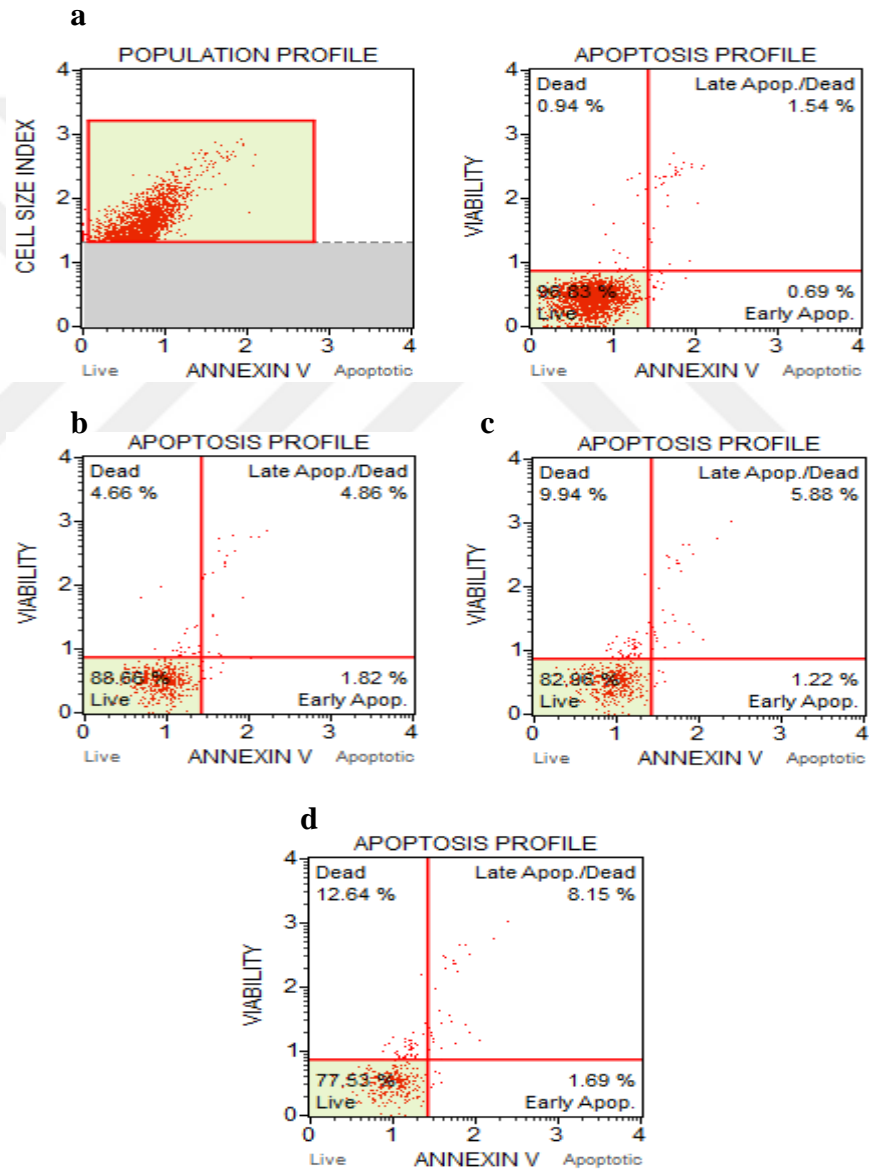
OL' in 24. saat sonunda 250, 500, 750 μM konsantrasyonlarının T98G hücrelerindeki üzerinde oluşturduğu apoptotik etki Şekil 41'de sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 250 μM OL uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %2,12; %31,60, %4,17 iken, 500 μM OL uygulandığında sırasıyla %10,74; %39,12 ve %8,54 olarak belirlendi. 750 μM OL uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %7,62; %27,73 ve %6,64 olarak analiz edildi.



Şekil 41. T98G hücrelerinde OL' in apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 250 μM , (c) 500 μM ve (d) 750 μM .

4.2.2.4. OL' in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

24. saat sonunda 250, 500, 750 μM OL'nin HUVEC hücrelerindeki apoptotik etkisi Şekil 42'de sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 250 μM OL uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %1,82; %4,86, %4,66 iken, 500 μM OL uygulandığında sırasıyla %1,22; %5,88 ve %9,94 olarak belirlendi. 750 μM OL uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %1,69; %8,15 ve %12,64 olarak analiz edildi.



Şekil 42. HUVEC hücrelerinde OL' in apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 250 μM , (c) 500 μM ve (d) 750 μM .

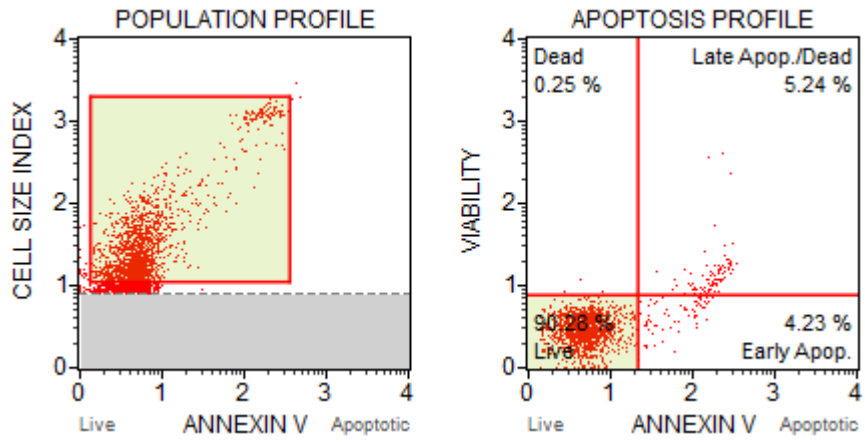
4.2.3. OLE' nin Hücree Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

4.2.3.1. OLE' nin U87MG Hücreeeri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

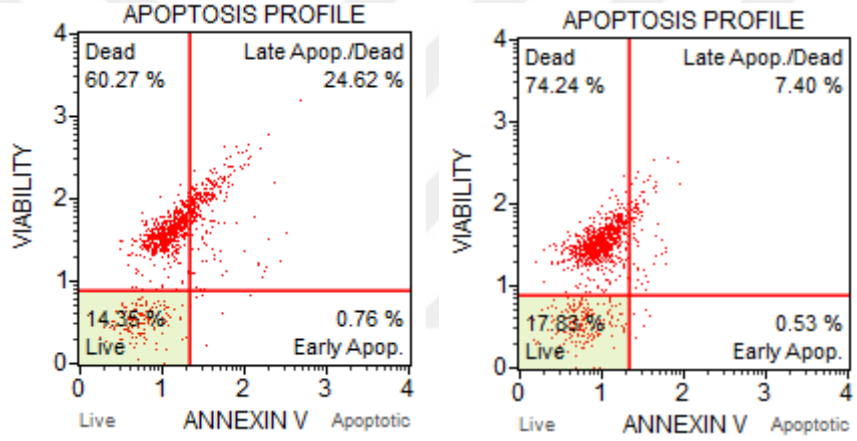
U87MG hücreeeri üzerindeki apoptotik etkinin belirlenmesi için WST-1 sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda 24. saat sonunda 500, 1000, 2000 µg/ml OLE' nin apoptotik etkisi Annexin V analizi ile değerlendirildi ve elde edilen veriler Şekil 43'da sunuldu.

U87MG hücreeerinde 500, 1000, 2000 µg/ml OLE' nin apoptotik etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 500 µg/ml OLE uygulanan hücreeerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0,76; %24,62, %60,27 iken, 1000 µg/ml OLE uygulandığında sırasıyla %0,53; %7,40 ve %74,24 olarak belirlendi. 2000 µg/ml OLE uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0,42; %6,90 ve %72,34 olarak analiz edildi.

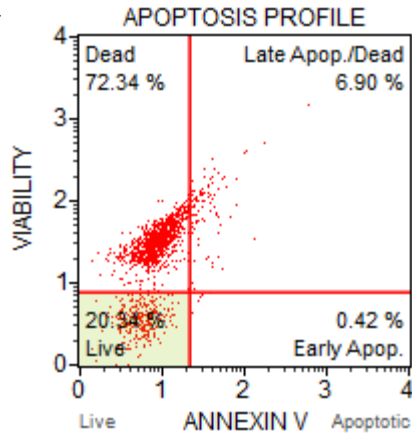
a



b



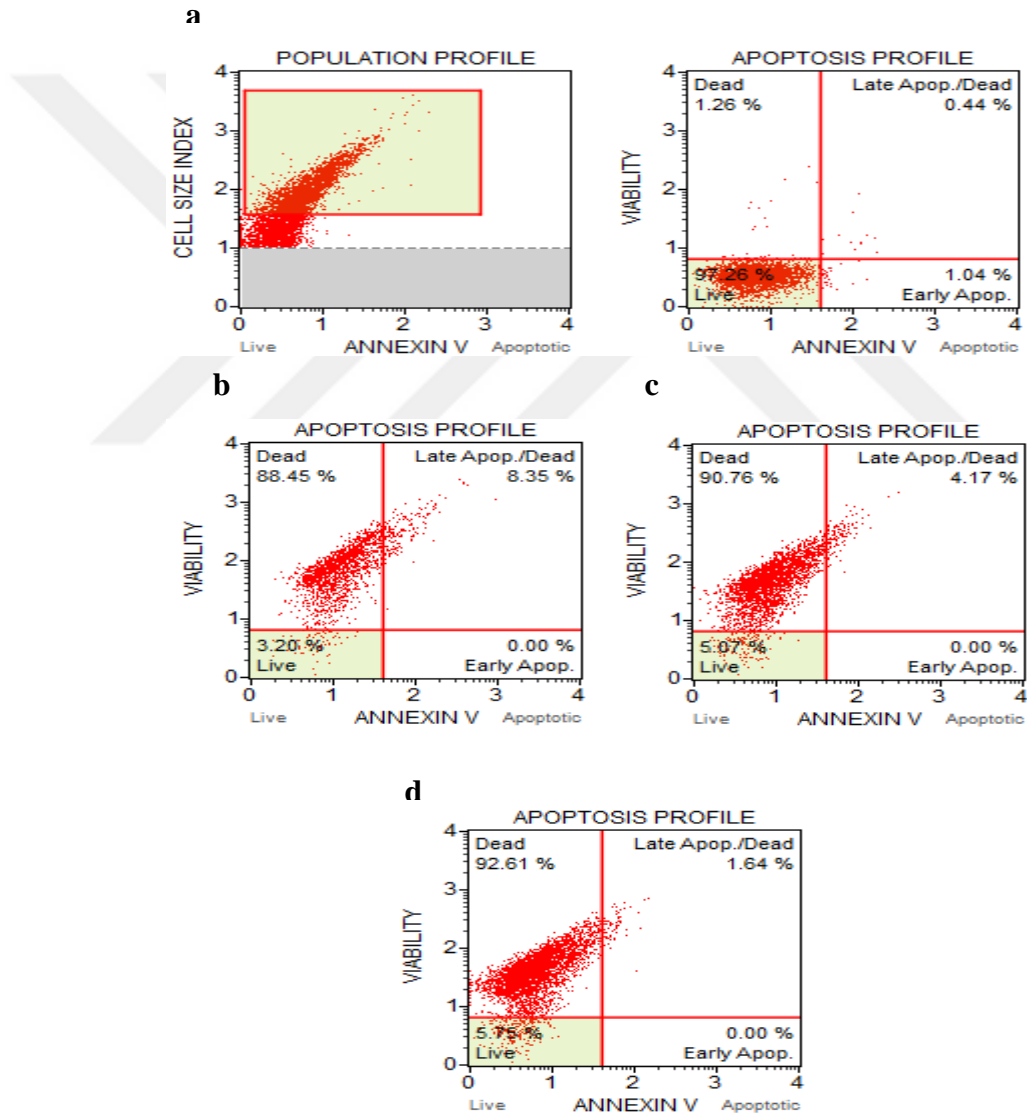
d



Şekil 43. U87 hücrelerinde OLE' nin apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 500 µg/ml, (c) 1000 µg/ml ve (d) 2000 µg/ml.

4.2.3.2. OLE' nin U138MG Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

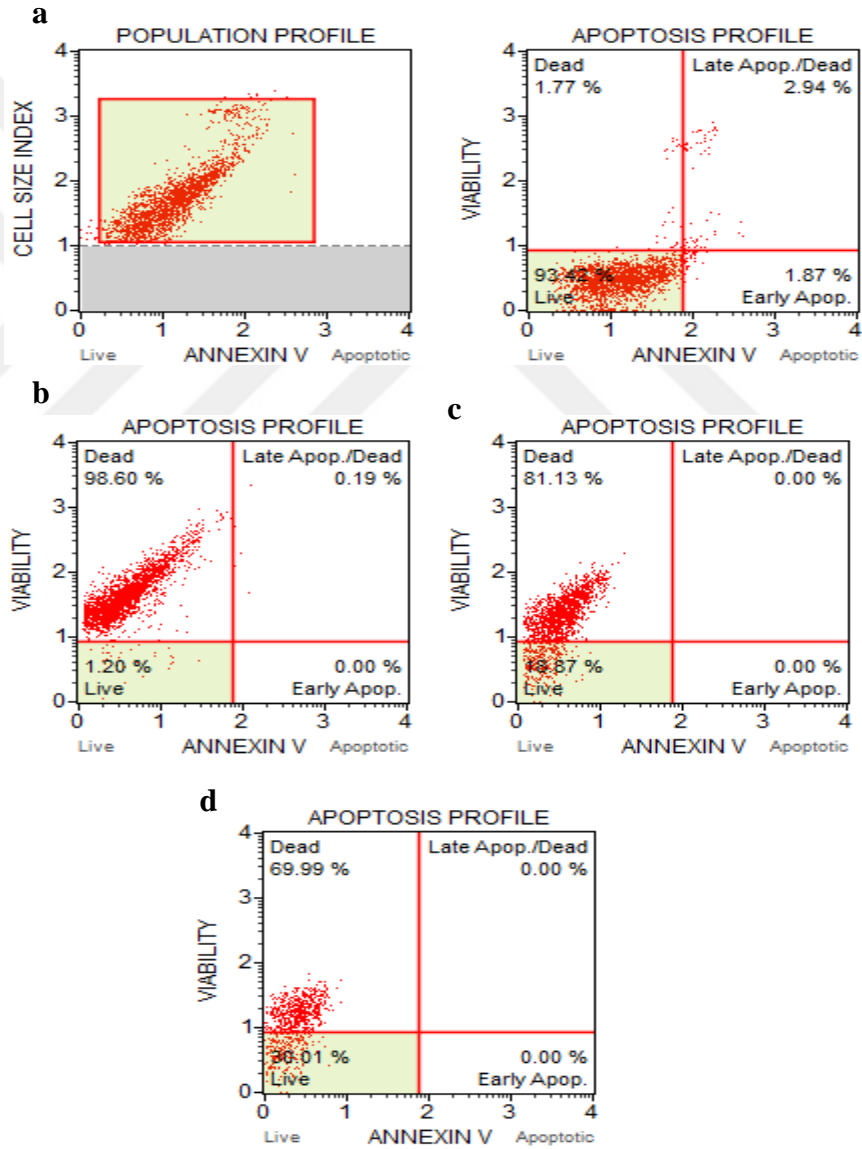
500, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$ OLE' nin U138MG hücrelerindeki 24 saatteki apoptotik etkisi Şekil 41'de sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 500 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0; %8,35; %88,45 iken, 1000 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulandığında sırasıyla %0; %4,17 ve %90,76 olarak belirlendi. 2000 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0; %1,64 ve %92,61 olarak analiz edildi.



Şekil 44. U138 hücrelerinde OLE' nin apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 500 $\mu\text{g/ml}$, (c) 1000 $\mu\text{g/ml}$ ve (d) 2000 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3.3. OLE' nin T98G Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

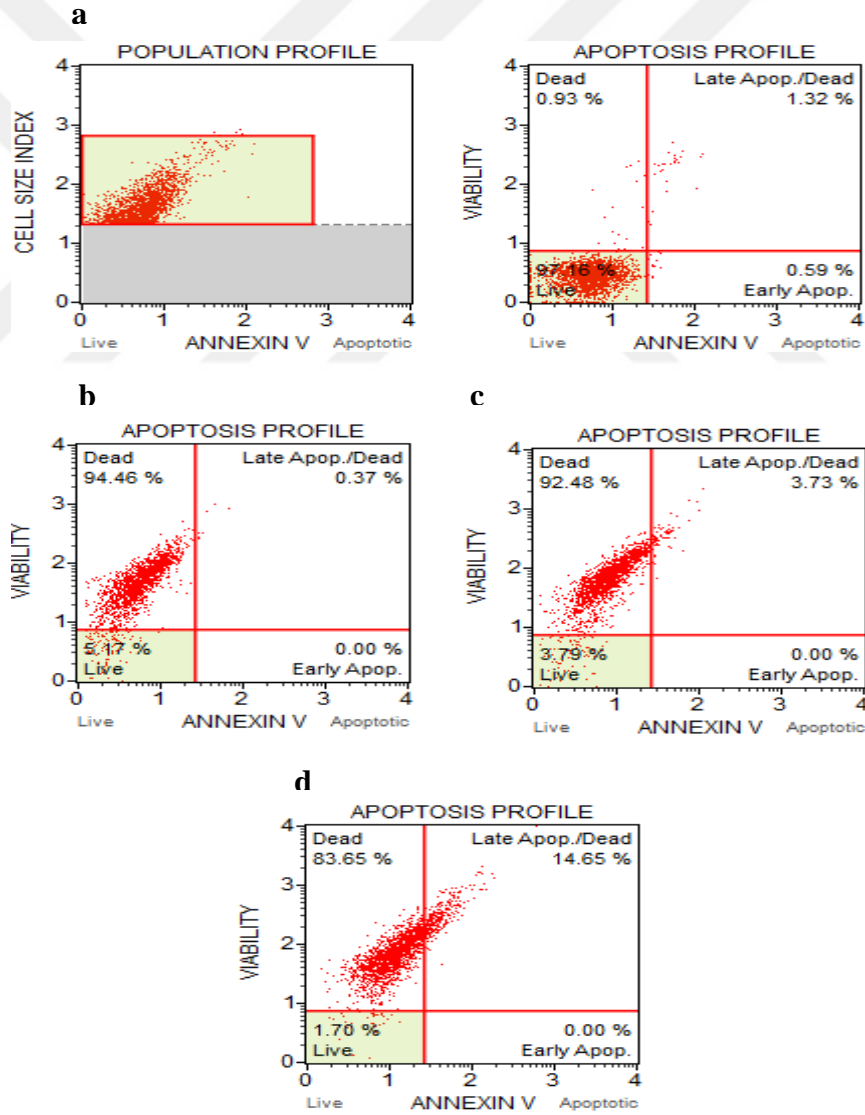
24. saat sonunda 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$ OLE' nin T98G hücrelerindeki apoptotik etkisi Şekil 45'de sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 500 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0; %0,19; %98,60 iken, 1000 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulandığında sırasıyla %0; %0 ve %81,13 olarak belirlendi. 2000 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0; %0 ve %69,99 olarak analiz edildi.



Şekil 45. T98 hücrelerinde OLE' nin apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 500 $\mu\text{g/ml}$, (c) 1000 $\mu\text{g/ml}$ ve (d) 2000 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3.4. OLE' nin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

HUVEC hücrelerinde apoptotik etki 24 saat sonunda OLE konsantrasyonları için 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde analiz edilerek Şekil 46'te sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 500 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0; %0,37; %94,46 iken, 1000 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulandığında sırasıyla %0; %3,73 ve %92,48 olarak belirlendi. 2000 $\mu\text{g/ml}$ OLE uygulandığında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0; %14,65 ve %83,65 olarak analiz edildi.

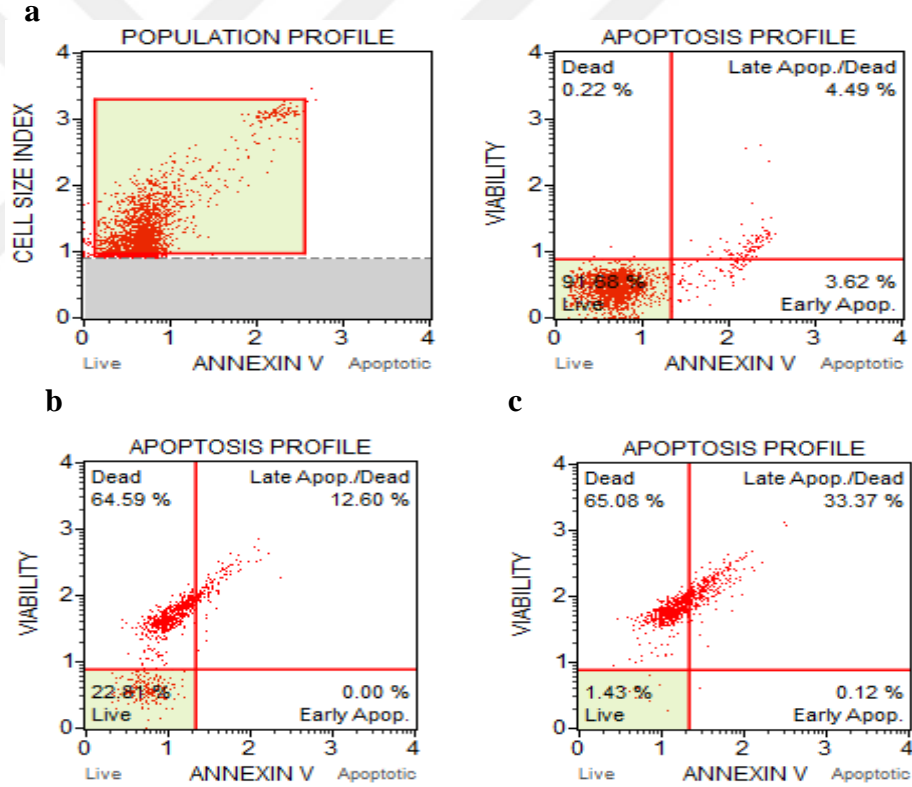


Şekil 46. HUVEC hücrelerinde OLE' nin apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 500 $\mu\text{g/ml}$, (c) 1000 $\mu\text{g/ml}$ ve (d) 2000 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.4. TMZ, OL ve OLE' nin Hücre Hatları Üzerindeki Kombin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

4.2.4.1. TMZ, OL ve OLE' nin U87MG Üzerindeki Kombin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

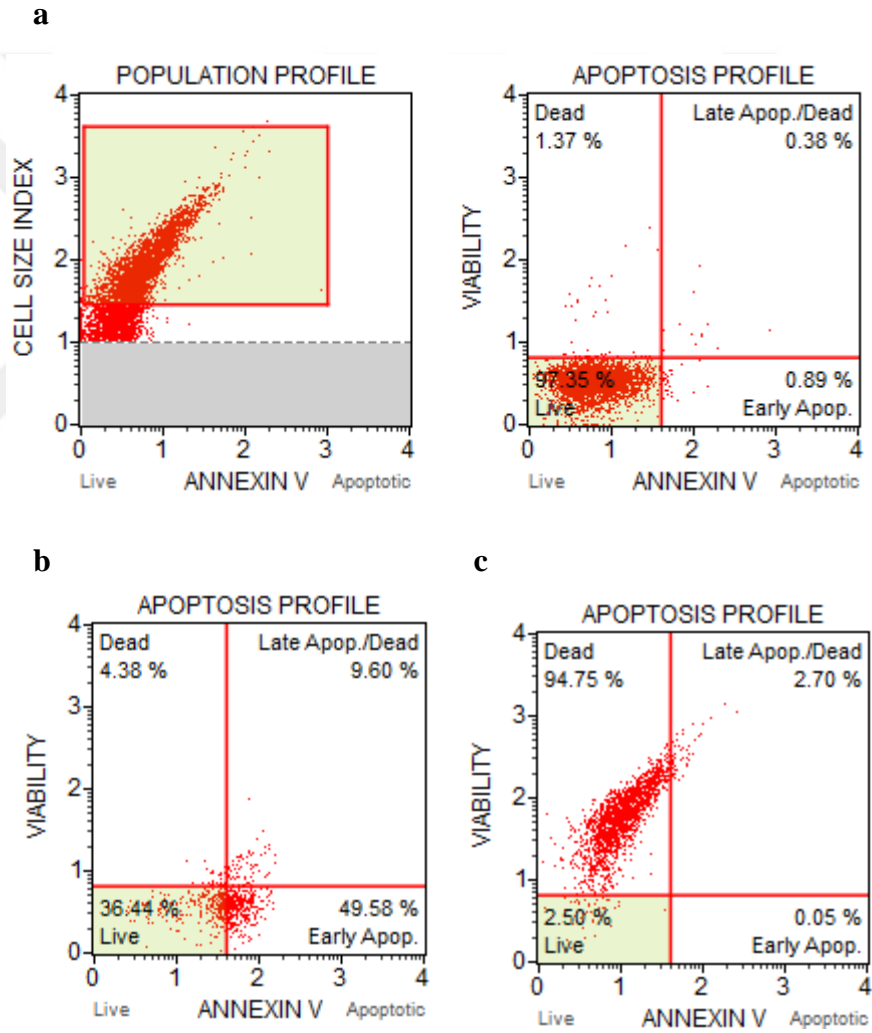
U87MG hücrelerinde kombin apoptotik etkisi 24 saat sonunda 1000 μ M TMZ +500 μ M OL ve 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE olacak şekilde analiz edilerek, elde edilen bulgular Şekil 47'te sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1000 μ M TMZ+500 μ M OL uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %0; %12,60; %64,59 iken, 500 μ M TMZ +500 μ g/ml OLE uygulandığında sırasıyla %0,12; %33,37 ve %65,08 olarak belirlendi.



Şekil 47. U87 hücrelerinde TMZ, OL ve OLE' nin kombin apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 1000 μ M TMZ+500 μ M OL, (c) 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE.

4.2.4.2. TMZ, OL ve OLE' nin U138MG Üzerindeki Kombin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

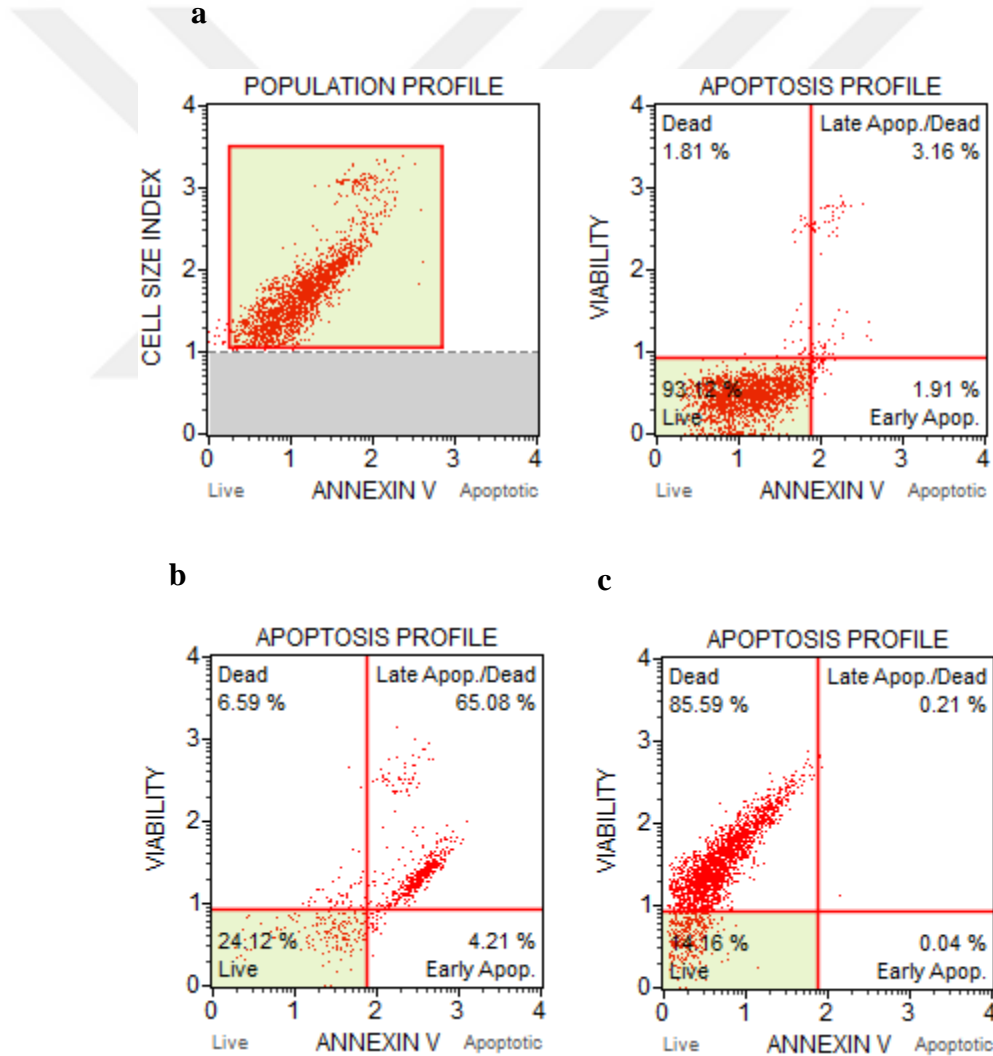
U138MG hücrelerinde kombin apoptotik etkisi 24 saat sonunda 1000 μ M TMZ+500 μ M OL ve 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE olacak şekilde analiz edilerek, elde edilen bulgular Şekil 48'te sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1000 μ M TMZ+500 μ M OL uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %49,58; %9,60; %4,38 iken, 500 μ M TMZ +500 μ g/mL OLE uygulandığında sırasıyla %0,05; %2,70 ve %94,75 olarak belirlendi.



Şekil 48. U138 hücrelerinde TMZ, OL ve OLE' nin kombin apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 1000 μ M TMZ+500 μ M OL, (c) 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE.

4.2.4.3. TMZ, OL ve OLE' nin U138MG Üzerindeki Kombin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

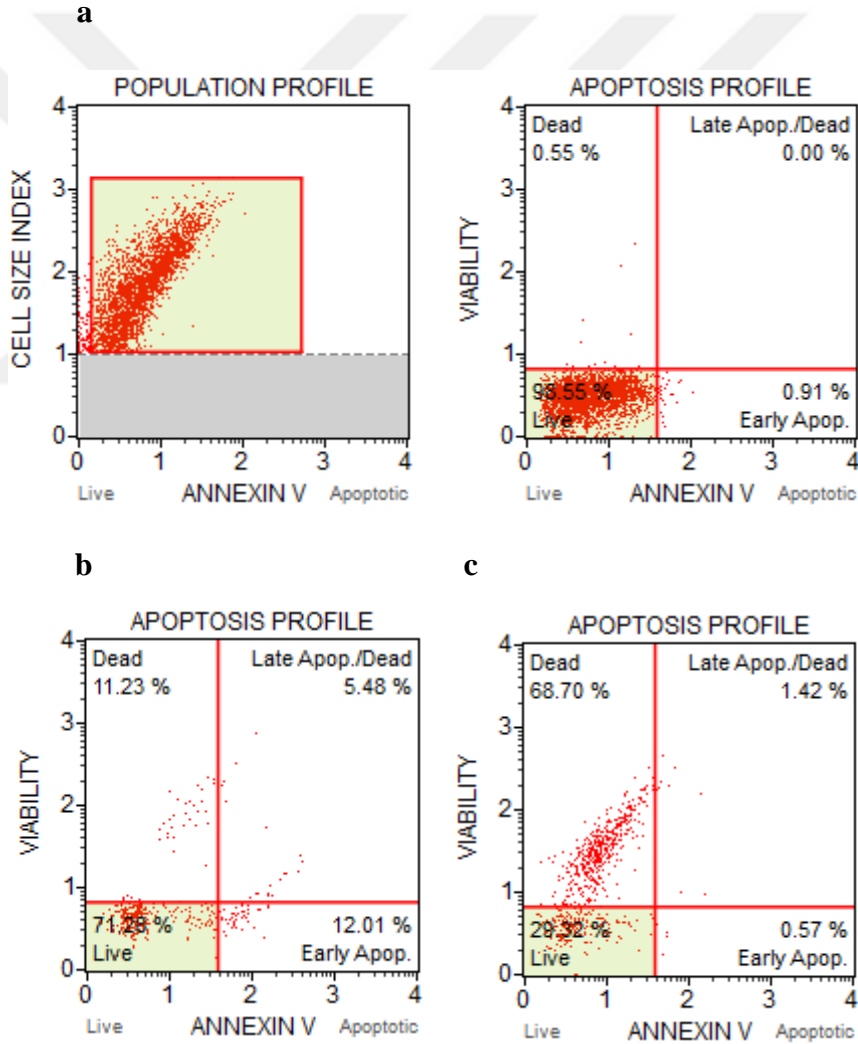
T98G hücrelerinde kombin apoptotik etkisi 24 saat sonunda 1000 μ M TMZ+500 μ M OL ve 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE olacak şekilde analiz edilerek, elde edilen bulgular Şekil 49'da sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1000 μ M TMZ+500 μ M OL uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %4,21; %65,08; %6,59 iken, 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE uygulandığında sırasıyla %0,04; %0,21 ve %85,59 olarak belirlendi.



Şekil 49. T98 hücrelerinde TMZ, OL ve OLE' nin kombin apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 1000 μ M TMZ+500 μ M OL, (c) 500 μ M TMZ+ 500 μ g/ml OLE.

4.2.4.4. TMZ, OL ve OLE' nin Kombin Olarak U138MG Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

HUVEC hücrelerinde kombin apoptotik etkisi 24 saat sonunda 1000 μ M TMZ+500 μ M OL ve 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE olacak şekilde analiz edilerek, elde edilen bulgular Şekil 50'de sunuldu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1000 μ M TMZ +500 μ M OL uygulanan hücrelerde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları sırasıyla %12,01; %5,48; %11,23 iken, 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE uygulandığında sırasıyla %0,57; %1,42 ve %68,70 olarak belirlendi.



Şekil 50. HUVEC hücrelerinde TMZ, OL ve OLE' nin kombin apoptotik etkisine ait Annexin V histogramları. (a) Kontrol, (b) 1000 μ M TMZ+500 μ M OL, (c) 500 μ M TMZ+500 μ g/ml OLE.

4.3. Hücrelerde Meydana Gelen Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi

4.3.1. TMZ' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerindeki Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi

TMZ' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi WST-1 testi sonuçları doğrultusunda 72 saat süre ile 250, 500, 1000 μ M TMZ için akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EB) boyaması ile analiz edilerek elde edilen görüntüler Şekil 48 ve 49'da sunuldu. Boyama sonucunda yeşil floresan boya ile boyanan hücreler sağlıklı hücreleri ve kırmızı floresan boya ile boyanan hücreler nekrotik hücreleri göstermektedir.

U87MG hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TMZ' in uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerin daha oval morfolojik bir yapıya sahip olarak hem AO hem de EB ile boyanan hücrelerin arttığı görüldü. 1000 μ M TMZ uygulanan hücrelerde belirgin bir şekilde geç apoptozun karakteristik özelliklerinden olan nükleus parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler gözlemlendi (Şekil 51).

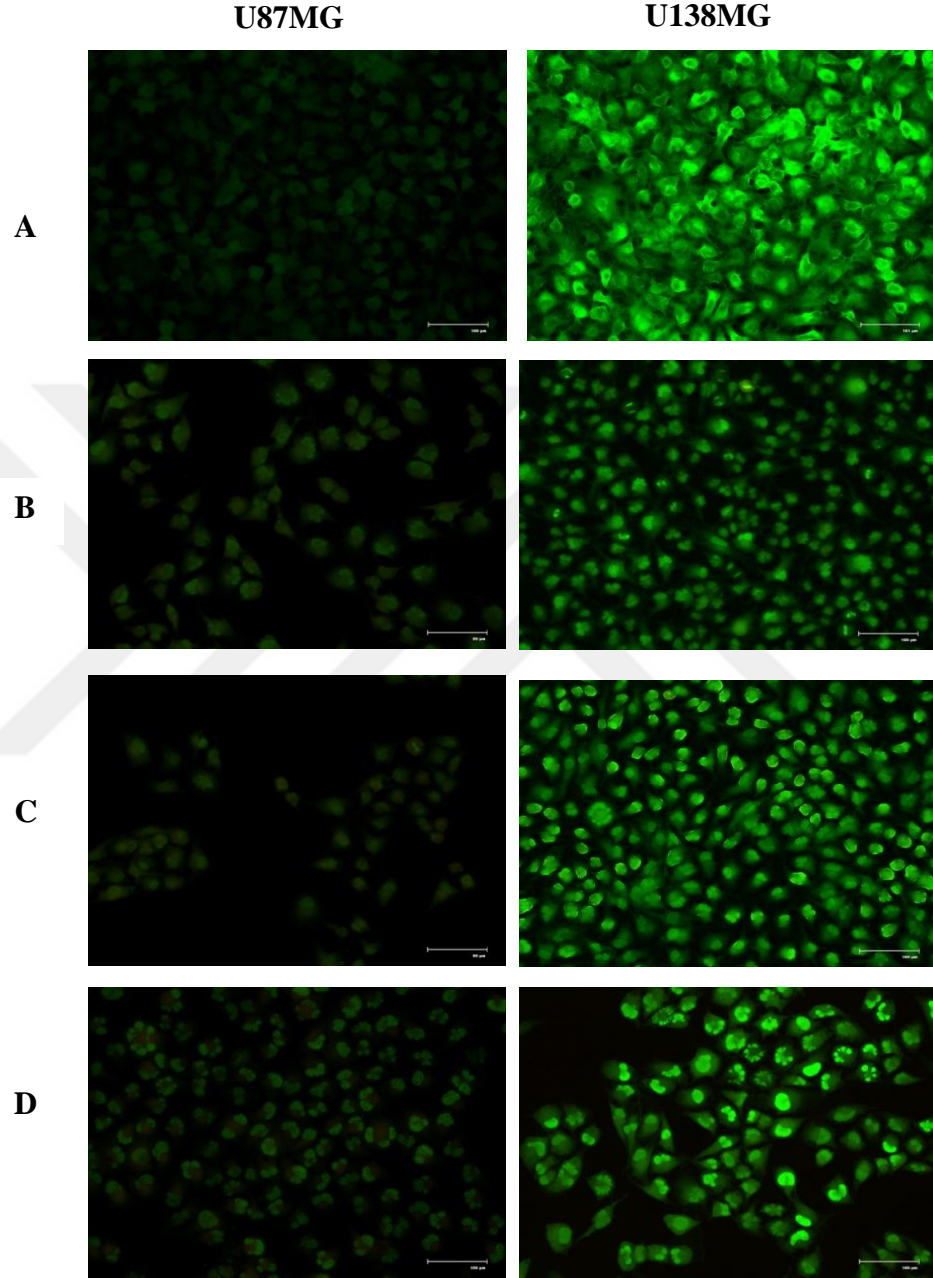
U138MG hücrelerin genel morfolojik yapıları incelendiğinde U87MG hücrelerine göre daha iğsi yapıya sahip oldukları görüldü. 250 μ M TMZ uygulanan U138MG hücrelerinde geç evre apoptotik hücrelerin yanı sıra anafaz ve metafaz evresinde olan bölünen hücreler gözlemlendi. Ancak TMZ' in uygulanan konsantrasyonu arttıkça özellikle 1000 μ M TMZ uygulanan hücrelerde belirgin şekilde nükleus parçalanması gözlemlendi (Şekil 51).

T98G hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TMZ' in uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerde belirgin seviyede nükleus parçalanması ve kromatin yoğunlaşması gözlemlendi ve ayrıca nekrotik ölüm belirlendi. Ayrıca, U87MG hücrelerine göre T98G hücreleri TMZ' ye daha dirençli olduklarından dolayı hücrelerde daha az oranda geç apoptotik hücre görüldü. Sonuç olarak, TMZ uygulanan U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde TMZ' in artan

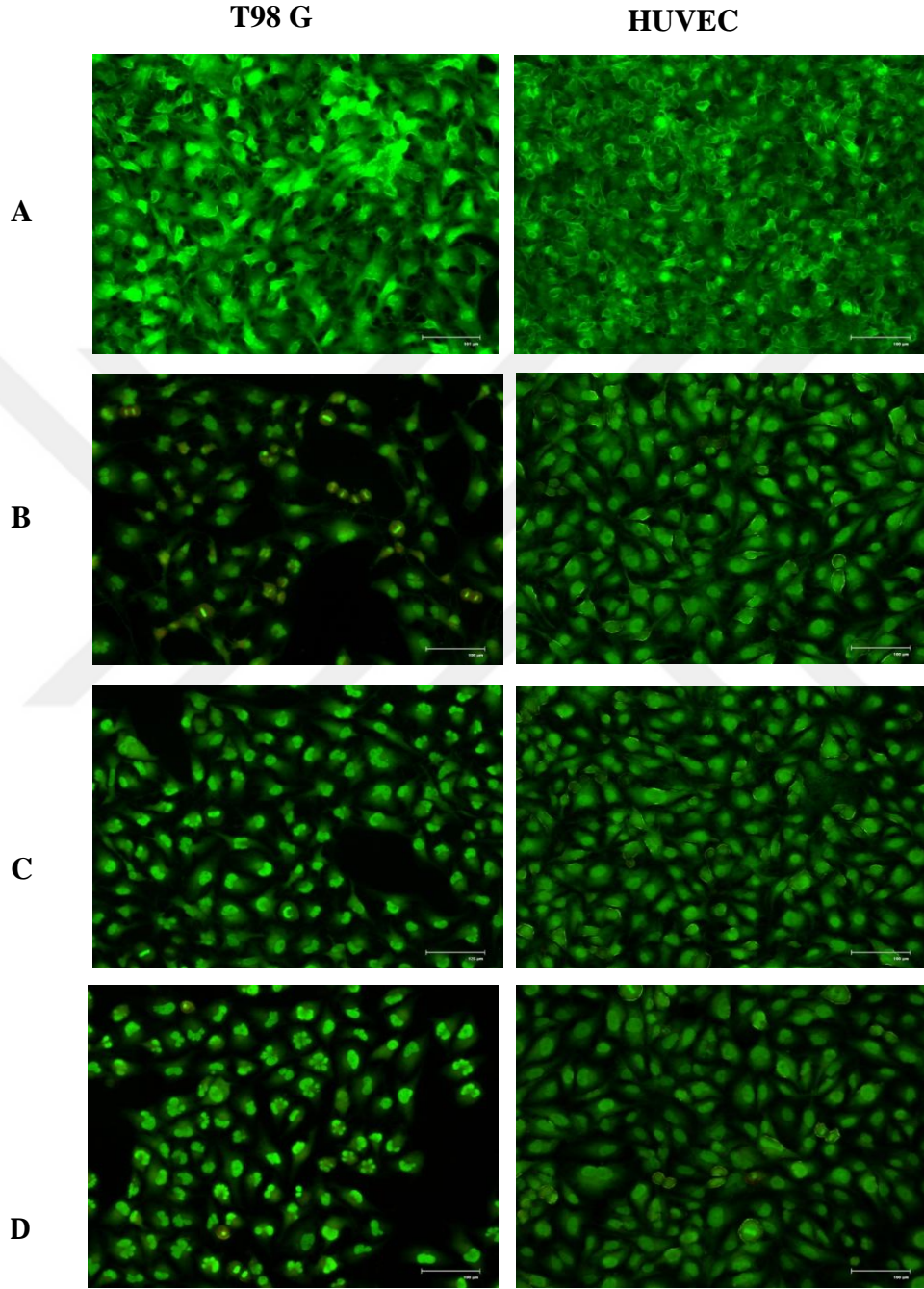
konsantrasyonuna bağlı olarak geç evre apoptotik hücre miktarında artış ve nükleus parçalanması belirlendi (şekil 52).

HUVEC hücrelerinde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TMZ' in artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerde hasarın arttığı ve özellikle 1000 μM TMZ uygulanan hücrelerde EB ile boyanan nekrotik hücreler ve bazı hücrelerde nükleus parçalanması gözlemlendi (şekil 52).





Şekil 51. Farklı konsantrasyonlarda TMZ' in U87MG ve U138MG hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesi (A) Kontrol, (B) 250 μ M, (C) 500 μ M, (D) 1000 μ M TMZ.



Şekil 52. Farklı konsantrasyonlarda TMZ' in T98G ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesi (A) Kontrol, (B) 250 μ M, (C) 500 μ M, (D) 1000 μ M TMZ.

4.3.2.OL' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerindeki Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi

OL' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi WST-1 testi sonuçları doğrultusunda 24 saat süre ile 250, 500, 750 μ M OL için akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EB) boyaması ile analiz edilerek elde edilen görüntüler Şekil 53 ve 54'te sunuldu.

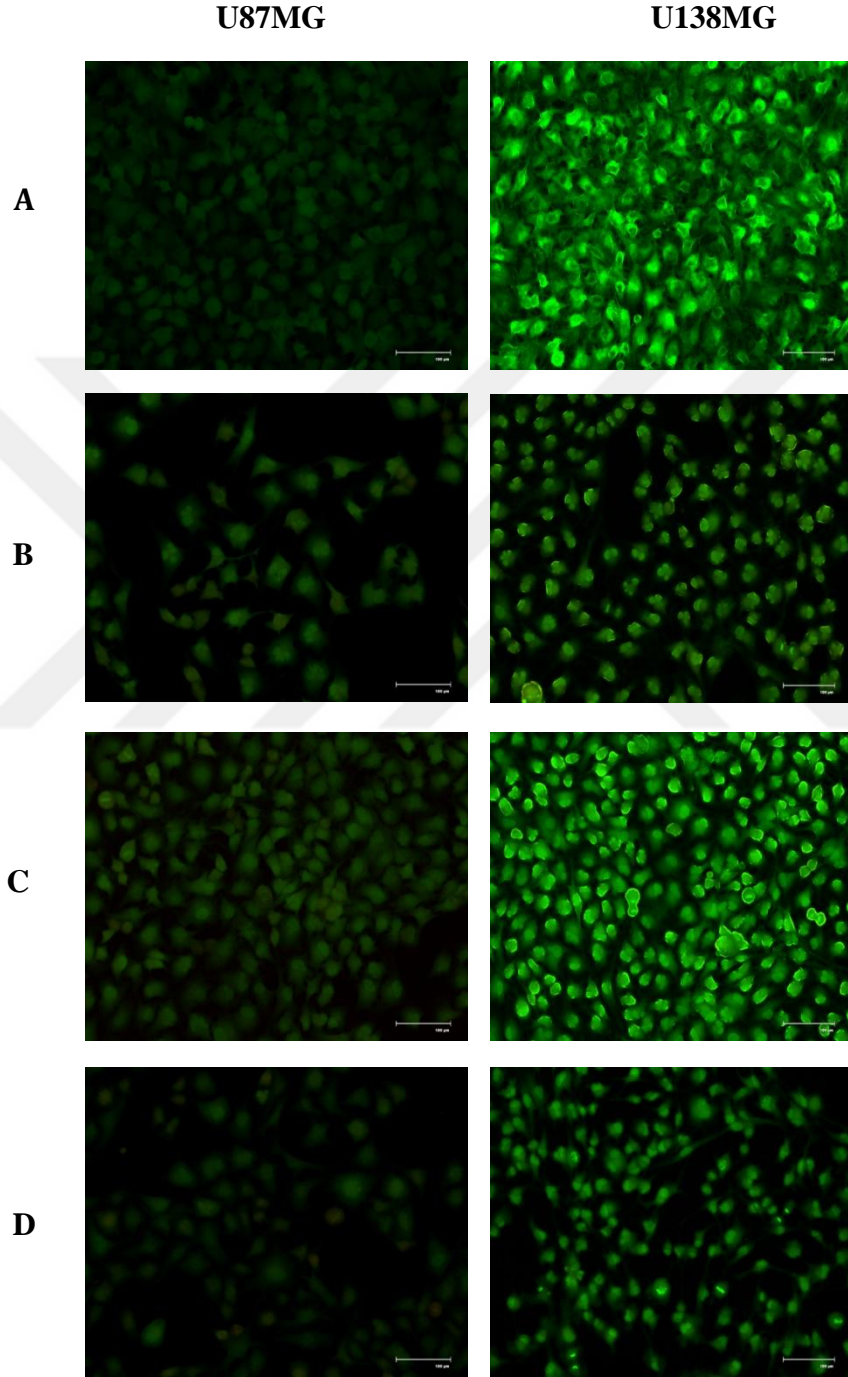
U87MG hücrelerinde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, 250 ve 500 μ M OL uygulanan hücrelerde AO ve EB ile boyanan turuncu nükleusa sahip geç evre apoptotik hücreler ve hücrelerde nüklear parçalanma ve kromatin yoğunlaşması gözlemlenmesine rağmen, 750 μ M OL uygulanan hücrelerde geç evre apoptotik hücreler ve az oranda EB ile boyanan nekrotik hücreler de görüntülendi (Şekil 50).

U138MG hücrelerinde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, özellikle 250 μ M OL uygulanan hücrelerde nüklear parçalanma gözlemlenmesine rağmen, OL' in uygulanan konsantrasyonu artıkça geç ve erken evre apoptotik hücrelerin yanı sıra metafaz ve anafaz evresinde bölünen hücreler görüntülendi. OL' in U87MG hücrelerinde U138MG hücrelerine göre daha fazla geç apoptotik ölüme neden olduğu ve hücrelerin daha oval bir morfolojiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 53).

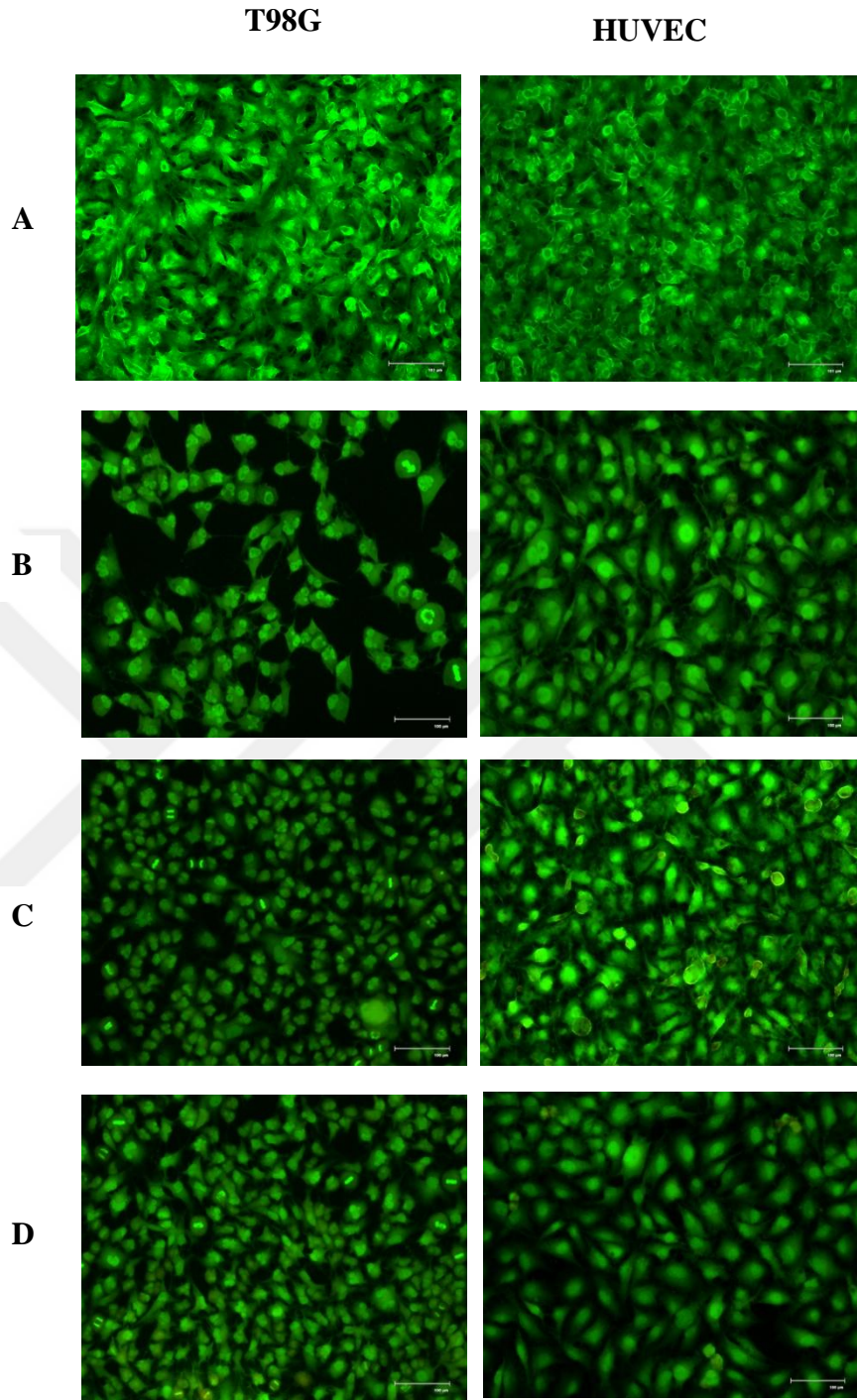
T98G hücrelerinde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, OL uygulanan U138MG hücrelerinde belirlendiği gibi özellikle 250 ve 500 μ M OL uygulanan hücrelerde nüklear parçalanma ve kromatin yoğunlaşması gözlemlendi. Ayrıca, 500 ve 750 μ M OL uygulanan T98G hücrelerinde geç evre apoptotik hücrelerin yanı sıra metafaz ve anafaz evresinde hücreler de görüntülendi ve genel olarak T98 hücrelerinin hücre membran bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi (Şekil 54).

HUVEC hücrelerinde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, OL' in artan konsantrasyonuna bağlı olarak EB ile boyanmış nekrotik hücrelerin yanı sıra

hücrelerin daha oval bir morfolojiye sahip olduğu ve hücrelerde hasara bağlı olarak vakuol oluşumları ve kromatin yoğunlaşması gözlemlendi (Şekil 54).



Şekil 53. Farklı konsantrasyonlarda OL' in U87MG ve U138MG hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesi (A) Kontrol, (B) 250 µM, (C) 500 µM, (D) 750 µM OL.



Şekil 54. Farklı konsantrasyonlarda OL' in T98G ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesi (A) Kontrol, (B) 250 μ M, (C) 500 μ M, (D) 750 μ M OL.

4.3.3.OLE' nin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerindeki Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi

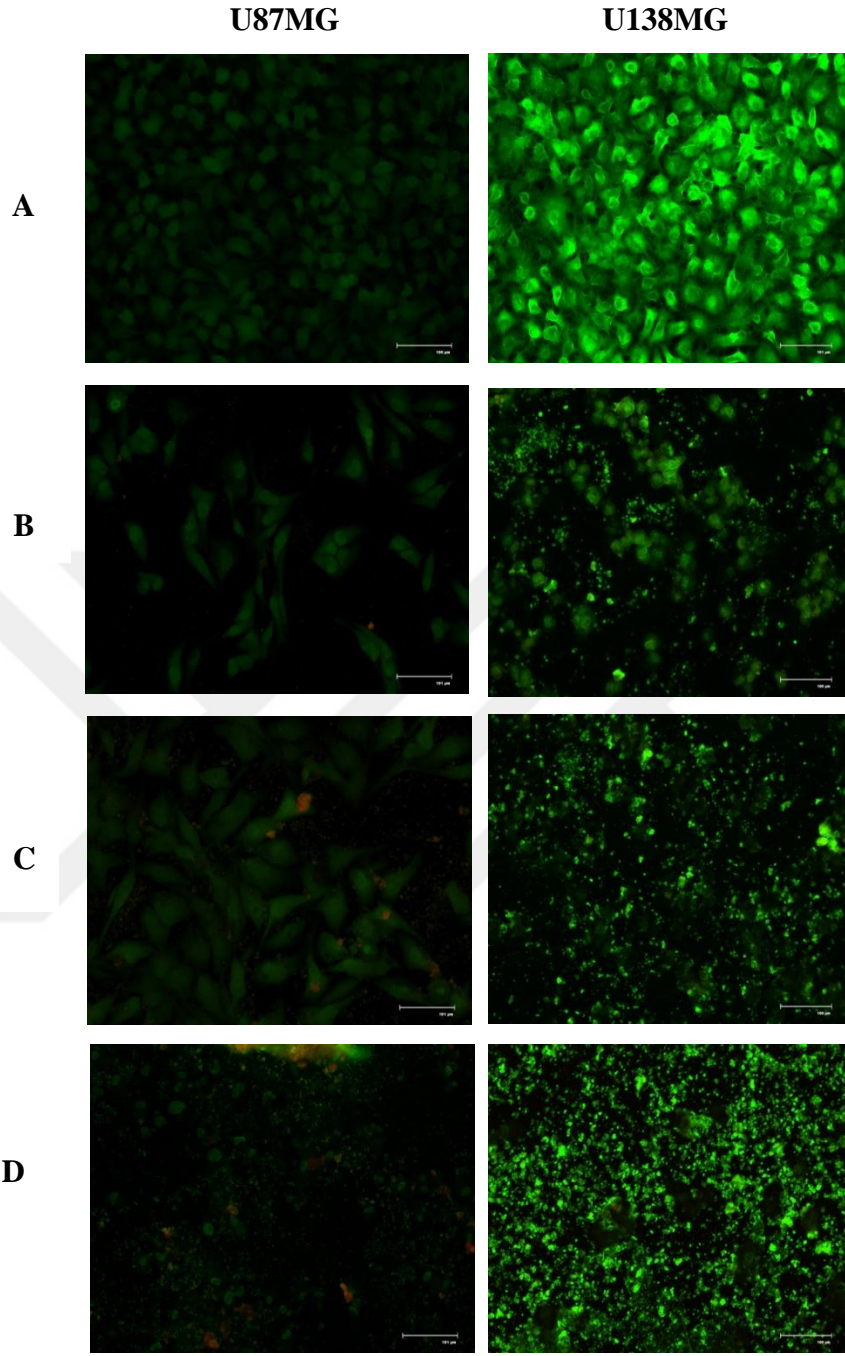
OLE' nin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi WST-1 testi sonuçları doğrultusunda 24 saat süre ile 500, 1000, 2000 µg/ml için akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EB) boyaması ile analiz edilerek elde edilen görüntüler Şekil 55 ve 56'da sunuldu.

U87MG hücrelerinde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, 500 ve 1000µg/ml OLE uygulanan hücrelerin membran bütünlüğü korunmasına rağmen, hücrelerde kromatin yoğunlaşması, nüklear parçalanma ve geç evre apoptotik hücreler gözlemlendi. Ancak 2000 µg/ml OLE uygulanan hücrelerde, hücre membran bütünlüğünün bozulduğu ve ayrıca EB ile boyanan yuvarlak yapıda çok sayıda nekrotik hücre görüntülendi (Şekil 55).

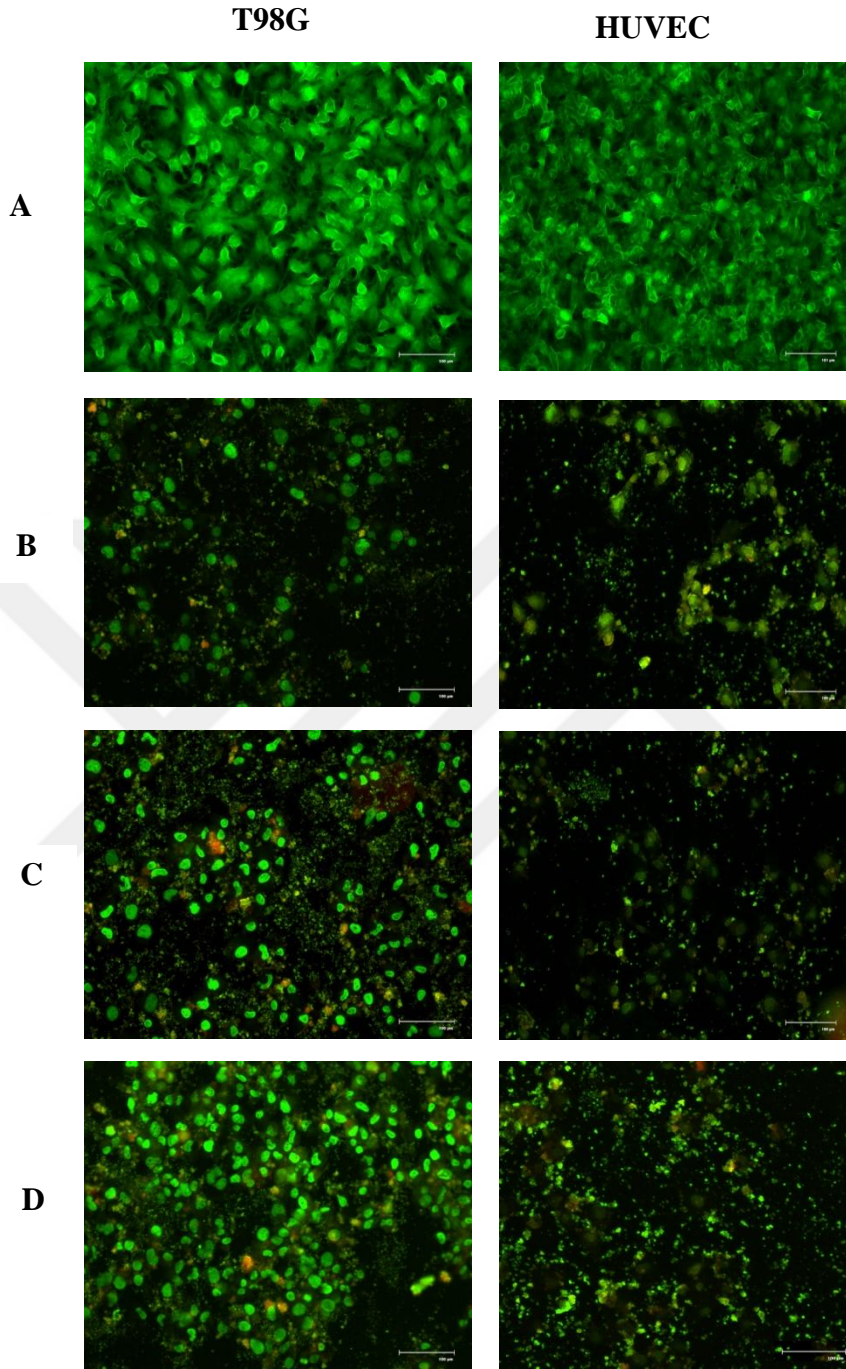
U138MG hücrelerinde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, özellikle 500 µM OLE uygulanan hücrelerin daha oval bir morfolojiye sahip olduğu ve nükleusta kromatin yoğunlaşması ve bazı hücrelerde nüklear parçalanma görüntülendi. Ancak OLE' nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak EB ile boyanmış nekrotik hücrelerin arttığı gözlemlendi. OLE' nin U138MG hücrelerinde U87 hücrelerine göre daha fazla nekrotik ölüme neden olduğu belirlendi (Şekil 55).

T98G hücrelerinde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, OLE' nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerde kromatin yoğunlaşması ve nüklear fragmentasyon gözlemlendi. Ancak U87MG ve U138MG hücrelerine göre daha az oranda nekrotik hücre belirlendi (Şekil 56).

HUVEC hücrelerinde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında ise, OLE' nin neden olduğu hasara bağlı olarak 500 ve 1000 µg/ml OLE uygulanan hücrelerde membran bütünlüğünün bozulduğu ve ayrıca nükleusta kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler görüntülendi. 2000 µg/ml OLE uygulanan hücrelerde ise EB ile boyanmış yuvarlak yapıda nekrotik hücreler gözlemlendi (Şekil 56).



Şekil 55. Farklı konsantrasyonlarda OLE' nin U87MG ve U138MG hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesi (A) Kontrol, (B) 500 µg/ml, (C) 1000 µg/ml, (D) 2000 µg/ml OLE.



Şekil 56. Farklı konsantrasyonlarda OLE' nin T98G ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesi (A) Kontrol, (B) 500 µg/ml, (C) 1000 µg/ml, (D) 2000 µg/ml OLE.

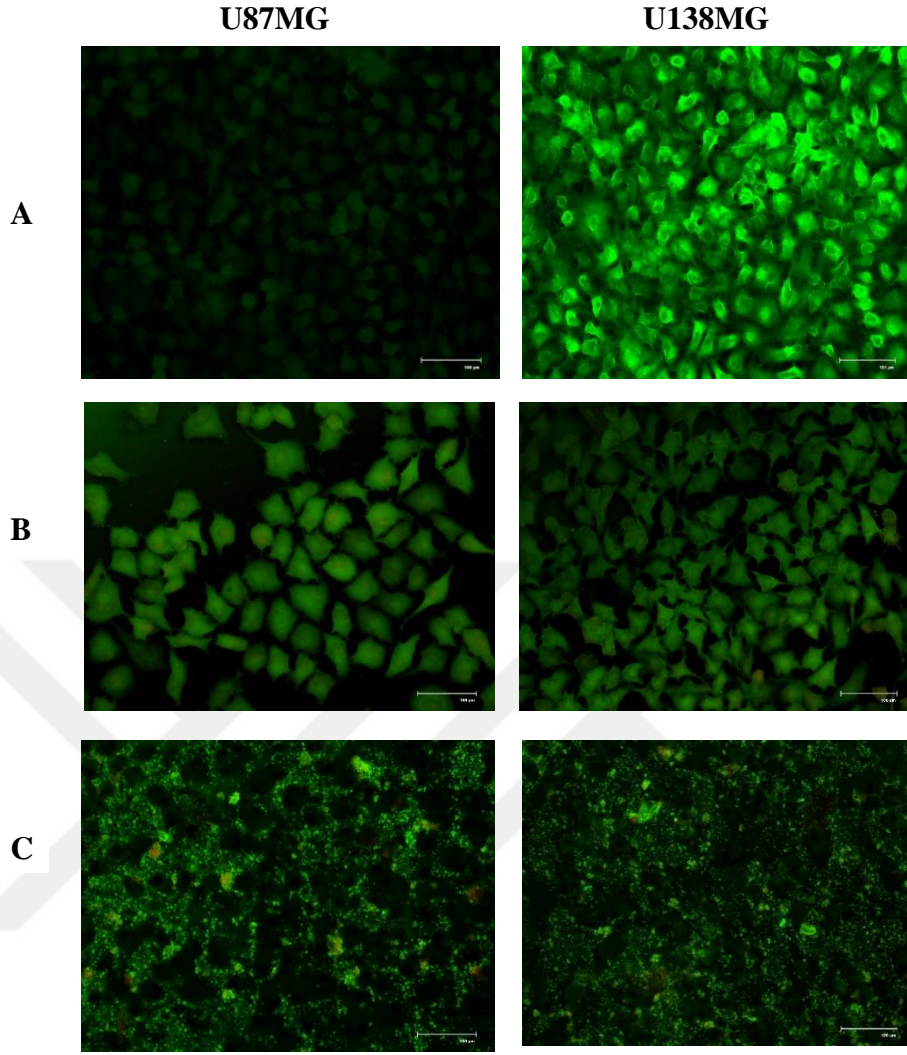
4.3.4. TMZ, OL ve OLE' nin Kombin Olarak U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerindeki Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi

TMZ, OL ve OLE' nin kombin etkisinin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi WST-1 testi sonuçları doğrultusunda 24 saat süre ile 1000 μ M TMZ + 500 μ M OL ve 500 μ M TMZ +500 μ g/ml OLE için akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EB) boyaması ile analiz edilerek elde edilen görüntüler Şekil 57 ve 58'de sunuldu.

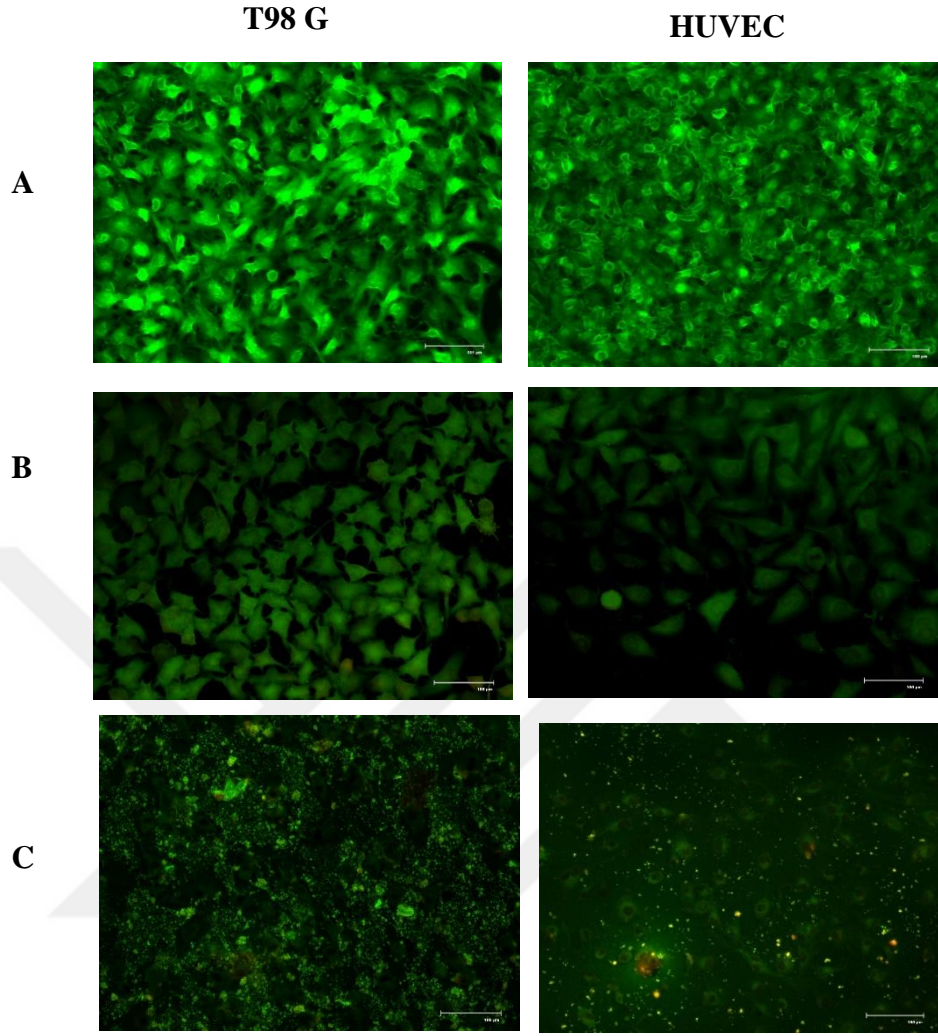
1000 μ M TMZ + 500 μ M OL uygulanan U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde nüklear parçalanma, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler görüntülenmesine rağmen, kombin etkinin en fazla U87MG ve T98G hücrelerinde geç apoptotik ölüme neden olduğu görüntüldü. Ayrıca, U138MG ve T98G hücrelerinde EB ile boyanan nekrotik hücreler gözlemlendi. HUVEC hücrelerinde ise hasara bağlı olarak daha oval morfolojiye sahip hücrelerin yanı sıra hücrelerde kromatin yoğunlaşması belirlendi (Şekil 57, 58).

500 μ M TMZ + 500 μ g/ml OLE uygulanan U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde özellikle OLE' nin toksik etkisinden dolayı EB ile boyanmış nekrotik ölüm gözlemlendi.

Sonuç olarak, 1000 μ M TMZ + 500 μ M OL uygulanan U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde tek ajan olarak TMZ ve OL' e göre nüklear parçalanmanın daha az olduğu belirlenmesine rağmen, 500 μ M TMZ + 500 μ g/ml OLE uygulanan hücrelerde OLE' nin etkisinden dolayı hücrelerde geç apoptotik ölüm yerine nekrotik ölüm belirlenmiştir. Ayrıca, 500 μ M TMZ + 500 μ g/ml OLE uygulanan HUVEC hücrelerinde yalnızca OL uygulanan HUVEC hücrelerine göre OLE' nin toksik etkisinden dolayı nekrotik ölüm gözlemlenmiştir.



Şekil 57. TMZ, OL ve OLE' nin kombin etkisinin U87MG ve U138MG hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesi (A) Kontrol, (B) 1000 µM TMZ + 500 µM OL, (C) 500 µM TMZ + 500 µg/ml OLE .



Şekil 58. TMZ, OL ve OLE' nin kombin etkisinin T98G ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesi (A) Kontrol, (B) 1000 µM TMZ + 500 µM OL, (C) 500 µM TMZ + 500 µg/ml OLE.

4.4. Apoptoz ve Nekroz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerin mRNA Düzeyinde Değişikliklerin Belirlenmesi

4.4.1. TMZ' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

TMZ' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde apoptoz ve nekroz ile ilişkili *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AIFM1*, *TP53*, *BID*, *BAK1*, *BCL2L11*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *CFLAR*, *FAS*, *FADD*, *TNF*, *TNFRSF1A*, *PARP1*, *RIPK1* ve

RIPK3 genlerinde mRNA ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 13-16'da sunuldu.

500 μ M TMZ uygulanan U87MG hücrelerinde *TP53*, *BCL2*, *BCL2L1*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 2,98; 2,18; 3,22; 2,92 kat artış belirlenmesi ile birlikte *TNFRS1A* gen ekspresyon seviyesinde 0,33 kat azalış analiz edildi (Şekil 56). 1000 μ M TMZ uygulandığında ise *CASP9*, *TP53*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 2,14; 5,74; 2,9; 4,15; 2,21; 4,72 kat artışı belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 59).

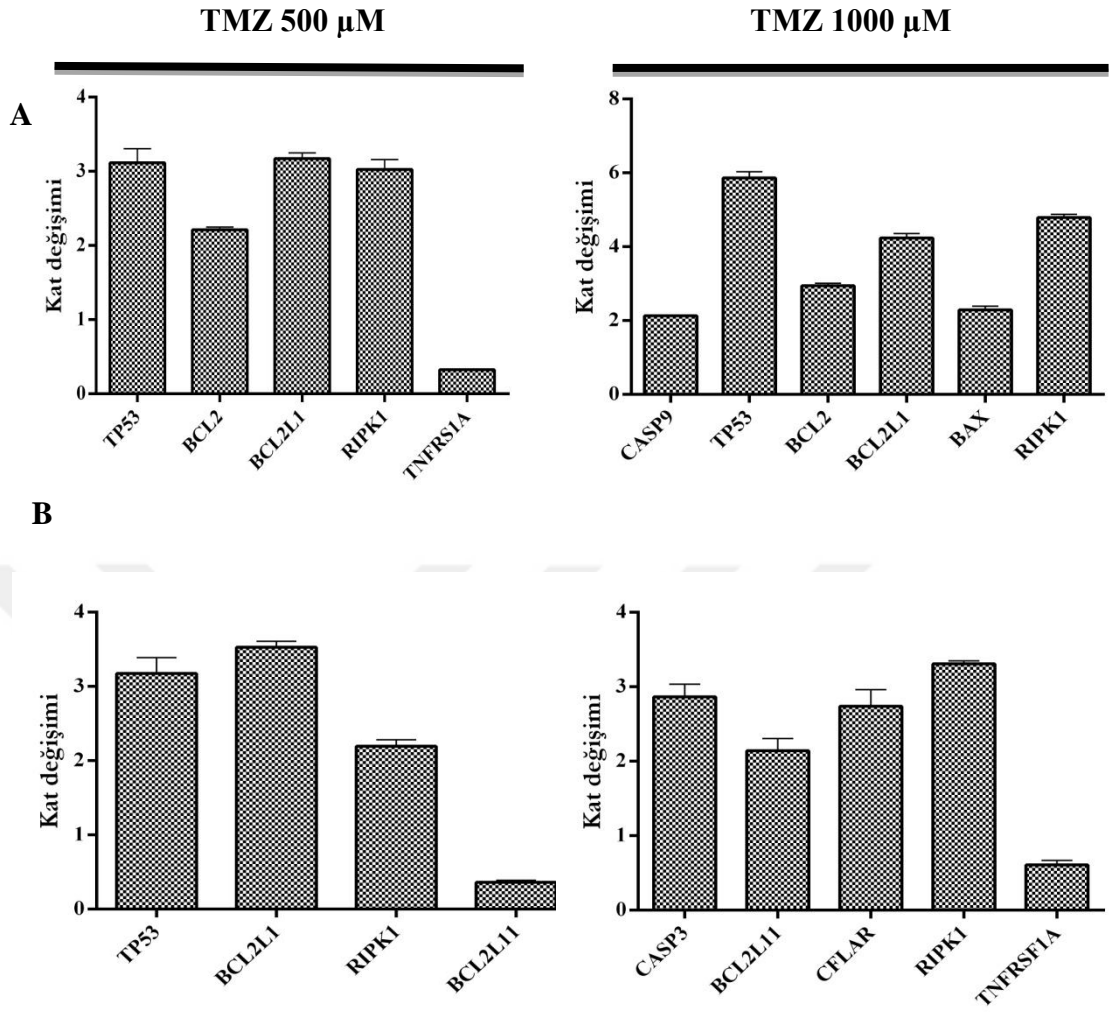
500 μ M TMZ uygulanan U138MG hücrelerinde *TP53*, *BCL2L1*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyeleri 3,02; 3,47; 2,13 kat artarken, *BCL2L11* gen ekspresyon seviyesinin 0,38 kat azaldığı görüldü ($p<0,05$). 1000 μ M TMZ uygulandığında ise, *CASP3*, *BCL2L11*, *CFLAR*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 2,74; 2,02; 2,57; 3,27 kat artış belirlenmiş olup *TNFRS1A* geninin ekspresyon seviyesi 0,56 kat azaldı. ($p<0,05$) (Şekil 59).

Tablo 13. U87MG hücrelerinde 500 µM ve 1000 µM TMZ' in 72 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		TMZ 500 µM		TMZ 1000 µM		
	2 ⁻ ΔΔCt	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
CASP3	0,003773	0,006754	1,7901	0,040494	0,008749	2,3187	0,084803
CASP8	0,001565	0,001612	1,0305	0,937247	0,00268	1,7132	0,045879
CASP9	0,000374	0,000424	1,1329	0,809761	0,000802	2,1435	0,044391
AIFM1	0,001861	0,001597	0,8586	0,290617	0,002644	1,4208	0,130567
TP53	0,003002	0,008953	2,9828	0,018437	0,017257	5,7491	0,005391
BID	0,007357	0,007025	0,9548	0,684163	0,008549	1,162	0,644232
BAK1	0,000487	0,00046	0,9439	0,662888	0,00087	1,7859	0,089908
BCL2L11	0,00149	0,001532	1,0281	0,7807	0,002926	1,9634	0,213394
BCL2	0,000107	0,000233	2,1835	0,036935	0,00031	2,9012	0,043233
BCL2L1	0,001732	0,005588	3,2266	0,000594	0,007189	4,1506	0,012151
BAX	0,003058	0,004787	1,5655	0,033589	0,00677	2,214	0,046754
CFLAR	0,00093	0,000695	0,7474	0,306038	0,00147	1,5801	0,230565
FAS	0,000737	0,000573	0,7774	0,588319	0,000979	1,3287	0,513343
FADD	0,001856	0,00176	0,9482	0,720311	0,00228	1,2283	0,419322
TNF	0,000001	0,000001	1,1019	0,93611	0,000002	2,5257	0,082337
TNFRSF1A	0,013952	0,004688	0,336	0,023885	0,006316	0,4527	0,06783
PARP1	0,009248	0,004235	0,458	0,326249	0,012344	1,3348	0,483375
RIPK1	0,000447	0,00131	2,9282	0,020305	0,002113	4,724	0,015688
RIPK3	0,000002	0,000001	0,683	0,334954	0,000002	0,9181	0,615541

Tablo 14. U138MG hücrelerinde 500 µM ve 1000 µM TMZ' in 72 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		TMZ 500 µM		TMZ 1000 µM		
	2 ⁻ ΔΔCt	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
CASP3	0,004865	0,004798	0,9862	0,909368	0,013353	2,7447	0,035793
CASP8	0,002137	0,002003	0,9374	0,916227	0,004324	2,0232	0,104991
CASP9	0,000411	0,000582	1,4175	0,003366	0,000795	1,9363	0,145813
AIFM1	0,001066	0,001172	1,0994	0,451565	0,00206	1,9319	0,156758
TP53	0,006615	0,020007	3,0244	0,000758	0,027584	4,1699	0,141265
BID	0,01278	0,009486	0,7423	0,159896	0,015553	1,217	0,536708
BAK1	0,000819	0,001111	1,3566	0,427678	0,001575	1,923	0,200532
BCL2L11	0,002524	0,000963	0,3816	0,029336	0,005119	2,0279	0,039505
BCL2	0,000212	0,000278	1,3134	0,337544	0,000585	2,7638	0,055716
BCL2L1	0,003158	0,010972	3,4742	0,041421	0,009935	3,1456	0,061199
BAX	0,004053	0,014714	3,6301	0,157489	0,010746	2,6512	0,480288
CFLAR	0,000733	0,000844	1,1514	0,549786	0,001891	2,5787	0,044085
FAS	0,000083	0,000173	2,0849	0,113059	0,000334	4,0278	0,092314
FADD	0,00147	0,00268	1,8234	0,005725	0,003369	2,2921	0,270101
TNF	0,000001	0,000001	0,8566	0,709004	0,000004	4,1315	0,111134
TNFRSF1A	0,021692	0,013602	0,6271	0,311369	0,012259	0,5651	0,027146
PARP1	0,010574	0,01588	1,5018	0,194878	0,020007	1,8921	0,31835
RIPK1	0,000694	0,00148	2,1337	0,047131	0,002275	3,2792	0,005227
RIPK3	0,000002	0,000001	0,6598	0,30153	0,000003	1,5404	0,27979



Şekil 59. TMZ 500 ve 1000 µM uygulanan (A) U87 MG ve (B) U138 MG hücrelerinde anlamlı kat değişimi bulunan apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin gösterilmesi

500 µM TMZ uygulanan T98G hücrelerinde *CASP8*, *TP53*, *BAK1*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *FADD*, *TNF*, *PARP1*, *RIPK1*, *RIPK3* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 2,06; 6,58; 2,87; 3,7; 4,68; 2,46; 2,49; 25,99; 4,05; 4,05; 13,96 kat artış analiz edildi ($p < 0,05$) (Şekil 60). 1000 µM TMZ uygulandığında ise, *TP53*, *BCL2L11*, *BCL2*, *BCL2L1*, *TNF*, *PARP1*, *RIPK1*, *RIPK3* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 2,56; 2,12; 3,57; 3,10; 17,02; 3,4; 3,4; 10,67 kat artışı belirlendi ($p < 0,05$) (Şekil 60).

500 µM TMZ uygulanan HUVEC hücrelerinde *BAK1*, *BCL2L11*, *RIPK3* genlerinin ekspresyon seviyesinde ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 3.24, 2.77, 7.31 kat değişim analiz edildi ($p < 0,05$) (Şekil 57). 1000 µM TMZ uygulandığında ise, *CASP8*, *CASP9*, *TP53*, *BAK1*, *BCL2L11*, *BAX*, *PARP1*, *RIPK3* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 2,45; 2,04; 3,30; 3,74; 7,70; 2,21; 2,12; 3,29 kat artışı belirlendi ($p < 0,05$; $p < 0,01$) (Şekil 60).

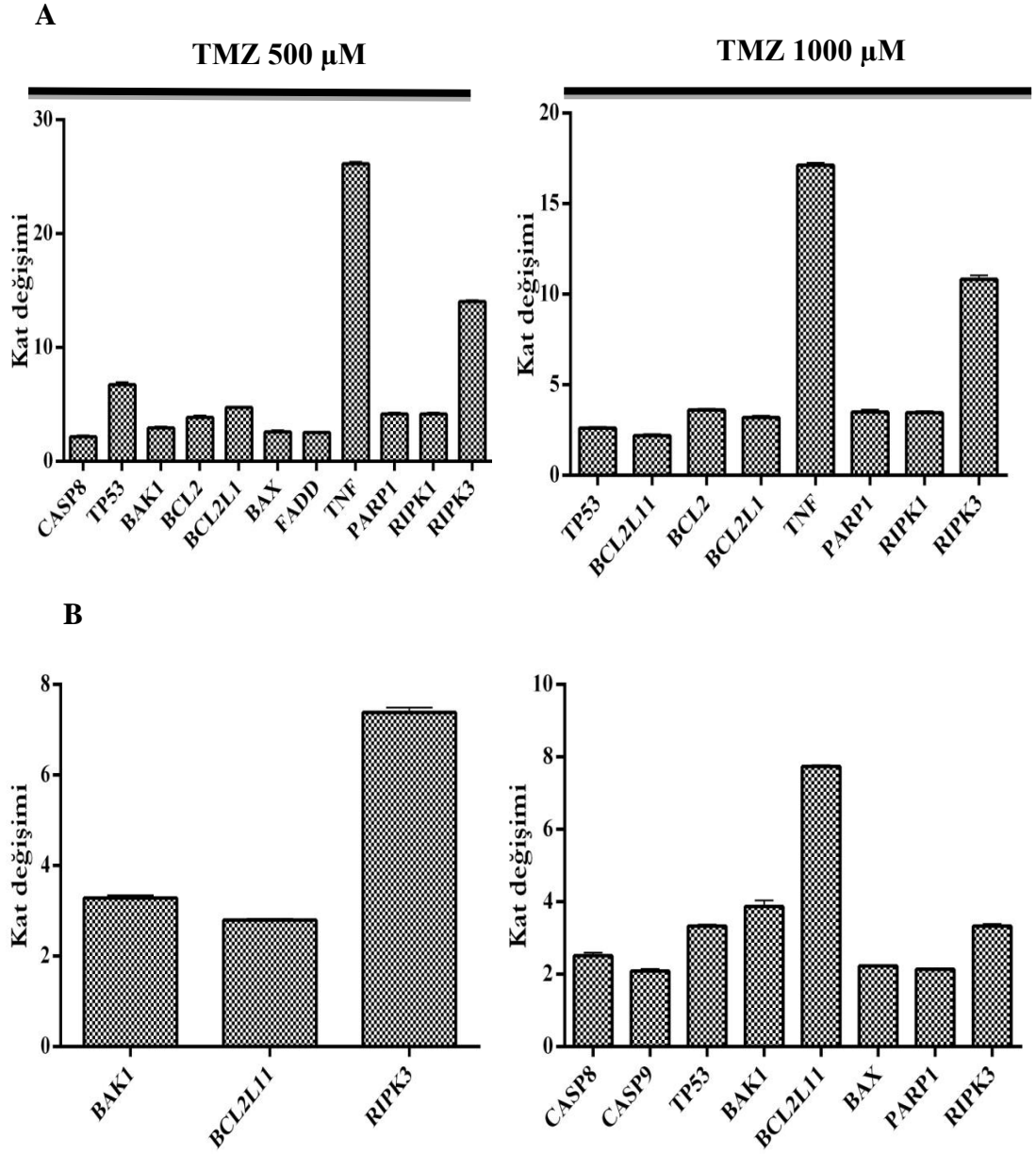
Tablo 15. T98G hücrelerinde 500 µM ve 1000 µM TMZ' in 72 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		TMZ 500 µM		TMZ 1000 µM		
	2 ⁻ ΔΔCt	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
CASP3	0,004765	0,007425	1,5583	0,356032	0,00849	1,7818	0,311347
CASP8	0,001298	0,002674	2,061	0,016986	0,002913	2,2449	0,090905
CASP9	0,000801	0,000922	1,1514	0,558362	0,000862	1,0767	0,709196
AIFM1	0,002285	0,003611	1,5801	0,054496	0,00324	1,4175	0,221174
TP53	0,003603	0,023738	6,5887	0,007588	0,009227	2,5609	0,009429
BID	0,012517	0,013048	1,0425	0,818083	0,013634	1,0892	0,593942
BAK1	0,000401	0,001153	2,8745	0,000591	0,000795	1,9816	0,087779
BCL2L11	0,002307	0,003988	1,7291	0,093441	0,004899	2,1238	0,022495
BCL2	0,000193	0,000723	3,7494	0,028792	0,000689	3,5718	0,022893
BCL2L1	0,001225	0,005732	4,6805	0,004163	0,003808	3,1095	0,020729
BAX	0,005448	0,013446	2,468	0,009533	0,008709	1,5984	0,140436
CFLAR	0,001119	0,002022	1,8067	0,02021	0,002036	1,8192	0,020478
FAS	0,000437	0,001009	2,308	0,205158	0,000827	1,8921	0,035158
FADD	0,001869	0,004667	2,4967	0,024851	0,00228	1,2198	0,561727
TNF	0,000008	0,000216	25,9921	0,020959	0,000141	17,0299	0,007942
TNFRSF1A	0,011625	0,009843	0,8467	0,458406	0,006677	0,5743	0,052305
PARP1	0,000522	0,002118	4,0558	0,005188	0,001777	3,4027	0,013922
RIPK1	0,000522	0,002118	4,0558	0,005188	0,001777	3,4027	0,013922
RIPK3	0,000007	0,000097	13,961	0,002367	0,000074	10,6787	0,001952

Tablo 16. HUVEC hücrelerinde 500 µM ve 1000 µM TMZ' in 72 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		TMZ 500 µM		TMZ 1000 µM		
	2 ^{^-} ΔΔCt	2 ^{^-} ΔΔCt	Kat değişimi	p	2 ^{^-} ΔΔCt	Kat değişimi	p
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
CASP3	0,005154	0,00588	1,3472	0,214782	0,007041	1,366	0,089365
CASP8	0,001322	0,001539	1,2114	0,530612	0,00324	2,4509	0,004817
CASP9	0,000655	0,000367	1,0668	0,767974	0,001337	2,042	0,009245
AIFM1	0,002595	0,002933	0,7702	0,342705	0,002933	1,1303	0,721731
TP53	0,000255	0,000582	1,6663	0,162688	0,000844	3,3096	0,000127
BID	0,002228	0,002619	1,5263	0,204265	0,003545	1,5911	0,084823
BAK1	0,000147	0,000407	3,2415	0,001202	0,000551	3,7494	0,000169
BCL2L11	0,00065	0,000827	2,7766	0,001433	0,005013	7,7097	0,002843
BCL2	0,000216	0,000193	1,0234	0,983434	0,000333	1,5404	0,112988
BCL2L1	0,006479	0,011465	2,0515	0,078598	0,011869	1,8319	0,086778
BAX	0,00324	0,005202	1,9862	0,101573	0,007189	2,2191	0,007642
CFLAR	0,002807	0,00491	1,6472	0,350622	0,005759	2,0515	0,158495
FAS	0,001601	0,002147	0,3601	0,128793	0,001011	0,6314	0,284491
FADD	0,00063	0,000566	0,8706	0,723465	0,000536	0,8507	0,373208
TNF	0,006419	0,004324	0,9374	0,672908	0,008258	1,2864	0,670422
TNFRSF1A	0,003998	0,003979	0,9138	0,707911	0,003611	0,9033	0,541836
PARP1	0,005627	0,005287	1,1225	0,766856	0,011951	2,1238	0,036994
RIPK1	0,000833	0,000888	1,1251	0,868244	0,001852	2,2243	0,27466
RIPK3	0,000001	0,000001	7,3107	0,019525	0,000005	3,2944	0,017071

Şekil 60. TMZ 500 ve 1000 μ M uygulanan (A) T98G ve (B) HUVEC hücrelerinde anlamlı kat değişimi bulunan apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin gösterilmesi



Şekil 60. TMZ 500 ve 1000 μ M uygulanan (A) T98G ve (B) HUVEC hücrelerinde anlamlı kat değişimi bulunan apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin gösterilmesi

4.4.2.OL' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

OL' in U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde apoptoz ve nekroz ile ilişkili *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AIFM1*, *TP53*, *BID*, *BAK1*, *BCL2L11*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *CFLAR*, *FAS*, *FADD*, *TNF*, *TNFRSF1A*, *PARP1*, *RIPK1* ve *RIPK3* genlerinde mRNA ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 17-20 'de sunuldu.

500 µM OL uygulanan U87MG hücrelerinde *TP53*, *BCL2L1*, *BAX* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 3,66; 2,06; 2,40 kat artış belirlendi ($p<0.05$).

U138MG hücrelerinde *CASP8*, *CASP9*, *AIFM1*, *BAK1*, *CFLAR*, *FADD*, *TNFRSF1A*, *PARP1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 0,36; 0,31; 0,36; 0,29; 0,44; 0,24; 0,23; 0,23 kat anlamlı azalış görülmekle birlikte, *FAS* ve *TNF* gen ekspresyonlarında sırasıyla 9,6 ve 3,4 kat artış belirlenmiştir. ($p<0,05$) (Şekil 61).

500 µM OL uygulanan T98G hücrelerinde *CASP3*, *CASP9*, *AIFM1*, *TP53*, *BCL2L11*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *CFLAR*, *FADD*, *TNFRSF1A*, *PARP1*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 0,12; 0,10; 0,17; 0,45; 0,24; 0,42; 0,49; 0,25; 0,14; 0,053; 0,13; 0,19; 0,19 kat azalışı belirlenmiştir ($p<0.05$).

HUVEC hücrelerinde *BAK1* genlerinin ekspresyon seviyesinde 2,77 kat değişim belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 61).

Tablo 17. U87MG hücrelerinde 500 µM OL' in 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		OL 500µM	
	2 ^{^(-Avg.(Delta(Ct))}	2 ^{^(-Avg.(Delta(Ct))}	Fold Change	p-value
ACTB	1	1	1	0
CASP3	0,003773	0,006003	1,5911	0,208154
CASP8	0,001565	0,001865	1,192	0,400947
CASP9	0,000374	0,000376	1,0046	0,800042
AIFM1	0,001861	0,002074	1,1147	0,58066
TP53	0,003002	0,010998	3,6638	0,014398
BID	0,007357	0,001228	0,1669	0,252893
BAK1	0,000487	0,000514	1,0546	0,807836
BCL2L11	0,00149	0,00159	1,0668	0,678035
BCL2	0,000107	0,000218	2,042	0,156138
BCL2L1	0,001732	0,00357	2,061	0,045619
BAX	0,003058	0,00734	2,4005	0,010911
CFLAR	0,00093	0,000937	1,007	0,921223
FAS	0,000737	0,001583	2,1485	0,07781
FADD	0,001856	0,00146	0,7864	0,339116
TNF	0,000001	0,000001	1,8834	0,154596
TNFRSF1A	0,013952	0,007442	0,5334	0,085374
PARP1	0,009248	0,009334	1,0093	0,824702
RIPK1	0,000447	0,000894	2	0,192995
RIPK3	0,000002	0,000002	1,3348	0,725778

Tablo 18. U138MG hücrelerinde 500 µM OL' in 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

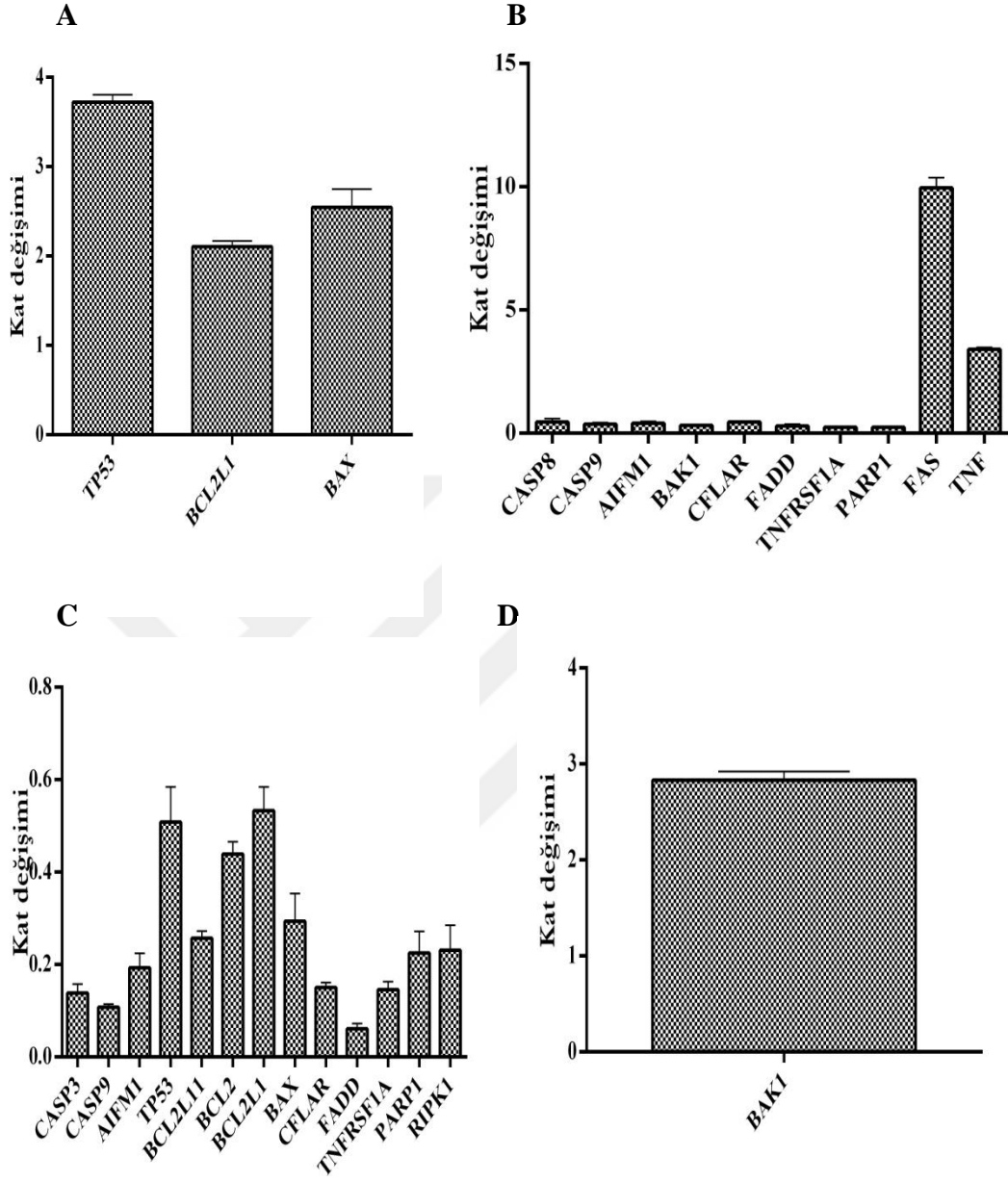
	Muamelesiz grup		OL 500µM	
	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Fold Change	p-value
ACTB	1	1	1	0
CASP3	0,004865	0,003561	0,732	0,229328
CASP8	0,002137	0,000777	0,3635	0,022456
CASP9	0,000411	0,000129	0,315	0,001398
AIFM1	0,001066	0,000388	0,3643	0,004634
TP53	0,006615	0,016139	2,4396	0,052877
BID	0,01278	0,005976	0,4676	0,251241
BAK1	0,000819	0,000243	0,2966	0,000552
BCL2L11	0,002524	0,001511	0,5987	0,245058
BCL2	0,000212	0,000249	1,1783	0,608636
BCL2L1	0,003158	0,001852	0,5864	0,00587
BAX	0,004053	0,006244	1,5404	0,709898
CFLAR	0,000733	0,000324	0,4424	0,03044
FAS	0,000083	0,000802	9,6688	0,002366
FADD	0,00147	0,000356	0,242	0,002028
TNF	0,000001	0,000004	3,3636	0,047125
TNFRSF1A	0,021692	0,005166	0,2382	0,000217
PARP1	0,010574	0,002507	0,2371	0,001466
RIPK1	0,000694	0,000608	0,8766	0,51922
RIPK3	0,000002	0,000003	1,8618	0,262101

Tablo 19. T98G hücrelerinde 500 µM OL' in 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		OL 500µM	
	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Fold Change	p-value
ACTB	1	1	1	0
CASP3	0,004765	0,000594	0,1247	0,041839
CASP8	0,001298	0,000456	0,3511	0,055682
CASP9	0,000801	0,000082	0,1027	0,002598
AIFM1	0,002285	0,00039	0,1708	0,004754
TP53	0,003603	0,001639	0,4548	0,023591
BID	0,012517	0,00822	0,6567	0,171147
BAK1	0,000401	0,000234	0,5837	0,02927
BCL2L11	0,002307	0,000567	0,246	0,036255
BCL2	0,000193	0,000081	0,4204	0,038495
BCL2L1	0,001225	0,000608	0,4965	0,020264
BAX	0,005448	0,001368	0,2512	0,035332
CFLAR	0,001119	0,00016	0,1429	0,000201
FAS	0,000437	0,000198	0,4527	0,08799
FADD	0,001869	0,000099	0,053	0,011526
TNF	0,000008	0,000009	1,0644	0,747941
TNFRSF1A	0,011625	0,001543	0,1327	0,004396
PARP1	0,000522	0,000101	0,1926	0,000237
RIPK1	0,000522	0,000101	0,1926	0,000237
RIPK3	0,000007	0,000006	0,9202	0,982865

Tablo 20. HUVEC hücrelerinde 500 µM OL' in 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		OL 500µM	
	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Fold Change	p-value
ACTB	1	1	1	0
CASP3	0,005154	0,00588	1,1408	0,477079
CASP8	0,001322	0,001539	1,1647	0,624681
CASP9	0,000655	0,000367	0,5599	0,036958
AIFM1	0,002595	0,002933	1,1303	0,720946
TP53	0,000255	0,000582	2,2815	0,071352
BID	0,002228	0,002619	1,1755	0,555561
BAK1	0,000147	0,000407	2,7702	0,007805
BCL2L11	0,00065	0,000827	1,2716	0,382087
BCL2	0,000216	0,000193	0,895	0,571851
BCL2L1	0,006479	0,011465	1,7695	0,116789
BAX	0,00324	0,005202	1,6058	0,091023
CFLAR	0,002807	0,00491	1,7492	0,27409
FAS	0,001601	0,002147	1,341	0,621537
FADD	0,00063	0,000566	0,8992	0,509826
TNF	0,006419	0,004324	0,6736	0,37598
TNFRSF1A	0,003998	0,003979	0,9954	0,890076
PARP1	0,005627	0,005287	0,9395	0,696377
RIPK1	0,000833	0,000888	1,0668	0,739723
RIPK3	0,000001	0,000001	0,9817	0,786436



Şekil 61. OL 500 μ M 'ın (A) U87 MG, (B) U138 MG, (C) T98G ve (D) HUVEC hücrelerinde anlamlı kat değışimi bulunan apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesindeki değışikliklerin gösterilmesi

4.4.3.OLE' nin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

OLE' nin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde apoptoz ve nekroz ile ilişkili *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AIFM1*, *TP53*, *BID*, *BAK1*, *BCL2L11*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *CFLAR*, *FAS*, *FADD*, *TNF*, *TNFRSF1A*, *PARP1*, *RIPK1* ve *RIPK3* genlerinde mRNA ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 21-24'te sunuldu.

500 µg/ml OLE uygulanan U87MG hücrelerinde *CASP8*, *TP53*, *BAX*, *TNFRS1A* ve *PARP1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 3,4; 17,9; 9; 2,8; 3,8 kat artış belirlenmiştir.

U138MG hücrelerinde *TP53*, *CFLAR*, *FAS*, *TNF*, *RIPK1* ve *RIPK3* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 3,1; 2,8; 16,4; 5,7; 2,4; 2,8 kat artış belirlenmesiyle birlikte *BID* ve *FADD* genlerinin ekspresyon seviyeleri sırasıyla 0,32; 0,31 kat azalış tespit edildi. ($p<0,05$) (Şekil 62).

500 µg/ml OLE uygulanan T98G hücrelerinde *CASP8*, *FAD*, *TNF* ve *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 5,3; 10,3; 4,5; 5,9 kat artışı belirlenmesine rağmen, *BID*, *BAK1*, *PARP1* genlerinde sırasıyla 0,11; 0,16; 0,49 kat azalış görüldü ($p<0,05$).

HUVEC hücrelerinde *TP53*, *BAK1*, *BAX*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 7,4; 3,5; 4,5; 6,8 kat artışı belirlenmiş olup, *FADD* geninin ekspresyon seviyesi 0,12 kat azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 62).

Tablo 21. U87MG hücrelerinde 500 µg/ml OLE' nin 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		OLE 500 µg/ml	
	2 ^{-Avg.(Delta(Ct))}	2 ^{-Avg.(Delta(Ct))}	Fold Change	p-value
ACTB	1	1	1	0
CASP3	0,003773	0,00688	1,8234	0,103411
CASP8	0,001565	0,005336	3,4105	0,021172
CASP9	0,000374	0,000675	1,8025	0,097166
AIFM1	0,001861	0,001359	0,7304	0,237042
TP53	0,003002	0,053909	17,9594	0,029665
BID	0,007357	0,017098	2,3241	0,081795
BAK1	0,000487	0,000961	1,9725	0,065026
BCL2L11	0,00149	0,001539	1,0329	0,77458
BCL2	0,000107	0,000233	2,1785	0,108709
BCL2L1	0,001732	0,003129	1,8067	0,062345
BAX	0,003058	0,027521	9,0005	0,01123
CFLAR	0,00093	0,001597	1,7171	0,171323
FAS	0,000737	0,001004	1,3629	0,391808
FADD	0,001856	0,00148	0,7974	0,407938
TNF	0,000001	0,000001	1,5369	0,37393
TNFRSF1A	0,013952	0,03892	2,7895	0,01458
PARP1	0,009248	0,035239	3,8106	0,018187
RIPK1	0,000447	0,001211	2,7069	0,06948
RIPK3	0,000002	0,000002	1,341	0,714954

Tablo 22. U138MG hücrelerinde 500 µg/ml OLE' nin 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

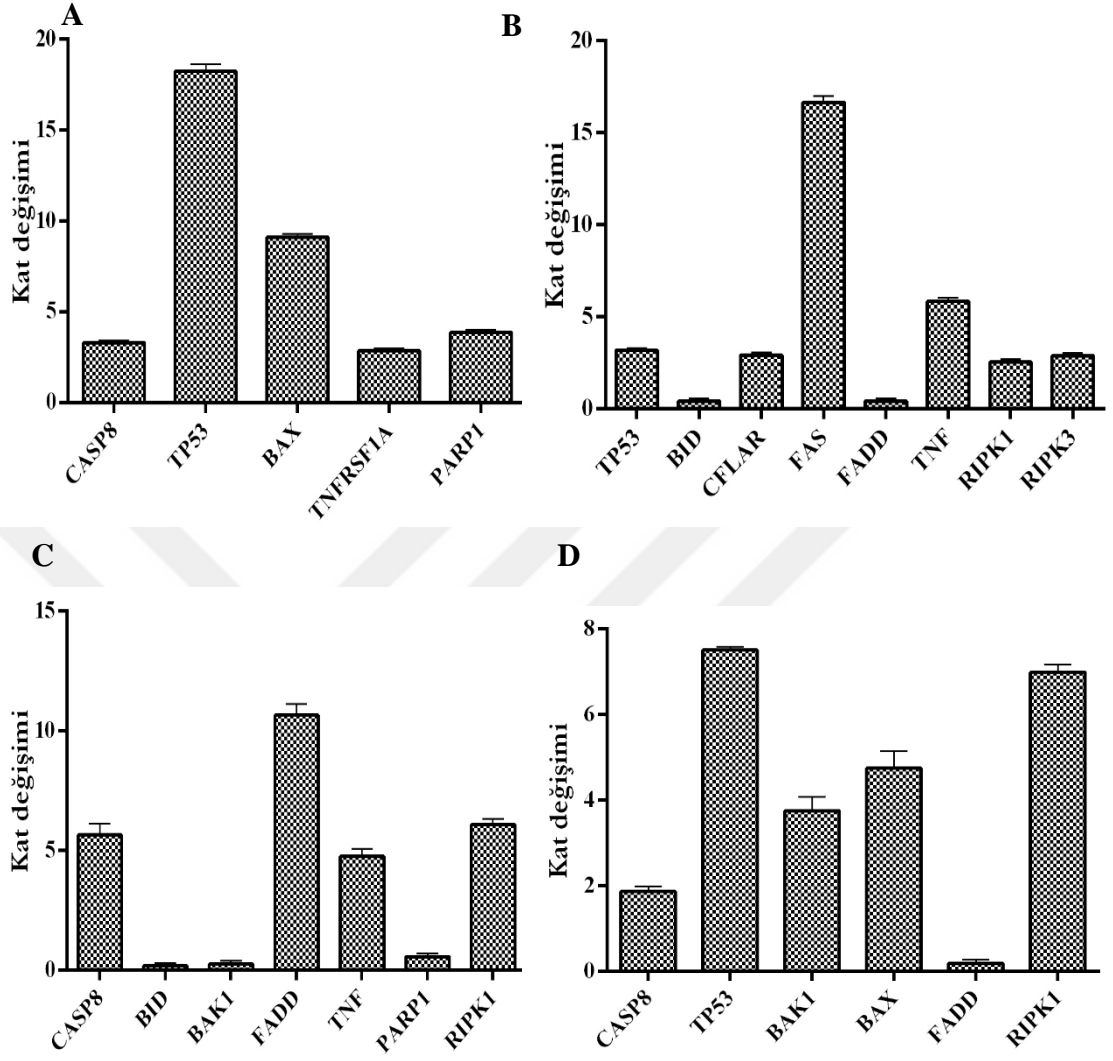
	Muamelesiz grup		OLE 500 µg/ml	
	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Fold Change	p-value
ACTB	1	1	1	0
CASP3	0,004865	0,006785	1,3947	0,185427
CASP8	0,002137	0,003704	1,7331	0,031664
CASP9	0,000411	0,000439	1,0693	0,65826
AIFM1	0,001066	0,002208	2,0705	0,060045
TP53	0,006615	0,020617	3,1167	0,004895
BID	0,01278	0,004139	0,3238	0,010875
BAK1	0,000819	0,000608	0,7423	0,101471
BCL2L11	0,002524	0,001801	0,7137	0,234178
BCL2	0,000212	0,000351	1,6586	0,113732
BCL2L1	0,003158	0,00623	1,9725	0,105016
BAX	0,004053	0,009685	2,3894	0,57407
CFLAR	0,000733	0,002084	2,8415	0,014776
FAS	0,000083	0,001362	16,4119	0,00094
FADD	0,00147	0,000465	0,3164	0,005587
TNF	0,000001	0,000006	5,6962	0,000129
TNFRSF1A	0,021692	0,016592	0,7649	0,237311
PARP1	0,010574	0,014714	1,3915	0,099328
RIPK1	0,000694	0,001689	2,434	0,036025
RIPK3	0,000002	0,000005	2,8024	0,01215

Tablo 23. T98G hücrelerinde 500 µg/ml OLE' nin 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		OLE 500 µg/ml	
	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Fold Change	p-value
ACTB	1	1	1	0
CASP3	0,004765	0,000658	0,1381	0,051166
CASP8	0,001298	0,006928	5,3394	0,040389
CASP9	0,000801	0,000566	0,7071	0,581265
AIFM1	0,002285	0,003844	1,6818	0,189083
TP53	0,003603	0,013446	3,7321	0,088444
BID	0,012517	0,001436	0,1148	0,00218
BAK1	0,000401	0,000067	0,1669	0,001863
BCL2L11	0,002307	0,005107	2,214	0,154535
BCL2	0,000193	0,000228	1,181	0,553953
BCL2L1	0,001225	0,021051	17,188	0,091605
BAX	0,005448	0,017948	3,2944	0,082747
CFLAR	0,001119	0,001926	1,7211	0,133772
FAS	0,000437	0,000229	0,5249	0,16482
FADD	0,001869	0,019326	10,3388	0,018853
TNF	0,000008	0,000037	4,5211	0,028938
TNFRSF1A	0,011625	0,009163	0,7882	0,753756
PARP1	0,000522	0,006375	0,4908	0,037158
RIPK1	0,000522	0,0031	5,9381	0,044274
RIPK3	0,000007	0,000009	1,3104	0,442469

Tablo 24. HUVEC hücrelerinde 500 µg/ml OLE' nin 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup		OLE 500 µg/ml	
	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Fold Change	p-value
ACTB	1	1	1	0
CASP3	0,005154	0,003713	0,7203	0,135122
CASP8	0,001322	0,002366	1,7901	0,028483
CASP9	0,000655	0,000924	1,4109	0,128925
AIFM1	0,002595	0,004721	1,8192	0,05664
TP53	0,000255	0,0019	7,447	0,000029
BID	0,002228	0,00318	1,4273	0,188047
BAK1	0,000147	0,000517	3,5227	0,002341
BCL2L11	0,00065	0,00144	2,214	0,186301
BCL2	0,000216	0,000277	1,2834	0,483823
BCL2L1	0,006479	0,012062	1,8618	0,081541
BAX	0,00324	0,014478	4,4691	0,000825
CFLAR	0,002807	0,005324	1,8965	0,186587
FAS	0,001601	0,001561	0,9749	0,735151
FADD	0,00063	0,000078	0,1236	0,003997
TNF	0,006419	0,005238	0,816	0,487051
TNFRSF1A	0,003998	0,003924	0,9817	0,872433
PARP1	0,005627	0,003023	0,5371	0,159437
RIPK1	0,000833	0,005719	6,8685	0,0071
RIPK3	0,000001	0,000005	3,0384	0,067338



şekil 62. 500 µg/ml OLE 'nin (A) U87 MG, (B) U138 MG, (C) T98G ve (D) HUVEC hücrelerinde anlamlı kat değişimi bulunan apoptoz ve nekroz ile ilişikli genlerin ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin gösterilmesi

4.4.4. TMZ (1000 µM)+OL (500 µM) ve TMZ (500 µM)+OLE (500µg/ml) Kombin Tedavinin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde mRNA Düzyeyinde Etkisinin Belirlenmesi

TMZ (1000 µM)+OL (500 µM) ve TMZ (500 µM)+OLE (500 µg/ml)'nin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde apoptoz ve nekroz ile ilişkili *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AIFM1*, *TP53*, *BID*, *BAK1*, *BCL2L11*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *CFLAR*, *FAS*, *FADD*, *TNF*, *TNFRSF1A*, *PARP1*, *RIPK1* ve *RIPK3* genlerinde mRNA ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 24-27'de sunuldu.

TMZ (1000 µM)+OL (500 µM) uygulanan U87MG hücrelerinde *CASP3*, *CASP9*, *TP53*, *BAK1*, *BAX*, *TNF* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 2,10; 2,54; 5,05; 2,49; 5,74; 3,84 kat artış belirlenmesine rağmen, *AIFM1* gen ekspresyonu seviyesinde 0,08 kat azalış belirlendi. TMZ (500 µM)+OLE (500 µg/ml) uygulanan hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 63).

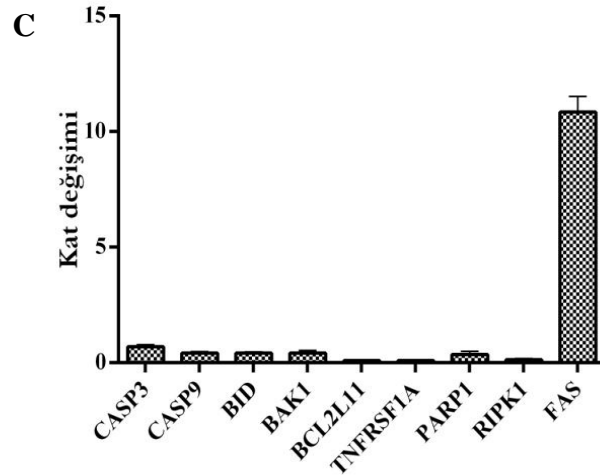
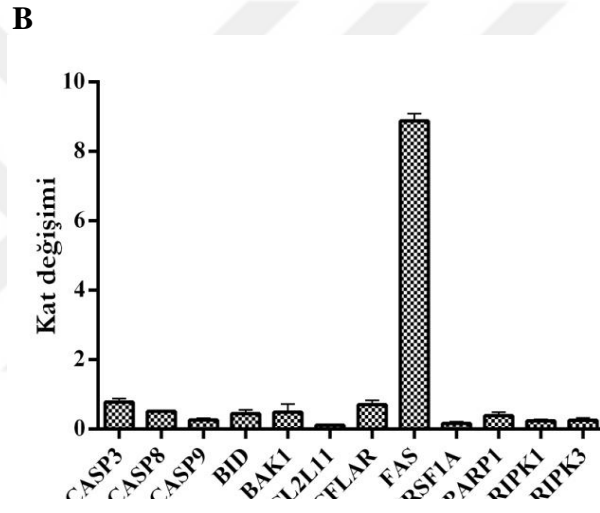
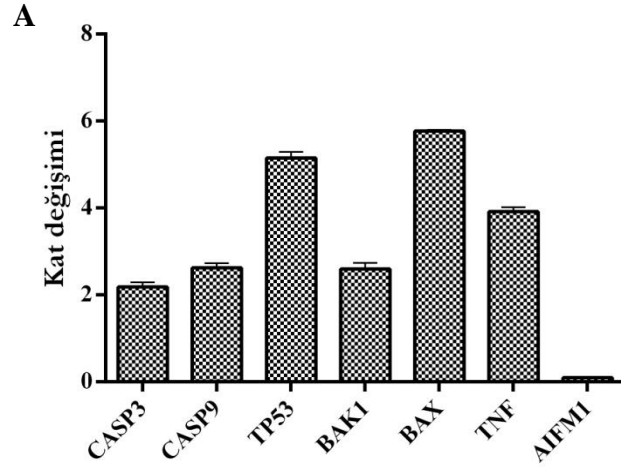
TMZ (1000 µM)+OL (500 µM) uygulanan U138MG hücrelerinde *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BID*, *BAK1*, *BCL2L11*, *CFLAR*, *TNFRSF1A*, *PARP1*, *RIPK1*, *RIPK3* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 0,70; 0,5; 0,23; 0,37; 0,32; 0,10; 0,61; 0,12; 0,31; 0,20; 0,20 kat azalış analiz edilmesi ile birlikte *FAS* gen ekspresyon seviyesinde 8,73 kat artış belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 60). TMZ (500 µM)+OLE (500 µg/ml) uygulandığında ise, *CASP3*, *CASP9*, *BID*, *BAK1*, *BCL2L11*, *TNFRSF1A*, *PARP1*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 0.63; 0.37; 0.37; 0.34; 0.09; 0.08; 0.26; 0.08 kat azalışı belirlenirken, *FAS* gen ekspresyon seviyesinde 10.36 kat artış belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 63).

Tablo 25. U87MG hücrelerinde TMZ (1000 µM)+OL (500 µM) ve TMZ (500 µM)+OLE (500 µg/ml)'nin 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup	TMZ 1000 µM+OL 500 µM			TMZ 500 µM+OLE 500 µg/mL		
	2 ⁻ ΔΔCt	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
CASP3	0,003773	0,00794	2,1043	0,007125	0,009843	2,6087	0,321744
CASP8	0,001565	0,002718	1,7371	0,008303	0,004063	2,5967	0,326343
CASP9	0,000374	0,000952	2,5432	0,005763	0,001132	3,0244	0,313694
AIFM1	0,001861	0,000161	0,0866	0,001806	0,000415	0,2232	0,087171
TP53	0,003002	0,015163	5,0513	0,000225	0,029564	9,8492	0,241406
BID	0,007357	0,011255	1,5298	0,10208	0,016027	2,1785	0,36355
BAK1	0,000487	0,001216	2,4967	0,01073	0,001631	3,3481	0,294201
BCL2L11	0,00149	0,001869	1,2541	0,09812	0,004119	2,7638	0,282648
BCL2	0,000107	0,000094	0,8847	0,575839	0,000163	1,5263	0,474797
BCL2L1	0,001732	0,002769	1,5984	0,146098	0,005576	3,2191	0,313014
BAX	0,003058	0,017579	5,7491	0,002865	0,013571	4,4383	0,317189
CFLAR	0,00093	0,001658	1,7818	0,06433	0,002814	3,0244	0,298219
FAS	0,000737	0,000299	0,4061	0,095939	0,00097	1,3165	0,510075
FADD	0,001856	0,00273	1,4709	0,084301	0,005839	3,1456	0,307867
TNF	0,000001	0,000003	3,8459	0,002318	0,000003	3,5064	0,323227
TNFRSF1A	0,013952	0,026522	1,9009	0,021609	0,047366	3,3948	0,289155
PARP1	0,009248	0,014954	1,617	0,150384	0,024803	2,682	0,319105
RIPK1	0,000447	0,000084	0,1882	0,078844	0,000174	0,3887	0,351559
RIPK3	0,000002	0,000003	1,674	0,345615	0,000008	4,2673	0,317998

Tablo 26. U138MG hücrelerinde TMZ (1000 µM)+OL (500 µM) ve TMZ (500 µM)+OLE (500 µg/ml)'nin 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup	TMZ 1000 µM+OL 500 µM			TMZ 500 µM+OLE 500 µg/ml		
	2 ⁻ ΔΔCt	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p	2 ⁻ ΔΔCt	Kat değişimi	p
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
CASP3	0,004865	0,003424	0,7038	0,001947	0,003108	0,6388	0,000997
CASP8	0,002137	0,001069	0,5	0,030526	0,001477	0,691	0,101265
CASP9	0,000411	0,000094	0,229	0,000295	0,000154	0,3746	0,002051
AIFM1	0,001066	0,000801	0,7509	0,113504	0,000742	0,6958	0,061303
TP53	0,006615	0,009184	1,3883	0,027747	0,009641	1,4573	0,042893
BID	0,01278	0,004754	0,372	0,01032	0,004831	0,3781	0,011901
BAK1	0,000819	0,000264	0,3223	0,001909	0,000281	0,3431	0,000827
BCL2L11	0,002524	0,00027	0,1071	0,008558	0,00023	0,0911	0,008075
BCL2	0,000212	0,000101	0,4796	0,076017	0,000104	0,4931	0,071227
BCL2L1	0,003158	0,004255	1,3472	0,163814	0,002074	0,6567	0,116138
BAX	0,004053	0,003058	0,7544	0,282152	0,002192	0,5409	0,216456
CFLAR	0,000733	0,000448	0,6113	0,028467	0,00075	1,0234	0,85148
FAS	0,000083	0,000725	8,7341	0,001773	0,00086	10,3627	0,007157
FADD	0,00147	0,001789	1,217	0,123565	0,001381	0,9395	0,608918
TNF	0,000001	0,000001	0,7974	0,202495	0,000002	1,5874	0,033648
TNFRSF1A	0,021692	0,002674	0,1233	0,000018	0,0019	0,0876	0,000016
PARP1	0,010574	0,003338	0,3157	0,000253	0,002814	0,2661	0,000218
RIPK1	0,000694	0,000141	0,2035	0,029388	0,000058	0,0842	0,012068
RIPK3	0,000002	0	0,2026	0,039248	0,000001	0,6462	0,224789



Şekil 63. TMZ+OL 'un (A) U87MG, (B) U138MG, TMZ+OLE' nin (C) U138MG hücrelerinde anlamlı kat değişimi bulunan apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin gösterilmesi

TMZ (1000 μ M)+OL (500 μ M) uygulanan T98G hücrelerinde *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *AIFM1*, *TP53*, *BAK1*, *BCL2L11*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *CFLAR*, *FADD*, *TNFRSF1A*, *PARP1*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 5,84; 7,42; 2,1; 5,52; 11,55; 5,29; 2,39; 5,6; 16,11; 2,65; 5,15; 4,52; 3,99; 2,28; 10,05; 10,05 kat artışı analiz edildi (Şekil 61). TMZ (500 μ M)+OLE (500 μ g/ml) uygulandığında ise, *CASP3*, *CASP8*, *AIFM1*, *TP53*, *BID*, *BAK1*, *BCL2L1*, *CFLAR*, *FAS*, *FADD*, *PARP1*, *RIPK1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 4,82; 5,4; 2,19; 7,34; 2,18; 5,15; 4; 4; 11,90; 2,77; 3,99; 3,99 kat artışı belirlenirken, *TNFRSF1A* gen ekspresyon seviyesinde 0,37 kat azalış görüldü ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Şekil 64).

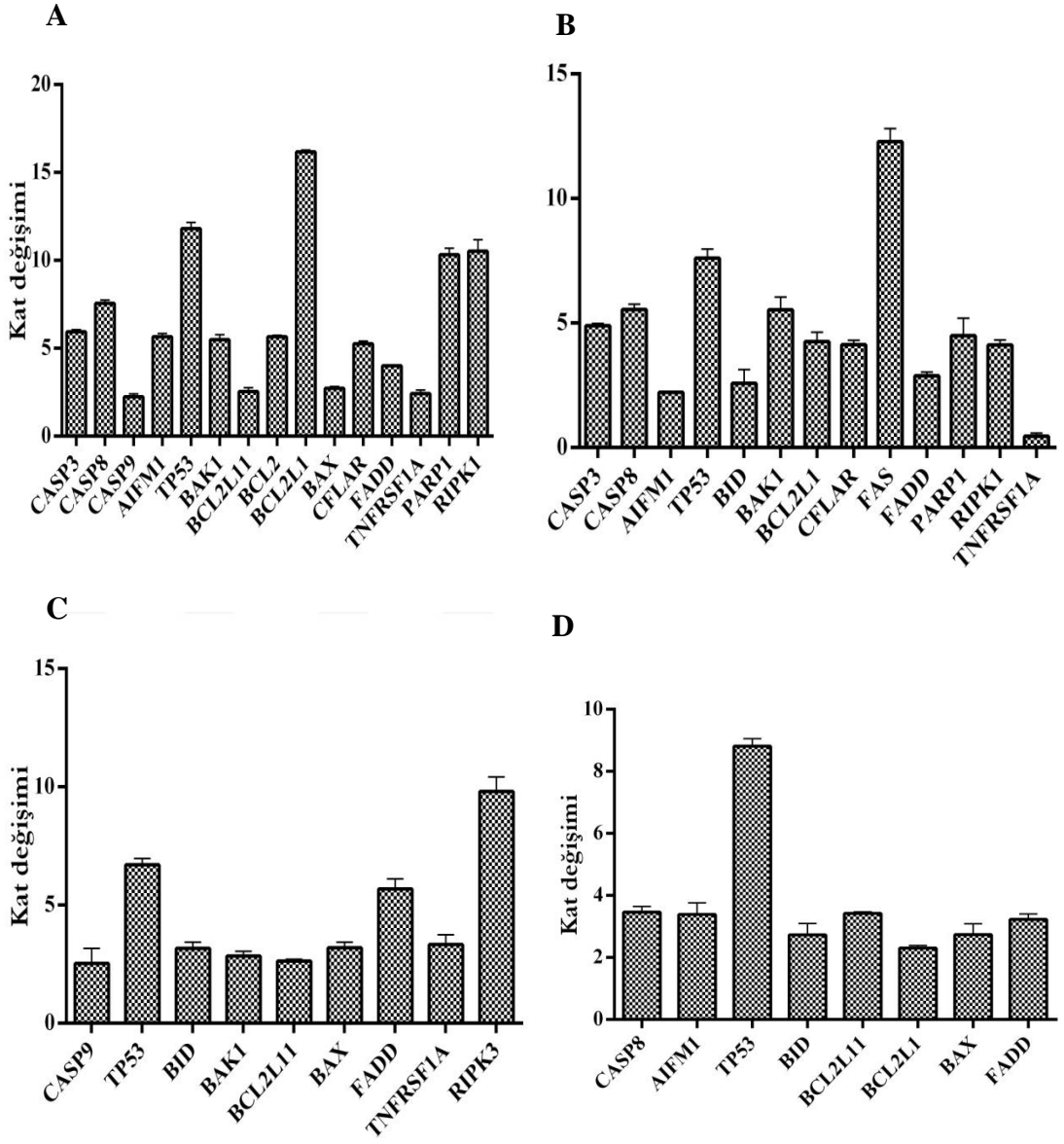
Tablo 27. T98G hücrelerinde TMZ (1000 μ M)+OL (500 μ M) ve TMZ (500 μ M)+OLE (500 μ g/ml)'nin 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup	TMZ 1000 μ M+OL 500 μ M			TMZ 500 μ M+OLE 500 μ g/mL		
	2 ⁻ $\Delta\Delta$ Ct	2 ⁻ $\Delta\Delta$ Ct	Kat değişimi	p	2 ⁻ $\Delta\Delta$ Ct	Kat değişimi	p
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
CASP3	0,004765	0,027841	5,8428	0,000266	0,022982	4,8232	0,007586
CASP8	0,001298	0,009641	7,4299	0,015486	0,007009	5,4014	0,001787
CASP9	0,000801	0,001704	2,1287	0,002629	0,000577	0,7203	0,091452
AIFM1	0,002285	0,012633	5,5277	0,001191	0,005013	2,1936	0,001216
TP53	0,003603	0,041617	11,5514	0,004868	0,026461	7,3445	0,001594
BID	0,012517	0,024918	1,9908	0,00878	0,027394	2,1886	0,000672
BAK1	0,000401	0,002123	5,2902	0,008745	0,002069	5,1575	0,00001
BCL2L11	0,002307	0,005524	2,395	0,024283	0,002147	0,9309	0,624244
BCL2	0,000193	0,001081	5,6048	0,005258	0,000928	4,8121	0,245573
BCL2L1	0,001225	0,019732	16,1113	0,000547	0,004899	4	0,00021
BAX	0,005448	0,014478	2,6574	0,006042	0,003653	0,6705	0,244068
CFLAR	0,001119	0,005772	5,1575	0,00185	0,004487	4,0093	0,000147
FAS	0,000437	0,001976	4,5211	0,126932	0,005202	11,9037	0,000693
FADD	0,001869	0,00746	3,9908	0,043608	0,00519	2,7766	0,017628
TNF	0,000008	0,000014	1,6434	0,096622	0,000007	0,8351	0,312315
TNFRSF1A	0,011625	0,026583	2,2868	0,001997	0,004344	0,3737	0,012889
PARP1	0,000522	0,00525	10,0561	0,000002	0,002084	3,9908	0,000239
RIPK1	0,000522	0,00525	10,0561	0,000002	0,002084	3,9908	0,000239
RIPK3	0,000007	0,000003	0,4965	0,067935	0,000005	0,7071	0,594373

TMZ (1000 μ M)+OL (500 μ M) uygulanan HUVEC hücrelerinde *CASP9*, *TP53*, *BID*, *BAK1*, *BCL2L11*, *BAX*, *FADD*, *TNFRSF1A*, *RIPK3* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 2,08; 6,51; 2,98; 2,70; 2,57; 3,02; 5,38; 3,04; 9,36 kat artışı belirlenirken, *AIFM1* gen ekspresyon seviyesinde 0,18 kat azalış analiz edildi (Şekil 62). TMZ (500 μ M)+OLE (500 μ g/ml) uygulandığında ise, *CASP8*, *AIFM1*, *TP53*, *BID*, *BCL2L11*, *BCL2L1*, *BAX*, *FADD* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 3,33; 3,11; 8,63; 2,46; 3,37; 2,24; 2,48; 3,10 kat artışı belirlendi ($p < 0,05$; $p < 0,01$) (Şekil 64).

Tablo 28. HUVEC hücrelerinde TMZ (1000 μ M)+OL (500 μ M) ve TMZ (500 μ M)+OLE (500 μ g/ml)'nin 24 saatte apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi

	Muamelesiz grup	TMZ 1000 μ M+OL 500 μ M			TMZ 500 μ M+OLE 500 μ g/ml		
	2 ⁻ $\Delta\Delta$ Ct	2 ⁻ $\Delta\Delta$ Ct	Kat değişimi	p	2 ⁻ $\Delta\Delta$ Ct	Kat değişimi	p
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
CASP3	0,005154	0,003262	0,6329	0,08682	0,004979	0,9659	0,936866
CASP8	0,001322	0,002577	1,9498	0,043361	0,004405	3,3326	0,046166
CASP9	0,000655	0,001365	2,0849	0,032135	0,001362	2,0801	0,079831
AIFM1	0,002595	0,000475	0,183	0,016891	0,008088	3,1167	0,032021
TP53	0,000255	0,001661	6,5131	0,003001	0,002202	8,6338	0,003803
BID	0,002228	0,006646	2,9828	0,016421	0,005499	2,468	0,020797
BAK1	0,000147	0,000397	2,7007	0,008887	0,000362	2,468	0,153219
BCL2L11	0,00065	0,001677	2,5787	0,008624	0,002197	3,3792	0,03524
BCL2	0,000216	0,000166	0,7702	0,413543	0,000283	1,3104	0,497392
BCL2L1	0,006479	0,012402	1,9141	0,087564	0,014545	2,2449	0,045066
BAX	0,00324	0,009798	3,0244	0,017419	0,008051	2,4852	0,034271
CFLAR	0,002807	0,005154	1,8361	0,241575	0,008014	2,8547	0,073175
FAS	0,001601	0,002355	1,4709	0,457603	0,003897	2,434	0,091035
FADD	0,00063	0,003393	5,3889	0,002544	0,001958	3,1095	0,00688
TNF	0,006419	0,010143	1,5801	0,342144	0,012839	2	0,147279
TNFRSF1A	0,003998	0,012174	3,0455	0,002049	0,018496	4,6268	0,07148
PARP1	0,005627	0,006723	1,1947	0,698507	0,008649	1,5369	0,288119
RIPK1	0,000833	0,001874	2,2501	0,266133	0,002003	2,4061	0,212905
RIPK3	0,000001	0,000014	9,361	0,025661	0,000006	4,3671	0,053698



Şekil 64. TMZ+OL 'un (A) T98G, TMZ+OLE' nin (B)T98G, TMZ+OL 'un (C) HUVEC ve TMZ+OLE' nin (D) HUVEC hücrelerinde anlamlı kat değişimi bulunan apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin gösterilmesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mevcut tez çalışmasında, TMZ' in GB hücrelerinde terapötik etkisini arttırmak amacı ile potansiyel anti-kanserojen özelliklerinden dolayı OLE ve onun en önemli fenolik bileşigi olan OL' in ayrı ayrı ve TMZ ile kombin olarak terapötik etkilerinin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC kontrol hücre hatlarında belirlenerek OL' in OLE' nin etkilerinin ortaya çıkmasında temel molekül olup olmadığının araştırılması ve OLE ve OL' in hücre ölüm yollarındaki moleküler mekanizması üzerinde olan etkilerinin aydınlatılması hedeflenmiştir.

Alkilleyici bir ajan olan TMZ malign gliomların tedavisinde kullanılmasına rağmen, TMZ' e karşı direnç gelişmesine neden olan mekanizmalar (MGMT ve MDR gibi) ve hastalığın agresif seyri, TMZ' in GB tedavisinde etkinliğini kısıtlamaktadır (Caldera ve ark., 2012). Bu nedenle son yıllarda potansiyel terapötik etkiye sahip bitki özütleri ve etken maddeleri ile farklı kemoterapötik ilaçların kombin tedavi stratejileri dikkat çekmektedir (Jakubowicz-Gil ve ark., 2013)

TMZ' in literatürde TMZ' ye farklı direnç oranına sahip GB hücre hatlarında sitotoksik etkisinin belirlendiği çalışmalar mevcuttur (Kanzawa ve ark., 2003; Natsume ve ark., 2005; Ryu ve ark., 2012). Ryu ve ark. (2012), TMZ' ye karşı hassas U87MG ve dirençli U138MG hücrelerinde 0–1000 μ M TMZ' in sitotoksik etkisini belirledikleri çalışmalarına, 72 saat sonunda TMZ' in etkin dozunun U87MG ve U138MG hücrelerinde sırasıyla 500 μ M' dan az ve fazla olduğunu belirtmişlerdir. Kanzawa ve ark. (2003) ve Natsume ve ark. (2005) tarafından ise, 0-1000 μ M arasında farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulanan TMZ' ye karşı dirençli T98G hücrelerinde 72 saat sonunda TMZ' in sitotoksik etkisinin 1000 μ M konsantrasyondan itibaren olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca Kanzawa ve ark. (2003), 2-6 gün boyunca 10-1000 μ M TMZ' in T98G hücresinde sitotoksik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, 4. gün sonunda 1000 μ M TMZ uygulanan T98G hücrelerinde sitotoksik etkinin artması sonucu hücrelerin apoptotik ölüme gittiği ve hücre sayısının doza ve zamana bağlı olarak azaldığını belirtmişlerdir.

Mevcut tez çalışmasında, TMZ'e farklı direnç oranına sahip GB hücre hatlarında öncelikle TMZ' in sitotoksik ve apoptotik etkisi analiz edilmiştir. TMZ'ye karşı hassas ve dirençli hücre hatları olan U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde literatürde belirtilen konsantrasyonlar ile uyumlu olarak TMZ uygulanan hücrelerde canlılık oranlarının doza ve zamana bağlı olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.01$). Ayrıca, U87MG hücreleri için TMZ' in IC_{50} değeri 353.40 μM olarak belirlenirken, U138MG ve T98G hücreleri için sırasıyla IC_{50} değeri 556.96 μM , 597.53 μM olarak belirlenmiştir.

TMZ' in GB hücre hatlarında (U87MG, T98G) neden olduğu apoptotik etkinin belirlendiği çalışmalarda, TMZ' in özellikle erken ve geç evre apoptotik ölüme neden olduğu belirtilmiştir (Yamini ve ark., 2004; Karpel-Massler ve ark.2014; Brognara ve ark.,2016). Mevcut tez çalışmasında 72 saat sonunda 250, 500 ve 1000 μM TMZ'in U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Annexin V/PI analizi sonucunda, hücrelerde TMZ' in artan konsantrasyonuna bağlı olarak erken ve geç evre apoptotik ölümün arttığı belirlenmiştir. Ancak, T98G hücrelerinde hücrelerin TMZ'ye karşı dirençli olmasından dolayı nekrotik ölümün erken ve geç evre apoptotik ölüme göre daha fazla oranda arttığı analiz edilmiştir.

TMZ'in GB hücre hatlarında neden olduğu morfolojik ve/veya apoptotik değişimlerin görüntülediği çalışma sayısı literatürde sınırlıdır. Jakubowicz-Gil ve ark. (2013) tarafından, U87MG hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca 100 μM ve 150 μM TMZ uygulanan hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak apoptozun arttığı görüntülenmiştir.

Mevcut tez çalışmasında, TMZ'in U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde neden olduğu apoptotik etkinin gözlemlenmesi için gerçekleştirilen AO/EB boyaması sonucunda, U87MG ve U138MG hücrelerinde 250 μM ve 500 μM TMZ uygulandığında erken evre ve geç evre apoptotik hücreler gözlemlenmesine rağmen, 1000 μM TMZ uygulandığında ise, hücrelerde özellikle geç apoptotik ölüm gözlemlenmiştir. T98G hücrelerinde ise doza bağlı olarak geç apoptotik ölüm miktarında artış ile birlikte nekrotik ölüm de görüntülenmiştir. Ancak, hücrelerin TMZ'ye karşı yanıt oranlarına göre hücrelerde apoptoz ve nekroz ölüm oranlarında

farklılıklar gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, elde edilen bulgular Annexin V/PI analiz sonuçlarını destekler niteliktedir.

TMZ' in apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde neden olduğu değişimler RT-PCR analizinin gerçekleştirilmesi ile belirlenmiştir. 500 ve 1000 µM TMZ uygulanan U87MG hücrelerinde apoptotik ve proapoptotik (*TP53*, *BAX*) genlerinin ekspresyonlarının artışının yanında antiapoptotik (*BCL2*, *BCL2L1*) genlerin ekspresyonlarında artışa neden olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Ancak Annexin V ve mikroskop sonuçlarımız doğrultusunda U87MG hücrelerinin büyük oranda apoptoz ve az oranda nekroza gittiği belirlenmiştir. Bu nedenle antiapoptotik genlerin varlığı hücrelerde direnç gösterme potansiyelini oluşturmasına rağmen apoptotik ve proapoptotik gen ekspresyon seviyesinin U87MG hücrelerini ölüme götürdüğü düşünülmektedir. Bunun yanında nekroz ile ilişkili *RIPK1* gen ekspresyonunun arttığı da belirlenmiştir. *TP53* ve *PTEN* mutasyonlarına sahip U138MG hücreleri 500 µM TMZ' de apoptotik gen *TP53* ve *BCL2L1* gibi antiapoptotik gen ekspresyonunun artmasının yanında *BCL2L1* proapoptotik gen ekspresyon seviyesinde anlamlı azalış belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca nekroz ile ilişki *RIPK1* gen ekspresyon seviyesinde artış görülmüştür. Annexin V/PI ve mikroskop analizleri doğrultusunda U138MG hücrelerinde apoptotik ve bir miktar nekrotik ölüm belirlenmiştir. Ancak *TP53* gen ekspresyonunda anlamlı kat artışı olmasına rağmen, *TP53* mutasyonuna sahip olan bu hücrelerde analiz edilen genler arasından antiapoptotik gen ekspresyonlarında gözlenen artış ve proapoptotik gen ekspresyonlarında belirlenen azalışın nedeni ile TMZ uygulanan U138MG hücrelerinde belirlenen hücre ölümünde diğer pro-apoptotik genlerin etkili olabileceği öngörülmüştür. Genlerde mRNA düzeyinde ekspresyon seviyesinde artış o genin taşıdığı mutasyondan dolayı hatalı protein oluşumuna ve doğru fonksiyonun yitirilmesinde neden olmaktadır (Greenbaum ve ark., 2003, Payne 2015). U138MG hücrelerine uygulanan 1000 µM TMZ uygulaması sonucu *CASP3* ve *BCL2L1* gibi apoptoza ve *RIPK1* gibi nekroza yol açan gen ekspresyon seviyelerinde artış görülmüştür. Bu sebeple elde edilen gen ekspresyon sonuçlarımız diğer bulgularımızı destekler niteliktedir. *TP53* mutasyonu içeren T98G hücrelerinde ise 500 µM TMZ uygulaması sonucu apoptotik (*CASP8*, *BAX*) ve nekrotik genlerde (*FADD*, *RIPK1*) ekspresyon artışı belirlenirken, 1000 µM TMZ uygulaması sonucu apoptotik

(*BCL2L11*) ve nekrotik genlerde (*RIPK1*, *PARP1*) ekspresyon seviyesinde artışı görülmüş olup, bu bulgularımız Annexin V/PI ve mikroskop değerlendirme sonuçlarını destekler niteliktedir.

OL kumarin-benzeri bileşiklerin bir grubu olarak en çok *Olea europaea* L.'nin meyve, zeytin yağı ve yapraklarında bulunan fenolik bileşiktir (Cardeno ve ark., 2014, Han ve ark., 2009, Yao ve ark., 2014). OL' in (100-500 μ M) çeşitli kanser hücre hatlarında (MCF-7, U251 ve A172, Hep G2, Huh7, RKO, LNCaP ve DU145) sitotoksik etkisinin belirlendiği çalışmalar literatürde mevcuttur (Acquaviva ve ark., 2012; Han ve ark., 2009; Liu ve ark., 2016). Mevcut tez çalışmasında OL' in (50-750 μ M) U87MG, U138MG ve T98G hücreleri üzerinde en etkin süresi olarak 24 saat belirlenmiştir ve hücrelerde canlılık oranının doza bağlı olarak anlamlı azaldığı analiz edilmiştir ve IC50 değerleri GB hücre hatlarında sırası ile 490 μ M, 744,1 μ M ve 1277 μ M olarak belirlenmiştir ($p < 0.01$). Kontrol olarak kullanılan HUVEC hücrelerinin canlılık oranında ise önemli bir azalış belirlenmemiştir.

Liu ve ark. (2016), 200 ve 400 μ M OL' in U251 ve A172 glioblastoma hücrelerinde 24 saat sonunda apoptotik etkisini inceledikleri çalışmalarında, 200 μ M ve 400 μ M OL uygulanan GB hücre hattı olan U251 hücrelerinde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 8.92 ve % 15.46 belirlenmesine rağmen, diğer bir GB hücre hattı olan A172 hücrelerinde sırasıyla %6.18 ve %17.10 olarak tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2016). Diğer bir çalışmada ise, 72 saat sonunda 150, 200, 250 ve 300 μ M OL uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı hücrelerinde ve MCF-10A normal meme doku hücrelerinde doza bağlı olarak apoptotik ve nekrotik ölümün arttığı belirlenmiştir (Daghestani ve ark., 2012). İnsan kolon adenokarsinoma HT-29 hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise, 24 saat boyunca 400, 600, and 800 μ M OL uygulanan hücrelerde OL' in düşük konsantrasyonlarında belirgin bir apoptotik etki belirlenmemesine rağmen, OL' in artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerde geç apoptotik ölümün arttığı belirtilmiştir. Ayrıca literatür taraması sonucunda OL ile ilişkili morfolojik analiz sınırlıdır. Morfolojik analiz ile yapılan çalışmalarda 200 μ M OL uygulanan MCF-7, H1299 ve HeLa hücrelerinde apoptozun karakteristik özellikleri olan hücre membran bütünlüğünün bozulduğu ve kormatin yoğunlaşması ile apoptotik cisimciklerin oluştuğu görüntülenmiştir (Han ve ark., 2009 ve Yao ve ark. 2014).

Mevcut tez çalışmasında, OL' in artan konsantrasyonuna bağlı olarak U87MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde geç apoptotik ölüm oranının artmasına rağmen, U138MG hücrelerinde erken apoptotik ölüm oranının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, hücrelerde OL' in apoptotik etkisi AO/EB boyaması ile de görüntülenmiştir. OL' in U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde etkisi incelendiğinde, *PTEN* mutasyonu içeren U87MG hücrelerinde 500 µM OL uygulaması sonucunda apoptotik genlerin (*TP53*, *BAX*) ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir. *TP53* ve *PTEN* mutasyonu içeren U138MG hücrelerine uygulanan 500 µM OL sonucunda ise tez çalışması kapsamında analiz edilen genler arasında apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin (*CASP8*, *CASP9*, *FADD*, *PARP1*) ekspresyon seviyesinin azaldığı, bunun yanında *FAS* geninin ekspresyon seviyesinin 9 kat arttığı görülmektedir ($p < 0.05$). *FAS* gen ekspresyon seviyesinin bazı kanser hücrelerinde daha fazla olduğu literatürde bilinmektedir. Fas hücre yüzeyinde reseptör görevi görerek, ligandın (FasL) bağlanmasını sağlar. FasL' nin Fas ile etkileşime girmesi sonucunda hedef hücre üzerinde apoptozis tetiklenmesi sağlanır (Wu ve ark., 2001). U138MG hücrelerinin *TP53* ve *PTEN* mutasyonuna sahip olması bu hücrelerde farklı mekanizmaların aktiflenmesine neden olarak apoptotik ve nekrotik genlerin ekspresyon seviyesinin azalmasına neden olabilmektedir. U87MG hücrelerinin *PTEN* mutasyonu taşımlarına rağmen OL ile muamelesinde apoptotik genlerin ekspresyonlarının artmasında *TP53* mutasyonu içermemesi olarak öngörülmüştür. *TP53* mutasyonu içeren T98G hücrelerinde ise analiz ettiğimiz genler arasında apoptotik ve nekrotik genlerin ekspresyon seviyesinde artış görülmüştür. U138MG ve T98G hücrelerinin OL'e yanıt vermesini engelleyen faktörlerden birinin apoptosis ile ilişkili TP53' ün bu hücrelerde mutasyonlu olması olduğu öngörülmüştür. Ancak, OL uygulanan U138MG ve T98G hücrelerinde gerçekleştirilen diğer analizler sonucu apoptotik ölümün belirlenmesinde tez kapsamında çalışılmayan diğer apoptotik genlerin etkili olabileceği öngörülmüştür.

OLE' nin en önemli biyoaktif bileşenlerinden biri olan OL dışında, hidroksitriazol, rutin, dimetil olerepein ve luteolin gibi etken maddelerde yer almaktadır (Han ve ark., 2009, Marchetti ve ark., 2015). Bu nedenle mevcut tez çalışması kapsamında OLE içeriğinde OL dışında başka etken maddelerden kaynaklı

bir sitotoksik etkiye, apoptotik ve nekrotik ölüme neden olup olmadığını belirlenmesi amacıyla OLE' nin GB hücre hatlarında etkisi analiz edilmiştir. OLE' nin (0-3000 µg/ml) farklı kanser hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saatte (TPC-1, BCPAP, HL60, HT29, T98G, U138MG, U87MG) sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur (Anter ve ark., 2011, Bulotta ve ark., 2013, Reyes-Zurita ve ark., 2009, Tezcan ve ark., 2014). Bu çalışmalarda hücrelerde farklı zaman dilimlerinde uygulanan doza bağlı olarak hücrelerde canlılık oranlarının anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.01$). Mevcut tez çalışmasında, OLE (500-2500 µg/ml) uygulanan U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinin canlılık oranında anlamlı azalış tespit edilmiştir ($p < 0.01$) ve IC50 değerleri sırasıyla 168,01 µg/ml; 233,3 µg/ml; ve 171,84 µg/ml olarak belirlenmiştir.

OLE' nin hücrelerde apoptotik ve nekrotik ölüme neden olduğu Annexin V/PI analizi ile belirlenmiştir (Anter ve ark., 2011, Tezcan ve ark., 2014). Mevcut tez çalışmasında, Annexin V/PI analizi ile OLE' nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak U87MG ve U138MG hücrelerinde geç apoptotik ve nekrotik ölümün arttığı, T98G hücrelerinde ise nekrotik ölümün önemli derecede arttığı belirlenmiştir. U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde OLE' nin neden olduğu apoptotik ve/veya nekrotik ölümün, hücrelerin fenotipik ve genotipik özelliklerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği öngörülmüştür. OLE' nin hücrelerde neden olduğu ölüm yolları ile ilişkili morfolojik değişimlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen AO/EB boyaması sonucunda, U87MG ve U138MG hücrelerinde geç apoptotik ve nekrotik ölüm belirlenmesine rağmen, T98G hücrelerinde nekrotik ölüm gözlemlenmiştir. Anter ve ark. (2011) gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 2, 6 ve 24 saat boyunca 160µg/ml OLE uygulanan HL60 hücrelerinde AO/EB boyaması sonucunda nekrotik ölüm olduğunu belirtmişlerdir (Anter ve ark., 2011).

OLE' nin apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde etkisi incelendiğinde, U87MG hücrelerinde apoptotik ve nekrotik genlerin ekspresyonlarının arttığı belirlenmiş olup özellikle *TP53* gen ekspresyonunda 17 kat artış belirlenmiştir. U138MG hücrelerinde de apoptotik ve nekrotik genlerin ekspresyon seviyelerinin anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. OL muamelerinde olduğu gibi OLE uygulanması sonucu da FAS gen ekspresyonu 16 kat artış göstermiştir. T98G

hücreleri analiz edildiğinde apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyonunun artmasının yanında FADD geninde 10 kat artış belirlenmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda, mevcut tez çalışmasında TMZ' in hücrelerde terapötik etkisini arttırmak ve OL ve OLE ile kombin olarak potansiyel sinerjik veya antogonist etkisini belirlemek amacı ile belirlenen konsantrasyonlarda TMZ+OL ve TMZ+OLE' nin U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkisi belirlenmiştir. OLE' nin farklı kemoterapötik ajanlar ile kombin etkisinin araştırıldığı çalışma sayısı literatürde sınırlıdır. Tezcan ve ark. (2014), T98G, U138MG ve U87MG hücrelerinde TMZ (300-500 µM), OLE (1, 2 mg/ml) ve OLE-TMZ' in kombin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, TMZ-OLE' nin hücrelerde tek başına uygulanan TMZ ve OLE'ye göre daha etkili olduğunu ve bu nedenle sinerjik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Mevcut tez çalışmasında OL ve OLE' nin TMZ ile kombin olarak U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile değerlendirilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda TMZ ve OL uygulanan U87MG, U138MG, T98G ve HUVEC hücrelerinde canlılık oranı anlamlı derecede ($p<0.05$) azalmasına rağmen, tek olarak TMZ uygulanan hücrelere göre tüm hücre hatlarında canlılık oranı TMZ ve OL kombin uygulamasında daha yüksek oranda belirlenmiştir. Bu nedenle, TMZ ve OL' in antagonist etkiye sahip olduğu öngörülmektedir. TMZ ve OLE uygulanan hücrelerde ise, tek başına TMZ ve tek başına OLE uygulanan U87MG, U138MG ve T98G hücrelerine göre canlılık oranı daha fazla oranda anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.01$). HUVEC hücrelerinde ise tek başına OLE uygulanan hücrelere göre canlılık oranının TMZ ve OLE birlikte uygulanan hücrelerde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. TMZ ve OLE' nin hücrelerde sinerjik etkiye sahip olduğu öngörülmüştür. Sonuç olarak, TMZ ve OLE' nin sinerjik etki göstermesine rağmen, OL ve TMZ' in antagonist etkiye sahip olması, OLE içeriğinde bulunan diğer etken maddeler ile TMZ' in sinerjik etki potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle bu konuda OLE içeriğinde yer alan diğer etken maddeler ile detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

TMZ+OL ve TMZ+OLE' nin hücrelerde neden olduğu apoptotik ve nekrotik ölüm miktarları Annexin V/PI analizi ile değerlendirmiştir. TMZ+OL uygulanan U87MG, U138MG, T98G hücrelerinde erken, geç apoptotik ve nekrotik ölümün

arttığı belirlenmiştir. Ancak, WST-1 analizi ile elde edilen sonuçlara paralel olarak tek TMZ uygulanan hücelere göre, TMZ ve OL uygulanan U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde apoptotik ve nekrotik ölüm oranlarında azalış tespit edilmiştir. OLE ve TMZ' in kombin uygulandığı U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde tek başına OLE uygulanan hücelere göre geç apoptotik ve nekrotik ölüm oranlarının daha fazla arttığı analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, WST-1 analizi sonuçlarını destekler niteliktedir. Ayrıca, GB hücre hatlarında TMZ, OL ve OLE' nin kombin apoptotik ve nekrotik etkileri AO/EB boyaması ile görüntülenmiştir. TMZ ve OL' in birlikte uygulanması sonucu U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde geç apoptotik ve nekrotik ölüm daha az gözlemlenmesine rağmen, HUVEC hücrelerinde ise tek başına TMZ ve tek başına OL uygulanan hücelere göre daha fazla oranda hasar görüntülenmiştir. Diğer yandan, TMZ ve OLE' nin sinerjik etkisinden dolayı U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde tek başına OLE uygulanan hücelere göre daha fazla oranda nekrotik ölüm gözlemlenmesine rağmen, HUVEC hücrelerinde daha az nekrotik ölüm görüntülenmiştir. Ancak, TMZ' in U87MG, U138MG ve T98G hücrelerinde neden olduğu apoptotik ölüm TMZ+OLE kombin uygulanan hücrelerde gözlemlenmemiştir. Bu nedenle hücrelerde daha fazla oranda nekrotik ölümün gerçekleşmesine neden olan moleküler mekanizmaların araştırılacağı detaylı çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

TMZ+OL ve TMZ+OLE uygulanan hücrelerde apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde değişimler RT-PCR analizi ile değerlendirildiğinde, TMZ+OL uygulanan U87MG hücrelerinde tek başına OL ve tek başına TMZ uygulanan hücelere göre daha fazla apoptotik genlerin (*CASP3*, *CASP9*, *TP53*, *BAX*, *TNF*) ve nekrotik (*TNF*) gen ekspresyon seviyesinde anlamlı artış belirlenmiştir ($p<0.05$). U138MG hücrelerinde TMZ+OL'un birlikte uygulandığında OL tek başına uygulandığı durumda olduğu gibi apoptoz (*CASP9*, *CASP9*) ve nekroz (*PARP1*, *RIPK1*) ile ilişkili gen ekspresyonu seviyesinde azalma görülmesi ile birlikte, *FAS* gen ekspresyonunda yaklaşık 9 kat artış belirlenmiştir ($p<0.05$). T98G hücrelerinde OL tek başına analiz edildiğinde apoptotik (*CASP9*, *BCL2L11*) ve nekrotik (*RIPK1*) genlerin ekspresyon seviyelerinin azalmalarına neden olurken, TMZ ve OL kombin olarak verildiğinde apoptoz (*CASP8*, *BCL2L11*) ve nekroz (*RIPK1*) genlerinde yüksek oranda artışa yol açtığı belirlenmiştir ($p<0.05$).

TMZ+OLE uygulanan U87MG hücrelerinde istatistiksel bir anlam ifade etmemekle birlikte apoptoz (*BAX*, *BCL2L11*) ve nekroz (*RIPK3*) ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. TMZ+OLE uygulanan U138MG hücrelerinde ise OLE' nin tek başına ve TMZ' in tek başına uygulandığında ekspresyon seviyesi düşen genlere benzer gruplarda yer alan genlerde (*BCL2L11*, *BID*) düşüş olduğu belirlenmiş olup, kanser hücrelerinin genotip/fenotip özelliği ile ilişkili olduğunu öngörmekte olduğumuz *FAS* geninin ekspresyonunda 10 kat artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). T98G hücrelerinde TMZ+OLE birlikte uygulandığında apoptotik (*AIFM1*, *FAS*) ve nekrotik (*RIPK1*) genlerin ekspresyon seviyesinde artış görüldü. T98G hücrelerinde OLE' nin tek başına olan etkisinde birkaç genin (*BID*, *BAK1*) ekspresyon seviyelerinin azalması, ancak TMZ+OLE ile birlikte verildiğinde bu genlerin ekspresyon seviyesinin artmasında, T98G hücrelerinin genotip/fenotip özelliği ve TMZ+OLE' nin T98G hücreleri üzerinde sinerjik etkisinin varlığı olduğu öngörülmüştür. Sonuç olarak, U138MG hücrelerinin apoptoziste rol oynayan *TP53* ve *PTEN* mutasyonlarını birlikte içermesi nedeni ile tek başına OL ve TMZ+OL kombin uygulamasında apoptotik ve nekrotik genlerin ekspresyonlarında anlamlı derecede azalış gösterdiği, bununla birlikte hücrenin özelliğine bağlı olarak *FAS* gen ekspresyon artışının anlamlı olarak görüldüğü belirlenmiştir. T98G ve U138MG hücrelerinde ise OL tek başına ve kombin olarak (TMZ+OL) verildiğinde gerek WST-1 sonuçları gerekse Annexin V/PI ve mikroskop görüntülerinde bu değerlerin birbirlerine yakın olduğu görülmekte olup, ekspresyon sonuçlarını destekler niteliktedir.

OLE içerisinde yer alan diğer etken maddelerin GB hücre hatlarında potansiyel terapötik etkisinin belirleneceği detaylı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, tek OLE ve OLE+TMZ kombin sinerjik terapötik etkisi sonucunda hücrelerde belirlenen nekrotik ölüme yol açan moleküler ve epigenetik mekanizmaların aydınlatılması ve bu mekanizmalarda rol alan birbiri ile ilişkili spesifik genlerin ekspresyon seviyesinde değişimlerin belirlenmesi ile mevcut tez çalışması geliştirilebilir.

Sonuç olarak mevcut tez çalışmasının bulguları OLE' nin sitotoksik etkilerinin ve TMZ ile sinerjik etkilerinin ortaya çıkmasında onun en önemli fenolik bileşeni olan OL' in tek etmen olmadığı literatürde ilk kez ortaya konmuştur. Ayrıca mevcut

tez çalışmasında tek başlarına ve TMZ ile kombin olarak apoptotik, nekrotik ve nekroptotik ölüm yolları üzerine olan etkileri gen ekspresyonu seviyesinde mevcut ayrıntılarda ilk kez ele alınmıştır. Elde edilen bulgular GB tedavisine yönelik ileri analizlere ışık tutacaktır.



6. KAYNAKLAR

Acquaviva R, Giacomo CDI, Sorrenti V et al (2012) Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International journal of oncology* 41(1): 31.

Agarwal P, Sandey M, DeInnocentes P et al (2013) Tumor Suppressor Gene p16/INK4A/ CDKN2A-Dependent Regulation Into and Out of the Cell Cycle in a Spontaneous Canine Model of Breast Cancer *Journal of Cellular Biochemistry* 114: 1355– 1363.

Alel'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, Article ID 956958, doi:10.1155/2012/956958

Allen BK, Stathias V, Maloof ME et al (2015) Epigenetic Pathways and Glioblastoma Treatment: Insights From Signaling Cascades. *Journal of Cellular Biochemistry* 116: 351–363.

Altaner C (2008) Glioblastoma and stem cells-Minireview. *Neoplasma*, 55(5), 369.

Anter J, Fernández-bedmar Z, Villatoro-pulido M et al (2011) Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic , and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts, 723, 165– 170. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.005>.

Barbaro B, Toietta G, Maggio R et al (2014) Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18508-18524.

Bastien JI, McNeill KA, Fine HA (2015) Molecular Characterizations of Glioblastoma, Targeted Therapy, and Clinical Results to Date. *Cancer*. 15; 121(4): 502-16.

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.

Borawska ŻR, Fiedorowicz MH, Naliwajko A et al (2013) Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-13-50>.

Boss A, Bishop KS, Marlow G et al (2016) Evidence to support the Anti-Cancer effect of olive leaf extract and future Directions. *Nutrients*, 8(8), 513.

Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan ST et al (2016) Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. doi: 10.3389/fsurg.2016.00021

- Brognara E, Fabbri E, Montagner G et al (2016) High levels of apoptosis are induced in human glioma cell lines by co-administration of peptide nucleic acids targeting miR-221 and miR-222. <http://doi.org/10.3892/ijo.2015.3308>
- Bulotta S, Corradino R, Celano M et al (2013) Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. <http://doi.org/10.1530/JME-12-0241>
- Burgess R, Jenkins R, Zhang Z (2008) Epigenetic changes in gliomas. *Cancer biology & therapy*, 7(9), 1326-1334.
- Caldera V, Mellai M, Annovazzi L et al (2012) MGMT hypermethylation and MDR system in glioblastoma cancer stem cells. *Cancer Genomics-Proteomics*, 9(4), 171-178.
- Cardeno A, Sánchez-hidalgo, M (2015) Oleuropein, a Secoiridoid Derived from Olive Tree, Inhibits the Proliferation of Human Colorectal Cancer Cell Through ... Oleuropein, a Secoiridoid Derived from Olive Tree, Inhibits the Proliferation of Human Colorectal Cancer Cell Through Downregulation of HIF-1 α . <http://doi.org/10.1080/01635581.2013.741758>
- Carrasco-García E, Saceda M, Martínez-Lacaci I (2014) Role of Receptor Tyrosine Kinases and Their Ligands in Glioblastoma. *Cells*. 3(2): 199–235.
- Chen L, Tweddle A (2012) p53, SKP2, and DKK3 as MYCN target genes and their potential therapeutic significance. *Front Oncol* 28; 2: 173.
- Chen YH, Hung MC, Shyu WC (2012) Role of cancer stem cells in brain tumors. *Biomedicine*, 2(3), 84-91.
- Choi JD, Lee JS (2013) Interplay between epigenetics and genetics in cancer. *Genomics & informatics*, 11(4), 164-173.
- Christmann M, Verbeek B, Roos WP et al (2011) O 6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1816(2), 179-190.
- Cohen A, Holmen S, Colman H (2013) IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas *Curr Neurol Neurosci Rep*. 13(5): 345.
- Crespo I, Vital A.L, Gonzalez-Tablas M et al (2015) Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme *Am. J Pathol*, 185: 1820-1833.
- Cruceru ML, Neagu M, Demoulin J et al (2013) Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms *J. Cell. Mol. Med.* Vol 17, No 10, 2013 pp. 1218-1235.

Dimitrov L, Hong CS, Yang C et al (2015) New Developments in the Pathogenesis and Therapeutic Targeting of the IDH1 Mutation in Glioma. *Int J Med Sci.* 20;12(3): 201-13.

Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J et al (2012) Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & Development* 26: 756–784

Durmaz R, Vural M (2007) Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği Türk Nöroşirürji Dergisi, Cilt: 17, Sayı: 2, 80-904

Earl T (2007) Targeting Epigenetic Processes in Glioblastoma Multiforme Christian Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for Graduation with Distinction in Biological Sciences in the Undergraduate Colleges of the Ohio State University.

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Engin K, Özyardımcı N (2001) Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul. Bölüm III Bölüm Yazarı: Dr. Engin ULUKAYA.

Escobar L, Echeverría O, Vázquez-Nin G (2015) Necrosis as Programmed Cell Death. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » "Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis", book edited by Tobias M. Ntuli, ISBN 978-953-51-2236-4 DOI: 10.5772/61483

Eser S, Yakut C, Özdemir R et al (2010) Cancer Incidence Rates in Turkey in 2006: A Detailed Registry Based Estimation *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 11(6), 1731-1739.

Eser S, Yakut C, Özdemir R et al (2009) Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 11(6), 1731-1739.

Favaloro B, Allocati N, Graziano et al (2012) Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 4(5), 330-349.

Feoktistova M, Leverkus M (2015) Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS journal*, 282(1), 19-31.

Friedman HS, Kerby T, Calvert H (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical Cancer Research*, 6(7), 2585-2597.

Goldsmith, C. D., Vuong, Q. V, Sadeqzadeh, E et al (2015) Phytochemical Properties and Anti-Proliferative Activity of *Olea europaea* L. Leaf Extracts against Pancreatic Cancer Cells, 12992–13004.

Gonçalves CS, Lourenço T, Xavier-Magalhães A et al (2013) Mechanisms of Aggressiveness in Glioblastoma: Prognostic and Potential Therapeutic Insights. *Nat Rev Neurol*. <http://dx.doi.org/10.5772/52361>

Gresner SM, Rieske P, Wozniak K (2007) Gliomas: Association of histology and molecular genetic analysis of chromosomes 1p,10q,19q. *Acta Neurobiol Exp* 2007,67: 103-112

Gudinavičienė G, Pranys D, Juozaitytė E (2004) Impact of morphology and biology on the prognosis of patients with gliomas *Medicina* Vol. 40, No. 2

Han J, Talorete AETPN (2009) Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells, 45–53.

Harris CC (1996) Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. *J Natl Cancer Inst*. 16;88(20): 1442-55.

Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D et al (2010) Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging and Radioresistance. *Neoplasia*. 12(9): 675-84.

Hongmei Z (2012) Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. INTECH Open Access Publisher.

Huang Z, Cheng L, Guryanova OA et al (2010) Cancer stem cells in glioblastoma—molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* 2010, 1(7): 638–655.

Ichimura K, Bolin MB, Goike HM et al (2000) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer research*, 60(2), 417-424.

Indran IR, Tufo G, Pervaiz, S et al (2011) Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(6), 735-745.

Jakubowicz-Gil J, Langner E, Dorota B (2013) Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment, <http://doi.org/10.1007/s13277-013-0785-0>

Jhanwar-Uniyal M, Labagnara M, Friedman M et al (2015) Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers*, 7(2), 538-555.

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.

Jovčevska I, Kočevnar N, Komel R (2013) Glioma And Glioblastoma - How Much Do We (Not) Know? (Review) *Molecular And Clinical Oncology* 1: 935-941

Kalkan R (2015) Glioblastoma Stem Cells as a New Therapeutic Target for Glioblastoma Clinical Medicine Insights: Oncology 2015:9 95–103.

Kalkan R, Atlı Eİ (2014) Geçmişten Günümüze Glioblastoma Genetiği Nöroşirirjü Dergisi, Cilt: 24, Sayı: 3, 239-249

Kanu O, Hughes B, Di C et al (2009) Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways Clinical Medicine: Oncology 3: 39–52

Kanzawa T, Germano IM, Kondo Y et al (2003) Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide, 922–929. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601193>

Karpel-Massler G, Wirtz R (2014) Artesunate Enhances the Antiproliferative Effect of Temozolomide on U87MG and A172 Glioblastoma Cell Lines, <http://doi.org/10.2174/18715206113136660340>

Katsushima K, Kondo Y (2014) Non-coding RNAs as epigenetic regulator of glioma stem-like cell differentiation. doi: 10.3389/fgene.2014.00014

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

Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. Neuro-oncology, 1(1), 44-51.

Kondo Y, Katsushima K, Ohka F et al (2014) Epigenetic dysregulation in glioma Cancer Sci.105(4): 364

Koul D (2008) PTEN signaling pathways in glioblastoma. Cancer biology & therapy, 7(9), 1321-1325.

Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert, E et al (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & development*, 29(12), 1203-1217.

Li J, Yuan J (2008) Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene, 27(48), 6194-6206.

Liffers K, Lamszus K, Schulte A (2015) EGFR Amplification and Glioblastoma Stem-Like Cells. Stem Cells Int. 427518 1,2.

Lino MM, Merlo A (2011) PI3Kinase signaling in glioblastoma. J Neurooncol; 103(3): 417–427.

Liu M, Wang J, Huang B et al (2016) Oleuropein inhibits the proliferation and invasion of glioma cells via suppression of the AKT signaling pathway, 2009–2016. <http://doi.org/10.3892/or.2016.4978>

Maleszewska M, Kaminska B (2013) Is Glioblastoma an Epigenetic Malignancy? *Cancers* 2013, 5, 1120-1139.

Manfredi JJ (2010) The Mdm2–p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & Dev.* 2010. 24: 1580-1589

Marchetti C, Clericuzio M, Borghesi B et al (2015) Oleuropein-enriched olive leaf extract affects calcium dynamics and impairs viability of malignant mesothelioma cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/908493>

Martinez R, Schackert G (2007) Epigenetic Aberrations in Malignant Gliomas: An Open Door Leading to Better Understanding and Treatment *Epigenetics*, 2: 3, 147-150.

Martínez-Martos JM, Mayas MD, Carrera P, et al (2014) Phenolic compounds oleuropein and hydroxytyrosol exert differential effects on glioma development via antioxidant defense systems. *Journal of Functional Foods*, 11, 221-234.

McLendon R, Friedman A, Bigner D et al (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways *Nature*, 455, pp. 1061–1068

Miller CR, Perry A (2007) Glioblastoma Morphologic and Molecular Genetic Diversity *Arch Pathol Lab Med—Vol 131*.

Moll UM, Petrenko O (2003) The MDM2-p53 Interaction. *Mol Cancer Res.* 1(14): 1001-8.

Montaldi AP, Godoy PRDV, Sakamoto-hojo ET (2015) Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis APE1 / REF-1 down-regulation enhances the cytotoxic effects of temozolomide in a resistant glioblastoma cell line. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 793, 19–29.

Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone, A et al (2011) Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 558-572.

Nag S, Qin J, Srivenugopal K, Wang M, Zhang R (2013) The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of Biomedical Research* DOI: 10.7555/JBR.27.20130030

Natsume A, Ishii D, Wakabayashi T et al (2005) IFN- B Down-Regulates the Expression of DNA Repair Gene MGMT and Sensitizes Resistant Glioma Cells to Temozolomide, (17). <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0036>

Nifterik KA, Van Berg J Van Den et al (2010) Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *British Journal of Cancer*, 103(1), 29–35.

Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V et al (2011) Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells, 63–69. <http://doi.org/10.1007/s12263-010-0177-7>

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 DOI: 10.2353/ajpath.2007.070011

Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research*, 19(4), 764-772.

Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B (2011) Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences*, 119(1), 3-19.

Park DM, Rich JN (2009) Biology of glioma cancer stem cells. *Molecules and cells*, 28(1), 7-12.

Persano L, Rampazzo E, Basso G et al (2013) Glioblastoma cancer stem cells: Role of the microenvironment and therapeutic targeting *Biochemical Pharmacology* 85 612–622.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Experimental cell research*, 283(1), 1-16.

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. doi: 10.3389/fonc.2013.00169.

Ramirez YP, Weatherbee JL, Wheelhouse RT et al (2013) Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1475-1506.

Rasime K (2015) Epigenetics of Glioblastoma Multiforme. *J Clinic Res Bioeth.* 6:3 <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9627.1000225>.

Rastogi RP, Sinha RP (2010) Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. <http://dx.doi.org/10.17877/DE290R-8930>.

Reyes-zurita FJ, Rufino-palomares EE, Lupiáñez JA, et al (2009) Maslinic acid , a natural triterpene from *Olea europaea* L ., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Letters*, 273(1), 44–54.

Ryu CH, Yoon WS, Park KY et al (2012) Valproic Acid Downregulates the Expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-Resistant Glioma Cells. <http://doi.org/10.1155/2012/987495>

Sabry OM (2014) Review: Beneficial health effects of olive leaves extracts. *J Nat Sci Res*, 4, 1-9.

Safa AR, Saadatzadeh MR, Cohen-Gadol AA (2015) Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes & Diseases* 2, 152e163.

Safa AR, Saadatzadeh MR, Cohen-Gadol AA et al (2016) Emerging targets for glioblastoma stem cell therapy *The Journal of Biomedical Research*, 2016, 30(1): 000-000.

Sciuscio D, Hegi ME (2013) *Epigenetics and Brain Cancer*. DOI 10.1007/978-0-85729-458-6_2, © Springer-Verlag London

Serrano M (1997) The Tumor Suppressor Protein p16INK4a *Experimental Cell Research* 237, 7–13.

Shi D, Gu W (2012) Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes Cancer*. 2012 Mar;3(3-4):240-8. doi: 10.1177/1947601912455199.

Silber JR, Bobola MS, Blank A et al (2012) O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(1), 71-82.

Su Z, Yang Z, Xu Y et al (2015) Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*, 14(1), 48.

Tezcan G, Ozgur M, Tunca B et al (2017) ScienceDirect Olea europaea leaf extract and bevacizumab synergistically exhibit beneficial efficacy upon human glioblastoma cancer stem cells through reducing angiogenesis and invasion in vitro. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 90, 713–723.

Tezcan G, Tunca B, Bekar et al (2014) Olea europaea leaf extract improves the treatment response of GBM stem cells by modulating miRNA expression, 4(5), 572–590.

Thomas RP, Recht L, Nagpal S (2012) Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing. *Clin Pharmacol*, 5, 1-9.

Torisu M, Katano M, Higashi D et al (2009) Proceedings Of The 12th Annual Meeting Of The Society Of Biotherapeutic Approaches, 6 December, 2008, Fukuoka, Japan Preface. *Anticancer Research*, 29(11), 4845-4900.

Tsujimoto Y (1997) Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death & Differentiation*, 4(6).

Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M et al (2014) Glioblastoma multiforme – an overview *Contemp Oncol (Pozn)* 18 (5): 307–312.

Vanlangenakker N, Berghe TV, Krysko DV et al (2008) Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current molecular medicine*, 8(3), 207-220.

Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG (2015) Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.57

Wang J, Ma Y, Cooper MK (2013) Cancer stem cells in glioma: challenges and opportunities *Transl Cancer Res* 2013; 2(5): 429-441.

Weathers SP, Gilbert MR (2014). Advances in treating glioblastoma. *F1000Prime Rep*, 6, 46.

Wu M, Ding H, Fisher DE (2001) Apoptosis: Molecular Mechanisms. USA David E Fisher *Encyclopedia of Life Sciences / Nature Publishing Group / www.els.net*

Yamini B, Yu X, Gillespie GY et al (2004) Advances in Brief Transcriptional Targeting of Adenovirally Delivered Tumor Necrosis Factor by Temozolomide in Experimental Glioblastoma, 6381–6384.

Yan CMEI, Chai ERQ, Cai HYI et al (2015) Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line, 4617–4624. <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.3266>

Yang H, Ye D, Guan KL (2012) IDH1 and IDH2 Mutations in Tumorigenesis: Mechanistic Insights and Clinical Perspectives. *Clin Cancer Res*; 18(20) October 15, 2012.

Yao J, Wu J, Yang X et al (2014) Oleuropein Induced Apoptosis in HeLa Cells via a Mitochondrial Apoptotic Cascade Associated With Activation of the c-Jun NH 2 - Terminal Kinase, 311, 300–311. <http://doi.org/10.1254/jphs.14012FP>

Yıldız G, Uylaşer V (2011) Doğal bir antimikrobiyel: oleuropein. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1).

Yin H, Zhou Y, Wen C et al (2014) Curcumin sensitizes glioblastoma to temozolomide by simultaneously generating ROS and disrupting AKT / mTOR signaling, 1610–1616. <http://doi.org/10.3892/or.2014.3342>.

Young RM, Jamshidi A, Davis G et al (2015) Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of translational medicine*, 3(9).

Yuan JJ, Wang CZ, Ye JZ et al (2015) Enzymatic hydrolysis of oleuropein from *Olea europaea* (olive) leaf extract and antioxidant activities. *Molecules*, 20(2), 2903-2921.

Zadeh G, Bhat KPL, Aldape K (2013) EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma: Partners in Crime. *Cancer Cell*. Volume 24, Issue 4, p403-404,

Zong WX, Thompson CB (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*, 20(1), 1-15.

Zülgh KJ (1969) Biology and morphology of glioblastoma multiforme. *Acta radiologica: therapy, physics, biology*, 8(1-2), 65-77.



SİMGELER VE KISALTMALAR

GB: Glioblastoma

EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü

IDH1: İzositrat dehidrogenaz

MDM2: Mouse Double Minute 2

PTEN: Phosphatase And Tensin

RB: Retinomlastoma

TP53: *Tumor Protein P53*

CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

LOH: Loss of heterozygosity

DNMT: DNA methyltransferase

MGMT: O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase

TNFR1: NFRSF1A Associated Via Death Domain

TRAILR1: Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily

TMZ: Temazolamid

OLE: *Olea europaea*

OL: Oleuropein

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilime olan sevgisi, karakteri ve hoşgörüsü ile bana çok şey öğreten, sabrını, desteğini ve bilimsel katkılarını esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Berrin TUNCA' ya, bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ünal EGELİ ve Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER' e teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü desteği ile bana güç veren, bilgi ve donanımı ile beni yetiştiren, hiçbir zaman emeklerini ödeyemeyeceğim, manevi ablam Araş. Gör. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER' e, tez sürecinde ve özel hayatta her türlü desteği sağlayan Biyolog Ayten HACİEFENDİ' ye, tez yazmamı keyifli hale getiren, güler yüzü eksilmeyen, yardımsever YL. Öğr. Beste YURDACAN' a ve destekleri için Enis AKAY'a, projenin kurgulanması ve yazılmasında emeği geçen Dr. Gülçin TEZCAN' a birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Tıbbi Biyoloji A.D asistan, öğrenci ve tüm çalışanlarına, can yoldaşım, kardeşim Elif'e ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



ÖZGEÇMİŞ

1990 yılı Bursa doğumluyum. İlköğretimimi Gemlik 11 Eylül İlköğretim Okulu’da tamamladım. Gemlik Celal Bayar Anadolu Lisesi 2009 yılı mezunuyum. Lisans eğitimimi İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde tamamlayarak 2013 yılında mezuniyetimin ardından Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D’da yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

