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

İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMALARDA TİMOKİNON'UN HÜCRE CANLILIĞINA VE PROLİFERASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan

Berfin UĞUR

Danışman

Prof.Dr. Zuhal HAMURCU

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2022

KAYSERİ

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMALARDA TİMOKİNON'UN HÜCRE CANLILIĞINA VE PROLİFERASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan

Berfin UĞUR

Danışman

Prof.Dr. Zuhal HAMURCU

Haziran 2022

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Berfin UĞUR

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Geninde Mutasyon Taşıyan ve Taşımayan Glioblastomalarda Timokinon'un Hücre Canlılığına ve Proliferasyonuna Etkisinin Araştırılması'adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	**Danışman**
Berfin UĞUR	**Prof.Dr.Zuhal HAMURCU**
İmza	**İmza**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

İmza

KABUL ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Zuhal HAMURCU danışmanlığında Berfin UĞUR tarafından hazırlanan "İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Geninde Mutasyon Taşıyan ve Taşımayan Glioblastomalarda Timokinon'un Hücre Canlılığına ve Proliferasyonuna Etkisinin Araştırılması" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

14/06/2022

JÜRİ:

Danışman: Prof.Dr. Zuhal HAMURCU (Tıbbi Biyoloji AD)

Üye: Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ (Tıbbi Biyoloji AD)

Üye: Doç.Dr. Züleyha DOĞANYİĞİT (Bozok Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji AD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……tarih ve ……. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

14/06/2022

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca danışmanlığımı yapan, tezimin her aşamasında bilgi, öneri, özveri ve her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübesiyle hem akademik hem de sosyal anlamda bana katkı sağlayan çok değerli hocam, Prof. Dr. Zuhal HAMURCU' ya,

Tezin her aşamasında değerli fikirleriyle katkı sağlayan değerli hocalarım Doç.Dr. Serpil TAHERİ'ye,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini hep hissettiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Hamiyet Altuntaş'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm değerli hocalarıma ve öğretim üyelerine;

Bu tezin gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi bünyesindeki tüm çalışanlara ve sevgili çalışma arkadaşlarım; Nursultan NURDİNOV, Venhar ÇINAR, Ahsen GÜLER, İrem METİN, Serhat ALBAYRAK, Sena ÖZKUL ve Berkay ARSLAN'a;

Tezimin çalışmasında kapısını her zaman açık tutan, tezimin başarılı bir şekilde ilerlemesine sebep olan, cihaz ve malzeme konusunda yardımını esirgemeyen sayın Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi kurumuna ve sayın müdürümüz Prof.Dr. Yuzuf Özkul'a;

Hayatım boyunca beni destekleyen ve haklarını ödeyemeceğim anneme, babama ve kardeşlerime,

Teşekkürlerimi sunarım.

İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMALARDA TİMOKİNON'UN HÜCRE CANLILIĞINA VE PROLİFERASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Berfin UĞUR

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2022

Danışman: Prof.Dr. Zuhal HAMURCU

ÖZET

Gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 4 alt evrede toplanmıştır. Evre I ve Evre II "düşük evreli", Evre III ve Evre IV (glioblastoma multiforme, GBM) ise "yüksek evreli" kabul edilmiştir. 2016'da yapılan sınıflandırmada GBM'ler, izositrat dehidrogenaz (IDH) geninde mutasyon taşıyan ve taşımayan olarak ikiye ayrılmıştır, GBM'lerin, heterojen olmaları, yüksek proliferasyon oranları, agresif özellikleri hastalarda tedaviyi zorlaştırmaktadır. GBM hastalarında uygulanan geleneksel tedavi stratejileri, tümör rezeksiyonu, temozolomide dayalı kemoterapi, radyoterapi veya bunların kombinasyonuna dayanmaktadır. GBM tedavisinde ilerlemeler olmasına rağmen, hastaların yaşam süreleri oldukça kısadır. GBM'lerin tedavisi için daha etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanser ilaçlarının yan etkilerinden dolayı alternatif tedavi olarak veya var olan tedavilerine destek olarak bitkisel kaynaklı ve sitotoksititesi az olan doğal biyoaktif maddelerin kullanımı önem kazanmıştır. Bunlar arasında, antioksidan, antienflamatuar ve antikanser özellikleri nedeniyle; çörek otu özütü timokinon (TQ), son yıllarda çeşitli kanser araştırmasında konu olmuştur. TQ, proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi kanserin farklı evrelerinin inhibisyonunda etkili olduğu dolayısıyla metastazı engelleyebildiği bildirilmiştir.

Literatürde GBM kanser hücrelerinde timokinon antiproliferatif etkisi araştırılmıştır. Ancak literatür incelendiğinde IDH-mutant olan GBM hücreleri üzerine TQ'nun anti-proliferatif etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Önerilen tez çalımasın da TQ'nun IDH-mutant GBM hücrelerin canlılığı ve proliferasyonuna proliferasyonuna

olası etkisinin IDH-mutant olamayan GBM hücreleri ile karşılaştırılmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma sonuçlarımıza göre, IDH-mutant olmayan GBM hücrelerinde 25 μM'dan itibaren, IDH-mutant GBM hücrelerinde ise 6.25 μM'dan itibaren TQ'nun hücre canlılığını azalttığı bulundu. Bu sonuçlarımız TQ'nun IDH-mutant GBM hücrelrinde çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki gösterdiği ve bu hastalar için kemoteröptiklere alternatif olarak veya kemoteröpatiklerle kombinasyonun kemoteröpatiklerin etkinliğini artırabileceğini işaret etmiştir.

Anantar Kelimeler: GBM; IDH; IDH-mutant GBM; IDH-mutant; Proliferasyon; Timokinon.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF THIMOKINONE ON CELL VITALITY AND PROLIFERATION IN GLIOBLASTOMAS WITH AND WITHOUT MUTATION IN THE ISOCITRATE DEHYDROGENase (IDH) GENE

Berfin UGUR

Erciyes University Institute of Health Sciences

Master Thesis, June 2022

Advisor: Prof.Dr. Zuhal HAMURCU

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive primary (stage IV) brain tumor and develops from star-shaped glial cells called astrocytes. GBM has aggressive features such as rapid proliferation, invasion and migration into brain tissue. Glioblastoma is the most common malignant primary brain tumor, accounting for approximately 57% of all gliomas and 48% of all primary malignant central nervous system (MMS) tumors. GBMs are highly resistant to treatments due to their heterogeneity, high proliferation rates, and aggressive properties, and their average survival time is less than one year. Although various advanced treatments, including surgery, radiotherapy, and chemotherapy, have been recorded, patient survival is still very low and the mechanisms underlying the pathophysiological mechanisms of glioblastoma development have not yet been elucidated.

Since cancer types are individual, the preferred treatment methods may vary between individuals. Due to the side effects of cancer drugs, the use of natural bioactive substances with plant origin and low cytotoxicity has gained importance as an alternative treatment or to support existing treatments. Among them, due to its antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties; The black seed extract thymoquinone (TQ) has received particular attention and has been the subject of various cancer research in recent years. TQ's brain, breast, pancreas, prostate, blood, mouth, bone, uterus, liver and lung etc. Its anticancer activity on different types of cancer has been demonstrated in various in vitro and in vivo studies. It has been reported that TQ is

effective in the inhibition of different stages of cancer such as proliferation, migration and invasion, thus preventing metastasis.

In the literature, the antiproliferative effect of many thymoquinones has been investigated in many cancer cells, including GBM.

However, when the literature was examined, no study was found that investigated the anti-proliferative effect of TQ on IDH-mutant GBM cells.

In the proposed thesis study,it was aimed to comparatively investigate the possible effect of TQ on the viability and proliferation of IDH-mutated mutant GBM cells, as well as its effect on non-IDH-mutant and IDH mutant cells.

Keywords: GBM; IDH; IDH-mutant GBM; IDH-mutant; Proliferation; Thymoquinone.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK 1
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ii
KABUL VE ONAY SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
KISALTMALAR ve SİMGELER xi
TABLOLAR LİSTESİ xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 KANSER 3
2.2.Glioma 4
2.3. Glioblastoma Multiform 5
2.3.1.Glioblastoma multiform (GBM) Etiyolojisi 6
2.3.2.GBM Epidemiyolojisi 6
2.3.3. GBM İçin Güncel Tedavi Yaklaşımları 7
2.3.4. GBM'nin Sınıflandırılması 8
2.3.5.Glioblastoma Multiform (GBM) ve İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Mutasyonu ... 12
2.4.Timokinon 13
2.5.1.Timokinon ve Kanser 15
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER 17

3.1. GEREÇ 17
3.1.1.Kullanılan cihaz, alet ve sarf malzemeler 17
3.2. YÖNTEM 18
3.2.1. Hücre Kültürü 18
3.2.1.1. Besiyeri Hazırlanması 19
3.2.1.2 Hücrelerin Çoğaltılması 19
3.2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması 19
3.2.1.3 Hücrelerin Sayımı 20
3.2.1.4 Hücre Dondurma 20
3.2.3. Timokinon ile Hücrelerin Muamele Edilmesi 20
3.2.3.1.Timokinonun hazırlanması 20
3.2.4. Hücre proliferasyonu (MTS analizi) 20
3.2.5.Klonojenik Analiz 21
3.2.6. Hücre canlılık analizi (Tripan Mavisi ile Boyama) 21
3.2.7.İstatiksel Analiz 22
4.BULGULAR 23
4.1. TQ'nun U87-MG ve IDH mutant U87 GBM hücrelerinin canlılığına etkisi 23
4.2 TQ'nun U87-MG ve IDH mutant U87 GBM hücrelerinin klon oluşuma etkisi 31
5.TARTIŞMA 35
6.KAYNAKLAR 39
EKLER 49
ÖZ GEÇMİŞ 51

KISALTMALAR ve SİMGELER

a-KG **:** Alfa-ketoglutarat

ALT **:** Alternatif Telomer Uzaması

AML **:** Akut Miyeloid Lösemi

ATCC **:** Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

EGFR **:** Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

FBS **:** Fetal Sığır Serumu

GBM : Glioblastoma Multiform

2-HG **:** D-2-hidroksiglutarat

IDH **:** İzositrat Dehidrojenaz

KBB **:** Kan Beyin Bariyeri

LGG **:** Düşük Dereceli Glioma

$NADP^+$ **:** Adenin Dinükleotit Fosfat

NF1 **:** Nörofibromatoz Tip 1

NIH : Ulusal Kanser Enstitüsü

p53 **:** Tümör Protein 53

PDGFRA **:** Trombosit Türevli Büyüme Faktörü Reseptörü A

PIK3CA **:** Fosfatidilinozitol 3-Kinaz Katalitik Alt Ünite Alfa

PIK3R1 **:** Fosfoinositid-3-Kinaz Düzenleyici Alt Birim 1

PTEN **:** Fosfataz ve Tensin Homologu

Rb **:** Retinoblastoma

RB1' **:** RB Transkripsiyonel Koruyucusu 1

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

TERT **:** Tirozinkinazların Amplifikasyonu, Telomeraz Ters Transkriptaz

TERTp **:** Telomeraz Ters Transkriptaz Promotörü

TMZ : Temeozolomid

TP53 **:** Tümör Protein 53

TQ **:** Timokinon

WHO **:** World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. IDH–Vahşi Tip ve IDH-Mutant Glioblastomların Özellikleri …….11

Tablo 3.1. Kullanılan Cihazlar ……..…..…..17

Tablo 4.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri 18

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Hücre içi ve hücreler arası heterojenite (Anjum ve ark., 2017).....5

Şekil 2.2 GBM tedavisinin tarihsel gelişimi (Ozdemir- Kaynak ve ark., 2018).....8

Şekil 2.3 IDH1'in dimerizasyonu. İki tane monomeri olan vahşi tip IDH1, izositratı a-KG'ye çeviren katalitik bir homodimer meydana getirmektedir. IDH1 mutasyonu taşıyan hücrelerde, vahşi bir tip monomer ve R132H mutantı bulunduran monomer birleşerek, bir heterodimer meydana getirmektedir. Heterodimer, D-2-HG sentezlemek için a-KG'ı tüketen neomorfik aktivite sergilemektedir 12

Şekil 2.4 (a) çörek otu ve (b) tohumları.....13

Şekil 2.5 Timokinonun 2B ve 3B yapısı, C_{10} $H_{12}O_2$.....14

Şekil 2.6 NS farmakolojik aktivitelerinin kapsamlı özeti 15

Şekil 4.1 24 saat TQ ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde canlılık oranı. A) 24 saat 0.4-100 µM TQ ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 100 µM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu B) 24 saat 0.4-100 µM TQ ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 6.25-100 µM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns (non-significant): anlamsız; *p<0.05; ***p<0,001; **p<0.01; ***p<0,001; ****p<0.0001). 24

Şekil 4.2 24 saat TQ ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerin canlılık oranı. Her iki hücrede de artan TQ konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin canlılığının azaldığı bulundu (ns (non-significant): anlamsız; *p<0.05; ***p<0,001;****p<0.0001). 26

Şekil 4.3 24 saat TQ ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde tripan mavisi ileboyanan hücre sayısı. Her iki hücrede de artan TQ konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin canlılığının azaldığı bulundu. ns (non-significant): anlamsız; *p<0.05; ***p<0,001;****p<0.0001. 30

Şekil 4.4 Timokinon ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde koloni oluşum oranı. C) 0.4-200 µM timokinon ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre timokinon uygulanan hücrelerde önemli oranda klon sayısının azaldığı bulundu. D) 0.4-100 µM timokinon ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre timokinon uygulanan hücrelerde önemli oranda klon sayısının azaldığı bulundu. ns (non-significant); **p<0.001; ****p<0.0001. 34

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gliomalar, glial hücrelerden kaynaklanan tümörlerdir ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından 4 alt evrede toplanmıştır. Evre-I ve Evre-II "düşük evreli", Evre-III ve Evre-IV (glioblastoma multiforme, GBM) ise "yüksek evreli" kabul edilmiştir (Sonoda Y, 2020). Son yapılan sınıflandırmaya göre, GBM'ler izositrat dehidrogenaz (IDH) geninde görülen mutasyona göre IDH geninde mutasyon taşıyan ve taşımayan olarak ikiye ayrılmıştır.

GBM'lerin, heterojen olmaları, yüksek proliferasyon oranları, agresif özellikleri hastalar da tedaviyi zorlaştırmaktadır. GBM hastalarında uygulanan geleneksel tedavi stratejileri, tümör rezeksiyonu, Temozolomid'e dayalı kemoterapi, radyoterapi veya bunların kombinasyonuna dayanmaktadır. GBM tedavisinde ilerlemeler olmasına rağmen, hastaların yaşam süreleri oldukça kısadır. GBM'lerin tedavisi için daha etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Fabian ve ark., 2019; Pearson ve ark., 2017; Shergalis ve ark., 2018).

Kanser tedavisi için son yıllarda yapılan çalışmalar, daha az yan etkileri olan yeni ve etkili hedefler geliştirmeye odaklanmıştır (Mun ve ark., 2018.). Çörek otundan elde edilen TQ'nun, birçok kanser türlerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Deng ve ark.,2019.).

TQ'nun GBM hücrelerinde de antiproliferatif etkisi araştırılmıştır. Ancak literatür incelendiğinde IDH-mutant olan GBM hücreleri üzerine TQ'un anti-proliferatif etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu yüzden sunulan tez çalışmasında, IDH-mutant hücrelerinin proliferasyonu üzerine TQ'nun etkisi ve IDH-mutant olmayan

GBM hücreleri ile daha iyi bir prognoz sergileyen ile IDH-mutant GBM hücreleri
TQ'ya karşı duyarlılıklarının karşılaştırılmalı olarak araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KANSER

Çağımızın en büyük sağlık tehditleri arasında kanser ilk sıralarda yer almaktadır (Ansary ve ark., 2021). Küresel çapta yapılan araştırmalara göre kanser mortalitesi çok yüksek olan bir hastalıktır. (El-Far ve ark., 2020). Kanser, kardiyovasküler bir hastalık olan miyokard enfarktüsünden sonra ikinci sırada yer alan ölüm nedenidir. (Homayoonfal ve ark., 2021) Dünya sağlık örgütünün (WHO) 2019'daki verilerine göre 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş öncesinde görülen ölümlerin birinci veya ikinci olarak önde gelen nedenidir (Sung ve ark., 2021).

Kanser anormal hücrelerin aşırı çoğalması sonucu tümör hücrelerine dönüşmesi ile karakterize edilmektedir. Tümör hücrelerine dönüşüm, vücudumuzun belirli kısımlarında kanser öncesinde hücrelerin habis bir duruma dönüşmesine neden olan çok sayıda farklı kademelerden geçmektedir. İlk önce bitişiğinde yer alan dokuları, daha sonra organları ve en sonunda vücudun diğer kısımlarına metastaz yapma yeteneği ile ölümcül bir hastalık olarak öne çıkmaktadır (Homayoonfal ve ark., 2021; Singh ve ark., 2020).

Kanserde ölüm oranlarının yüksek olması nedeniyle tedavisinin çözüme kavuşması dünya çapında bir öncelikli bir hal almıştır (Mahmoud ve Abdelrazek, 2020). Bu durum göz önünde bulundurularak kanser çeşitlerine ve gelişimlerine göre farklı tedavi yöntemleri açığa çıkmıştır. Bunlar arasında hormonal tedavi, cerrahi, kemoterapi, kodlamayan RNA'ları hedefleme bulunmaktadır. Tedavide kemoterapi ilk sıralarda yer alır. Kemoterapinin birçok faydası olmasına rağmen saç foliküllerine, kemik iliğinde bulunan normal yapıdaki hücrelere zarar verir, toksik etkiler gösterir, ilaç direnci gelişir. Tüm bunlar göz önüne alındığında doğal bitkilerin içerisinde bulunan biyoaktif

bileşiklerin kanser tedavisinde kullanımı büyük önem kazanmıştır (Ansary ve ark., 2021).

2.2. Glioma

Glial hücreler; oligodendrositler, astrositler ve ependimal hücreler nöronların fonksiyonlarının desteklenmesine ve aksonların miyelin ile kaplanmasına yardımcı olmaktadır. Ancak glial hücreler tümör hücrelerine dönüşebilir (Ferris ve ark., 2017).

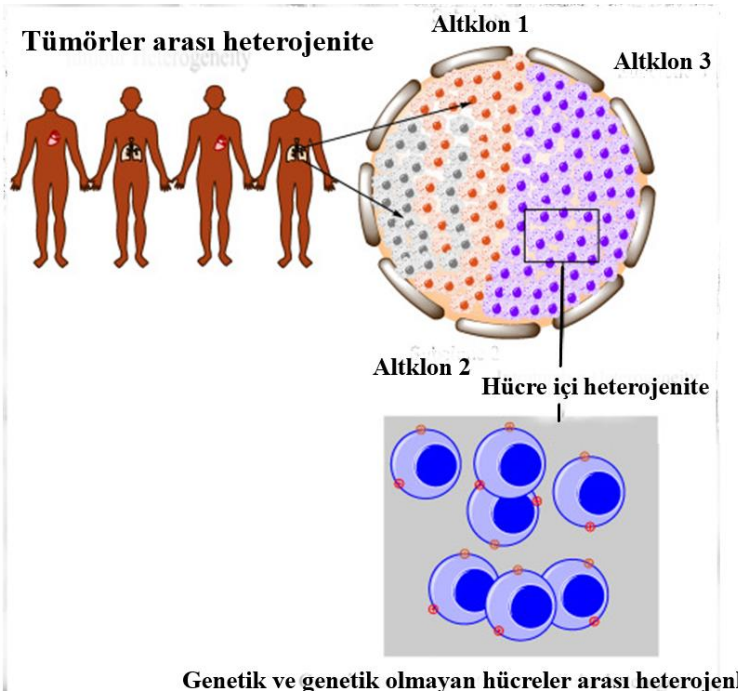
Santral sinir sistemi (MSS) tümörlerinin en büyük grubunu, glial hücrelerden gelişen ve genel olarak glioma olarak adlandırılan malign tümörler oluşturur (Anjum ve ark., 2017).

MSS'ne ait olan ilk glioma sınıflandırması 1926'da Percival Bailey ve Harvey Cushing tarafından bildirilmiştir (Komori ve ark., 2017). Histolojik açıdan bakıldığında farklı çeşitte MSS tümörü bulunmaktadır (Davis 2018). 2016 yılında WHO, gliomaları histopatolojik yani hücresel kökenine göre ve agresiflik derecelerine göre sınıflandırmıştır. Agresiflik derecelerine göre; glioma tümörlerini I ve IV arasında numaralandırmıştır. Histopatolojik olarak ise; astrositomlar, oligodendrogliomlar (oligoastrositom) veya ependimomlar olarak sınıflandırılmaktadırlar (Miller ve ark., 2017). *WHO günümüzde MSS tümörlerini,* sınıflandırmak ve bunları 6 farklı kategoriye bölmek için yeni bir yaklaşım benimsemiştir: WHO Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflandırması (WHO CNS5)1'in beşinci baskısı, 1979, 1993, 2000, 2007 ve 2016'daki önceki yayınların ardından beyin ve omurilik tümörlerinin sınıflandırılması için uluslararası standardın altıncı versiyonudur. WHO MSS5, MSS tümör sınıflandırmasında moleküler tanılamanın rolünü ilerletmek için daha da ileri giderek, ancak histoloji ve immünohistokimya dahil olmak üzere tümör karakterizasyonuna yönelik diğer yerleşik yaklaşımlarda kök salarak önemli değişiklikler sunmaktadır. MSS tümör sınıflandırması uzun süredir yardımcı doku bazlı testler (örn., immünohistokimyasal, ultrastrüktürel) tarafından desteklenen histolojik bulgulara dayanmaktadır. Daha yakın zamanlarda, moleküler biyobelirteçler hem yardımcı hem de teşhis bilgilerinin tanımlanmasında önem kazanmıştır. Bu nedenle WHO MSS5, CNS neoplazmalarının en doğru sınıflandırması için önemli olan klinikopatolojik fayda ile çok sayıda moleküler değişikliği içerir (Louis ve ark., 2021).

Gliomanın bazı alt tipleri; nadir olarak toplumda gözlense de çok ciddi bir mortaliteye ve morbiditeye sebep olmaktadır (Raizer ve Parsa, 2015.).

2.3. Glioblastoma Multiform

Glioblastoma multiform (GBM); tüm glioma çeşitleri arasındaki en agresif ve yüksek dereceli bunun yanında en sık görülen, heterojen yapıda olan glioma tümör tipidir heterojenitesi bulunmaktadır. GBM vakalarında tümörler arası (intertumoral) ya da tümör içi (intratümoral) heterojenite de meydana gelebilmektedir. Bir organ üzerinde çoğalmış olarak bulunan tümörler diğer organlarda bulunan tümörlerden farklılık göstermektedir. Şaşırtıcı bir şekilde, aynı organ üzerinde bulunan tümörler bile birbirinden farklı bir yapıdadır, bu durum tümörler arası heterojenite (intertumoral) olarak tanımlanmıştır. Bunun beraberinde; ister aynı tanıyı almış, isterse farklı tanı almış tümör hücreleri de birbirinden farklılık göstermektedir. Bu durum hücre içi heterojenitesi (intratümör) olarak tanımlanmaktadır. Hücresel heterojenite ile birlikte sağlıklı yapıda olan dokuları istila etme yeteneği, hücre içi heterojeniteye sebebiyet vermektedir (Şekil 2.1). Bu durumdan dolayı GBM tedavi edilemeyecek bir hal almıştır (Anjum ve ark., 2017).



Şekil 2.1. Hücre içi ve hücreler arası heterojenite (Anjum ve ark., 2017).

2.3.1. Glioblastoma multiform (GBM) Etiyolojisi

Kanserin sebepleri arasında genetik ve çevresel etkenler bulunmaktadır (Güran, 2005). Genetik etkenler arasında mutasyonlar, hormonsal bozunmalar bulunmaktadır Çevresel etkenler arasında ise; radyasyon, ultraviyole ışınlar, sigara ve alkol tüketimi, beslenme bozuklukları bulunmaktadır (Çetinkaya ve Şahin, 2020). Ancak, glioblastomanın etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıstır. Yapılan birçok araştırmaya rağmen, GBM'nin büyük bir kısmının ortaya çıkmasında belirgin herhangi bir risk faktörü doğrulanamamıştır. GBM' de diğer kanser türleri gibi sporadik ilerleme göstermektedir.

GBM gelişimi ile sigara, cep telefonlarında ki elektromanyetik alan, beyine alınmış çok ağır darbe vb. çevresel faktörler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çevresel faktörler ile GBM arasında bir ilişki olduğuna dair kanıt bulunamamıştır. Araştırmalar, cep telefonu kullanımının GBM gelişme riskini artırmadığını göstermiştir (Kanderi ve Gupta, 2021).

Yapılan bazı çalışmalarda; GBM' nin gelişim göstermesiinde östrojen hormonunun rolü olduğu bildirilmiştir (Hanif ve ark., 2017). İnsan sitomegalovirüsü (HCMV) benzeri virüsler nedeniyle GBM' nin gelişebileceği düşünülmektedir (Urbańska ve ark., 2014.).

Sonuç olarak, günümüze kadar yapılan çalışmalar dahilinde yalnızca iyonlaştırıcı radyasyon ile karşılaşmak, tasdik edilmiş tek çevresel etken olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte, GBM' in etiyolojisinin sırlarını çözmek için daha birçok çalışmaya ihtiyaç vardır (Thakkar ve ark., 2014).

2.3.2. GBM Epidemiyolojisi

Glial hücrelerde ortaya çıkan tümörlerin insidansı, çalışmanın örneklerinin toplandığı şehrin ve ülkenin tıbbi ve sosyal imkânlarına bağlı olarak değişimler göstermektedir. Ancak, çalışmalardan elde edilen verilere göre GBM en fazla rastlanan malign primer glioma türüdür (Özduman ve ark., 2019).

Yıllık olarak görülme sıklığı her 100.000 sağlıklı insan arasında 5 kişide açığa çıkmaktadır. Her sene hastalarda yeni teşhis edilen GBM vaka sayısı 17.000'dir. GBM vakaları ilerleyen yaşlarda toplumlarda daha sık olarak gözlemlenmektedir ve 75-84 yaş aralığında zirveye ulaşmaktadır (Montemurro, 2020).

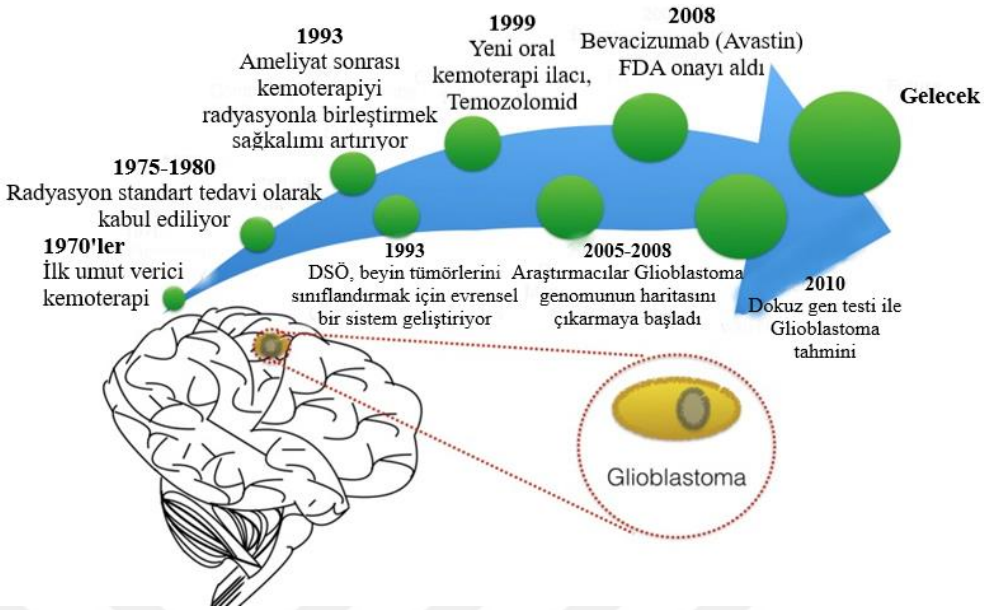
GBM çocuklarda ve yenidoğanlarda da ortaya çıkmaktadır. GBM insidansı 100.000 çocukta 1.1 – 3.6 aralığındadır. Erkek çocuklarda, kız çocuklarına göre daha fazla ortaya çıkmaktadır. Erişkinlerde ortaya çıkan GBM ile, çocuklarda ortaya çıkan GBM arasında morfolojik herhangi bir ayrım bulunmamaktadır. Erişkin ve çocuklarda görülen GBM' de ki tek fark hücrelerin proliferatif aktivitesidir. Proliferasyon indeksi olan Ki-67 indeksi çocuklarda daha fazla bulunmuştur (Urbańska ve ark., 2014).

2.3.3. GBM İçin Güncel Tedavi Yaklaşımları

GBM'e yönelik tedavi klinikte hala çözümlenemeyen bir muammadır. Son yıllarda, bir seri tedavi yöntemleri çalışılmıştır. GBM'in tedavi edilememesindeki en temel zorluk hastalığın bulunduğu lokasyon ve hastalığın heterojenliğidir. Cerrahi operasyonlar, kemoterapi ve radyoterapide ki yeni tedaviler hastaların daha uzun ve daha kaliteli bir yaşam sürmesini sağlamasına rağmen, hastalığın prognozu hala çok kötüdür (Hanif ve ark., 2017).

GBM için kullanımı en uygun olan tedavi yöntemi cerrahidir. Cerrahi rezeksiyon ile tedaviyi sınırlandıran etken GBM'nin agresifliğidir. GBM için kemoterapötik yaklaşım ise ilk olarak 1970'ler de kan beyin bariyerini (KBB)'yi geçen karmustinin keşfi ile başlamıştır. 1979 yılına gelindiğinde ise Salazar ve arkadaşları radyasyon tedavisinin gliomalara karşı kullanılabileceğini ispatlamışlardır. Radyasyon tedavisinin gliomalara karşı kullanılabileceği ispatlandıktan sonra 1993 yılında radyasyon tedavisinin ve kemoterapinin birleştirilmesinin hastaların hayatta kalma sürelerini uzattığı kanıtlanmıştır. 1999 yılında ise Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından oral olarak uygulanan bir kemoterapötik olan Temizolomid'in,

anaplastik astrositomun tedavisinde kullanılabileceği onaylanmıştır. 2005 yılına gelindiğinde Ulusal Kanser Enstitüsü (NIH) tarafından GBM'deki genetik değişikliklerin haritasını oluşturmak için Kanser Genom Atlas Projesi başlatılmıştır. 2008 yılında ise GBM'nin gelişmesine ve invazyon yapmasına neden olan mutasyonlar tanımlanmıştır. 2010 yılında GBM'nin tedaviye cevap verme ihtimalini hesaplamak için birkaç gen tanımlanmıştır (Şekil 2.2) (Ozdemir-Kaynak ve ark.,2018).



Şekil 2.2. GBM tedavisinin tarihsel gelişimi (Ozdemir- Kaynak ve ark., 2018)

Geçerli olan tedavi yöntemi hala cerrahi rezeksiyondur. Radyoterapi ve kemoterapi birincil tedavinin yanında verilmektedir. Radyoterapi ve temeozolomid (TMZ) tedavisi bir arada verildiğinde sağ kalım artmaktadır. 1970'den günümüze kadar gelen süreçte tedavi yöntemleri ile alakalı birçok çalışma olmasına karşın, standart tedaviye eklenebilecek önemli bir yenilik bulunamamıştır (Keskin ve ark., 2021).

2.3.4. GBM'nin Sınıflandırılması

Beyin tümörlerinin glial hücrelerden köken aldığı ilk kez 1863 yılında Virchow tarafından ortaya atılmıştır. Glial hücreleri tanımladıktan sonra, hücrelerin morfolojilerini inceleyerek beyin tümörlerini gliom ile sarkom olarak ikiye ayırarak sınıflandırmışlardır. 1888 yılında Bramwell tarafından gliomların cerrahi zorluklarından bahsedilmiştir. 1914 yılında ise Mallory glioblastoma multiform kelimesini icat etmiştir. 1920 yılına gelindiğinde ise Rio Hortega ilk kez nöral ve glial progenitör hücreleri embriyolojik olarak belirtmiştir. Beyin tümörlerine ait ilk sınıflandırma; 1926 yılında Percival Bailey ve Harvey Cushing tarafından ortaya atılmıştır (Komori ve ark., 2018).1940 yılında nöropatolog Hans Joachim Scherer, glioblastomları primer (birincil) ve ikincil (sekonder) glioblastom ifadesini ilk kez ifade etmiştir. 1940 yılında olduğu göz önüne alındığında zamanın bilgi ve literatürüne göre çok önde olan çalışmalar yapmıştır. Scherer, glioblastomları; astrositomlarda meydana gelen ikincil

glioblastomların, primer glioblastomlardan daha farklı olduğunu, bu yüzden bu gliblastomların ayırt edilmesini ve ayrıca primer glioblastomların; sıkıntılı glioblastomların sebebi olduğunu bildirmiştir (Kleihues ve Ohgaki, 1999). Nils Ringertz 1950 yılında farklı tipte astrositom tümörleri tanımlamış ve bunların farklılıklarını derecelendirmiştir (Iacob ve Dinca, 2009; Özduman ve ark., 2019).

2016 yılına kadar çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır ancak günümüzde geçerliliğini koruyan WHO 2016 sınıflandırmasıdır. 2016 yılında yapılan WHO derecelendirme sistemine göre, glioma tümörleri biyolojik davranışlarına, histopatolojik kriterler tarafından belirlenen klinik bulgularına ve malignitelerine göre 4 dereceye ayrılmıştır (Louis ve ark., 2016). Derece-I pilositik astrositom, derece-II düşük evre astrositom, derece-III anaplastik astrositom ve derece-IV GBM olarak tanımlanmıştır.2016 yılında yapılan bu sınıflandırmada histopatolojiye ek olarak beyin tümörlerinin moleküler özellikleri de sınıflandırmaya dahil etmiştir (Tan ve ark., 2020). Moleküler parametre olarak IDH geninde meydana gelen mutasyonlara bakılmıştır (Louis ve ark., 2007). IDH mutasyonları immünohistokimyasal olarak tespit edilebilmektedir. Moleküler düzeyde glioblastomalar: IDH-vahşi tip ve IDH-mutant olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Glioblastomların yüzde doksanı IDH-vahşi tiptedir (Wen ve Huse, 2017).

GBM günümüzde yapılan sınıflandırılmada 6'ya ayrılmıştır: (1) *Yetişkin tipi yaygın gliomalar* (yetişkinlerin nöro-onkoloji pratiğinde birincil beyin tümörlerinin çoğunluğu, örneğin; *glioblastoma, IDH-vahşi tip*); (2) *Pediatrik tip diffüz düşük dereceli gliomalar* (iyi bir prognozu olması beklenmektedir); (3) *Pediatrik tip diffüz yüksek dereceli gliomalar* (agresif davranması beklenmektedir); (4) Sınırlandırılmış astrositik gliomalar (grup 1, 2 ve 3'teki doğal olarak "yaygın" tümörlerin aksine, daha katı büyüme modellerine atıfta bulunularak sınırlandırılmıştır); (5)*Glionöronal ve nöronal tümörler* (nöronal farklılaşma özelliğine sahip çeşitli bir tümör grubu; ve (6) *Ependimomlar* (artık ortaya çıktığı bölgeye, histolojik ve moleküler özelliklere göre sınıflandırılmıştır). *Koroid Pleksus tümörleri, belirgin epitelyal özellikleri ile Gliomlar*, *Glionöronal tümörler* ve *Nöronal tümörler* kategorisinden ayrılır (Louis ve ark., 2021).

IDH vahşi tip GBM, birincil (primer) GBM olarak da bilinmekte ve de novo olarak gelişim göstermektedir. De novo olarak adlandırılmasının sebebi ailesel bir geçmişinin

olmaması ve hastalığın herhangi bir sebebinin olmayıp mutasyonların birikmesiyle gerçekleşmesidir (Pisapia, 2017). Birincil GBM'ler de çok düşük oranda IDH1 ya da IDH2 mutasyonları meydana gelmektedir (Agnihotri ve ark., 2014). Primer glioblastomaların maling seviyesi daha düşüktür ve histopatolojik olarak daha önceden teşhis edilmesi zordur bu nedenle sadece tanı anında teşhis edilmektedir. Primer glioblastoma genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığın ortalama olarak açığa çıktığı yaş 62 dir. Belirli bir bölgedeki yaşayan popülasyonlara bakıldığında, primer glioblastomlar kadınlara bakılarak erkeklerde daha sık gözlenmektedir (erkek-kadın oranı, 1:33) (Ohgaki ve Kleihues 2007). Primer (IDH-vahşi tip) GBM'lerin büyük bir kısmı (%83) telomeraz ters transkriptaz promotörü (TERTp) mutasyonları taşımaktadır. Kısa süre önce yapılan bir çalışmada; primer (IDH-vahşi tip) GBM taşıyan hastalarda doğum sonrasında çok yüksek sıklıkta TERTp mutasyonu bulundurduğunu açıklamıştır **(**Kim ve ark., 2021**)**.

IDH-Mutant Glioblastoma; ikincil (sekonder) olarak sınıflandırılır (Pisapia, 2017). Ayrıca sekonder glioblastoma; ilerleyici glioblastoma olarak da bilinmektedir. Fakat bu adlandırma pek doğru değildir çünkü glioblastoma maling ilerlemenin bir sonucudur. Sekonder glioblastomanın kendisi ilerleyici değildir (Kleihues ve Ohgaki, 1999).

IDH mutasyonu; gliomalarda ilk kez 2008 yılında Parsons ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Parsons ve arkadaşları glioblastoma teşhisi konan hastalarda, yeni nesil dizileme teknolojisinden faydalanarak; öncelikle genç ve sekonder glioblastoma taşıyan hastaların %12'sinde IDH mutasyonlarının varlığını keşfetmiştir. Aynı çalışma grubu, IDH1 mutasyonu taşıayan hastaların, IDH1 mutasyonu taşımayan hastalara göre daha iyi sağkalım ve prognoza sahip olduğu ilk kez rapor edilmiştir.

Parsons ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmanın yayınlanmasından sonra Yan ve arkadaşları, WHO'nün belirlmiş olduğu derece II/III astrositomlarda, oligodendrogliomlarda, oligoastrositomlar ve sekonder glioblastomların büyük bir kısmının IDH1 ve IDH2 mutasyonlarına sahip olduğunu rapor etmiştir. Bu verilere göre 2021 yılında yapılan sınıflandırma ile GBM; IDH geninde mutasyon taşıyan ve taşımayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Louis ve ark., 2021). Bu hastaların özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Tan ve ark., 2020).

WHO derece II (düşük dereceli) yaygın astrositomlardan ya da WHO derece III anaplastik astrositomların ilerlemesiyle sekonder glioblastomlar meydana gelmektedir. Tanı konması için daha az malign olan astrositomlardan meydana geldiğine dair kanıtlar bulmak gerekmektedir. Sekonder GBM'ler, primer GBM'lerin aksine daha erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Ortalama tanı yaşı 45'dir. Sekonder glioblastomanın, primer glioblastomadan diğer bir farkı ise; sekonder glioblastoma kadınlarda daha sık meydana gelmektedir (erkek-kadın oranı, 0:65). Çünkü sekonder glioblastomanın genetik bir özelliği olan mutasyonlar kadınlarda daha yaygın bir şekilde gözlenmektedir (Kleihues ve Ohgaki, 1999). IDH1 mutasyonları neredeyse yalnızca düşük dereceli gliomalarda ve ikincil GBM'lerde görülür. (Agnihotri ve ark., 2014). Sekonder GBM'lerde, IDH1'de meydana gelen mutasyonlar genellikle, beyinin frontal ile temporal loblarında daha sık oluşmaktadır. Bu durum sekonder GBM için ayırt edici bir özelliktir (Li ve ark., 2016). IDH-Mutant Glioblastoma daha genç yaşta ortaya çıkmakta ve olumlu bir sagkalım gösterdikleri ortaya çıkmıştır (tablo 2.1) (Mirchia ve Richardson, 2020).

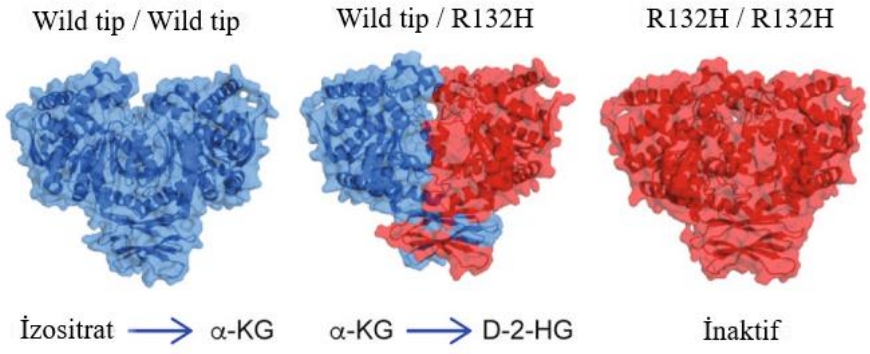
Tablo 2.1. IDH–Vahşi Tip ve IDH-Mutant Glioblastomların Özellikleri (Tan ve ark., 2020).

ÖZELLİK	IDH Vahşi Tip Glioblastoma	IDH Mutant Glioblastoma
Öncü Lezyon	De novo mutasyonlar nedeniyle açığa çıkar	Diffüz astrositom, anaplastik astrositom'dan açığa çıkarlar
Oran	Yaklaşık olarak %90 gibi bir oranla, toplumda çok sık gözlenmektedir.	Yaklaşık %10 gibi bir oranla toplumda daha az rastlanmaktadır.
Tanı Yaşı	62	44
Beyindeki Açığa Çıktığı Bölge	Supratentoryal	Tercihen frontalde
Histolojik Varyantları	Dev hücreli glioblastoma, gliosarkom, epiteloid glioblastoma	Histolojik varyantı bulunmamaktadır.
Nekroz	Yaygın	Sınırlı
Moleküler Patogenez	TERT promotör mutasyonu, EGFR amplifikasyonu, LOH 10q, LOH 10p, PTEN delesyonu, MGMT promotör metilasyonu, BRAF V600E mutasyon	IDH1/IDH 2 mutasyonu, TP53 mutasyonu, ATRX mutasyonu, PDGFRA amplifikasyonu, LOH 10q, LOH 19q

2.3.5. Glioblastoma Multiform (GBM) ve İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Mutasyonu

İzositrat dehidrojenazlar (IDH), izositratı alfa-ketoglutarata (a-KG, 2-oksoglutarat, 2-OG) dönüştüren enzimlerdir. IDH1 ikinci kromozomun 2q33.3 lokusunda kodlanmaktadır. IDH2 ise on beşinci kromozomun 15q26.1 lokusunda kodlanmaktadır. IDH1 ve IDH2 hücre içerisinde farklı yerlerde bulunmasına karşın, birbirlerinin izoenzimleridir. IDH1 ve 2'den (NADP+-bağımlı enzimler) farklı olarak IDH3, NAD'ye baglıdır ve trikarboksilik asit döngüsünde NAD'den NADH'ye indirgenirken izositratın 2-ketoglutarat (2KG)'a dönüsümünü katalizler (Al-Khallaf, 2017; Ramachandran ve Colman, 1980). Lipit metabolizmasında çok önemli aktivitelere sahiptir.

IDH proteinlerinde mutasyon olduğu zaman; hücre ürettiği alfa-ketoglutarat miktarını azaltmaktadır. Gliomalarda meydana gelen IDH mutasyonlarında temel olarak sitozolik IDH1'in R132 kodonunda ve mitokondriyal IDH2'de R172 kodonunda meydana gelmektedir (Şekil 2.3). Meydana gelen bu mutasyonlar; IDH1 ve IDH2'nin, vahşi tip IDH enzimi aktivitesi ile üretilen 2-OG'yi, onkometabolit olduğu düşünülen D-2-hidroksiglutarat (2-HG)'ye çevirirler. Bu onkometabolitin aşırı üretilmesi sonucunda NADPH üretimini inhibe olur. Bu durum hücresel metabolizma, genomik kararsızlık ve redoks homeostazı üzerinde etkilemektedir (Liu ve ark., 2020).



Şekil 2.3. IDH1'in dimerizasyonu. İki tane monomeri olan vahşi tip IDH1, izositratı a-KG'ye çeviren katalitik bir homodimer meydana getirmektedir. IDH1 mutasyonu taşıyan hücrelerde, vahşi bir tip monomer ve R132H mutantı bulunduran monomer birleşerek, bir heterodimer meydana getirmektedir. Heterodimer, D-2-HG sentezlemek için a-KG'ı tüketen neomorfik aktivite sergilemektedir (Han ve ark., 2020).

IDH geninde görülen mutasyonlar yalnızca gliomalarda değil; akut miyeloid lösemi (AML), intrahepatik kolanjiokarsinom, kondrosarkom ve melanom gibi merkezi sinir sisteminde meydana gelen diğer malignitelerde de gözlenmektedir (Liu ve ark., 2020).

2.4. Timokinon

Çörek otu (Nigella sativa), Ranunculaceae (Düğünçiçeğigiller) familyasına ait olan şifalı bir bitkidir. Çörek otu ayrıca siyah kimyon yada siyah tohum olarak da bilinmektedir. Çörek otu; Doğu Akdeniz, Kuzey Afrika, Hint alt kıtası ve Güneybatı Asya'nın geniş bir bölgesine aittir. Ancak Mısır, İran, Yunanistan, Suriye, Arnavutluk, Türkiye, Suudi Arabistan' da gibi bazı ülkeler de yetiştirilmektedir. Arapça'daki adıyla çörek otu "Habba sawda" olarak bilinir ve ölüm hariç tüm hastalıkları tedavi etmek için kullanılabileceği geçmişten günümüze dek söylenmiştir (Dalli ve ark., 2021).

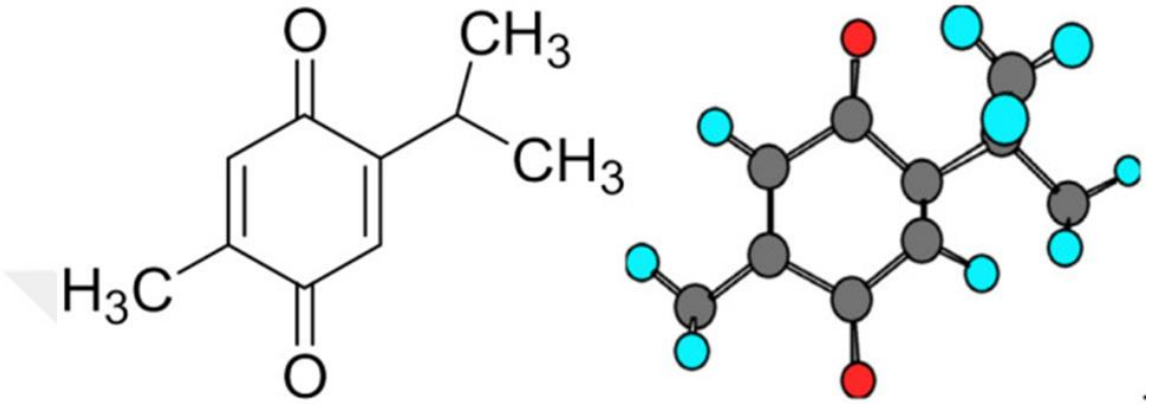
Çörek otu antioksidan, antienflamatuar, immünomodülatör, antikanser, gibi özellikler taşıdığı için geleneksel tıpta bu kadar yaygın kullanılmaktadır (Hannan ve ark., 2021).

Çörek otunu değerli kılan en önemli özelliği tohumlarıdır (Şekil 2.4). Tohumlarında birçok biyoaktif bileşen bulunmaktadır. Çörek otu tohumlarında en çok yağların bulunduğu gözlemlenmiştir. Tohumlarında; %28,5 oranında yağ, %26,7 oranında protein , %24,9 oranında karbonhidrat, %8,4 oranında ham lif bulunmaktadır. %50-60 arasında doymamış linoleik yağ asiti, %10 dihomolinoleik asit, %3 eikosadienoik asit, %20 oleik asit gibi birden fazla doymuş yağ asitleri bulunmaktadır. Çörekotu tohumlarında bulunan en önemli biyoaktif madde ise timokinon (TQ)' dur (McGrowder ve ark., 2020).



Şekil 2.4. (a) çörek otu ve (b) tohumları (Farooq ve ark., 2021).

Çörek otu tohumunun en biyoaktif bileşiği olan TQ, kimyasal olarak $C_{10}H_{12}O_2$ moleküler formüle sahip, 2-izopropil-5-metil-1,4-benzo-kinon olarak da bilinmektedir (Şekil 2.5) (Zhu ve ark., 2016).



Şekil 2.5. Timokinonun 2B ve 3B yapısı, $C_{10}H_{12}O_2$. (Pal ve ark., 2021).

TQ'nun, anti-oksidatif, anti-inflamatuar, immünomodülatör, anti-kanser, anti-mikrobiyal, hepatoprotektif, hipoglisemik ve antidiyabetik, mide-koruyucu, nöro-koruyucu, kardiyo-koruyucu, nefro-koruyucu, hipolipidemik ve anti-histaminik etkilere sahip olduğu birçok çalışmalarla gösterilmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. NS farmakolojik aktivitelerinin kapsamlı özeti (Dalli ve ark., 2021) .

TQ aynı zamanda hem in vitro hem de in vivo kanser hücreleri üzerinde antineoplastik, antiapoptotik ve antiproliferatif etki göstermiştir. TQ'nun en ilgi çekici yanı ise, kanser hücrelerine karşı etkili olup, sağlıklı hücrelere karşı herhangi bir toksisite oluşturmaması veya zarar vermemesidir (Ballout ve ark., 2018).

2.5.1.Timokinon ve Kanser

Günümüzde tedavisi hala bulunamayan kanser için çeşitli tedavi seçenekleri mevcuttur. Bunlar arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi bulunmaktadır (Farooq ve ark., 2021). Kemoterapi kanser tedavisi için ilk sıralarda yer almaktadır. Fakat kemoterapi bazı kanser türlerinde toksik etki, bazı kanser türlerinde ilaç direnci, bazı kanser türlerinde ise apoptozdan kaçmak için sinyal yolaklarını değiştirme yeteneği vermesi sebepleriyle potansiyeli düşük bir tedavi halini almaktadır. Ayrıca kemoterapi alımının başka dezavantajları da bulunmaktadır. Diğer dezavantajlar arasında normal ve sağlıklı olan hücrelerin homeostazını bozmaktadır. Tüm bunlar göz önüne alındığında,

kanser tedavisi için insanların maliyet olarak daha rahat ulaşabileceği ve toksik etkileri az olan güvenli olan doğal bileşiklerin belirlenmesi önem kazanmıştır (Ansary ve ark., 2021; Farooq ve ark., 2021).

TQ birçok kanser hücreleri üzerinde ve tümör modellerinde anti-tümörojenik etkiler göstermesi sebebiyle son yıllarda büyük ilgi görmüş doğal üründür. Yapılan çoğu çalışma, TQ'nun glioblastoma, meme, akciğer, kolorektal, pankreas, tiroid, osteosarkom ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser türleri üzerinde hücre proliferasyonunu, invazyonu, metastazı ve anjiyogenezi inhibe ettiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Diğer yapılan çalışmalarda ise, TQ'nun skuamöz karsinom, kolon kanseri, böbrek kanseri ve insan meme adenokarsinom hücreleri üzerinde otofajiyi indüklediği açıklanmıştır. Yapılan birkaç çalışmada ise, TQ'nun glioblastoma hücreleri üzerinde otofajiyi inhibe ettiği açıklanmıştır (Ünal ve ark., 2021). Ayrıca apoptozu indükleyerek ve hücre döngüsünü durdurma gibi aktiviteleri sayesinde kanser üzerinde etkili olmaktadır. TQ'nun önemli kanser yolakları olan; nükleer faktör-kappa B (NF-κB), p53, STAT3 ve PPAR-y'yi düzenlemektedir (Kabil ve ark., 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Sunulan tez çalışmasının deneysel aşamaları Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. GEREÇ

3.1.1.Kullanılan cihaz, alet ve sarf malzemeler

Tablo 3.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihaz	Amacı
-80°CDerin dondurucular	Hücrelerin dondurulması, numunelerin saklanması
-20°C Derin dondurucular	Numunelerin ve sarf malzemelerin saklanması
Azot tankı	Hücrelerin dondurulması
Buzdolabı	Sarf malzemelerin saklanması
CO_2 İnkübatörleri	Hücre kültür ortamı
Steril Kabin LaminAir Class II	Hücre kültür ortamı
Glomax ELISA Reader	Hücre canlılık testi, MTS
Santrifüj	Santrifüj ve hücre kültürü
İnvert Mikroskop	Hücrelerin görüntülenmesi
Floresan Mikroskop	Apoptoz deneyinde
Tek kanallı pipet seti	Hücre kültür çalışmalarında
Su banyosu	Hücre kültür çalışmalarında
Hassas terazi	Tartma işleminde
Pipet tabancası	Hücre kültür çalışmalarında

Tablo 4.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Kullanılan Sarf Malzemeleri	**Amacı**
DMEM F12 Medyum	Besiyer hazırlanmasında
FetalBovine Serum	Besiyer hazırlanmasında
Penicillin-Streptomycin	Besiyer hazırlanmasında
L-glutamine	Besiyer hazırlanmasında
Trypsin-EDTA	Hücre pasajlamada
25'lik Ve 75'lik Hücre Kültür Flaskı	Hücrelerin çoğaltılacağı kültür kapları
6 ve 96 Kuyucuklu Hücre Kültür Plakaları	Klonojenik ve sitotoksite tespit için ekim kapları
Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (DPBS)	Hücre kültürü
Timokinon	Hücre kültürü
MTS	Hücre canlılık testi
PMS	Hücre canlılık testi
DMSO	Hücre kültürü
15 ml'lik ve 50 ml'lik Falkon Tüp	Hücre kültürü
Cryo Tüp	Hücre dondurma
5,10 ve 25 ml'lik Serolojik Pipet	Hücre kültürü
Thoma Lamı	Hücre sayımı
Kristal violet	Klonojenik test
Metanol	Tripan mavisi

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Tez çalışmamızda IDH-mutant olmayan U-87MG (ATCC® HTB-14™) ve IDH mutant-U-87(ATCC® HTB-14IG™) hücre hatları kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan hücreler uygun büyüme besiyeri (medya) kullanılarak 37 °C'de %5 CO_2 içeren

inkübatörde çoğaltıldı. Hücre çoğaltma işlemleri (pasaj) laminar air flow içerisinde steril şartlarda yapıldı. Çoğaltılan hücreler uygun şartlarda saklandı.

3.2.1.1. Besiyeri Hazırlanması

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/F12) GBM hücre hatlarının çoğaltılması ve deneylere hazır hale getirilmesi için kullanıldı. DMEM/F12 içerisine inaktive edilmiş 50 ml fetal sığır serum (FBS) (%5), 5 ml L-glutamin (%1) ve 5 ml Penisilin/Streptomisin (%1) eklendi ve uygun şartlarda (+4°C) buzdolabında saklandı. Deneylerin hemen öncesinde su banyosunda 37°C'de ısıtıldı.

3.2.1.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücre kültüründe yapılacak olan tüm deneylere başlamadan önce, laminar air flow ultraviyole ışın ve %70 etonol ile sterilize edildi. Daha önceden sıvı azot tankında (-196°C) dondurulmuş halde bulunan hücreler buz üzerinde erimeye bırakıldı. Çözünen hücreler steril falkonlara alındı ve üzerine besiyeri (medya) eklendi. Daha sonra üzerine medya eklenen hücreler santrifüj edildi. Santrifüjden sonra supernatant atıldı ve pellet üzerine tekrar medya eklenerek pipetaj işlemi gerçekleştirildi. Pellet miktarına bakılarak hücreler ihtiyaca göre flasklara ekildi. Flasklara ekilen hücreler 37°C %5 CO_2'li inkübatörde çoğaltıdı.

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklara ekilen hücreler günlük olarak kontrol edilip, invert mikroskopta incelenmiştir. Flask içerisindeki doluluk oranı %80-100 ulaştığı zaman pasajlama yapıldı. Pasajlama işlemi için ilk önce; flask tabanına tutunmuş olan hücreleri tabandan ayrımak için %0.05'lik Tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA eklenen flask 37°C %5 CO2'li inkübatörde 5 dakika bekletildi. Hücrelerin tabandan kalkıp kalkmadığını kontrol etmek amacıyla invert mikroskop aracılığı ile kontrol edildi. Tripsin aktivitesini son vermek amacı ile flasklara eklediğimiz tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri eklendi. Flask tabanı iyice yıkanarak hücreler 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı ve 1500 rpm +4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj bitiminde supernatant atıldı, dibe çökmüş pellet şeklindeki hücrelerin üzerine medya eklenerek pipetaj yapıldı. İstenilen miktarda hücre yeni bir flaska ekildi.

3.2.1.3. Hücrelerin Sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, Thoma lamı kullanıldı. Thoma lamında sayım yapmak için; santrifüj sonrasında çöken hücre pelleti üzerindeki medya (besiyeri) atıldı ve üzerine 1 ml yeni medya (besiyeri) eklendi. Medya eklendikten sonra hücrelerin medya içerisinde dağılıp süspanse olması için pipetaj işlemi yapıldı. Süspanse olan hücre-medya (besiyeri) karışımından 10 µl alındı ve Thoma lamına eklendi. Thoma lamının üzeri lamelle kapatıldı. İnvert mikroskopta 40x büyütmede hücreler sayıldı. Sayım sonrasında aşağıdaki formülle hücre sayısı hesaplandı: 1ml'deki hücre sayısı = sayılan bölgelerin ortalama sayısı × 10^4.

3.2.1.4. Hücre Dondurma

Çalısma dısında kullanılmayan hücreler depolanmak üzere %90 tam kültür medyum ve%10 DMSO (9:1 oranı) olacak sekilde dondurularak muhafaza edildi. Bunun için hücreler kademeli sekilde önce -80°C'de bekletildi, daha sonra 196°C'lik sıvı azot tankında ileride kullanılmak üzere saklandı.

3.2.3. Timokinon ile Hücrelerin Muamele Edilmesi

3.2.3.1. Timokinonun hazırlanması

Deneylerler de kullanılan TQ ticari olarak satın alındı (Sigma Aldrich, 274666-1G). Toz şeklinde olan TQ, dimetil sülfoksit (DMSO) çözüldü ve stok solüsyon -20°C derecede saklandı. Deneylerde kullanılcak doza uygun olarak stok solüsyon FBS (-) ile seyreltildi.

3.2.4. Hücre proliferasyonu (MTS analizi)

Hücre proliferasyonunu/canlılığını belirlemek için 3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyu (MTS) analizi kullanıldı. Kullandığımız TQ'nun hücre proliferasyonu/canlılığı üzerindeki etkisini test etmek için, U-87 ve U-87 IDH1-mutant hücreler 100 µl medya içerisinde 1500 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekildi. Deney süresince 37 °C %5 CO_2'li etüvde inkübe edildi.

Hücreler inkübasyonlarının 72. saatinde 0.4,0.8, 1.6, 3.25, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında TQ ile muamele edildi. Bir bölüm hücrelere ise hiçbir uygulama yapılmadı, bir kısım hücreler ise TQ'nun çözücüsü DMSO ile muamele edildi. 24

saatlik TQ muamelesinden sonra MTS (Cell Titer)/ PMS (Sigma Aldrich, phenazine methosulfate) 20 µl eklendi ve daha sonra ELISA (Biotek ELx808) okuyucuda 450 nm'de ölçüm yapıldı. Hücrelerin %50'sinin öldüğü IC: %50 konsantrasyonu belirlendi. Belirlenen bu konsantrasyon daha sonraki yapılan bütün deneylerde hücrelere uygulandı.

3.2.5. Klonojenik Analiz

Kanserli hücrelerin çoğalma ve koloni oluşturma düzeylerini belirlemek için bu yöntem kullanıldı. Koloni oluşumu üzerine etkisini test etmek için, U87 ve IDH mutant U87 hücreleri belirli miktarda medya bulunan 6 kuyucuklu kaplara ekildi ve 37 °C%5 CO2'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyonlarının 48. saatinde 0.4, 0.8, 1.6, 3.25, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM timokinon ile muamele edildi ve 37 °C %5 CO2'li etüvde inkübe edildi. Bir bölüm hücrelere ise hiçbir uygulama yapılmadı, bir kısım hücreler ise TQ'nun çözücüsü DMSO ile muamele edildi. Uygulama yapılmayan hücrelerde yeteri kadar klon oluşumu tespit edildiğinde (kabın tabanı tamamen dolduğunda) kültür sonlandırıldı (12 gün sonra). Hücrelerin bulunduğu ortamdan medya uzaklaştırıldı ve metanolle hazırlanmış %10'luk kristal viyolet ile hücrelerin boyanması sağlandı. Boyayı uzaklaştırmak amacıyla hücreler distile su ile yıkandı. Yıkandıktan sonra 6 kuyucuklu kaplar kurumaya bırakıldı. Kuruma sonrasında koloniler sayıldı ve fotoğraflandı.

3.2.6. Hücre canlılık analizi (Tripan Mavisi ile Boyama)

Hücre canlılığını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Canlı olmayan hücrelerin membran yapısı bozulur ve tripan mavisi hücre içerisine girmektedir. Bu yüzden, Tripan mavisi aktivitesini yitirmiş olan ölü hücreleri boyamaktadır. TQ'nun hücre canlılığına etkisini test etmek için, U87 ve IDH mutant U87 hücreleri 25'lik flasklara uygun miktarda (350.000/4 ml medyum) ekilerek 37 °C %5 CO2'li etüvde inkübe edildi. Hücreler inkübasyonlarının 72. saatinde MTS analizi ile belirlediğimiz IC:50 konsantrasyonlarda TQ ile muamele edildi. Bir bölüm hücrelere ise hiçbir uygulama yapılmadı, bir kısım hücreler ise TQ'nun çözücüsü DMSO ile muamele edildi. TQ ile muameleden 24 saat sonra kültür sonlandırıldı ve hücreler süspanse edildi. Epondorf tüp içerisinde 20 µl hücre süspansiyonu ve 10 µl tripan mavisi karıştırılarak ve 1 dakika

bekletildi. Sonra, bu karışımdan 10 µl alındı ve thoma lamında hem boyanan hem de boyanmayan hücreler sayıldı.

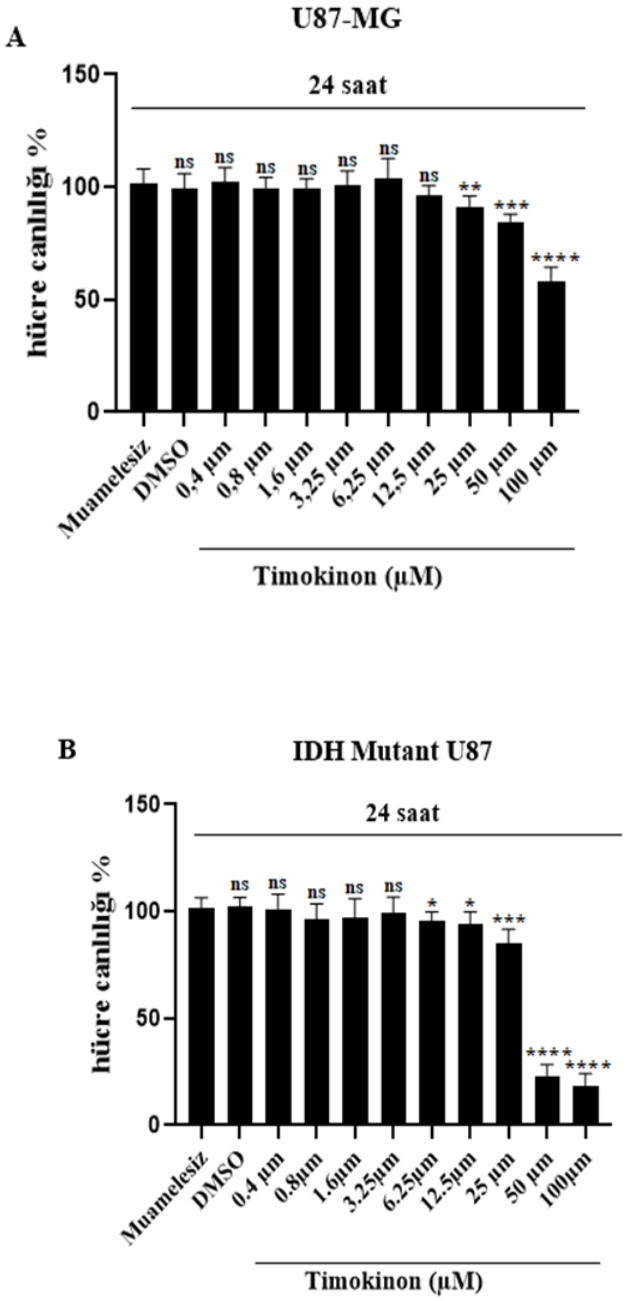
3.2.7. İstatiksel Analiz

Yapılan tüm deneyler en az üçer kere tekrar edilmiştir. İstatistik analizler yapılırken için Student-t testi kullanılmıştır. P değerinin 0.05'ten küçük olduğu veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Yapılan tüm analizler GraphPad Prism 8.2.1 kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

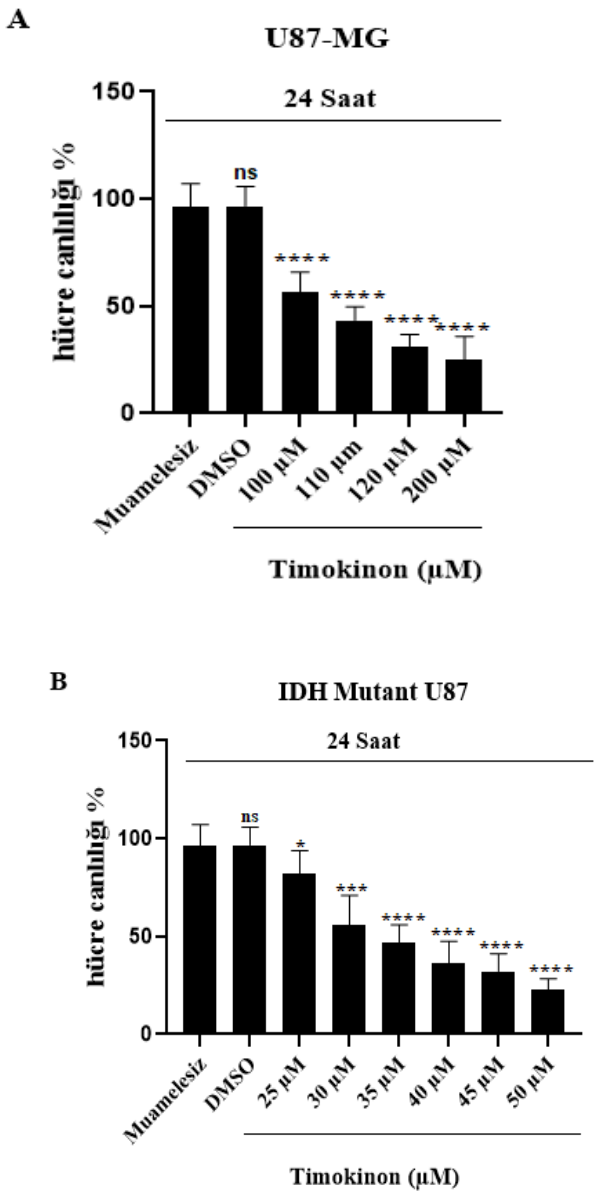
4.1. TQ'nun U87-MG ve IDH mutant U87 GBM hücrelerinin canlılığına etkisi

U87-MG ve IDH mutant U87 hücreleri 24 saat 12.5-100 µM arasında TQ ile muamale edildi. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan TQ'nun hücrelerin canlılığına etkisini analiz etmek için MTS analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre kontrol (muamelesiz) hücrelerle karşılaştırıldığında, 24 saat 0.4-100 µM arasında TQ uygulanan; U87-MG hücrelerinde 25 µM'dan itibaren hücre canlılığında azalma bulunurken (Şekil 4.1 A, Şekil 4.1 B), IDH mutant U87 hücrelerinde 6.25 µM'dan itibaren TQ'nun hücre canlılığını azalttığı bulundu (Şekil 4.1 B). 100 µM TQ IDH mutant olmayan hücrelerede hücrelerin %50 'sini öldürürken ($p<0,0001$, Şekil 4.1 A) IDH mutant U87 hücrelerinde 50 ve 100 µM TQ'nun, hücrelerin %90'nı öldürdüğü bulundu ($p<0,0001$, Şekil 4.1 B). Bu sonuçlarımız TQ'nun daha iyi prognoz serileyen IDH mutant U87 hücreleri için daha toksik etkiye sahip olduğunu işaret etti. Ayrıca sonuçlarımız TQ'nun çözücüsü olan DMSO'nun uygulandığı hücreler ile kontrol hücreleri arasında hücre canlılığı açısından fark olmadığı bulundu (Şekil 4.1, A-B).



Şekil 4.1. 24 saat TQ ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde canlılık oranı. A) 24 saat 0.4-100 µM TQ ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 100 µM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu B) 24 saat 0.4-100 µM TQ ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 6.25-100 µM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns (non-significant): anlamsız; *p<0.05; ***p<0,001; **p<0.01; ***p<0,001; ****p<0.0001).

Bu sonuçlarımızdan sonra TQ'nun IDH mutant U-87 hücreleri için hücrelerin %50'sini öldürdüğü ve IDH-mutant olmayan U87-MG hücreleri için hücrelerin %90'nın öldürdüğü dozu bulmak için faklı konsantrasyonlarda TQ ile hücreler muamele edildi ve MTS analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre, kontrol (muamelesiz) karşılaştırıldığında, 24 saat 100, 110, 120 ve 200 µM TQ uygulanan U87-MG hücrelerinde artan TQ konsantrasyona bağlı olarak hücre ölüm oranının arttığı bulundu. TQ'nun 120 µM'dan itibaren U87-MG hücrleri için toksik olduğu ve hücrlerin % 90'nını öldürdüğü bulundu (Şekil 4.2 A). 24 saat 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 µM TQ uygulanan IDH mutant U87 hücrelerinde artan TQ dozuna bağlı olarak hücrelerin ölüm oranı arttı. Bu hücreler için TQ'nun IC50 dozu 30 µM olarak bulundu ve 40 µM'dan itbaren hücrlerin %90 oranında öldürdüğü bulundu (Şekil 4.2 B). Ayrıca sonuçlarımız TQ'nun çözücüsü olan DMSO'nun uygulandığı hücreler ile kontrol hücreleri arasında arasında hücre canlılığı açısından fark olmadığını gösterdi ve DMSO'nun hücrelerin canlılığına etkisinin olmadığı her iki verimizle de teyit edildi (Şekil 4.2, A-B);



Şekil 4.2. 24 saat TQ ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerin canlılık oranı. Her iki hücrede de artan TQ konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin canlılığının azaldığı bulundu (ns(non-significant): anlamsız; *p<0.05; ***p<0,001;****p<0.0001).

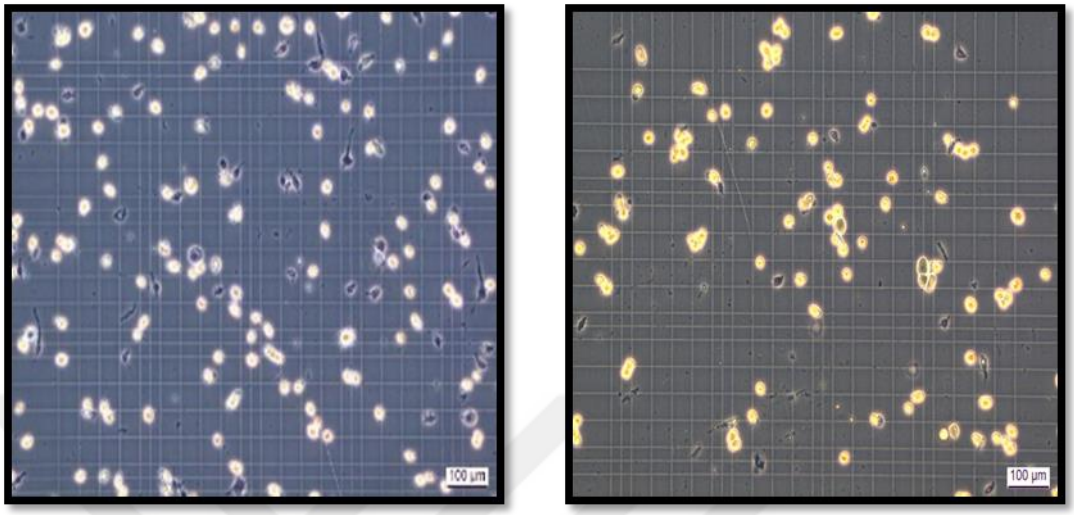
MTS analiz sonuçlarımızı doğrulamak için ölü hücrelere spesik olan Tripan mavisi kullanılarak hücreler boyandı. Bunun için; IDH mutant olmayan U87-MG hücreleri MTS analiz sonuçlarımıza göre bulduğumuz hücrelerin yaklaşık %50'sini öldüğü 100

ve 110 μM TQ ile 24 saat muamele edildi. IDH mutant U87 hücreleri, MTS analiz sonuçlarımıza göre bulduğumuz hücrelerin yaklaşık %50'sini öldüğü 30 ve 35 μM TQ ile 24 saat muamele edildi. Kontol hücreleri ve DMSO ile muamele edilen hücrelerde tripan mavisi ile boyanan hücre sayısı çok az bulundu. Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, 24 saatlik TQ uygulanan her iki hücre tipinde de hücrelerin yaklaşık %50'sinin tripan mavisi ile boyandığı hemen hemen yarısının ise boyanmadığı bulundu (Şekil 4.3, A-D).

U87-MG

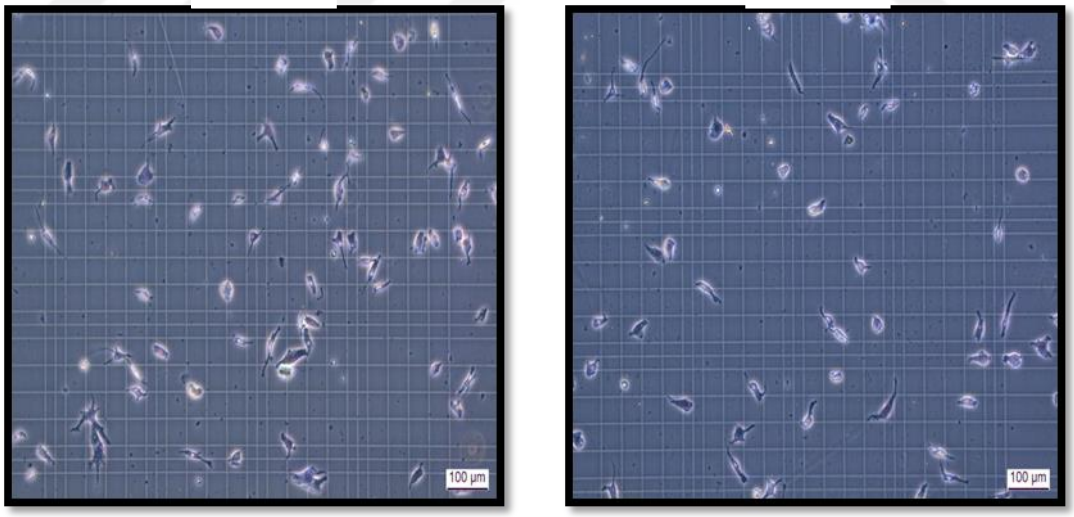
A

Muamelesiz **DMSO**



Timokinon

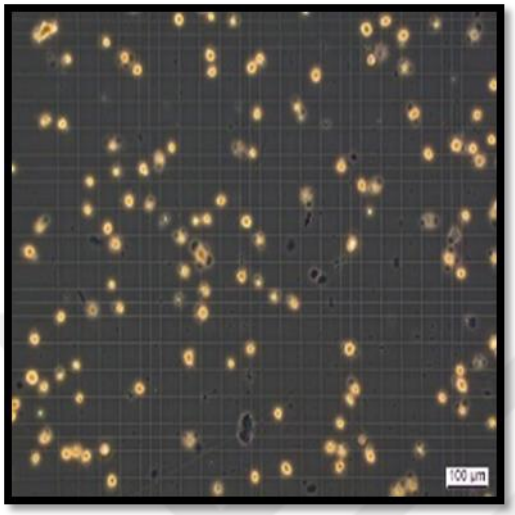
100 µM **110 µM**

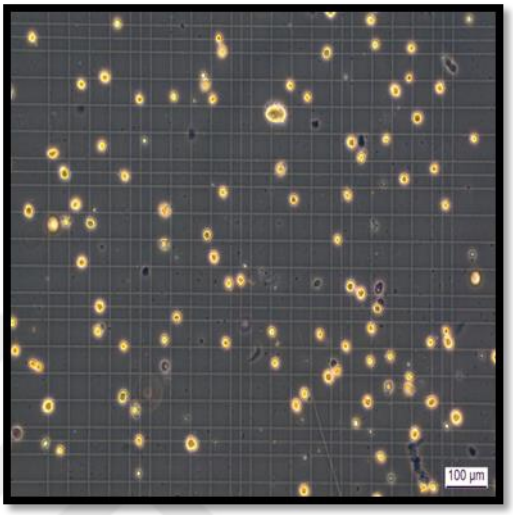


IDH Mutant U87

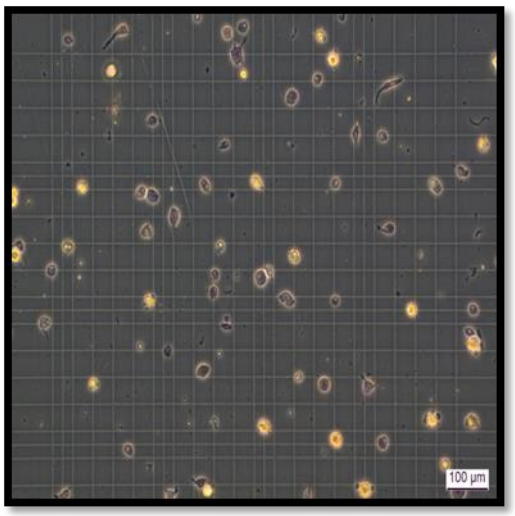
B

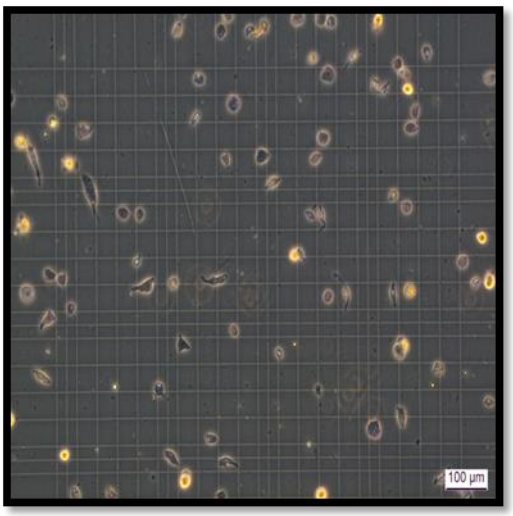
Muamelesiz **DMSO**



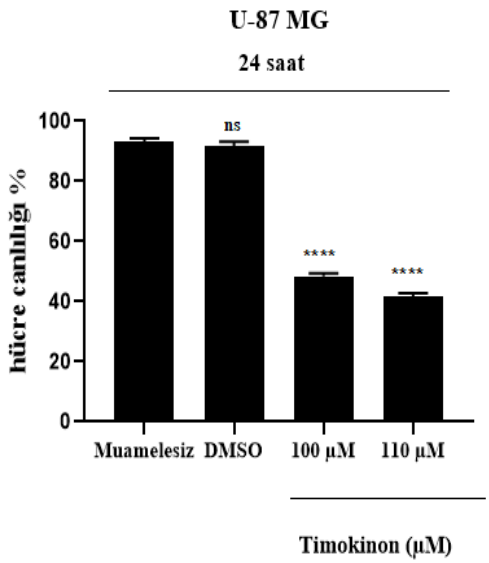


30 µM **35 µM**

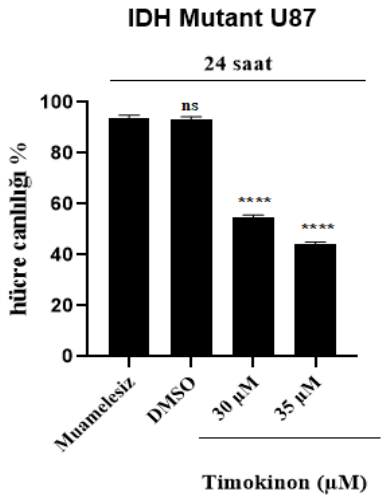




C



D



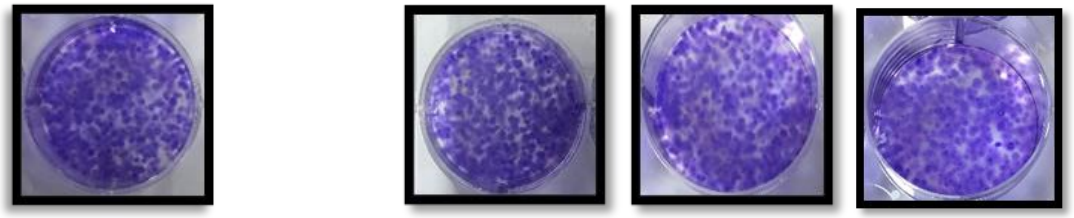
Şekil 4.3. A-B) 24 saat TQ ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde tripan mavisi ileboyanan hücre sayısı. C-D) Her iki hücrede de artan TQ konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin canlılığının azaldığı bulundu. ns (non-significant): anlamsız; *p<0.05; ***p<0,001;****p<0.0001.

4.2. TQ'nun U87-MG ve IDH mutant U87 GBM hücrelerinin klon oluşuma etkisi

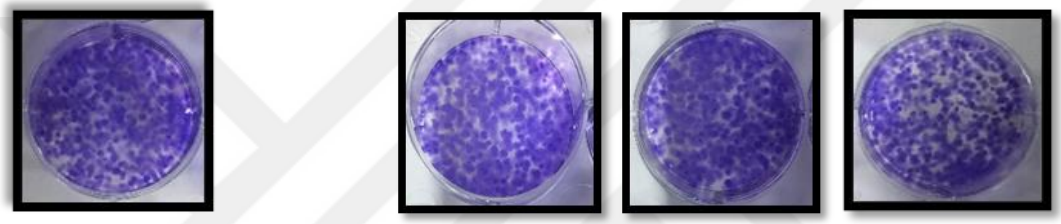
IDH mutant olmayan U-87 MG ve IDH mutant U87 hücreleri inkübasyonlarının 48. saatinde 0.4-200 μM 0.4-100μM TQ ile muamele edildi. Kontrol hücrelerinde klon oluşumu takip edilerek 12 gün sonra kültür sonlandırıldı ve hücreler boyandı. Boyama sonrası fotograflandı koloni sayıları sayıldı ve istatistiksel analiz yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre her iki hücre tipindede, hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol hücreleri ve DMSO ile muamele edilen hücreler arasında klon oluşumu açısından fark olmadığı bulundu (Şekil 4.4). Kontrol hücreleri karşılaştırıldığında, IDH mutant olmayan U-87 MG hücrelerinde artan TQ dozuna (0.4- 200 μM) bağlı olarak klon oluşumunun azaldığı bulundu. Ayrıca 120 ve 200 μM TQ dozu çok toksik olup klon oluşumu gözlenmedi (Şekil 4.4 A, B). Kontrol hücreleri karşılaştırıldığında, IDH mutant U-87 hücrelerinde artan TQ dozuna (0.4- 200 μM) bağlı olarak klon oluşumunun azaldığı bulundu. IDH mutant hücrelerin IDH mutant olmayan U87-MG hücrelerine göre TQ'na karşı daha duyarlı olduğu ve 35 μM'dan itibaren TQ'nun koloni oluşumun tamamen baskıladığı hücreleri öldürdüğü bulundu (Şekil 4.4 C).

U87-MG

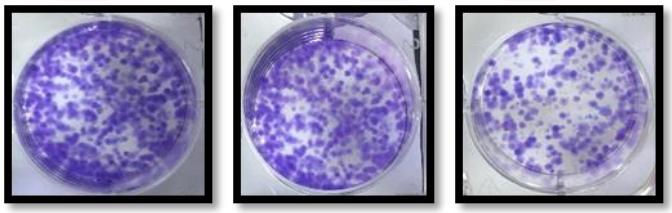
A **Muamelesiz** **0.4 µM** **0.8 µM** **1.6 µM**



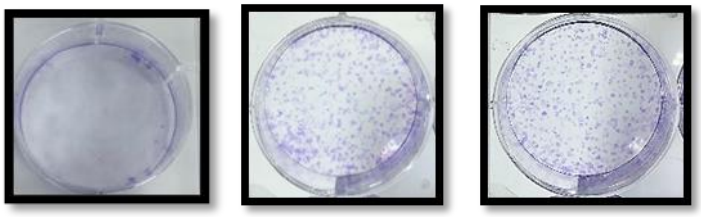
DMSO **3.25 µM** **6.25 µM** **12.5 µM**



25 µM **50 µM** **100 µM**

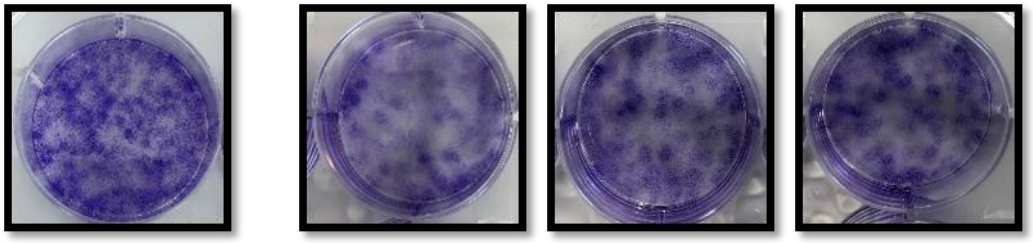


110 µM **120 µM** **200 µM**

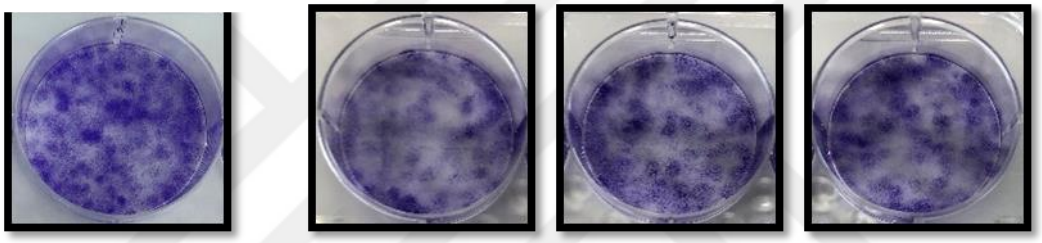


IDH Mutant U87

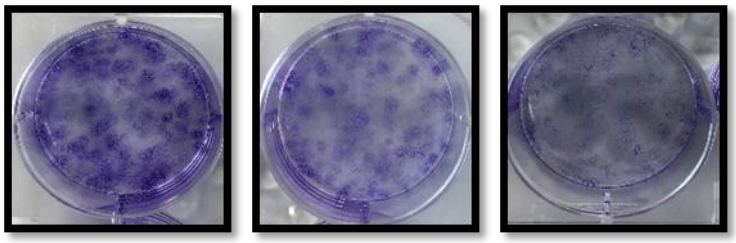
B **Muamelesiz** **0.4 µM** **0.8 µM** **1.6 µM**



DMSO **3.25 µM** **6.25 µM** **12.5 µM**



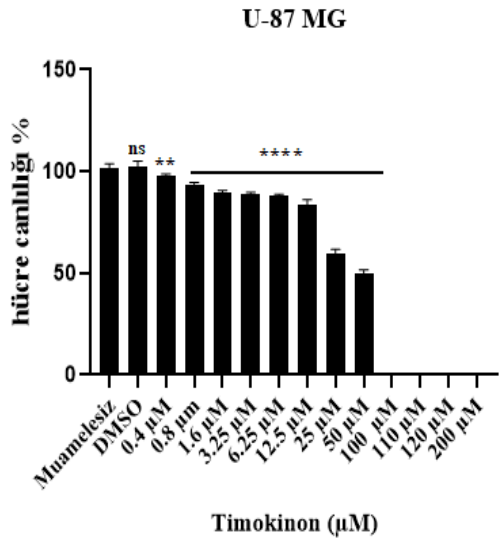
25 µM **30 µM** **35 µM**



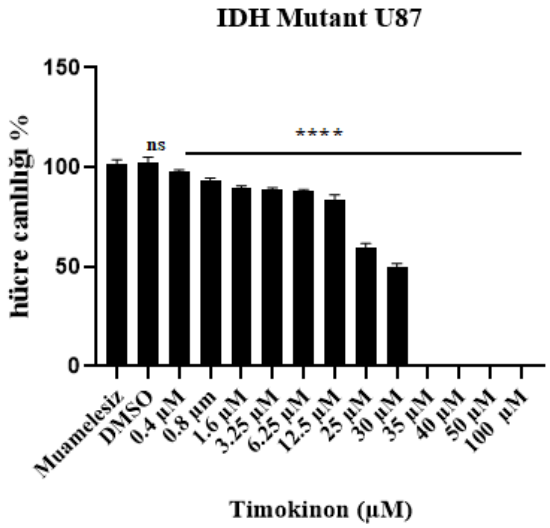
40 µM **50 µM** **100 µM**



C



D



Şekil 4.4. A-B) Timokinon ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde koloni oluşum oranı. C) 0.4-200 µM timokinon ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre timokinon uygulanan hücrelerde önemli oranda klon sayısının azaldığı bulundu. D) 0.4-100 µM timokinon ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre timokinon uygulanan hücrelerde önemli oranda klon sayısının azaldığı bulundu. ns (non-significant); **p<0.001; ****p<0.0001.

5. TARTIŞMA

Glioblastoma multiform (GBM), en yaygın malign primer beyin tümörüdür ve en agresif kanser türlerinden biridir. Tüm beyin tümörlerinin %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. GBM'nin tedavi yöntemleri arasında; radyoterapi, cerrahi ve alkilleyici ajan bazlı kemoterapidir. (Pazhouhi ve ark., 2016). Uygulanan tedavi yöntemlerine rağmen GBM'ler heterojen olmaları, yüksek proliferasyon oranları ve agresif özellikler taşıması nedeniyle tedavilere büyük ölçüde direnç geliştirmekte ve hastalık nüks etmektedir. GBM'de ortalama sağkalım süreleri 12 ila 15 ay arasındadır. Birçok hasta iki yıl içinde yaşamını kaybetmektedir (Peñaranda-Fajardo ve ark., 2019; Stupp ve ark.,2005). Kemoterapötik ilaçlar tarafından hem normal hücreler hem de kanserli hücreler hedeflendiği için birçok olumsuz yan etkiler içermektedir. Bu nedenle; normal hücrelere minimum miktarda sitotoksik olan ve aynı zamanda kanser hücrelerini spesifik olarak hedef alan yeni bileşiklerin keşfedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda çeşitli doğal bileşiklerin, normal hücrelere daha az sitotoksisiteye sahip, umut verici kemoterapötik ajanlar olduğu gösterilmiştir (Gurung ve ark., 2010).

Timokinon (TQ), *Nigella sativa Linn* (çörek otu) tohumunda bulunan biyoaktif bir bileşendir. Nigella sativa, Orta Doğu, Hint ve Avrupa ülkelerinde yüzyıllar boyunca; anti-inflamatuar, antioksidan etkileri bulunduğu için çeşitli hastalıkları etmek için kullanılmıştır. Yapılan bazı çalışmalar TQ'nun antineoplastik özellik taşıdığınıda göstermiştir (Racomave ark., 2013).

TQ, hücre döngüsünü, DNA yapısını ve sentezini, yapısal proteinleri (örneğin tubulin), apoptotik mekanizmayı ve ROS oluşumunu etkileyerek glioma hücresine özgü sitotoksik etkiler sergileyebilmektedir (Shoieb ve ark., 2003). TQ'nun normal hücre döngüsü ilerlemesini durdurduğu ve dolayısıyla GBM hücrelerinin proliferasyonunu engelleyebildiği yapılan çalışmalarda açıklanmıştır (Darakhshan ve ark.,2015). Yapılan

çalışmalarda, onaylanmış bir kemoterapi ajanı olan Temizolomid (TMZ) ve TQ'nun U-87 MG büyümesi üzerindeki sinerjik etkisi araştırılmıştır. TMZ ve TQ'nun hücre proliferasyonunu zamana ve doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (Pazhouhi ve ark., 2018)

Birkaç çalışma, TQ'nun farklı fazlarda seyreden hücre döngüsü evrelerinin durmasına neden olma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Gali-Muhtasib ve ark., 2004). TQ tedavisi, siklin D1, siklin E ve CDK inhibitörü p27 (Rajput ve ark., 2013) gibi çoklu hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ekspresyonunu değiştirebilmektedir. Kaspaz aktivasyonu ve PARP bölünmesi yolu ile apoptozu indükleyebilir (Li ve ark., 2010).

TQ, apoptoz açısından; hem p53'e bağımlı hem de p53'ten bağımsız yolları etkilemektedir (Alhosin ve ark., 2012; Arafa ve ark., 2011). TQ, guanin bazı ile etkileşime girerek DNA yapısını bozar (Zubair ve ark., 2013). Normal hücrelerde, p53 aracılığıyla DNA'da oluşan hasar için onarımı başlatIlırken, GBM hücrelerinde, p53 muatasyona uğradığı için TQ'nun sebep olduğu DNA hasarı doğrudan hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Gurung ve ark., 2010). DNA'ya bağımlı protein kinaz (DNA-PKcs), genomik bütünlüğü korumak ve DNA sarmallındaki kırıkları onarmak için gereklidir (Kurimasa ve ark., 1999).

GBM'de sıklıkla regüle edilen en önemli sinyalleşme basamaklarından ikisi, hücre büyümesini ve proliferasyonunu destekleyen PI3K/Akt/mTOR ve Ras/Raf/MEK/ERK yolaklarıdır (Nakada ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda açık adı (PDGF)'nin aşırı ekspresyonun; PI3K sinyali/PTEN inaktivasyonuna yanıt olarak NF-κB'nin anormal yapıcı aktivasyonunun, hücre proliferasyonunu ve hücre sağkalımını kontrol eden düzenleyici genlerin aktivasyonu yoluyla GBM proliferasyonunu destekleyebileceği gösterilmiştir (Smith ve ark., 2008). Reseptör olmayan tirozin kinaz, Focal Adhesion Kinase (FAK), GBM'de artan hem göç hem de istila oranları ile ilişkilendirilmiştir (Beierle ve ark., 2008). FAK sinyali, hücre dışı matris (ECM) sinyallerini ERK sinyaline ileterek ve matris metalloproteinaz- (MMP-2) 2 ve MMP-9'u (Natarajan ve ark., 2003; Zhao ve Guan, 2009) aktive ederek hücre yapışmasını ve hareketliliğini düzenlemektedir. Yapılan birçok çalışmada, TQ'nun FAK'ı aşağı regüle ettiğini ve MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonunu azalttığını ve böylece GBM hücrelerinin göçünü, yapışmasını ve istilasını azalttığını bildirmiştir (Arumugam ve ark., 2016).

GBM, hücre döngüsü ve DNA onarımı, apoptoz, ilaç direnci, büyüme faktörleri ve hücresel sinyal yolakları ile ilişkili çok karmaşık direnç mekanizmalarına sahiptir (Safari ve Khoshnevisan, 2015). TQ'nun, direnç mekanizmalarının inhibisyonu yoluyla GBM'nin ilaç direncini önemli ölçüde etkileyebildiği açıklanmıştır. TQ çeşitli sinyal yollarını etkileyerek bir tedaviye adjuvan olarak kemosensitizasyonu indükleyebilir (Cheng ve ark., 2011).

Literatür incelemesi yapıldığında; TQ'nun IDH Mutant GBM hücrelerinde etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. IDH-mutant GBM'ler IDH-mutant olmayan GBM'lere göre daha iyi prognoz sergilemektedir. IDH-mutasyonu taşıyan hastaların, IDH-mutasyonu taşımayan hastalara kıyasla anlamlı ölçüde daha uzun genel sağkalıma sahip oldugunu göstermiştir. IDH (-) IDH-mutasyonu taşımayan hastalar 9-15 ay kadar bir sağkalım gösterirken, IDH-mutasyonu taşıyan hastalar ortalama 24-31 aylık bir sagkalım gösterdikleri rapor edilmistir (Mirchia ve Richardson, 2020). Bu farlılığın nedeni tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak IDH mutasyonu sonucunda, α-KG'in onkometaboliT olan 2-HG dönüşümü sırasında çok fazla NADPH harcanır ve NADPH seviyesi azalır. NAPDH'ın, beyin dokusunda oksitlenmis glutatyon ve tiyoredoksini azaltıp hücreleri lipid peroksidasyonuna ve oksidatif DNA hasarına karsı korur. Dolayısyla, IDH-mutasyonlu hastalarda 2-HG oluşumu sırasında, NADPH seviyesi azaldığı için hücreler serbest radikaller ve ROS yoluyla strese daha duyarlı hale gelir (Waitkus ve ark.,2016). Daha önceki çalışmalarda TQ'nun GBM hücrelerinde DNA hasarına yol açarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Gurung ve ark., 2010). Bu bilgiden hareketle sunulan tez çalışmasında zaten oksidatif DNA hasarına duyarlı olan IDH-mutant hücrelerde TQ'nun IDH-mutant olmayan hücrelere göre daha etkin olabileceği hipotezlenmişti. Bu hipotezimizi test etmek için karşılaştırılmalı olarak IDH-mutant ve IDH-mutant olmayan GBM hücrelerde TQ'nun hücre canlılığı/proiliferasyonuna etkisi araştırıldı. Araştırma sonuçlarımıza göre TQ'nun IDH-mutan hücrelerde daha etkili olduğunu düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki gösterdiği bulundu.

Çalışma sonuçlarımıza göre, IDH-mutasyonlu hastalar da TQ'nun kemoteröpatiklerle kombin kullanımının kemoteröpatik ilaçların etkinliğini artırabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak, mevcut verilerimiz IDH-mutasyonlu GBM hastalarının tedavisinde yeni bir yaklaşımın kapısını açmakta ve *in vivo* çalışmaların yapılması önerilmektedir

6. KAYNAKLAR

Agnihotri S, Aldape KD, Zadeh G. Isocitrate dehydrogenase status and molecular subclasses of glioma and glioblastoma. Neurosurg Focus, 2014: 37(6); 13.

Ahmad A, Mishra RK, Vyawahare A, Kumar A, Rehman MU, Qamar W, Khan AQ, Khan R. Thymoquinone (2-Isoprpyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. Saudi Pharm J, 2019: 27(8); 1113-1126.

Alexander HR, Syed Alwi SS, Yazan LS, Zakarial Ansar FH, Ong YS. Migration and Proliferation Effects of Thymoquinone-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (TQ-NLC) and Thymoquinone (TQ) on In Vitro Wound Healing Models. Evid Based Complement Alternat Med, 2019; 2019: 14-16.

Al-Gabri NA, Saghir SAM, Al-Hashedi SA, El-Far AH, Khafaga AF, Swelum AA, Al-Wajeeh AS, Mousa SA, Abd El-Hack ME, Naiel MAE, El-Tarabily KA. TherapeuticPotential of Thymoquinone and Its Nanoformulations in Pulmonary Injury: A Comprehensive Review. Int J Nanomedicine, 2021; 16: 5117-5131.

Alhosin M, Ibrahim A, Boukhari A, Sharif T, Gies JP, Auger C, Schini-Kerth VB. Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of α and β tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts. Invest New Drugs. 2012: Oct;30(5); 1813-1819.

Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. Pharmacol Ther, 2015: 152:63-82.

Al-Khallaf H. Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. Cell Biosci, 2017: 3(7);37-42.

Allen M,Bjerke M, Edlund H,Nelander S.Westermark B. Origin of the U87MG gliomacellline: Goodnewsandbadnews. ScienceTranslationalMedicine, 2016: 8(354); 354-355.

Anjum K, Shagufta BI, Abbas SQ, Patel S, Khan I, Shah SAA, Akhter N, Hassan SSU. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma

multiforme (GBM) therapy: A review. Biomed Pharmacother, 2017: 92; 681-689.

Ansary J, Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Regolo L, Quinzi D, Gracia Villar S, Garcia Villena E, Tutusaus Pifarre K, Alvarez-Suarez JM, Battino M, Cianciosi D. Nutritional Value and Preventive Role of Nigella sativa L. and Its Main Component Thymoquinone in Cancer: An Evidenced-Based Review of Preclinical and Clinical Studies. Molecules, 2021: 26(8);2108.

Arafa el-SA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, El-Mahdy MA, Wani AA. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. Mutat Res. 2011 Jan 10;706(1-2):28-35.

Arumugam P, Subramanian R, Priyadharsini JV, Gopalswamy J. Thymoquinone inhibits the migration of mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells by down-regulating MMP-2 and MMP-9. Chin J Nat Med. 2016 Dec;14(12):904-912.

Ballout F, Habli Z, Rahal ON, Fatfat M, Gali-Muhtasib H. Thymoquinone-based nanotechnology for cancer therapy: promises and challenges. Drug Discov Today, 2018: 23(5); 1089-1098.

Beierle EA, Massoll NA, Hartwich J, Kurenova EV, Golubovskaya VM, Cance WG, McGrady P, London WB. Focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma: immunohistochemical and real-time PCR analyses. Clin Cancer Res. 2008 Jun 1;14(11):3299-3305.

Chen GG, Sin FL, Leung BC, Ng HK, Poon WS. Glioblastoma cells deficient in DNA-dependent protein kinase are resistant to cell death. J Cell Physiol. 2005 Apr;203(1):127-32.

Cheng L, Wu Q, Huang Z, Guryanova OA, Huang Q, Shou W, Rich JN, Bao S. L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. EMBO J. 2011 Mar ;30(5):800-813.

Chowdhury FA, Hossain MK, Mostofa AGM, Akbor MM, Bin Sayeed MS. Therapeutic Potential of Thymoquinone in Glioblastoma Treatment: Targeting Major Gliomagenesis Signaling Pathways. Biomed Res Int, 2018;2018: 18-20.

Çetinkaya M. Kanser ve ergoterapi. Gazi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2020:5(2):14-24.

D'Alessio A, Proietti G, Sica G, Scicchitano BM. Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. Cancers (Basel), 2019: 11(4); 469.

Dalli M, Bekkouch O, Azizi SE, Azghar A, Gseyra N, Kim B. Nigella sativa L. Phytochemistry and Pharmacological Activities: A Review (2019-2021). Biomolecules, 2021: 12(1); 20.

Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. Pharmacol Res, 2015: 138(58); 95- 96.

Davis ME. Epidemiology and Overview of Gliomas. Semin Oncol Nurs, 2018: 34(5); 420-429.

Deng S, Shanmugam MK, Kumar AP, Yap CT, Sethi G, Bishayee A. Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. Cancer. 2019 Apr 15;125(8):1228-1246.

Dolgin E. Venerable brain-cancer cell line faces identity crisis. Nature, 2016: 537(7619); 149-150.

El-Far AH, Tantawy MA, Al Jaouni SK, Mousa SA. Thymoquinone-chemotherapeutic combinations: new regimen to combat cancer and cancer stem cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2020: 393(9); 1581-1598.

Fabian D, Guillermo Prieto Eibl M, Alnahhas I, Sebastian N, Giglio P, Puduvalli V, Palmer J. Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. Cancers, 2019; 11(2), 174-185.

Farooq J, Sultana R, Taj T, Asdaq SMB, Alsalman AJ, Mohaini MA, Al Hawaj MA, Kamal M, Alghamdi S, Imran M, Shahin H, Tabassum R. Insights into the

Protective Effects of Thymoquinone against Toxicities Induced by Chemotherapeutic Agents. Molecules, 2021: 27(1); 226-232.

Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. Virchows Arch, 2017: 471(2); 257-269.

Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. Anticancer Drugs. 2004 Apr;15(4):389-399.

Guler EM, Sisman BH, Kocyigit A, Hatiboglu MA. Investigation of cellular effects of thymoquinone on glioma cell. Toxicol Rep, 2021: 8; 162-170.

Gurung RL, Lim SN, Khaw AK, Soon JF, Shenoy K, Mohamed Ali S, Jayapal M, Sethu S, Baskar R, Hande MP. Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. PLoS One. 2010 Aug 12;5(8):e12124.

Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, Gilbert MR, Yang C. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. Br J Cancer, 2020: 122(11); 1580-1589.

Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee ShU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Asian Pac J Cancer Prev, 2017: 18(1); 3-9.

Hannan MA, Rahman MA, Sohag AAM, Uddin MJ, Dash R, Sikder MH, Rahman MS, Timalsina B, Munni YA, Sarker PP, Alam M, Mohibbullah M, Haque MN, Jahan I, Hossain MT, Afrin T, Rahman MM, Tahjib-Ul-Arif M, Mitra S, Oktaviani DF, Khan MK, Choi HJ, Moon IS, Kim B. Black Cumin (Nigella sativa L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. Nutrients, 2021: 13(6); 1784.

Homayoonfal M, Asemi Z, Yousefi B. Targeting microRNAs with thymoquinone: anew approach for cancer therapy. Cell Mol Biol Lett, 2021: 26(1); 43-47.

Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. J Med Life, 2009: 2(4); 386-393.

Kabil N, Bayraktar R, Kahraman N, Mokhlis HA, Calin GA, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. Thymoquinone inhibits cell proliferation, migration, and invasion by regulating the elongation factor 2 kinase (eEF-2K) signaling axis in triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 2018: 171(3); 593-605.

Kanderi T, Gupta V. Glioblastoma Multiforme. In: StatPearls [Internet].: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2022; p.:1-10.

Kayabolen A, Yilmaz E, Bagci-Onder T. IDH Mutations in Glioma: Double-Edged Sword in Clinical Applications?. Biomedicines, 2021: 9(7); 799-801.

Keskin E, Elmas Ö, Aydın H.A, Şimşek K, Gün E.G, Kalaycı M, Glioblastome Multiforme Epidemiyolojisi, Tedavi Seçenekleri ve Sağkalım Süresi: Retrospektif Tek Merkezli Çalışma. Med J West Black Sea, 2021;5(2): 248-255.

Kim HJ, Park JW, Lee JH. Genetic Architectures and Cell-of-Origin in Glioblastoma. Front Oncol, 2021; 10: 615400.

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

Komori T, Muragaki Y, Chernov MF. Pathology and Genetics of Gliomas. Prog. Neurol Surg, 2018: (31); 1-37.

Kurimasa A, Kumano S, Boubnov NV, Story MD, Tung CS, Peterson SR, Chen DJ. Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. Mol Cell Biol. 1999 May;19(5):3877-3884.

Li F, Rajendran P, Sethi G. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. Br J Pharmacol. 2010 Oct;161(3):541-554.

Li QJ, Cai JQ, Liu CY. Evolving Molecular Genetics of Glioblastoma. Chin Med J (Engl), 2016: 129(4); 464-471.

Liu Y, Lang F, Chou FJ, Zaghloul KA, Yang C. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: Genetics, Biochemistry, and Clinical Indications. Biomedicines, 2020: 8(9); 294.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol, 2007: 114(2); 97-109.

Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro Oncol, 2021: 23(8);1231-1251.

Mahmoud YK, Abdelrazek HMA. Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy. Biomed Pharmacother, 2019: 115; 108783.

Malik S, Singh A, Negi P, Kapoor VK. Thymoquinone: A small molecule from nature with high therapeutic potential. Drug Discov Today, 2021: 26(11); 2716-2725.

McGrowder DA, Miller FG, Nwokocha CR, Anderson MS, Wilson-Clarke C, Vaz K, Anderson-Jackson L, Brown J. Medicinal Herbs Used in Traditional Management of Breast Cancer: Mechanisms of Action. Medicines (Basel), 2020: 7(8); 47-54.

Miller JJ, Shih HA, Andronesi OC, Cahill DP. Isocitrate dehydrogenase-mutantglioma: Evolving clinical and therapeutic implications. Cancer, 2017: 123(23); 4535-4546.

Mirchia K, Richardson TE. Beyond IDH-Mutation: Emerging Molecular Diagnostic and Prognostic Features in Adult Diffuse Gliomas. Cancers (Basel), 2020: 12(7); 1817-1832.

Montemurro N. Glioblastoma Multiforme and Genetic Mutations: The Issue Is Not Over Yet. An Overview of the Current Literature. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2020: 81(1); 64-70.

Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, Von Hoff DD. Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment. Clin Cancer Res. 2018 Jan 15;24(2):266-275.

Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada J. Aberrant signaling pathways in glioma. Cancers (Basel). 2011 Aug 10;3(3):3242-3278.

Natarajan M, Hecker TP, Gladson CL. FAK signaling in anaplastic astrocytoma and glioblastoma tumors. Cancer J. 2003 Mar-Apr;9(2):126-133.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol, 2007: 170(5); 1445-1453.

Özdemir-Kaynak E, Qutub AA, Yesil-Celiktas O. Advances in Glioblastoma Multiforme Treatment: New Models for Nanoparticle Therapy. Front Physiol,2018: 19(9); 170-179.

Özduman K, Hacıhanefıoğlu M, Pamır M. N. Glioblastoma.Türk Nöroşir Derg, 2019: 29(3); 305-334.

Pal RR, Rajpal V, Singh P, Saraf SA. Recent Findings on Thymoquinone and Its Applications as a Nanocarrier for the Treatment of Cancer and Rheumatoid Arthritis. Pharmaceutics, 2021: 13(6); 775-792.

Pazhouhi M, Sariri R, Rabzia A, Khazaei M. Thymoquinone synergistically potentiates temozolomide cytotoxicity through the inhibition of autophagy in U87MG cell line. Iran J Basic Med Sci, 2016: 19(8); 890-898.

Paolillo M, Comincini S, Schinelli S. In Vitro Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension. Cancers (Basel), 2021: 13(10); 2449-2454.

Pearson JRD, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2017; 2, 17040-17047.

Peñaranda-Fajardo NM, Meijer C, Liang Y, Dijkstra BM, Aguirre-Gamboa R, den Dunnen WFA, Kruyt FAE. ER stressand UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanismregulating GBM stemcellsthrough SOX2 modulation. Cell Death Dis 2019;10(10):690.

Pisapia DJ. The Updated World Health Organization Glioma Classification: Cellular and Molecular Origins of Adult Infiltrating Gliomas. Arch Pathol Lab Med, 2017: 141(12); 1633-1645.

Racoma IO, Meisen WH, Wang QE, Kaur B, Wani AA. Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells. PLoS One. 2013 Sep 9;8(9):e72882

Raizer J, Parsa A. Current Understanding and Treatment of Gliomas. Anticancer Research, London 2015; p. 2-6.

Rajput S, Kumar BN, Dey KK, Pal I, Parekh A, Mandal M. Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G(1) arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. Life Sci. 2013 Nov 13;93(21):783-790.

Ramachandran N, Colman RF. Chemical characterization of distinct subunits of pig heart DPN-specific isocitrate dehydrogenase. J Biol Chem, 1980 25;255(18):8859-8864.

Romanidou O, Kotoula V, Fountzilas G. Bridging Cancer Biology with the Clinic: Comprehending and Exploiting IDH Gene Mutations in Gliomas. Cancer Genomics Proteomics, 2018: 15(5); 421-436.

Safari M, Khoshnevisan A. Cancer Stem Cells and Chemoresistance in Glioblastoma Multiform: A Review Article. J Stem Cells. 2015;10(4):271-285.

Schneider-Stock R, Fakhoury IH, Zaki AM, El-Baba CO, Gali-Muhtasib HU. Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. Drug Discov Today, 2014: 19(1); 18-30.

Shergalis A, Bankhead A 3rd, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. Pharmacol Rev. 2018 Jul;70(3):412-445.

Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of Oncol. 2003 Jan;22(1):107-113.

Singh P, Singh A, Shah S, Vataliya J, Mittal A, Chitkara D. RNA Interference Nanotherapeutics for Treatment of Glioblastoma Multiforme. Mol Pharm, 2020: 17(11); 4040-4066.

Smith D, Shimamura T, Barbera S, Bejcek BE. NF-kappaB controls growth of glioblastomas/astrocytomas. Mol Cell Biochem. 2008 Jan;307(1-2):141-147.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radio therapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005; 352(10):987-996.

Stoyanov GS, Dzhenkov DL. On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. Folia Med (Plovdiv), 2018: 60(1); 48-66.

Stoyanov GS, Dzhenkov D, Ghenev P, Iliev B, Enchev Y, Tonchev AB. Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. Med Oncol, 2018: 35(3); 27-32.

Sonoda Y. Clinical impact of revisions to the WHO classification of diffuse gliomas and associated future problems. Int J Clin Oncol. 2020 Jun;25(6):1004-1009.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin, 2021: 71(3); 209-249.

Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. CA Cancer J Clin, 2020: 70(4); 299-312.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014: 23(10); 1985-1996.

Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme- an overview. Contemp Oncol (Pozn), 2014: 18(5); 307-312.

Ünal TD, Hamurcu Z, Delibaşı N, Çınar V, Güler A, Gökçe S, Nurdinov N, Ozpolat B. Thymoquinone Inhibits Proliferation and Migration of MDA-MB-231Triple Negative Breast Cancer Cells by Suppressing Autophagy, Beclin-1 and LC3. Anticancer Agents Med Chem, 2021: 21(3); 355-364.

Velázquez Vega JE, Brat DJ. Incorporating Advances in Molecular Pathology Into Brain Tumor Diagnostics. Adv Anat Pathol, 2018: 25(3); 143-171.

Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. Cancer Metastasis Rev. 2009 Jun;28(1-2):35-49.

Zheng J, Zhou Y, Li Y, Xu DP, Li S, Li HB. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. Nutrients, 2016: 8(8); 495.

Zhu WQ, Wang J, Guo XF, Liu Z, Dong WG. Thymoquinone inhibits proliferation in gastric cancer via the STAT3 pathway in vivo and in vitro. World J Gastroenterol, 2016: 22(16); 4149-4159.

Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A, Sarkar FH, Hadi SM. Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. Cell Death Dis. 2013 Jun 6;4(6): e660.

Wen PY, Huse JT. 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. Continuum (Minneap Minn), 2017: 23(6, Neuro-oncology);1531-1547.

White K, Connor K, Clerkin J, Murphy BM, Salvucci M, O'Farrell AC, Rehm M, O'Brien D, Prehn JHM, Niclou SP, Lamfers MLM, Verreault M, Idbaih A, Verhaak R, Golebiewska A, Byrne AT. New hints towards a precision medicine strategy for IDH wild-type glioblastoma. Ann Oncol, 2020: 31(12); 1679-1692.

Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. Gliomas, 2016; 381–397.

Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. Biochem Pharmacol, 2012: 83(4); 443-51.

EKLER

İzositratDehidrogenaz (IDH) Geninde Mutasyon Taşıyan ve Taşımayan GlioblastomalardaTimokinon'un Hücre Canlılığına ve Proliferasyonuna Etkisinin Araştırılması

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%3	%1	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%5
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	dusunenadamdergisi.org İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Bülent Ecevit Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	GÜNDÜZ, Cumhur, ÇOĞULU, Özgür, ÖZKINAY, Cihangir, TÜTÜNCÜOĞLU, Sarenur, SAPMAZ, Gül, KÖSEM, Mehmet and ÖZKINAY, Ferda. "İdiyopatik mental retardasyonlarda frajil-X sendromu araştırılması", TUBITAK, 2000. Yayın	<%1
6	abis-files.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

GEN KÖK

Genom ve Kök Hücre Merkezi
Genome and Stem Cell Center

Sayı: 68742022- 903.99.-261 27/09/2021
Konu: Değerlendirme Onay

Sayın; Prof.Dr. Zuhal HAMURCU

"İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Geninde Mutasyon Taşıyan Ve Taşımayan Glioblastomalarda Timokinonun Hücre Canlılığına Ve Proliferasyonuna Etkisinin Araştırılması" başlıklı projenizin Merkezimiz Genom Birimi' nde gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Not: Bu projeden çıkan bütün yayınlarınızda projenin Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinde yapıldığına dair ibarenin kullanılması zorunludur.

Kullanım şekli: "Erciyes University Genome and Stem Cell Center (GENKOK)

Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Berfin UĞUR

Uyruğu: Türkiye (TC)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Vedat Evliya Lisesi	2014
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı.	2019
Yüksek Lisans	ERÜ Sağlık Bilimler Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Kayseri, Türkiye	2022

YABANCI DİL

İngilizce