T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Metin ORAKDÖĞEN

GLİOBLASTOMA (U-87) ÜÇ BOYUTLU TÜMÖR MODELİNDE RUKSOLİTİNİB VE NİFUROKSAZİD İLE JAK/STAT SİNYAL YOLAĞININ İKİ FARKLI DÜZEYDE ENGELLENMESİ VE BUNUN ANJİOGENEZİSİ ENGELLEYİCİ ETKİSİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Merve YAZICI

EDİRNE - 2021

TEŞEKKÜR

Tezimi hazırlayışım boyunca bana olan önderliği ve eğitimimde sağladığı büyük katkıları için başta tez hocam Doç. Dr. Metin ORAKDÖĞEN ve Dr. Öğr. Üy. Emre DELEN' e, tecrübelerinden faydalandığım sayın hocam Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR' a, eğitimim boyunca örnek alıp esinlendiğim ve şekillendiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Osman ŞİMŞEK' e,

Eğitimim boyunca verdikleri destek ve yardımları için tüm Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı hocalarıma,

Asistanlık dönemim boyunca aynı ortamı paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma, kliniğimiz, polikliniğimiz ve servis hemşire, sekreter ve personeline,

Tezim süresince ve meslek hayatım boyunca benim yanımda olan sevgili aileme, tüm öğrencilik hayatım boyunca bana emek veren saygıdeğer öğretmenlerime sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje birimi tarafından 2020/72 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Kendilerine ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 2

- **GLİOBASTOMA** 2
- **GLİOMALARIN TARİHSEL SINIFLAMASI VE GÜNCEL SINIFLAMA** 8
- **GLİOMALARDA 2016 SINIFLAMASININ GETİRDİĞİ ETKİ VE FARKLILIKLAR** 10
- **GLİOMALARIN MOLEKÜLER MEKANİZMASI** 11
- **JAK/STAT SİNYALİZASYON** 12
- **NİFUROKSAZİDİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ** 14
- **RUXOLİTİNİBİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ** 14

GEREÇ VE YÖNTEMLER 15

BULGULAR 25

TARTIŞMA 38

SONUÇLAR 44

ÖZET 45

SUMMARY 46

KAYNAKLAR 47

EKLER

KISALTMALAR

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
GBM : Glioblastoma Multiforme
JAK/STAT : Janus Kinaz / Signal Transducer and Activator of Transcription
BT : Bilgisayarlı Tomografi
MRG : Manyetik Rezonans Görüntüleme
PET-CT : Pozitron Emisyon Tomografisi
IDH : Izositrat Dehidrogenaz
NOS : Not Otherwise Specified
TERT : Telemeraz Revers Transkriptaz
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
VEGF : Vasküler Endotelyal Growth Factor
FGF : Fibroblast Growth Factor
EGF : Epidermal Growth Factor
PDGF : Platelet – Derived Growth Factor
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
JAK : Janus Kinaz
SOCS : Suppressor of Cytokine Signalignα
PIK3K : Phosphatidylinositol 3- Kinase
mTOR : Mammalian Target of Rapamycin
GAS : Growth Arrest Stecific
ISRE : IFN - stimulated Response Element
HIF1α : Hypoxia – inducible Factor 1 alfa

SSS : Santral Sinir Sistemi

TMZ : Temozolomid

MTT : (3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide)

DMSO : Dimetil Sülfoksid

RT-qPCR : Kantitatif Real Time – PCR Analizleri

MMP : Matrix Metalloproteinaz

IL : Interlökin

IFN : Interferon

DMEM : Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

FBS : Fetal Sığır Serum

MAPK : Mitojen Activated Protein Kinaz

GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

VEGF : Vasküler Endothelial Growth Factor

GİRİŞ VE AMAÇ

Gliomalar, Amerika Birleşik Devletleri'nde, beyin ve santral sinir sistemi tümörlerinin %31'ini oluşturmaktadır ve %81'i malign karakterdedir (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasına göre malign grupta olan Glioblastoma multiforme (GBM), erişkin beyin kanserleri arasında en yaygın olanı ve tüm tedavi protokollerine rağmen (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve/veya kombinasyonları) en mortal seyredenidir (2). Hastalığın seyrindeki yüksek morbidite, mortalite ve tedavideki başarısızlıklar hastalığa pesimistik bir bakış açısı kazandırmıştır (3). Tedavideki başarısızlığın ve erken ölümlerin nedenlerinden biri de glioblastomaların altında yatan anjiogenezisi içeren karmaşık moleküler temelidir.

JAK/STAT sinyalizasyon yolağı anjiogenez ile yakından ilişki bir hücre içi sinyalizasyon yolağıdır. Vücudun normal fizyolojik koşullarında önemli görevlerinin yanında enflamasyon, fibrozis ve kanser gibi durumlarda da son derece önemli görevler üstlenmektedir. Bu bakımdan son yıllarda yapılan moleküler temelli çalışmalarda sıkça çalışılan yolakların başında gelmektedir. Yine gliomaların moleküler patofizyolojisindeki rolü bildirilmekte, laboratuar çalışmalarında da olsa yolağın inhibitörleri ile ilgili çalışmaların giderek arttığı dikkat çekmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada; bir glioblastoma multiforme hücre hattı olan U87 ile üç boyutlu tümör modeli oluşturma ve söz konusu iki ajanın JAK/STAT sinyal yolağının iki farklı düzeyde engellenmesi araştırılmıştır. Aynı zamanda bu yolağın susturulmasının anjiogenezis üzerindeki etkileri karşılaştırılacaktır. Bu sayede gliomaların moleküler özelliklerini daha iyi anlamak ve böylece gelecek yeni çalışmalar ile tedavide yeni moleküler hedefler belirlenmesi umut edilmektedir.

GENEL BİLGİLER

GLİOBLASTOMA

Tarihçe

İnsanoğlunun kafatası ve içindeki beyin dokusuna olan ilgisi bundan on bin yıl öncesine dayanmaktadır. Orta Anadolu ve Kapadokya'nın ilk yerleşim yeri olarak bilinen Aşıklı Höyük' teki kazı çalışmalarında bulunan ve tarihin ilk beyin ameliyatının yapıldığı belirtilen kafatasının, 20-25 yaşlarında ve cerrahi sonrasında 10 gün hayatta kalıp ölen bir kadına ait olduğu gösterilmiştir. Tarihte santral sinir sistemi tümörlerine ilişkin bilinen ilk raporlar, otopsi materyallerinde morfolojik düzeyde incelenmiş olup 1800' de Berns ve 1804' te Abernety tarafından bildirilmiştir (4). Merceklerin geliştirilmesi ve modern mikroskobun 1830'da J. J. Lister tarafından ortaya konulması ile histopatolojik inceleme dönemi başlamıştır (4). Modern otopsinin temelini oluşturan çalışmalarıyla, ilk kapsamlı histomorfolojik tanımı, 1865'te Alman patolog Rudolf Wirchow yapmıştır (5). Wirchow, sağlıklı ve tümörlü dokuyu histolojik olarak ayıran ve ilk 'gliom' terimini kullanan kişidir [6]. Mikroskobik boyanma özelliklerine göre beyin tümörlerini 2 guruba ayırarak (düşük dereceli ve yüksek dereceli olarak) ilk sınıflamaya öncülük etmiştir (4,6). 20. Yüzyıl başlarında doku kültürü çalışmalarıyla beraber glioblastomalar, hücresel (nekroz, çoğalma ve hücre morfolojisi) özellikleriyle birlikte incelenmeye başlanmıştır (7). Wirchow'un gliomları morfolojik olarak tanımlamasından yaklaşık 100 yıl sonra, 1926'da prekürsör hücrelerin tanımlanması ile Amerikan nöropatolog Percival Bailey ve Harvey Cushing tarafından, DSÖ 2016 sınıflamasının dayandığı, gliomların modern sınıflamasının temelleri atılmış, GBM'e ilk isimlerinden olan '*spongioblastoma multiforme*' adı verilmiştir (4). 20. Yüzyılın ikinci

yarısında gelişen moleküler belirteçlerle beraber gliomların sınıflamaları ve tanımlamaları bugünki halini almaya başlamıştır (4). Bu yüzyıldaki gelişmelere katkı sağlayan bir diğer alan da 1895'de X ışınlarının Wilhelm Roentgen tarafından keşfi olmuştur (8). 1904'de ilk nöro görüntüleme Amerikan dergilerinde raporlanmıştır (8). 1918-1919 yıllarında Walter E. Dandy, boşluklu organlardaki havanın, organın ana hatlarını çizmesi esasını beyine de uyarlamış ve bu fikir pnömoensefalografi ve ventrikülografiyi doğurmuştur (8). Yapılan direk grafilerde saptanan kalsifiye tümörler, 20. Yy. başlarında beyin tümörü teşhisinin kesitsel görüntülemeler elde edilene kadarki ilk başlangıcı olmuş ve ilk pediatrik beyin tümörü bu teknik kullanılarak 1952' de teşhis edilmiştir (9).

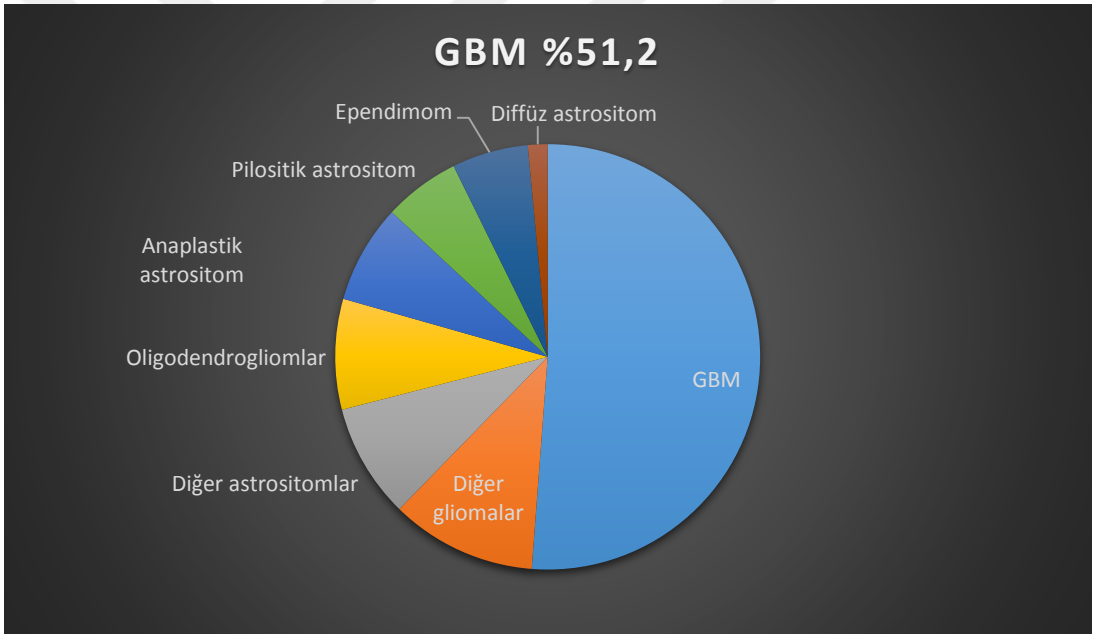
Tarihte ilk beyin tümörü ameliyatı 25 Kasım 1884'te, Rickmann J. Godlee tarafından yapılmıştır (10). Ülkemizde ise ilk nöroşirurji operasyonları; trigeminal nevralji, spinal kord ve beyin tümörleri üzerine, 1923'te Dr. Tuner tarafından yapılmıştır (11). Aynı yıllarda Dandy tarafından yapılan hemisferektomilerle glioblastomların ne kadar invaziv ve kötü seyirli olduğu ortaya konmuştur (12). Aradan geçen zamana ve tüm gelişmelere rağmen gelinen noktada kraniyal tümörler içerisindeki glioblastomalar, kötü seyrine devam etmektedir (13). Bu durum da, tarihten bu yana yapılan morfolojik, radyolojik, histolojik ve anatomik incelemelerin yanı sıra, moleküler incelemelerin de önemini ve gerekliliğini tartışmasız kılmaktadır (14).

Epidemiyoloji

Glioblastoma multiforme en kötü seyirli primer beyin tümörüdür (1). Beyaz ırkta siyah ırka göre daha sıktır (15). Ülkemizde epidemiyolojik veriler kısıtlı olsa da tek merkezli yapılan retrospektif bir çalışmada primer beyin tümörlerinin ikinci en sık olanı glioblastomalar olarak bulunmuştur (16). Ülkemizde, beyin, meninksler ve merkezi sinir sistemi kanserlerinin insidans hızı erkek cinsiyette kadına göre fazladır. Beyin ve santral sinir sistemi tümörlerinin tüm yaş guruplarında insidansı Amerika Birleşik Devletleri'nde yüz binde 22.64' tür. Bu tümörlerin yaklaşık üçte ikisi benign karakterdedir. Malign karakterde olanların ise yaklaşık %80' ini gliomlar oluşturur (17). Bunların yarıdan fazlasını da GBM ve evre 4 astrositomlar oluşturur (Şekil 1). Ortalama tanı yaşı 64'tür. Genel sağ kalım ise tüm tedavi yaklaşımlarına rağmen, tanı anından ilk bir yıla kadar %17-30, ikinci yılda ise %3-5'tir (18).

Birleşik Devletler merkezi beyin tümörü kayıt defterine (CBTRUS) göre 2013-2017 yılları arasında yapılan bir çalışmada primer beyin ve diğer santral sinir sistemi tümörlerine bağlı ölen sayısı 81.246, ölüm hızı ortalama yüz binde 4,42'dir (19). Yine aynı çalışmada en sık görülen primer malign beyin tümörü glioblastomdur (tüm tümörlerin % 14,5' i ve kötü huylu tümörlerin % 48,6' sı) (19).

1996 yılında Mayo klinik tarafından yayınlanan bir çalışmada; ortalama yaşı 62 olan, 64 hastanın %81' inin gliblastoma multiforme tanısı aldığı ve bu hastalara yapılan genel tedavi masraflarının 1993 Amerikan doları değeriyle kişi başı 67.887 $ olduğu bildirilmiştir (20). 2020 yılında yayınlanan bir çalışmada ise hastaların tedavi aldıktan sonra %46' sının emekli olduğu ve çalışamayacak duruma geldiği gösterilmiş, mortalitenin yanı sıra morbiditenin de önemi vurgulanmıştır (18).



Şekil 1. Santral sinir sistemi gliomlarının dağılımı (21).

Etiyoloji

Glioblastomaların yaş ile birlikte görülme sıklığı artmaktadır (18). Görülme sıklığındaki artışa rağmen etiyolojisi net olarak bilinmemektedir (21). Bazı çevresel ve genetik faktörlerin üzerinde durulmaktadır. Araştırılan bu faktörler arasında en iyi bilinen ve kanıtlanmış çevresel faktör iyonizan radyasyon maruziyetidir (22,23,24). İyonizan radyasyon DNA hasarı oluşturan bir etkendir (25). İyonizan radyasyona maruz kalınan yaş ne kadar küçükse risk o kadar artar (23). Beş yaş öncesinde kraniyal ışınlama alan çocuklarda riskin 30

kat arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (26).

Alerji ya da atopi hikâyesi ve ailesel kalıtımın etiyolojide rol oynadığı düşünülmektedir (23). Atopi ve alerji hikâyesinin GBM riskini azalttığına dair epidemiyolojik çalışmalar mevcuttur (27). Bir tümör; ailesel kalıtım (germline), kazanılmış (somatik) veya bunların birlikteliği olan poligenetik kalıtımla ortaya çıkar. Li-fraumeni Sendromu, Turcot Sendromu, Lynch Sendromu, Nörofibromatozis 1 ve 2, Cowden Sendromu ve Tüberosklerozis mendelien kalıtımla ortaya çıkan gliomların sendromik olanlarına örnektir (23).

Glioblastom etiyolojisindeki, kanıtlanmış çevresel ve genetik faktörlerin yanı sıra günümüzde hala tartışma konusu olan ve araştırılmaya devam edilen etkenler söz konusudur. Vinil klorür, pestisit, sigara, petrol rafine etme ve sentetik kauçuk üretimi gliomların gelişimi ile net olarak ilişkilendirilmemiştir (28). Formaldehit, cep telefonundan gelen elektromanyetik dalgalar ve non-iyonize radyasyonun GBM ‘e yol açtığı kanıtlanmamıştır (28). Yapılan çalışmalarda; risk faktörü olabileceği üzerinde durulmuş ancak uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (29). Beslenme alışkanlıkları üzerine yapılan bir çalışmada; kırmızı et ve ürünlerinin glioma riskini artırdığı ispatlanamamıştır (30).

Klinik

Gliomların klinik başvuru şekli; beyinde yerleştikleri lokalizasyona, cinsine ve boyutlarına göre değişiklik gösterir (28,31). Sıklıkla supratentoryal yerleşimli olan gliomların en sık (%68) klinik karşılığı ilerleyici nörolojik defisittir. Baş ağrısı ikici en sık başvuru şikâyetidir. Nöbet, mental değişiklikler, görme ve konuşma bozuklukları karşımıza gelebilecek klinik başvurulardan birkaçıdır. Nöbet daha çok düşük dereceli glial kitlelerin başvuru nedeni olsa da, yüksek dereceli oligodendrogliomlar da nöbetle karşımıza çıkabilir. İnfratentoryal yerleşimli kitleler ise genellikle; baş ağrısı, bulantı, kusma, papil ödemi, yürüme bozukluğu ve kraniyal sinir tutulumları ile ortaya çıkar. İntrakraniyal damarların tümör hücreleri tarafından tıkanması veya tümör içi kanama gibi durumlarda geçici iskemik atak benzeri bulgular görülebilir. Anatomik lokalizasyona göre de glioblastomlar klinik bulgular verebilir. Frontal lob lezyonlarında başta kişilik değişiklikleri olmak üzere, abuli, demans gibi bulgular görülebilir. Temporal lob lezyonlarında ise duyusal ve olfaktör sanrılar, deja vu ve hafıza bozuklukları gelişebilir. Parietal lob lezyonlarında ise vücudun karşı yarımında hemiparezi ve agnozi oluşabilir. Oksipital lob lezyonlarında görme kayıpları, korpus kallosum tutulumunda ise kelime körlüğü (aleksi) görülebilir. Glial tümörlerde

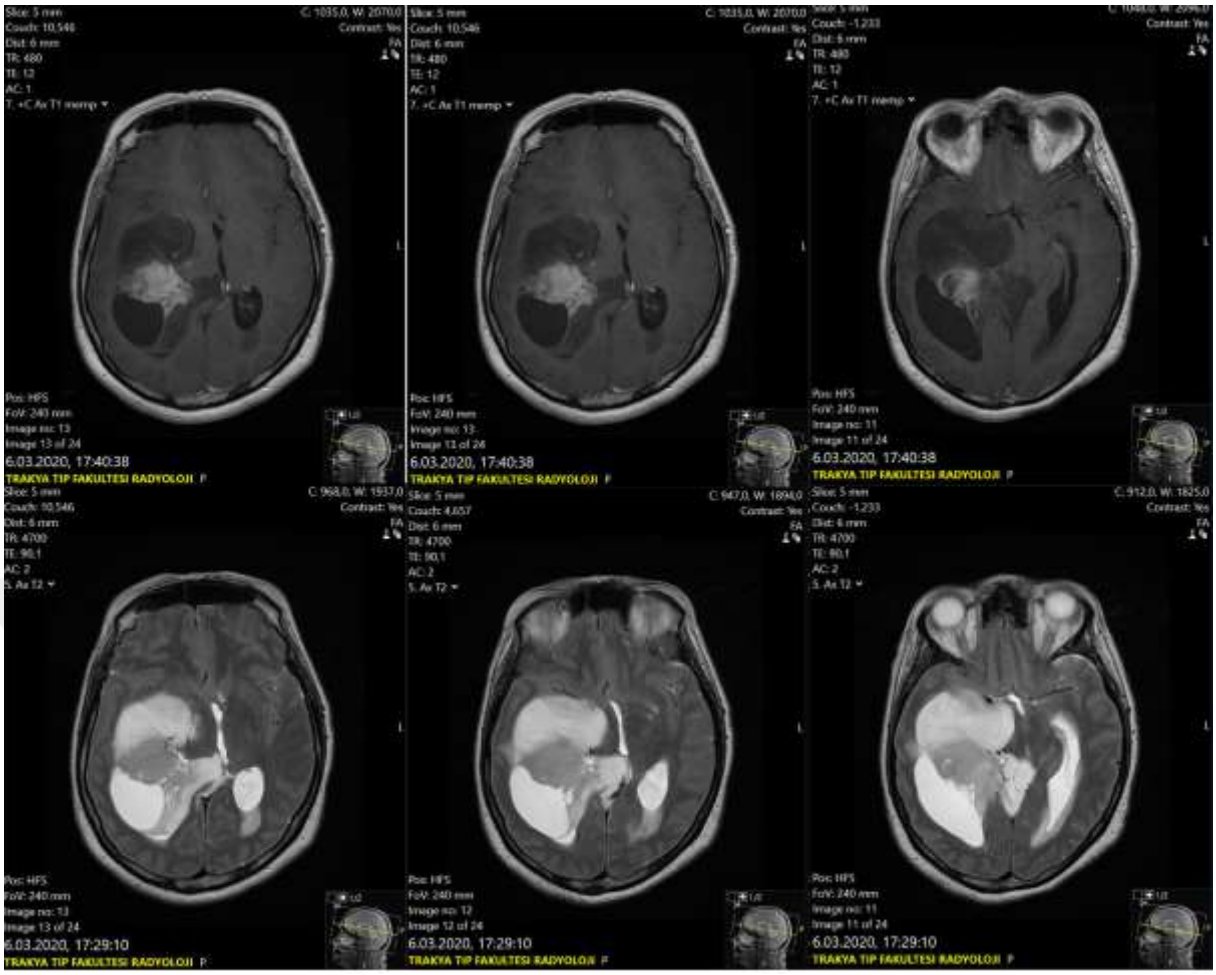
hastaların semptomlarını belirleyen bir diğer önemli unsur tümörün büyüme hızıdır. Yavaş büyüyen tümörler daha çok nöbet yakınmaları ile başvururken; hızlı büyüyen progresif tümörler baş ağrısı, motor kayıplar ve mental durum değişikliklerine neden olarak daha gürültülü bir tablo ile başvurabilirler (24). Her zaman lokalizasyon, tümör tipi ve büyüme hızı ilişkili klinik sunuş görülmeyebilir. Organ nakilleri sonrasında alıcıda görülen glioblastomlar, yanlışlıkla *Angiostrongylus cantonensis* tanısı alan sekonder GBM, serebellar kistik gliomlar, ekstrakranial organlara metastazı (akciğer karaciğer vb.), servikal miyelopati (32) ve hatta kalvaryal invazyonla sunumu, GBM' in nadir görülen klinik biçimleridir (33-36). Bu nedenledir ki GBM' in klinik yansıması geniş bir yelpazeye sahiptir.

Tanı

Glioblastomlarda tanısal görüntüleme genellikle; akut başlangıçlı şikayetlerde (nöbet, geçici iskemik atak gibi) bilgisayarlı tomografi (BT) , kronik şikâyetlerde (ilerleyici nörolojik defisit, baş ağrısı gibi) ise manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile yapılmaktadır.

Bilgisayarlı tomografide; belirsiz sınırlı hipodens alan, kafa içi basınç artışına bağlı sulkuslarda silinme, kitle içi kanama sonucu hipodens alan içerisinde sınırları nispeten düzenli hiperdens alan glioblastomun belirtilerindendir. Kitlenin lokalizasyonuna ve boyutuna bağlı olarak ventrikül basısı, orta hat şifti olabilir. Bu radyolojik görünüm sonrasında şikayetlerin başlangıcı ve süresi önemli olmaksızın hasta kontrastlı MR ile tetkik edilmelidir (37).

Manyetik rezonans görüntülemede glioblastomların radyolojik özellikleri, tümörün evresine göre değişiklik gösterebilir. Düşük dereceli gliomalarda MRI' da T2 hiperintens, T1 komşu parankim ile izointens ve kısmi kontrast tutulumu olabilir. Erken evre gliomalarda bu gibi durumlarda MR Spektroskopi ile bazı hücre içi ve hücrelerarası biyokimyasal belirteçler kullanılarak erken tanıya gidilebilir. Yüksek glial kitlelerde ise; MRG' de kitlesel lezyon etrafında periferik heterojen kontrast tutan, yoğun halka şekli ve lezyon içerisinde nekroza sekonder hipointens alan görülür. Nekroz GBM için spesifik bir radyolojik görünümdür. Tanısal görüntülemede kitle etkisine sekonder vazojenik ödem, kitle içine kanama (akut veya kronik zeminde) ve kitlenin bası etkisine bağlı orta hat şifti olası görüntülerdendir. İlk tanı aracı değilse de klinik takipte uzak metastaz düşünülen hastalarda Pozitron Emisyon Tomografisi (PET-CT) de kullanılabilir (28).



Şekil 2. GBM hastanın preoperatif görüntülemelerinde; sağ serebral hemisferde parietotemporooksipital bölgede, en belirgin yerinde 57x90x70 mm olarak ölçülen, santralinde patolojik kontrast fiksasyonu gösteren yaklaşık 40 mm çapında solid komponent içeren, T2 hiperintens kistik natürde lezyon izlenmektedir. Tariflenen lezyon basısına sekonder orta hattan sola doğru 9 mm şift mevcuttur.

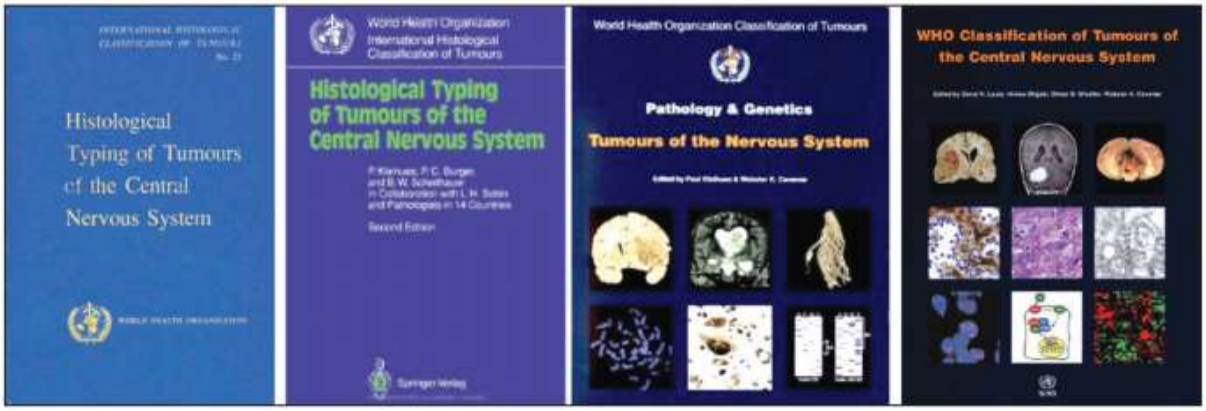
Tedavi

Gliblastom tedavisi; medikal, cerrahi, radyoterapi, kemoradyoterapi ve immünmodülatörleri içeren multifonksiyonel bir yaklaşımı barındırır. İlk tanı anında başlanan tedavi, ödeme sekonder belirtilerin azalmasına yönelik antiödem tedavidir. Bu amaçla başlanan kortikosteroidler (deksametazon) tedavi süresince veriliyor olsa da hastalığa ilişkin etkisi hakkında tartışmalar devam etmektedir (38). Biyopsi veya cerrahi tedavi olarak total rezeksiyon primer seçenektir. Cerrahi tedavinin sağ kalım üzerindeki etkisi daha birçok faktöre bağlıdır. Özellikle yaşlı hasta gurubunda cerrahi seçeneği kişiye göre özelleştirilir. Primer tedavi; uygun ve yeterli cerrahi rezeksiyonun ardından; radyoterapi ve/veya eş zamanlı kemoterapi şeklindedir (39,40). Son zamanlarda immunoterapideki hızlı ilerleme GBM

tedavisi için yeni seçenekler sağlamıştır (41). İmmünoterapide amaç, vücudun tümöre olan bağışıklık sisteminin aktivasyonunu artırmaktır. Henüz etkileri kanıtlanmamış olsa da GBM'de gen* tedavileri ile ilgili de çalışmalar mevcuttur (42). Büyümesini invazyon ve anjiyogenez sayesinde sağlayan GBM'de moleküler odaklar hedef alınarak tedavi seçenekleri oluşturulmaktadır.

GLİOMALARIN TARİHSEL SINIFLAMASI VE GÜNCEL SINIFLAMA

Sınıflamasının, tedavisinden geç yapılmaya başlandığı beyin tümörleri hakkında ilk fasikül 1952'de Armed Forces İnstitute of Pathology (AFIP) tarafından yayınlanmıştır (43). 1952'de DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tümör patolojisine yaklaşım açısından 3 ana öğe (anatomik bölge, histolojik tümör tipi ve malignensi derecesi) belirlemesine rağmen bunlar sistematik halde bir sınıflamaya dönüşmemiştir (44). Bu çerçevede AFIP'nin yayınladığı makale ve fasiküller 27 yıl kadar etkinliğini sürdürmüştür.1979 yılında DSÖ tedavi ve prognoz odaklı bir sınıflama yapmak üzere Oslo'da 300 patolog ile beraber, Dr Klaus J Zülch yöneticiliğinde toplanmıştır (44). Bu toplantıda histolojik, patolojik ve klinik yaklaşım temelleri tartışılsa da, Dr. Zülch bir nöroonkolog olduğu için tümör sınıflamasında tanısal yaklaşımın yanı sıra tedavi ve prognozun da göz önünde bulundurulmasını savunmuştur. Bunun olumsuz yanı ise bazı tümörlerin histolojik yapısı agresif olmasa dahi klinik olarak mortaliteye neden olabildiği durumlarda agresif tümör olarak sınıflandırılmasıdır (44). Bu tartışmalar sonucunda histolojik yapı ve klinik beraber değerlendirilmesi kararı alınarak ilk mavi kitap olan histolojik sınıflama yapılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. 1979,1993,2000,2007 DSÖ SSS Tümörleri mavi kitap edisyonları.

Dünya Sağlık Örgütü mavi kitaplarında, tüm sistemlerin edisyonu tamamlandıktan sonra yenilenme yapıldığı için kitapların değişimi nöropatoloji alanındaki değişimlere yetişememiştir. Bu durum 2014'de ediyon güncellemesi adı altında Harlem konsessus rehberini ortaya çıkarmıştır (44). Bu rehber histopatolojik tanı, WHO (World Health Organization) derecesi, moleküler değişiklik ve entegre tanıyı içermiştir (45).

GLİOMALARDA 2016 SINIFLAMASININ GETİRDİĞİ ETKİ VE FARKLILIKLARI

Dünya Sağlık Örgütünün 2016 Sınıflamasında, 2014 yılında güncellenen edisyondaki entegre tanı sistemine, moleküler belirteçler de eklenmiştir. Moleküler özelliklerden IDH mutasyonu, 1p/19q kodelesyonu, H3K27M mutasyonu, RELA füzyonu yeni sınıflamada doğrudan tanı içerisinde yer almıştır (45). Örneğin yeni sınıflamada oligodendrogliom tanısı molkeüler belirteçleri de belirtilerek; WHO grade 2,IDH mutant, 1p19q kodelesyonu olarak kullanılmıştır (44). 2016 sınıflamasında en temel değişiklikler; diffüz gliomlar, medullablastom ve embriyonel tümörlerde yapılmıştır. Bu değişikliklerin temel amacı; tümörleri moleküler özelliklerine göre sınıflandırmak, klinisyene doğru ve güvenilir bilgi vermek ve erişkin ve bazı pediatrik tümörleri birbirinden ayırmaktır.

Eski sınıflamada glial kitleler; astrositik tümörler, oligoastrositomlar, oligodendrogliomlar ve ependimom olmak üzere 4 sınıfa ayrılıyordu. 2016 sınıflamasında ise diffüz gliomlar, diğer astrositomlar ve ependimom olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktaydı. Glioblastomlar eski sınıflamada astrositik tümörler içinde yer alırken, yeni sınıflamada diffüz gliomlar içinde yer almıştır.

Glioblastomlar WHO 2016 sınıflamasına göre 3 guruba ayrılmıştır. Bunlar IDH mutant, IDH mutant olmayan ve NOS(Not otherwise specified)tur [45]. IDH non-mutant gurup ise 4 'e ayrılmıştır. Bunlar; dev hücreli glioblastom, gliosarkom, epiteloid glioblastom ve sınıflamaya yeni eklenen bir tanı olan diffüz orta hat gliomudur (46).

IDH non mutant glioblastomlar tüm glioblastomların %90'ını oluşturur. Median yaş 62 olup erkek cinsiyette sıklığı daha fazladır. Eski sınıflamada 'primer' ya da 'de novo' glioblastom olarak geçen IDH non mutant glioblastomların 4 alt tipi vardır. Bunlar; küçük hücreli, primitif nöronal bileşenli, granüler hücreli ve lidip hücreli/lipidize glioblastomdur.

IDH mutant glioblastom yeni sınıflamada glioblastom multiforme yerine kullanılmaktadır. Bu gurupta median yaş 45 olup kadın erkek insidansı eşittir. Sıklıkla frontal lobu tutmaktadır.

2016 sınıflaması sonrasında 3 yeni güncelleme daha yapılmıştır (44). 2016 yılındaki sınıflamada NOS ifadesinin; difüz glial tümörlerde önemli yere sahip olan IDH mutasyonu ve 1p/19q kodelesyonu moleküler değişikliklerine karar verilemediği, yani bu moleküler değişikliklere yönelik testler yapılamadığı durumların yanı sıra, test yapılabildiğinde de test sonuçları arasında uyumsuzluklar olduğunda kullanılması önerilmiştir (44). Ancak bu ifade tanısal zorluk yaşanan her olguda kullanılmaya başlanmış ve klinik karmaşalara yol açmıştır. cIMPACT- NOW(the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy) 1. güncellemesinde "NOS" ifadesinin kullanım alanının sadece moleküler değişiklikler yönünden test yapılamadığı durumlar ile sınırlandırılması önerilmiştir. Yani diffüz glial bir tümörde IDH mutasyonuna ve/veya 1p/19q kodelesyonuna bakılamadığı durumlarda tümöre "Difüz astrositom, NOS", "Oligodendrogliom, NOS" tanısı verilecektir (44). 2. güncellemenin konusu H3K27M mutant ve IDH mutant diffüz gliallerdir. 2016 sınıflamasında H3K27M mutasyonun sadece difüz orta hat gliomlarına spesifik olduğu ve Grade 4 olarak derecelendirildiği bildirilmiştir (45). Ancak mutasyonu gösteren ve infiltratif olmayan tümörlerin varlığının ortay çıkması bu tümörlerin hepsinin Grade 4 olarak evrelendirilmesinin yanlış olduğunu ortaya koymuştur. cIMPACT-NOW 2. güncellemesinde "Difüz orta hat gliomu, H3K27M mutant, WHO Derece IV" tanısının tümörün orta hat yerleşimli, infiltratif patern gösteren ve mutasyona sahip tümörler ile sınırlandırılmasını önermiştir. IDH mutant diffüz gliallerde ise tüm immünohistokimyasal ve mikrosatellit analizleri birlikte yapmak yerine, algoritma temasında tek tek yapmak önerilmiştir. Örneğin; difüz glial bir tümör, IDH mutant olduğu anlaşıldıktan sonra , önce ATRX ve p53 immünohistokimyasal boyaması ile incelenecek, ATRX immünoekspresyon kaybı saptandığında mutasyon lehine değerlendirilerek, p53 ile de yaygın ve koyu boyanma gösterilirse tümör IDH mutant bir astrositik tümör olarak tanımlanacaktır. IDH mutasyonu varken, ATRX immünoekspresyonu korunmuş, p53 ile fokal boyanan ya da hiç boyanma göstermeyen bir difüz glial tümörde ise 1p/19q kodelesyonu araştırılacak, kodelesyon da saptanır ise tümör oligodendroglial tümör olarak kabul edilecektir (44).

Üçüncü güncelleme IDH wild tip tümörlerde glioblastom moleküler özellikleri üzerine yapılmıştır. Diffüz glial tümörlerde öğrendiğimiz moleküler değişiklikler IDH, ATRX ve p53 mutasyonlarından ibaret değildir. IDH-wt tümörlerde Telomeraz Reverse Transkriptaz (TERT) promotor bölgesinde mutasyon varlığında, EGFR amplifikasyonu varlığında, Kromozom 7 kazanımı ve Kromozom 10 kaybı olduğunda da tümörler glioblastom benzeri klinik seyir göstermektedir. Şaşırtıcı olan ise bu moleküler değişiklikleri gösteren tümörlerin

bazılarının hiçbir yüksek derece morfolojik bulgusu göstermemesidir . cIMPACT-NOW 3. Güncellemesinde; IDH-wt tümörlerde morfoloji glioblastomu desteklemese dahi TERT mutasyonuna, EGFR amplifikasyonuna, Kromozom 7 kazanımı / Kromozom 10 kaybına bakılması gerekliliği vurgulanarak bu moleküler değişikliklerden herhangi birinin tespiti durumunda tümörün "Glioblastom moleküler özellikleri gösteren difüz glial tümör, WHO Derece IV" olarak kabul edilmesini önerilmiştir (44).

GLİOBLASTOMLARIN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Glioblastoma tedavisinde, günümüz şartlarında hala önemli bir aşama kaydedilememesinin nedeni hastalığın altında yatan karmaşık moleküler düzendir. Bu moleküler temelin önemli bir bölümünü de, glioma hücrelerinin etraf sağlam dokuya invazyonu ve akabinde anjiogenezisi oluşturur (47). Glioblastomlar vaskülaritesi en yüksek tümörler arasındadır (48). Bu yoğun vaskülarite peritümöral ödemden sorumludur (49). Anjiogenez 3 aşamada gerçekleşir; kan damarının bozulması, bazal membran ve onu çevreleyen ekstrasellüler matriksin bozulması ve endotel hücrelerinin göçü ile yeni kan damarlarının oluşması (47). Glioma hücreleri serebral kan damarları çevresinde toplanarak, astrositik bağlantıları kaldırır ve endotel-bazal membran arasındaki ilişkiyi bozar (49). Etkilenen endotel hücreleri Angiopoetin-2 salgılar ve damar duvarı stabilizasyonu bozulur (50). Angiopoetin-1 ve 2, tirozin kinaz aracılığıyla anjiogenez için bir kontrol noktası oluşturur (51).

Damar duvarında ve çevresindeki ekstrasellüler matriksteki bozulma, matriks metalloproteinazlarını ortaya çıkararak invazyonu kolaylaştırır (47). Bu enzim ailesindeki gelatinazlar astrositomlarda yüksek ekspresyon seviyelerine sahiptir (52).

Vasküler homeostaz pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik uyarılar arasındaki bir denge ile yönetilir. Pro-anjiyojenik uyarılar anti-anjiyojenik uyarılara baskın olduğunda gliomlarda damarlanma artar (53). Beyin tümörlerinde anjiyojenik mekanizmaların en güçlü aktivatörü doku hipoksisidir (47). Büyüyen tümörün neden olduğu hipoksik ortam, anjiogenezin uyarılmasına ve tümör hücrelerinin malign potansiyelinin artmasına katkı sağlar (54,55). Angiogenezisi engelleyerek tümör büyümesinin önüne geçilebileceği görüşü ilk defa 1971 yılında Folkman tarafından ortay atılmış olup sonrasında pek çok tedavi protokolünde bu tip ajanlar rutin tedaviye girmiştir (56). GBM anjiogenezin etkin rol oynadığı yüksek vasküler özellikler gösteren bir tümördür. Bu bakımdan tedavide anti-anjiogenetik moleküllerin kullanılması iyi bir seçenek gibi gözükmektedir (57). Nitekim 2009 yılında FDA (US Food

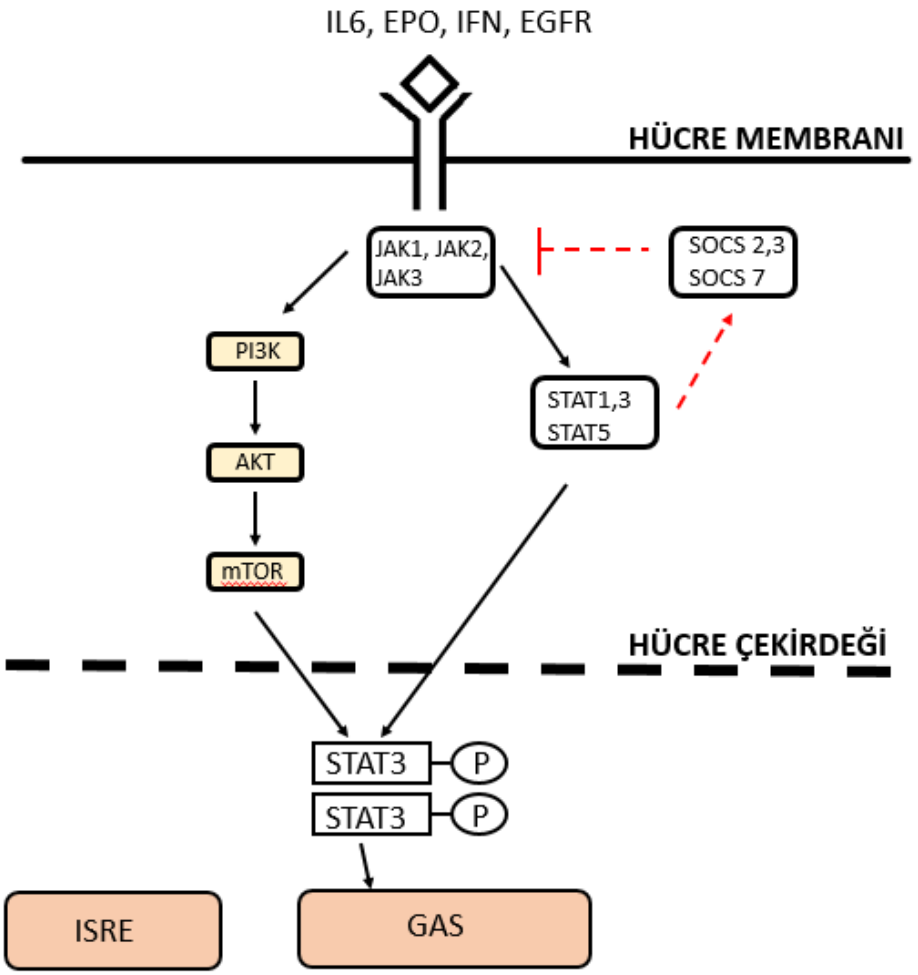
and Drug Administration), VEGF inhibisyonu yoluyla anti-anjiogenik etki gösteren bevacizumabın, nüks GBM'da kullanılmasına onay verilmiştir (58). Ancak bazı kısıtlamalardan dolayı GBM tedavisinde anti-anjiogenik moleküller rutin tedavide yer alamamaktadır. Bu kısıtlamaların başında, VEGF ya da PDGF inhibitörleri tedavisi uygulanan hastalarda tümör rekürrensinin olması ve hatta tekrar eden tümörün daha agresif ve invazif bir şekilde ortaya çıkmasının tespit edilmesi gelir (3). Nöronal sitotoksisite, tümör hücrelerinin invazifliğinin artması ve tedaviye direnç gelişmesi yine anti-anjiogenik tedavinin olumsuz yönleridir (59). Tedaviye yanıtta başarısızlığın patofizyolojisi ise tümör hücrelerinin VEGF inhibitörü ile inhibe edildiğinde, fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi diğer proanjiogenik moleküller üretmesi olduğu düşünülür (3).

Klasik olarak GBM' lerin, farklı kromozom anomalilerine sahip ve sağ kalım süreleri farklı olan 2 farklı antite olduğu düşünülmektedir. Bunlar Primer/De Novo GBM ve Sekonder GBM(düşük dereceli glial tümörlerden malign dejenerasyonla oluşan)' dir (3). Bu iki antitenin farklı genetik yolaklar ile geliştiği bilinmektedir (60). Sekonder GBM'ler daha öncesinde görülen anaplastik astrositomlardan gelişen bir grup olup IDH1/2, TP53 (p53) ve ATRX gen mutasyonlarını içerir (61). IDH1 mutasyonu az sayıdaki primer GBM olgularında görülse de sekonder GBM için moleküler bir belirleyicidir (62). Zaten bu mutasyona sahip primer GBM' li olguların da sekonder GBM' ler gibi öncül lezyonlardan geliştiği ancak bu gelişmenin hızlı bir şekilde olması ile klinik olarak gözden kaçtığı düşünülmektedir (63). IDH-1 mutasyonu aynı zamanda uzun sağ kalım süresi ile ilişkilendirilmiştir. Bir yıldan daha az sağ kalım süresi olan primer GBM'lerde ise TERT, PTEN mutasyonu ve EGFR'nin fazla ekspresyonu görülür (61,64). Platelet-derived growth factor (PDGF) ve epidermal growth factor (EGF) gibi büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin gliomaların gelişmesinde etkili oldukları tespit edilmiştir (3). Aynı zamanda fizyolojik şartlarda glial hücre gelişmesinde de etkili olan bu faktörlerin, PDGF'nin düşük dereceli gliomaların ve oligodendrogliomaların gelişmesinde, EGFR'nin ise yüksek dereceli gliomaların gelişmesinde etkili oldukları tespit edilmiştir (65,66). Karsinogenezinin gelişmesi alanında yapılan çalışmalar, EGFR artışı ile STAT3 gen artışının korele olduğunu göstermektedir (67). Fan ve ark. tarafından gliomalarda, EGFR artışı ile STAT3 transkripsiyon faktörünün arttığı in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir (68).

JAK/STAT SİNYALİZASYON

JAK/STAT (janus kinaz/signal transducer and activator of transcription) yolağı,

enflamasyon ve kanser gelişmesinde önemli rol oynayan bir hücre içi sinyalizasyon yolağıdır (69). Hücre yüzey ligand reseptörlerine, reseptörün hücre içi kısmına bağlı olan JAK ters fosforilizasyon ile aktive olur. JAK aktivasyonu ile sitoplazmada yer alan STAT'lar seçici olarak fosfarile edilir ve sitoplazmada STAT dimerleri oluşur. STAT dimerleri bir transkripsiyon faktörüdür ve nükleusta hedef genin promotör bölgesine bağlanarak gen regülasyonu düzenlenir (70). Yapılan çalışmalar ile JAK/STAT yolağı pek çok kanser ile ilişkilendirilmiştir. Kolon kanseri, kolorektal kanserler, pankreas kanseri, prostat kanseri, gastrik karsinomlar ve hepatasellüler karsinom ile yakından ilişkili olduğunu gösteren pek çok moleküler çalışma mevcuttur (69). Bunun yanısıra GBM olgularında da özellikle STAT3'ün terapötik bir hedef olabileceği bildirilmiştir (Şekil 4) (71).



Şekil 4. JAK/STAT sinyalizasyon şematik görüntüsü.

NİFUROKSAZİD KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Nifuroksazid oldukça yaygın kullanılan, bakteriyel kaynaklı kolit ve diyarede uzun yıllardır kullanılan bir barsak antiseptiğidir. Sahip oldukları nitro grubu (NO_2), bu grup ilaçlara çok etkili bir antimikrobiyal ve antiparaziter özellik kazandırır (72). Son yıllarda melanoma, göğüs ve kolorektal kanserlerde anti-tümör etkileri bildirilmiştir (73). Son olarak Ye ve ark., nifuroksazidinin STAT3 yolağı vasıtasıyla kolarektal kanserlerde metastazı engellediğini yayınlamışlardır (74). Yine pek çok kanser hücresinde STAT3 fosforilayonunu engellediği ve böylece anti-tümöral özelliğe sahip olduğu dikkat çekmektedir (75).

RUKSOLİTİNİB KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Ruxolitinib (INCB018424), Incyte Corporation (Wilmington, DE, USA) şirketi tarafından geliştirilen JAK 1 ve JAK 2 inhibitörüdür. "Küçük molekül inhibitörü olan ruxolitinib'in, FDA (United States Food and Drug Administration) tarafından myelofibrozis hastalarının tedavisinde rutin kullanımı onaylanmıştır (76). Kaposi sarkomu, alopesi areata, polisitemi vera, kortikostresoidlere dirençli graft versus host hastalığı gibi diğer alanlarda umut verici sonuçları yayınlanmıştır (77). Yapılan bir diğer çalışmada ruxolitinibin, JAK2 üzerinden JAK/STAT yolağını engelleyerek VEGF (vascular endothelial growth factor) ve HIF 1 α (hypoxia inducible factor-1 α) ekspresyonun azaltarak angiogenezi engellediği bildirilmiştir (78).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Hücre Kültürü laboratuvarında yürütüldü. Tablo 1 ve tablo 2' de çalışma da kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler liste halinde verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar, markası ile üretim yerleri

Cihazlar	**Markası, Ülkesi**
Biyogüvenlik Kabini	Heraeus, Almanya
Karbondioksitli İnkübatör	Heraeus, Almanya
Santrifüj	Centurion Scientific, İngiltere
İnvert mikroskop	Nikon, Japonya
Otomatik Pipet Seti	Gilson, Fransa
Dijital Pipetör	Thermo Fisher Scientific, ABD
Mikroplate Okuyucu	Thermo Fisher Scientific, ABD
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Almanya
Santrifüj	Hettich, Almanya
Nanodrop	Optizen, Güney Kore
PCR Cihazı	Applied Biosystems, ABD
Gerçek zamanlı PCR cihazı	Applied Biosystems, ABD
Gelişmiş Vorteks Karıştırıcı	WiseMix, Güney Kore
Karıştırıcı Blok	Bioer, Çin
Elektronik tartı	A&D Company, Japonya
4^0 C Buzdolabı	Vestel, Türkiye
-20°C Derin Dondurucu	Vestel, Türkiye
-80°C Derin Dondurucu	Wisd, Güney Kore
Ultra Saf Su Cihazı	Tka, ABD
Distile Su Cihazı	Tka, ABD
pH metre	Mettler Toledo, ABD
Tali® Sitometre	İnvitrogen, ABD
Tissue Lyser LT	Qiagen, ABD
Blotlama cihazı	İnvitrogen, ABD
Güç kaynağı	Cleaver, İngiltere
Görüntüleme sistemi	Dnr Bioimaging Systems, İsrail

Tablo 2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve markaları ile üretim yerleri

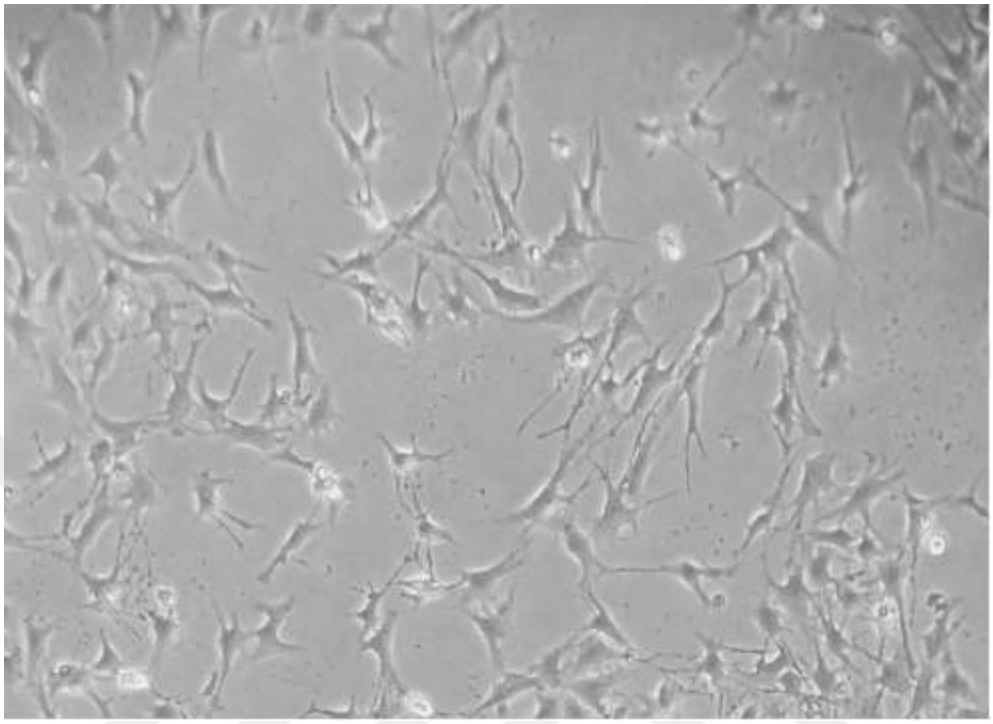
Kullanılan sarf malzeme	Markası, Ülkesi
DMEM, Dulbecco's Modification of Eagle's Medium	Gibco, ABD
%0.25 Tripsin EDTA	Gibco, ABD
Penisilin/Streptomisin	Gibco, ABD
Fetal Sığır Serumu	Gibco, ABD
Dimetil Sülfoksit Dimetil	Merck, ABD
Etanol	Merck, ABD
Dnaz/Rnaz İçermeyen Su	Life Technologies, ABD
25 cm² Hücre Kültür Kabı	Nest, ABD
75 cm² Hücre Kültür Kabı	Nest, ABD
96 Kuyucuklu Hücre Kültür Kabı	Nest, ABD
6 kuyucuklu Hücre Kültür Kabı	Ultra Cruz, ABD
96 Kuyucuklu PCR Reaksiyon Plakası	Life Technologies, ABD
Kriyojenik Vial	Nest, ABD
5 ml'lik Serolojik Pipet	Nest, ABD
10 ml'lik Serolojik Pipet	Nest, ABD
Ruxolitinib	Cayman Chemical Company, ABD
Nufrosinidin	Cayman Chemical Company, ABD
MTT,3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid	Biomatik, Kanada
PBS Tablet	Life Technologies, ABD
0,2 ml PCR Strip Tüpleri	Axygen, ABD
cDNA Revers Transkripsiyon Kiti	Life Technologies, ABD
RNA izolasyon Kiti	Life Technologies, ABD
Cyber Green Master Mix	Life Technologies, ABD
15 ml flakon tüpler	Nest, ABD
50 mlk flakon tüpler	Nest, ABD
1,5 ve 2 ml'lik tüpler	Eppendorf, Almanya
Western Blot Kiti	Life Technologies, ABD
Steril eldiven	Broche, Türkiye
Cam malzemeler, deney tüpleri, balon jojeler, beherler vs.	Lamtek, Türkiye

HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI

Çalışmada kullanılan hücre hattı

Çalışmamızda kullanılan ticari hücre, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen insan glioblastoma U87 (ATCC® HTB-14™) hücre hattıdır (Şekil 5). Bu hücre

hattı ATCC tarafından, malign glioma tanısı olan bireyin epitel dokusundan elde edilmiş olup, immün sistemi baskılanmış farelerde malign glioma oluşturma potansiyeli vardır.



Şekil 5. İnsan glioblastoma U87 hücre hattının invert ışık mikroskopu altındaki görüntüsü (40X büyütme)

Besi Yeri Ortamının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan U87 hücre hattı için Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) besiyeri minimal modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. DMEM besiyerinin içeriği Tablo 3'te özetlenmiştir. Bu besiyeri 56°C'de 30 dk bekletildi. %5 Fetal Sığır Serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı hazırlanarak karışıtırıldı. Kontaminasyon riskini en aza indirmek için 50 ml hacminde falkon tüplere bölünen DMEM besiyeri ve 4°C sıcaklıkta dolapta saklandı.

Tablo 3. Modifiye edilmiş Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) içeriği.

İçeriği	Moleküler Ağırlığı	Konsantrasyon (mg/L)	mM	
Aminoasitler:				
Glisin	75.0	30.0	0.4	
L-Arginin hidroklorid	211.0	84.0	0.398104	
L-Sistin 2HCl	313.0	63.0	0.201277	
L-Glutamin	146.0	580.0	3.972602	
L-Histidin hidroklorid-H2O	210.0	42.0	0.2	
L-Izolösin	131.0	105.0	0.801526	
L-Lösin	131.0	105.0	0.801526	
L-Lisin hidroklorid	183.0	146.0	0.797814	
L-Metionin	149.0	30.0	0.201342	
L-Fenilalanin	165.0	66.0	0.4	
L-Serin	105.0	42.0	0.4	
L-Treonin	119.0	95.0	0.798319	
L-Triptofan	204.0	16.0	0.07843	
L-Tirosin	181.0	72.0	0.39779	
L-Valin	117.0	94.0	0.80341	
Vitaminler:				
Kolin klorid	140.0	4.0	0.028571	
D-Kalsiyum pantotenat Folik	477.0	4.0	0.008385	
Asit	441.0	4.0	0.009070	
Niasinamid	122.0	4.0	0.032786	
Piridoksin hidroklorid Riboflavin	206.0	4.0	0.019417	
Tiamin hidroklorid	376.0	0.4	0.001063	
i-Inositol	337.0	4.0	0.011869	
	180.0	7.2	0.04	
İnorganik Tuzlar:				
Kalsiyum Klorid (CaCl2- 2H2O)	147.0	264.0	1.795918	2.47524
Ferrik Nitrat (Fe(NO3)3-9H2O)	404.0	0.1	0.81300	5.33333
Magnezyum Sülfat (MgSO4-	246.0	200.0	44.0476	110.344
7H2O)	75.0	400.0	0.91558	
Potasyum Klorid (KCl)	84.0	3700.0		
Sodyum Bikarbonat (NaHCO3)	58.0	6400.0		
Sodyum Klorid (NaCl)	154.0	141.0		
Sodyum Fosfat monobazik (NaH2PO4-2H2O)				
Diğer Bileşikler:				
D-Glukoz (Dekstroz)	180.0	1000.0	5.55555 0.03985	
Fenol Kırmızısı	376.4	15.0	1.0	
Sodyum Pirüvat	110.0	110.0		

HÜCRELERİN KÜLTÜRE ALINMASI, PASAJLANMASI VE DONDURULMASI

Hücrelerin Canlandırılması

Dondurulmuş olarak (-80°C) saklanan hücreler çözündürülmek amacıyla 37°C bekletildi. Hücreler, santrifüjde 1000 rpm'de 2 dakika kadar santrifüje edildi. Viallerdeki hücrelerden supernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Daha sonra viallerin içerisine 1 ml besiyeri eklendi. Vialler içerisindeki besiyeri ve hücrelerin iyice karışması sağlandı. Bu karışım, daha öncesinde hazırlanan içerisinde 3 ml besiyeri bulunan 25 cm²'lik flaksların içerisine konuldu. Bu flakslar steril inkübatörde (37°C ve %5 CO_2) kültüre alındı. Bu işlemler ile canlandırılan hücreler pasajlanma işlemine alındı.

Hücre hatlarının pasajlanması

Flaskların tabanında bulunan besiyeri dökülerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin tabandan kalkması amacıyla üzerine tripsin-EDTA eklendi ve etüvde 37°C'de 10 dakika boyunca bekletildi. Etüvden çıkarılan flakslardaki hücreler, santrifüj edilmek amacıyla 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 1.500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti besiyerinde karıştırılıp flasklara ekildi ve invert ışık mikroskobunda yoğunluğu kontrol edildi (Şekil 6).

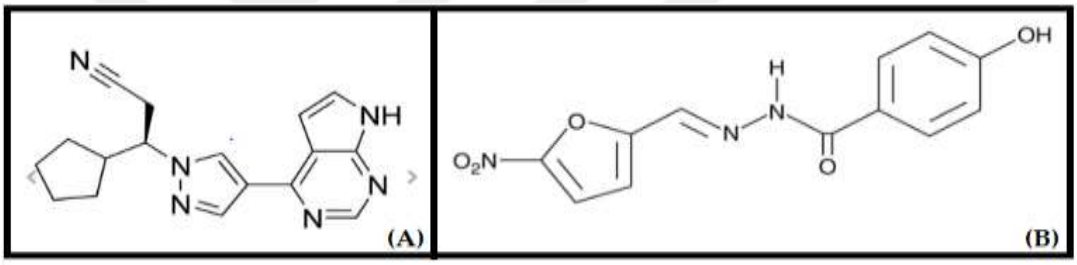


Şekil 6. İnvert mikroskop

Hücrelerin dondurulması işleminde tripsinize edilerek kalkan hücreler, santrifüj ile çöktürüldü. Üzerine %5 DMSO içeren besiyeri eklenerek iyice karışması sağlandı. Daha

sonra bu karışım 2 ml'lik kriyojenik viallere bölündü. Viallerdeki karışımlar kısa süreli saklama için -80°C derin dondurucuda uzun süreli sakalma için ise -196^{0}C'de sıvı azota alındı. Çalışmanın tüm aşamasında hücre hattının 5. pasajından başlandı ve en çok 25. pasajda çalışma sonlandırıldı.

Ruksolitinibin ve nifuroksazidinin stok ve uygulama solüsyonlarının hazırlanması Çalışmada anti-tümör ajan olarak nifuroxazide (18163, Cayman Chemical Company) ve ruxolitinib (11609, Cayman Chemical Company) kullanılmıştır. Nifuroxazide 13,76 mg tartılarak 500 µl (DMSO)'de 100 mM; Ruxolitinib 3 mg tartılarak 500 µl (1:1 DMSO:Ultra saf su, pH:3)'de 20 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok solüsyonlar çalışmalarda kullanılana kadar -20˚C'de saklanmıştır. Uygulamalardaki DMSO konsantrasyonu % 0,2'yi aşmayacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 7. Ruksolitinibin ve nifuroksazidinin kimyasal yapısı

MTT testi ile Ruksolitinibin ve Nifuroksazide'in IC50 dozu ve uygulama süresinin belirlenmesi

Bu kapsamda U-87 hücre hattı, 96-kuyucuklu kültür kaplarında (plate) 3000/kuyucuk olacak şekilde otomatik multipipetler ile ekildi. Bir gece (yaklaşık 16 saat süre) sonunda ruksolitinibin uygulamaları yapılarak 24, 48 saat süresince inkübasyona bırakılacaktır. Hücre canlılık testi için (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT) viyabilite analizlerinde gruplar 8 kuyucuktan ve su uygulaması içeren kontrol grupları oluşturuldu. Ruksolitinibin dozları 1.0-1000 µM konsantrasyonlarında kullanılacak, etkinlik durumuna göre daha yüksek ya da daha düşük konsantrasyonları da analiz edilebilecektir. Nifuroksazide dozları 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 µg/ml dozlarında kullanılarak, etkinlik durumuna göre daha yüksek ya da daha düşük konsantrasyonları da analiz etme imkanı sağlandı (79).

İnkübasyon sonrası hücre sağkalım analizleri için MTT testi yapıldı. Bunun için 5 mg/ml dozunda hazırlanan "Yellow tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide)" test solüsyonu 20 µl/kuyucuk olacak şekilde tüm kuyucuklara pipetlendi. Daha sonra plateler 2-4 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında kuyucukların içindeki besi yerleri tamamen uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200µl ultra püre dimetil sülfoksid (DMSO) eklenecek ve karanlık koşulda oda şartlarında 2 saat beklendi. Bu süre sonunda plateler multiskan GO mikroplaka okuyucu ile 492 ve 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Elde edilen değer taşıt maddesi uygulanan grupta % 100 canlılık olarak baz alınarak karşılaştırmalı ölüm oranı şeklinde belirledi. U-87 hücre serisinde ruksolitinib ve nifuroksazide için IC 50 değerleri SPSS 20 istatistik paket program ile probit analizi kullanılarak hesaplandı. Projenin bundan sonraki bölümlerinde ruksolitinib ve nifuroksozadinin uygulama dozları MTT çalışması ile U-87 hücre hatları üzerinde belirlenen ½ IC50, IC50 ve 2 x IC50 dozları olarak alındı. Bu dozlar U-87 3D tümör modelinde bu çalışma ile belirlenen süreler ile uygulandı ve bu süre sonunda moleküler testler yapıldı.

RNA İzolasyonu

Hücre hatlarından total RNA izolasyonunda Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences,USA) kullanıldı ve RNA'lar kit protokolüne göre izole edildi. Kit protokülo gereğince aşağıda sıralanan basmaklar izlenerek RNA izolasyonu yapıldı.

1) Lizis solüsyonu, her 1 ml lizis tamponu içinde 20 µl (%2) 2-merkaptoetanol olacak şekilde hazırlandı.

2) 96 kuyucuklu plakalardaki hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı, kuyucukların herbirine 125 µl lizis solüsyonu eklendi ve 20 dakika inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin lizis olması beklendi.

3) Lizis olan hücreler 8 kuyucuk/tekrar olacak şekilde toplandı ve üzerine 1:1 oranında %70’ lik etanol eklendi, hemen vortekslendi.

4) Bu karışım spin kolonlara aktarıldı ve 12.000 g’de 15 saniye 25°C’de santrifüj edildi ve altta biriken sıvı uzaklaştırıldı.

5) Kolon üzerine 700 µl birinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g’de 15 saniye 25°C’de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası spin kolonların alt tüpleri içindeki sıvıyla birlikte uzaklaştırıldı.

6) Saniye 25°C’de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası altta kalan sıvı uzaklaştırıldı (2 kez tekrarlandı).

7) Kolon üzerindeki membranın kuruması için 2 dakika 12.000 g’de 25°C’de santrifüj edildi ve alttaki tüp atıldı, kuruyan kolon 1,5 ml hacminde steril toplama tüplerinin içine

alındı. 8) Kolonun tam merkezine 30 µl RNaz içermeyen su pipetlenerek oda ısısında bir dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 12.000 g'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanan RNA miktarları Nanodrop cihazında (Optizen, Nano Q) ölçüldü ve saklanmak üzere dondurucuda alındı (-80°C).

cDNA Eldesi

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

1) -80°C'de saklanan RNA'ların +4°C' de erimesi sağlandı.

2) cDNA ana karışımı, Tablo 4'te listenen maddeler ile hazırlandı.

3) 200 µl'lik PCR striplerine, 10 µl RNA, 10 µl cDNA ana karışımından pipetlendi.

4) Reaksiyon karışımı PCR cihazında (Applied Biosystems) 25°C'de 10 dk; 37°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk tutularak cDNA sentezlendi.

5) Elde edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20°C dondurucuda saklandı.

Tablo 4. cDNA karışımında kullanılan malzemelerin listesi

Malzeme	**Miktar**
10X Ters transkripsiyon tamponu	2 µl
25X dNTP karışımı (100 mM)	0,8 µl
10X Ters transkripsiyon rastgele primerleri	2 µl
Multi Scribe™ Ters transkriptaz Nükleaz	1 µl
Nükleaz içermeyen H2O	4,2 µl
TOPLAM	**10 µl**

Kantitatif Real Time-PCR (RT-qPCR) Analizleri

Proje kapsamında array dizaynı JAK/ STAT yolağı: JAK1, JAK2, JAK3, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT6, VEGF, IL6, IL6-R, IFNF1, SOCS2, SOCS3, SOCS7, PIK3, MAPK, AKT, MTOR, EGFR, IFNAR, IFNGR, VEGFR, MMP9, HİF1-α genleri tablo 4'te dizileri verilen primerler ile analiz edildi. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak ise GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) geninin anlatımı kullanıldı. Bir önceki bölümde elde edilen cDNA'lar qPCR'da SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak Quant Studio 5 (Thermo Scientific, USA) real time PCR da 384 well pleytlerde spesifik primerlerı ile çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi esnasında elde edilen piklere ait Ct değerleri

gen ekspresyonların belirlenmesin de kullanıldı ve ΔΔCt metodu ile hesaplandı. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak GAPDH, 18 S, β-aktin kontrol primerleri kullanıldı.

Tablo 5. qRT PCR için kullanılan primer dizileri

Gen Adı	Gen isimleri	Primer dizilimi
HIF1α	Hypoxia-inducible factors -1α	AGCCAGATCTCGGCGAAGT(İleri) CAGAGGCCTTATCAAGATGCG(Geri)
MMP9	Matrix metallopeptidase 9	TACCCTATGTACCGCTTCAC GAACAAATACAGCTGGTTCC
VEGF	Vascular endothelial growth factor	AGGAGGGCAGAATCATCACG CAAGGCCCACAGGGATTTTCT
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor	CGGAAGAACAATGTAGTCTTTGC GAACATTTGGGAAATCTCTTGC
IL6	Interleukin 6	ATGAACTCCTTCTCCACAAG AGAGCCCTCAGGCT GGACTG
IL6R	Interleukin 6 receptor	CAGCTGAGAACGAGGTGTCC GCAGCTTCCACGTCTTCTTGA
IFNG	Interferon gamma	GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC
IFNGR1	Interferon gamma receptor-1	GCCACAGGTCCCTGTTTTTA TCCAACCCTGGCTTTAACTC
IFNAR	Interferon Alpha And Beta Receptor	AGTGTTATGTGGGCTTTGGATGGTTTAAGC TCTGGCTTTCACACAATATACAGTCAGTGG
EGFR	Epidermal growth factor receptor	GCCAAGGCACGAGTAACAAGC AGG GCA ATG AGG ACA TAA CC
JAK1	JAnus Kinase	ACAATTGGCATTCATTTTCCTG CCTGGGCCCAAACTTCCTA
JAK2	JAnus Kinase	CAGTGGTCAAGAGGGAAACA TGTCTGAGCGAACAGTTTCC
JAK3	JAnus Kinase	AACCCACGCATCTTCTCTCC GGGGCTCTCACTGTCTCCAG
SOCS2	Suppressor Of Cytokine Signalling-3	GCTCCAAAAGCGAGTACCAGC AGTAGAATCCGCTCTCCTGCA G
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signalling	GCTCCAAAAGCGAGTACCAGC AGTAGAATCCGCTCTCCTGCA G
SOCS7	Suppressor Of Cytokine Signalling	CAGGCCCTGAATTACCTC ACTGAACCTGACCGTACAGAGGTTGCTGCTGCTGCT
STAT1	Signal Transducer And Activator Of Transcription	CTAGTGGAGTGGAAGCGGAG CACCACAAACGAGCTCTGAA
STAT2	Signal Transducer And Activator Of Transcription	ACCCTAATCAGAGCCCAAATG TCAATCCAGACAGCCAAGTAC
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription	GGAGG AGTTGCAGCAAAAAG TGTGTTTGTGCCCAGAATGT
STAT4	Signal Transducer And Activator Of Transcription	GGAAATTCGGCATCTGTTGGCC TTCTCTTTGGAAACACGACCTAACTGT
STAT6	Signal Transducer And Activator Of Transcription	CCTCGTCACCAGTTGCTT TCCAGTGCTTTCTGCTCC
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	CCTGATCTTCCTCGTGCTGCTC ATGCCAATGGACAGTGTTCCTCTT
AKT	Serine/Threonine Protein Kinase	TTGTCATGGAGTACGCCAACG ACAGCCCGAAGTCTGTGATCTT
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	CTACACGCAGTTGCAGTACAT CAGCAGGATCTGGATCTCCC
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase	GGC CGA CTC AGT AGC AT CGG GCA CTC TGC TCT TT

Western blot analizleri

Ruxolitinib ve nifuroksazide'in uygulamaları sonrasında flasklardan medyum uzaklaştırıldı ve hücrelerden protein izolasyonu RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology) kit protokolüne göre yapıldı. Protein miktarları Qubit® Fluorometer (Invitrogen) ile eşitlendi, denature işleminden sonra, NuPAGE™ (Life Technologies) jellere yüklendi. Çalışmada Thermo Scientific firmasınca sağlanan hazır kitler kullanıldı, blotlama ve membrana aktarma işlem i iBlot (Life Technologies) sistemi ile hazır membranlar ve kit kullanılarak yapıldı. Blotlama sonrası proteinler kendilerine spesifik primer antikorları ile muameleye tabi tutuldu ve sonrasında antikorlar uygun sekonderler ile işaretlendikten sonra BioRad ChemiDoc kemolüminesans görüntüleme ile görüntülendi ve protein miktarları cihazda mevcut yazılım ile saptandı.

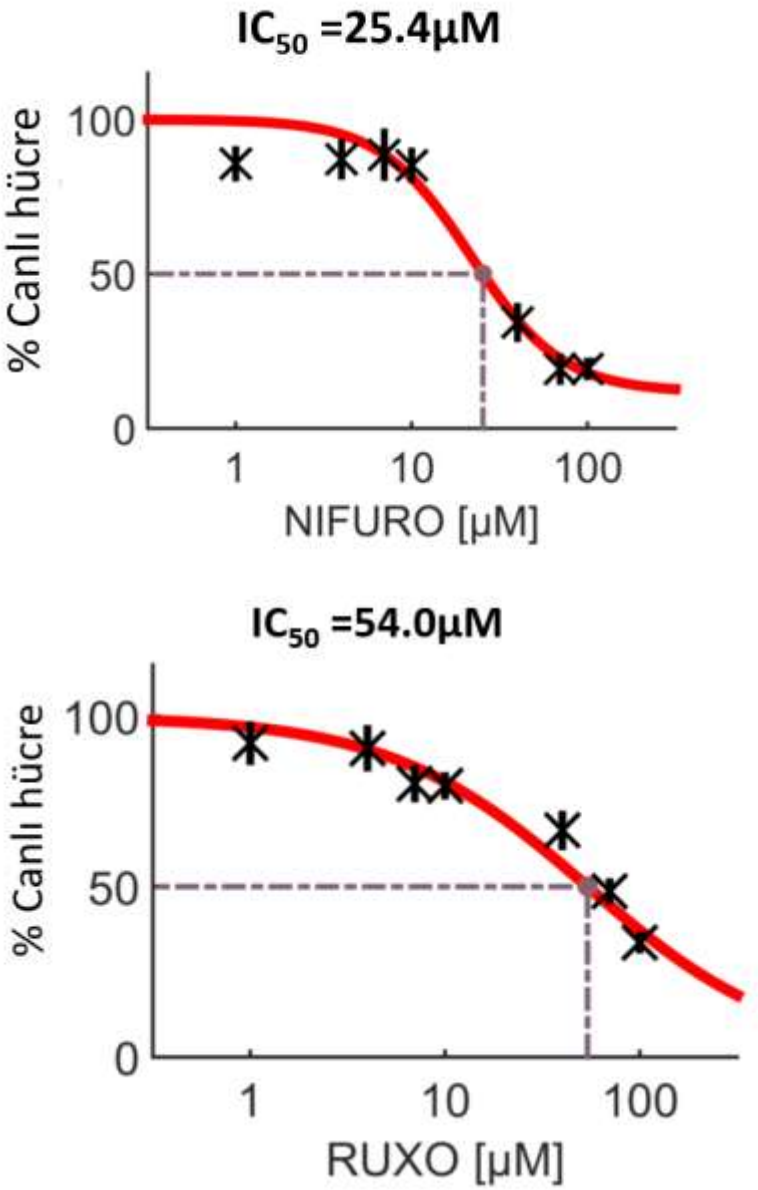
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistik analizleri XL-STAT demo (Addinsoft, ABD) ve SPSS 20, Üniversite Lisanslı (IBM, ABD) programları ile yapıldı. Elde edilen ”p” değerleri 0.05’den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Projede Western blot ile belirlenen protein ekspresyon değerleri ve qRT- PCR array çalışmalarında ΔΔCt metodu ile elde edilen ekspresyon değerlerinin ortalamaları, ayrıca üç boyutlu tümör ve invasion uzunlukları için yapılan ölçüm sonuçları ortalamaları arasındaki fark tek yönlü ANOVA ile belirlendi ve ortalamaların girdiği gruplar çalışma verilerin durumuna göre Tukey ya da Duncan testi ile saptandı.

BULGULAR

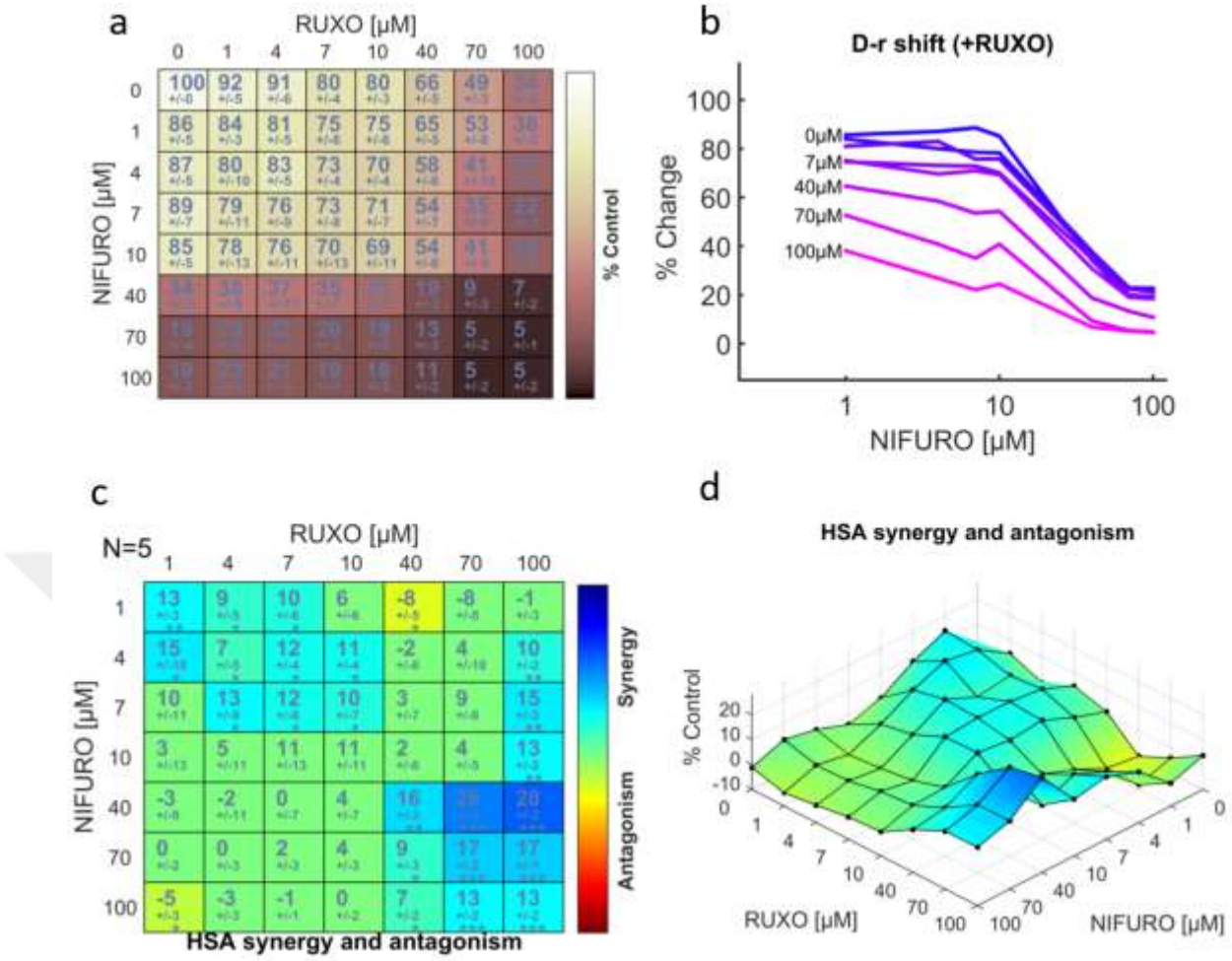
U87 hücre hattında MTT TESTİ ile ruksolitinibin ve nifuroksazidinin sitotoksik etkisinin belirlenmesi

Ruksolitinibin ve nifuroksazidinin U87 hücre hattı üzerindeki IC_{50} değerleri MTT testi ile değerlendirildi. Sitotoksik dozun saptanması amacıyla söz konusu ajanların, 100 µM konsantrasyondan başlayarak seri sulandırma ile 8 farklı dozu U87 hücre hatları üzerine denendi. Yapılan çalışma da 48 saat uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek dozda ölü hücre oranını saptandı. Bu oranlar kullanılarak probit analiz yapıldı ve IC50 değerleri nifuroksazidin ve ruksolitinibin için sırasıyla 25.4 ve 54.0 µM olarak belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. U87 GBM beyin tümörlerinde, 48 saat süre ile 100 µM konsantrasyondan başlayarak seri sulandırım kullanılarak 8 farklı doz uygulanan, nifuroksazid ve ruksolitinib ajanlarının hücre canlılığına etkisi için yapılan MTT testi sonucu ve probit analizi ile belirlenen IC_{50} değerleri.

MTT testi ile elde edilen hücre canlılığının verileri üzerinden, nifuroksazid dozlarına eklenen ruksolitinib'in doz azaltma etkisi Şekil 9'da gösterilmiştir. Böylece çalışma da kullanılan her iki ajanın sinerjizik etkisi belirlenmiştir. 40 µM konsantrasyonda nifuroksazidine eklenen 10 ve 40 µM konsantrasyonda ruksolitibin kontrol grubuna göre 4 kat sinerjik etki göstermiştir (Şekil 9).



Şekil 9. U87 GBM beyin tümörlerinde, 48 saat süre ile 100 µM konsantrasyondan başlayarak doz uygulama karesi ile 64 farklı dozda nifuroksazid ve ruksolitinib uygulamasının a) MTT testi ile belirlenen % hücre canlılığı b) Ruxolitinib'in Nifuroksazid üzerindeki doz azaltma indeksi (doz reduction index) c) Nifuroxazid X Ruxolitinib için antagonistik ve sinerjistik etki HSA skorları d) Antagonistik sinerjistik skor 3 boyutlu dağılımı.

MTT testi ile elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde ise U87 hücre hattı üzerine aşağıda yer aldığı gibi nifuroksozid (N) ve ruksolitinib (RX) uygulaması yapıldı: Grup 1: N 12.5 µM Grup 2: N 12.5 µM + RX 25 µM

Grup 3: N 12.5 µM + RX 50 µM

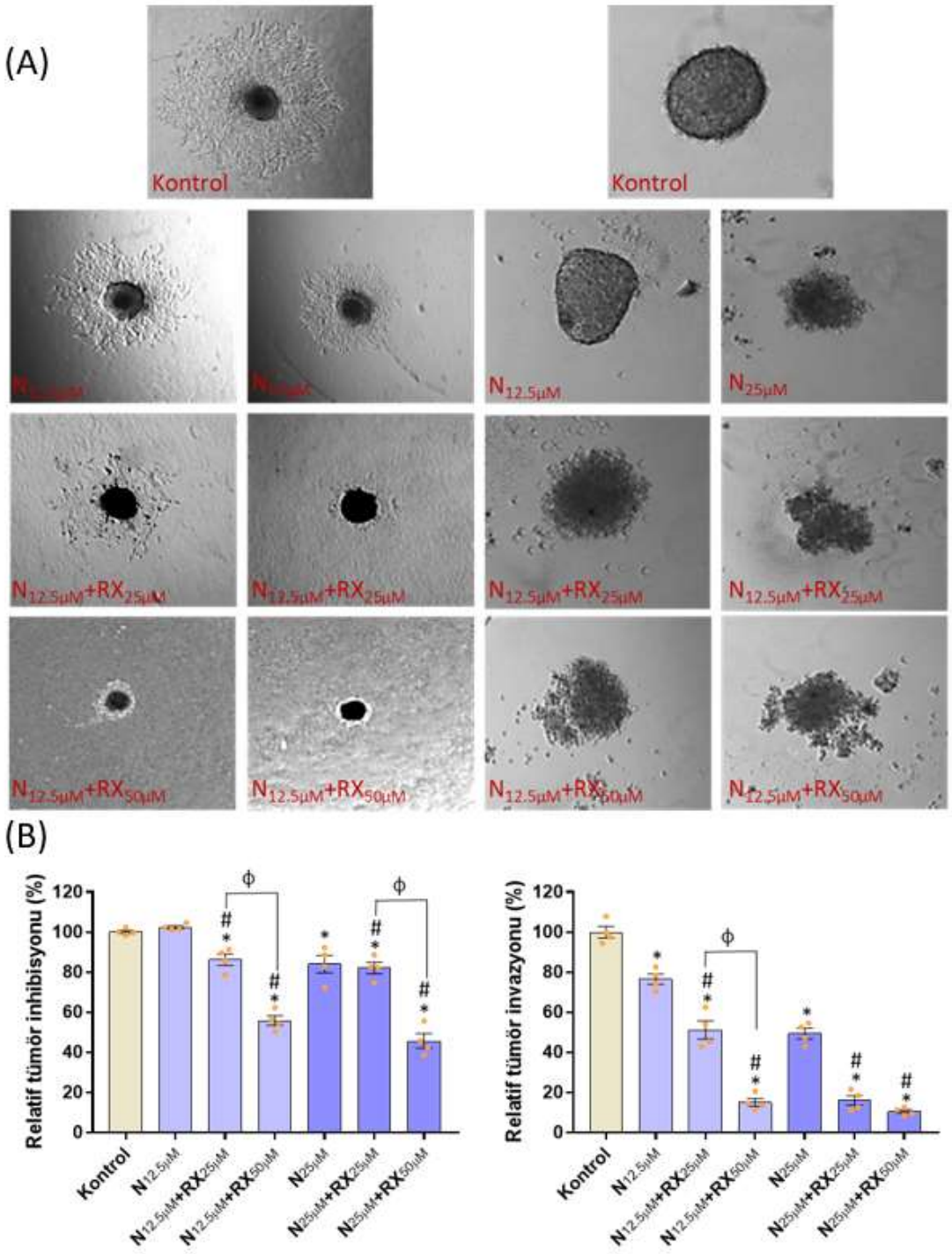
Grup 4: N 25 µM

Grup 5: N 25 µM + RX 25 µM

Grup 6: N 25 µM + RX 50 µM

Nifuroksozid ve Ruksolitinib'in Tümör İnhibisyonu ve Tümör İnvazyonu Üzerine Etkisi

Nifuroksozid ve ruksolitinib'in, MTT testi ile elde edilen veriler vasıtasıyla, tek başına ve kombine edilerek uygulanan dozlarda tümör büyümesi ve invazyonuna karşı etkileri oluşturulan 3D sferoid hücre kültüründe 48 saatlik uygulaması sonrasında kaydedildi. Bu ajanların tek başlarına ve beraber olarak uygulandıklarında hem tümör büyümesini hem de invazyonunu istatiksel olarak anlamlı şekilde azalttıkları görüldü. Tek başına uygulanan nifuroksozid dozunun (12.5 μM + 25 μM) her iki formuna eklenen ruksolitinibin tümör büyümesi ve invazyonuna üzerine istatiksel olarak kuvvetli bir şekilde düşürdüğü görüldü. Bu etki özellikle tümör invazyonu üzerinde, 12,5 μM dozunda uygulanan nifuroksazidine kombine edilen yüksek doz ruksolitinibin (50 μM) uygulamasında belirgindi (Şekil 10).



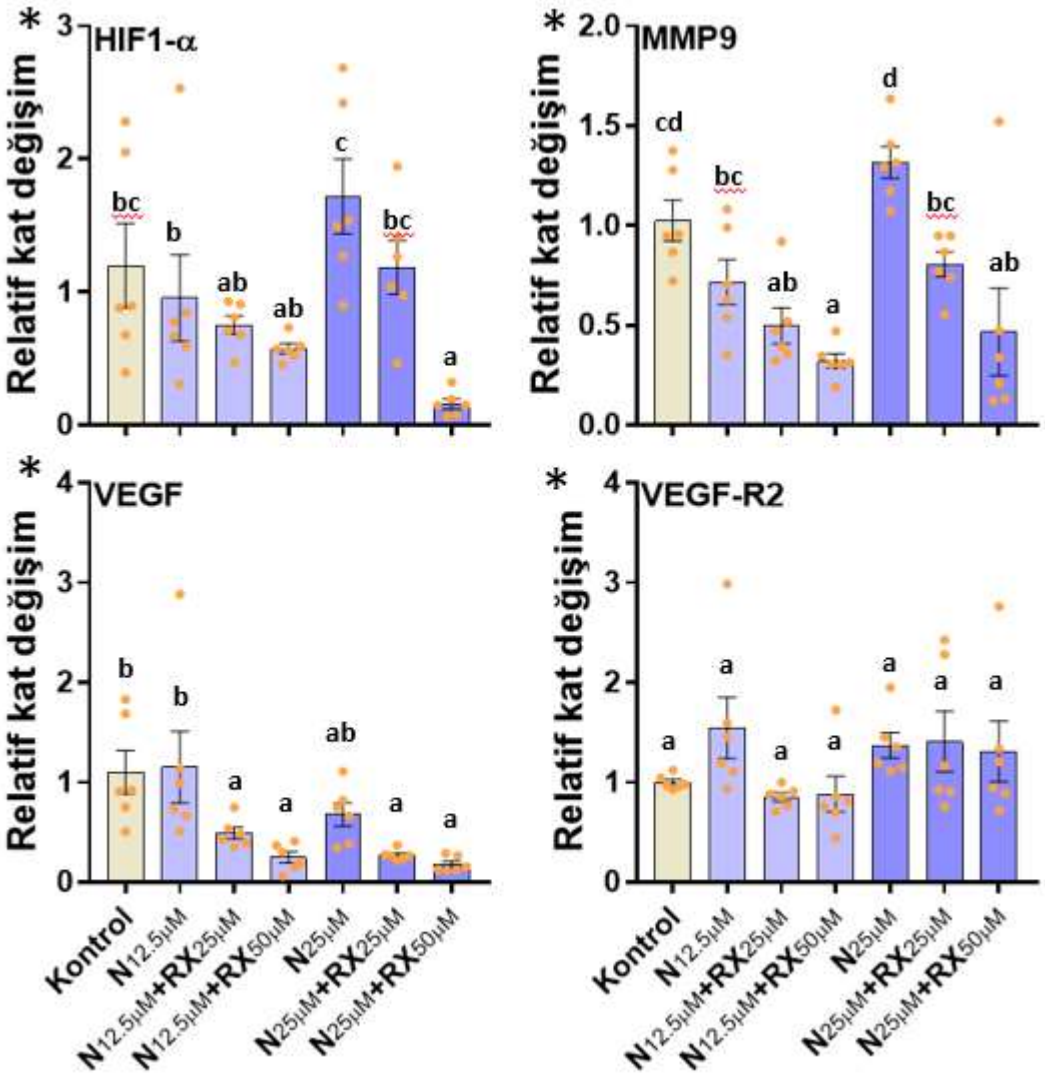
Şekil 10. (A) MTT testi ile belirlenen nifuroxazid ve rufkolitinib dozlarının, tek başlarına ve kombine edilerek U87 sferoid 3D hücre kültüründe tümör büyümesi ve invazyonu üzerine etkisinin kontrol grubu ile karşılaştırılması. (B) Sırasıyla relatif tümör büyümesi ve invazyonu değerlerinin % olarak ifade edilmesi. Değerler ±SE olarak verildi. # istatiksel olarak anlamlı fark, p≤ 0,05.

GEN EKSPRESYON ANALİZ SONUÇLARI

Yapılan çalışmada U87 insan glioblastoma hücre serisine nifuroksazid ve ruksolitinibinin tek başına ve kombinasyonlarının uygulaması yapılan gruplarda 48 saat sonra JAK1, JAK2, JAK3, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT6, VEGF, IL6, IL6-R, IFNF1, SOCS2, SOCS3, SOCS7, PIK3, MAPK, AKT, MTOR, EGFR, IFNAR, IFNGR, VEGFR, MMP9, HİF1-α gen ifadelerinde meydana gelen değişimler kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) metodu ile belirlendi. Madde uygulaması yapılan grupların gen ifadelerinde kontrol grubuna kıyasla belirlenen değişiklikler 3 tekrar olmak üzere çalışmaya alındı ve istatiksel değerlendirmeleri yapıldı. Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatiksel olarak farklı olarak ifade edildi (ANOVA-Duncan test, $p \leq 0.05$) Endojen kontrol geni olarak GAPDH geni kullanıldı.

HIF1α, MMP9, VEGF ve VEGF-R genlerinin ifadesi

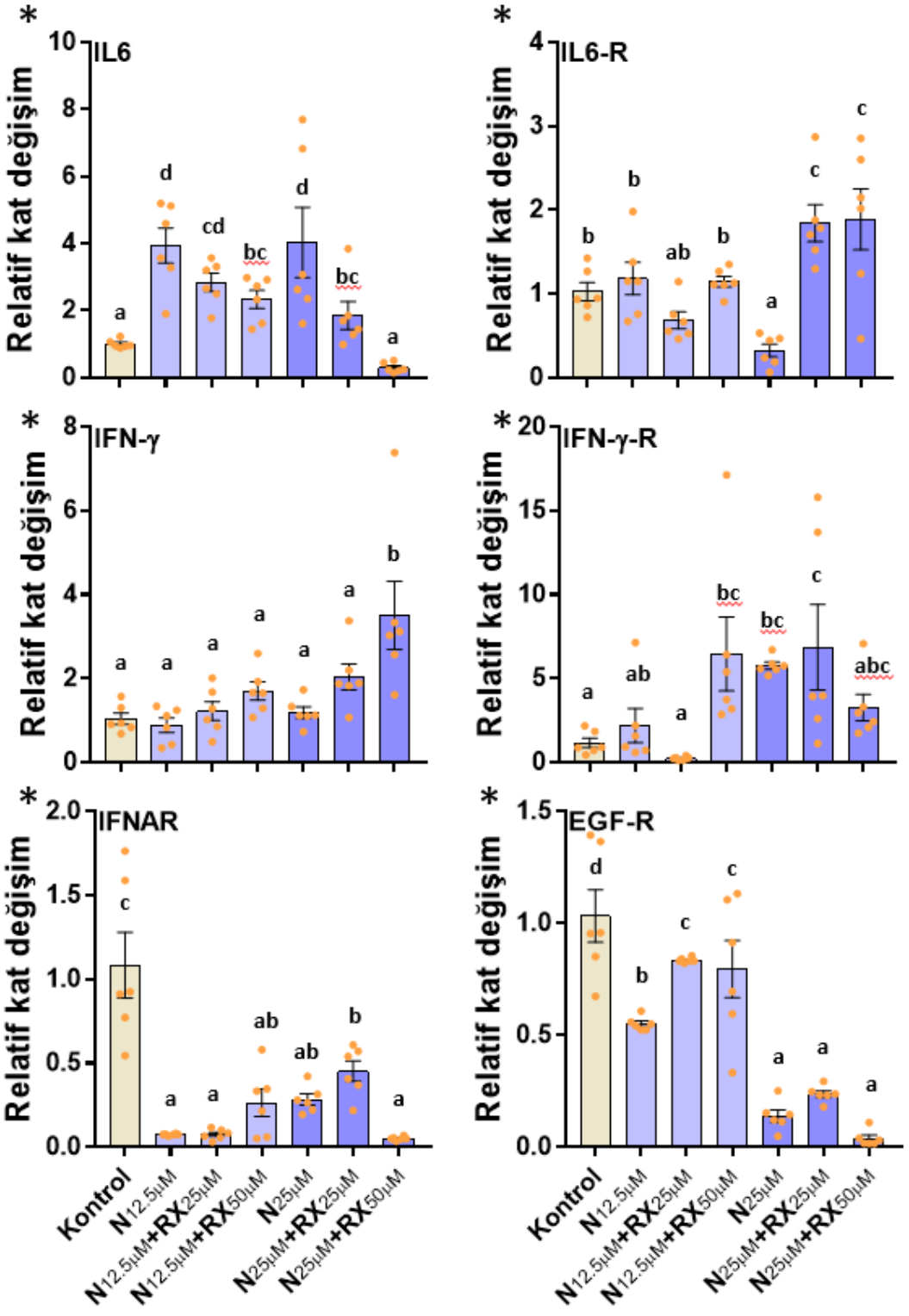
U87 hücre hattında uyguladığımız iki ajanın neden olduğu HIF1α, MMP9, VEGF ve VEGF-R genlerinin ifadesinin değişimi Şekil 11'de verilmiştir. HIF1α ve VEGF genlerinin ifadelerindeki değişimler incelendiğinde; nifuroksazidin bu genler üzerinde tek başında gen ifadesinde bir düşeşe neden olmakla beraber, tedaviye ruksolitinib eklenmesi ile beraber bu düşüşün kuvvetli bir şekilde ortaya çıktığı görülmüştür. İki ajan göz önünde bulundurulduğun da invazyonu engelleyen ajanın öncelikle ruksolitinib olduğu söylenebilir.



Şekil 11. U87 hücre hattında nifuroksazid ve ruksolitinib doz uygulaması sonrasında HIF1α, MMP9, VEGF ve VEGF-R genlerinin ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=6, ortalama±standart hata. *Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05).

JAK/STAT sinyalizasyon yolağına hücre membranında bağlanan IL6, IL6-R, IFN-ϒ, IFN-ϒR, IFNAR ve EGF-R genlerinin ifadesi

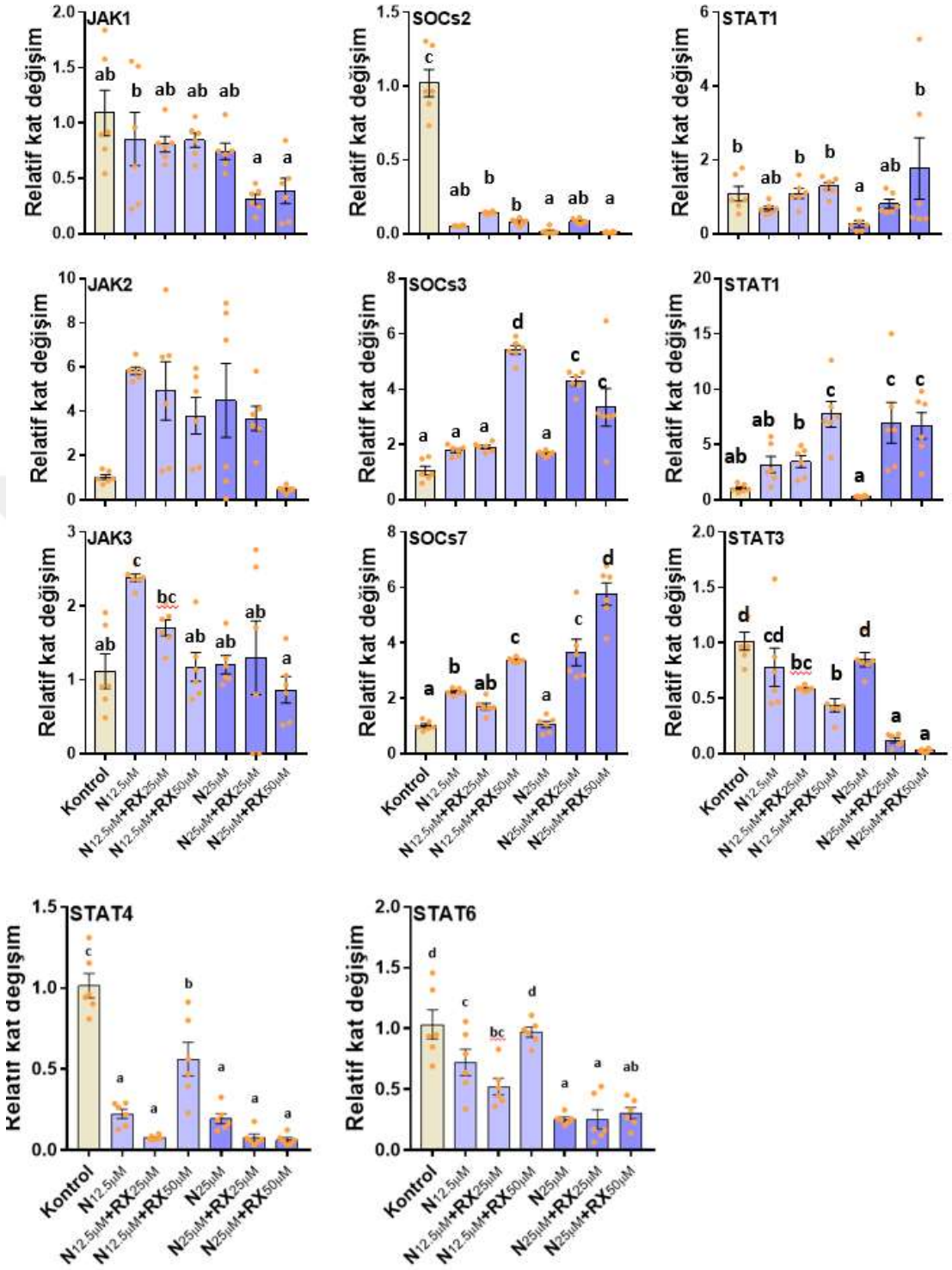
U87 hücre hattında uyguladığımız iki ajanın neden olduğu IL6, IL6-R, IFN-ϒ, IFN-ϒR, IFNAR ve EGF-R genleri gibi JAK/STAT yolağının hücre membranına bağlanarak sinyalizasyonu başlatan genlerin ekspresyonlarındaki değişim Şekil 12'de verilmiştir. Yolağın hücre sitozolinde engelleyen nifurosokzadinin tek başına etkisine nazaran ruksolitinib eklenmesi ile özellikle IL6'nın ifadesinde önemli bir düşüşe neden olduğu görülmektedir. Bu inhibisyon özellikle rukfolitinibin maksimum dozu olan 50 μM'de belirgin olması dikkat çekicidir. Yine dikkat çekici bir diğer sonuç iki ajanının da IFNϒ üzerine herhangi bir etkisinin görülmemesidir.



Şekil 12. U87 hücre hattında nifuroksazid ve ruksolitinib doz uygulaması sonrasında IL6, IL6-R, IFN-ϒ, IFN-ϒR, IFNAR ve EGF-R genlerinin ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=6, ortalama±standart hata. *Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05).

JAK/STAT sinyalizasyon yolağının üyeleri JAK1-2-3, SOCs2-3-7 ve STAT1-2-3-4,6 genlerinin ifadesi

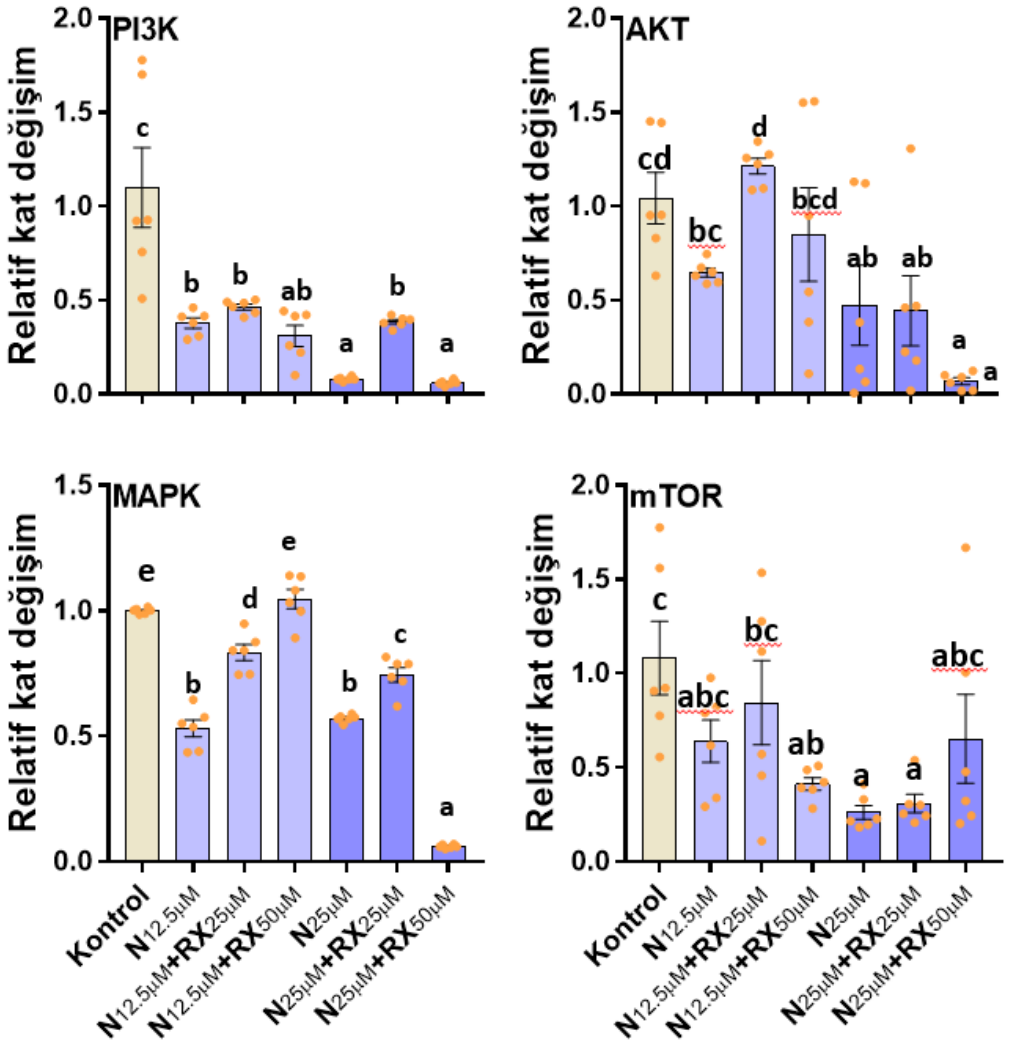
U87 hücre hattında uyguladığımız iki ajanın tek tek ve kombinasyonları şeklindeki tedavilerin neden olduğu JAK1-2-3, SOCs2-3-7 ve STAT1-2-3-4,6 genlerindeki ekspresyonlarındaki değişim Şekil 13'te verilmiştir. Tedaviye bir JAK inhibitörü olan ruksolitinibinin eklenmesi ile, JAK'ların ekspresyonlarında bir azalma görülmektedir. Bu yolağın negatif feedback kontrolü SOCS proteinleri üzerinden gerçekleşmektedir. Uyguladığımız ajanların özellikle SOCs2 üzerinde belirgin bir inhibe edici etkisi görülmektedir. STAT proteinlerinin ekspresyonları göz önüne alındığında ise kullandığımız ajanların STAT3 üzerinden belirgin bir engelleyici etkisi görülmektedir. Bu bakımdan çalışmamız literatür bilgileri ile uyumluluk gösterdiği söylenebilir.



Şekil 13. U87 hücre hattında nifuroksazid ve ruksolitinib doz uygulaması sonrasında JAK1-2-3, SOCs2-3-7 ve STAT1-2-3-4,6 genlerinin ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=6, ortalama±standart hata. *Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05).

JAK'lar tarafından sitozelde aktive edilen PIK3, MAPK, AKT, MTOR genlerinin ifadesi

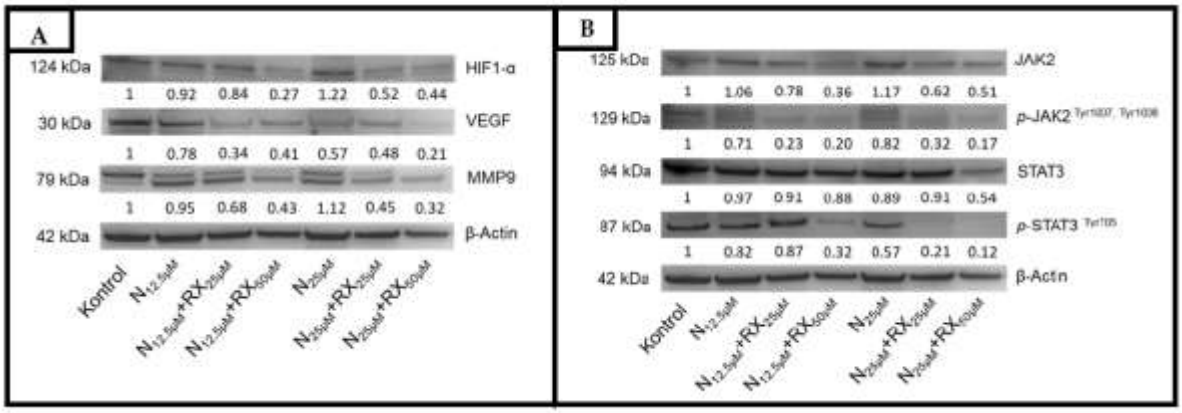
U87 hücre hattında uyguladığımız iki ajanın tek tek ve kombinasyonları şeklindeki tedavilerin neden olduğu, JAK/STAT yolağı arasındaki corsstalk ilişkinin olduğu PIK3, MAPK, AKT, MTOR genleri arasındaki genlerindeki ekspresyonlarındaki değişim Şekil 14'de verilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde etkinin özellikle mTOR üzerinde belirginleştiği görülmektedir.



Şekil 14. U87 hücre hattında nifuroksazid ve ruksolitinib doz uygulaması sonrasında genlerinin ifadesinin değişimi. Relatif kat artış, n=6, ortalama±standart hata. *Farklı harf ile gösterilen gruplarda ortalamalar kontrole göre istatiksel olarak farklıdır (ANOVA-Duncan test, p≤0.05).

WESTERN BLOT PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI

U87 insan glioblastoma 3D hücre kültüründe nifuroksazid ve ruksolitinibinin etkileri hem tek başlarına hem de kombinasyonları şeklinde uygulanmış ve protein ifadeleri gösterilmek amacıyla western blot analizi yapılmıştır. Çalışılan proteinler için endojen olarak kontrol β-aktin kullanılmıştır. ANjiogenezisi ve invazyonu göstermek aamcıyla HIF1α, MMP9, VEGF geneleri ve JAK/STAT sinyalizasyon yolağının çalışıp çalışmadığı anlamak amacıyla JAK2, p-JAK2, STAT3 ve p-STAT3 çalışılmıştır. Sonuçlarımıza göre özellikle nifuroksazid ve ruksolitinibinin yüksek doz kobinasyonun (N 25 μM + RX 50 μM), MMP9 ve VEGF kuvvetli bir şekilde inhibe etttiği, böylelikle anjiogenez ve invazyon üzerine kuvvetli bir inhibisyona neden olduğu görülmektedir (Şekil 15A). Yine, nifuroksazidini artan dozlarında ve bu dozlara ruksolitinib eklendiğinde JAK2, p-JAK2, STAT3 ve p-STAT3 protein ifadelerinin belirgin şekilde azaldığı görülmektedir (Şekil 15). Bu sonuçlar bize nifuroksazid ve ruksolitinibinin tek başlarına ve kombinasyonları şekilde artan dozlarda uygulandıklarında GBM'in invazyonunu, JAK/STAT sinyalizasyonu engelleyerek engellediği düşündürmektedir.



Şekil 15. U87 GBM beyin tümörlerinde, tek başlarına ve kobinasyonlar şeklinde uygulanan nifuroxazid ve rufkolitinib dozlarında (A) HIF1α, MMP9, VEGF genlerinin ve (B) JAK2, p-JAK2, STAT3 ve p-STAT3 genlerinin protein bantlarının görüntüsü.

TARTIŞMA

Çevresel faktörlere bağlı olarak günümüzde kanser görülme oranları giderek artmaktadır. İlerleyen teknolojik imkanlar ile kanser vakaları daha iyi tedavi edilebilir iken hala tedavi edilemeyen kanser olgularındaki artış devam etmektedir. Tedavi edilemez özelliği ile glioblastoma multiforme (GBM), bu kanser türleri arasında önemli bir yer tutar. 2018 yılında tüm dünya çapında saptanan 18,1 milyon yeni kanser vakası arasında santral sinir sistemi (SSS) kanserleri 19 sırada yer almaktadır (80). Yine SSS kanserleri, kansere bağlı ölümlerin ise %2 'sinden sorumludurlar (81). SSS kanserleri arasında ise GBM, en sık görülen primer malign lezyonlar arasındadır. Bunun yanında tedavi edilemez özelliği ile en öldürücü SSS kanseridir (82). Bundan dolayı hastaların beklenen sağ kalım süreleri son derece düşüktür ve sadece hastaya değil hasta yakınlarına da önemli psikososyal sorunlar yüklemektedir (83).

Şu an için tedavide uygulanan rutin yaklaşım mümkün olan en geniş rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi tedavileridir (84). Ancak bu tedavi yaklaşımlarının her birinin kendilerine özgü dezavantajları mevcuttur. Cerrahi rezeksiyon, tümörün fonksiyonel beyin dokusuna yakın yerleştiği durumlarda söz konusu olmadığı gibi hiçbir zaman hücresel düzeyde yer alan kanser hücreleri beyin dokusu da rezksiyono dahil edilmemektedir. GBM kemoterapisin de temozolomide (TMZ), rutin kullanılan ajandır (85). Ancak kan beyin bariyeri (KBB) bu tip ajanların SSS ne geçişine önemli ölçüde engel olmaktadır. Radyoterapi tedavisinde ise normal beyin dokusuna zarar vermemek için istenilen doza çıkılamaması önemli bir avantajdır. Görüldüğü üzere elde olan tedavi yöntemlerinin önemli dez avanjtaları vardır. Bu haliyle GBM halen tedavi edilemeyen kanser türleri arasında yer almaktadır. Sonuç olarak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

GBM tedavisindeki zorluğun temel sebebi hastalığın altında yatan karmaşık moleküler süreçtir. Çeşitli moleküler oyuncuların yer aldığı bu sürecin bir diğer etkisi de hastalığın rekkürensine neden olmasıdır. Tedavi de bu moleküler oyuncuların inhibisyonun denenmesi, zaman zaman daha agresif davranışlı GBM olgularının ortaya çıkmasına dahi neden olabilmektedir (3). Bu bakımdan hastalığın moleküler temelini ortaya koyacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Gelişen teknolojiye paralel olarak, moleküler biyoloji hızlı bir ilerleme göstermiştir. Hücrelerin çalışma şekilleri ve birbirleri arasında haberleşmesi önemli ölçüde ortaya çıkmaktadır. Böylece hastalıkların moloeküler temellerinin daha iyi ortaya konması ile de tedavi yaklaşımları özellikle medikal tedavi uygulamaları giderek artmaktadır. Hücre arası haberleşme bir dokunun normal ya da patolojik olsa da yaşamasının temel kuralıdır. Bu haberleşme, bir başka deyişle sinyalizasyon, için çeşitli mekanizmalar ve bu mekanizmalarda rol oynayan moleküller söz konusudur. En başta hücre yüzeyinde gelen sinyal molekülü ile (sitokinler) bu moleküler süreç başlar. Sonrasında hücre sitozolinde bir takım moleküller aktive olarak, sitokinler vasıtasıyla hücre yüzeyinde başlayan sinyal hücre çekirdeğine iletilmiş olur. Sinyalizasyon yolakların son ürünü olarak oluşan proteinler, sinyalizsyonun oluştuğu hücrede etkili olabileceği gibi hücrenin dışına çıkarak diğer hücrelerde sinyal gönderir ve hücre çoğalması başlamış olur. işte bu yolkalarıdaki herhangi bir bozulma kontrol edilemeyen hücre çoğalmalarına ve sonrasında kanser dokusunun gelişmesine neden olabilmektedir.

Son yıllarda özellikle kanser çalışmalarında JAK/STAT ((Janus protein kinaz/ sinyal iletici ve transkripsiyon aktive ediciler) sinyalizasyon yolağı sıkça çalışılan yolakların başında gelmektedir. Bu yolakta JAK'lar hücre yüzeyinde yer alan sitokinlerin bağlandığı reseptörlerdir. STAT' lar ise hücre sitozolinde JAK'lar aktivasyonu ile fosforillenerek dimer oluşturular ve hücrenin çekirdeğine girerler. Hedef genin prometer bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunda değişikliklere neden olurlar (Şekil 4). Dört adet JAK proteini tanımlanmıştır; JAK1, JAK2, JAK3 ve Tyk2. Yine insanlarda STAT protein ailesi ise yedi üyeden oluşmaktadır; (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6. Bu sinyalizasyon yolağına hücre yüzeyinde IL6 ve IFN sitokinleri bağlanabilmektedir. JAK/STAT sinyalizasyon yolağı hücre farklılaşması, hücre çoğalması, hücre göçü ve apaptoz gibi bir çok hücresel sürecin yönetilmesinde rol alır. Bu yolağın negatif geri beslemesi sitokin sinyal reseptörleri (SOCS) proteinleri üzerinde gerçekleşmektedir. STAT'lar kendileri üzerine negatif etkisi olan SOCS'ların ekpresyonun artırarak, STAT ekspresyonu

engellenerek, yolağın negatif geri beslenmesi sağlanmış olur (86). JAK/STAT sinyal yolağı immün sistem üzerinde son derece etkilidir. Bu etkisini belki de SOCS proteinleri üzerinden gerçekleştirmektedir. Çünkü bu proteinlerin makrofaj ve dentrik hücreler gib doğal bağışıklık sistemin hücreleri üzerinde önemli düzenleyiciler olduğu gösterilmiştir (87).

Literatürde yapılan pek çok çalışma da JAK/STAT yolağının başta hematolojik malignenslier olmak üzere onkogeneziste de önemli rol oynadığı gösterilmektedir. Ancak altta yatan mekanizma tam olarak ortaya konamamıştır. (86). Özellikle çalışmamızda kullanılan ajan olan ruksolitinibin myeloproleferait neoplaside faz III çalışmaları devam etmektedir (88). Bu yolak birkaç sitokince aktive edilebilir. Bunların başında IL6, IFN, EGFR ve EPO gelmektedir.

IL6, 25 kDA'lık pleiotropik sitokindir. İlk keşfedildiğinde B hücreleri aktivatör faktörü olduğu sanılsa da, sonraları prostat, meme, mide, kolon ve beyin kanserlerinde etkili bir enflamatuar sitokin olduğu anlaşılmıştır (89). Özellikle akut faz proteini olarak enflamasyon öncesinde sentezlenmektedir. Vücutta hemen hemen tüm dokularda bulunur ve reseptörünün fonksiyonel kısmı gp130 proteini olup; STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerini fosforilasyonuna neden olur (90). Literatürdeki pek çok çalışma da glioblastomada ile IL6 ekspresyonu arasında önemli bir ilişki gösterilmiştir. Rolhion ver ark. İnsan dokusu üzerine yaptıkları çalışmalarında IL6 ekspresyonunun, glioblastomunun grade arttıkça arttığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar ile IL6 nın glioblastomanın agtreseifliği arasında sıkı bir ilişki olduğu ve sonuç olarak tedavide yeni bir hedef olabileceğini ileri sürmüşlerdir (91). Yine bir diğer çalışma da IL6 ekspresyonu, glioblastoma olguları ile düşük dereceli gliomalar ile karşılaştırılmış ve düşük dereceli olgularda ekspresyonun oldukça düşük olduğu gösterilmiştir (92). Buna benzer olarak Kudo ve ark. IL6 ekspresyonunu normal beyin dokusu ile karşılaitırmışlar ve normal beyin dokusunda hiç ekspresyon göstermezlerken glioblasytoma olgularının hemen hepsinde göstermişlerdir (93). IL6 ekspresyonu aynı zamanda düşük sağ kalım ile de yakında ilişkili bulunmuştur (92). IL6 ile glioblastoma arasındaki bu ilişki invitro çalışmalarda da sıklıkla gösterilmiştir (94–96). IL6 aktivasyonu sadece JAK aktivasyonu sağlamamakta aynı zamanda hücre sitozolünde Ras-MAPK ve PI3 aktivasyonunu da sağlamaktadır (Şekil 4). Bunların arasında STAT3 en çok çalışılan sitokin sinyalleşme sistemlerinde biridir ve enflamasyonda önemli görevleri vardır (97,98). Glioblastoma başta olmak üzere meme ve pankreas kanserindeki rolü ortaya konmuştur (94,96). Sonuç olarak IL6'nın yüksek gradeli gliomaların moleküler patolojisinde önemli bir rolü olduğu ve tedavide hedef alınabilecek bir molekül olabilir.

JAK/STAT sinyal yolağını aktifleştiren bir diğer sitokin ailesi ise interferonlardır (IFN). IFN'lar 1957 yılında keşfedilmiş olup, nerdeyse hemen hemen her dokuda sentezlenirler. Tip I ve II olmak üzere iki sınıfa ayrılmışlardır. IFN α ve β tip I grubunu oluştururken, IFN ϒ tip II grubunu oluşturur. Her iki tipteki interferonlar vücuttaki biyolojik cevabı, hedef hücreler üzerindeki özgül reseptörlerine bağlanıp, gen transkripsiyonunda hızlı bir artışa yol açarak gerçekleştirirler. IFN'Ların hepsi STAT fosforliasyonu sağlayarak yolağın aktifleşmesini sağlarken GAS element aracılı γ-interferon (IFNγ) yanıtlarıdır; çok az farklı ISRE elementleri IFNα/β ya yanıt verir (Şekil 4) (99). IFN melanoma ve lösemi gibi tümörler başta olmak üzere solid tümörlerin patofizyolojisindeki rolü de gösterilmiştir (100). Bu bakımda son yıllarda anti-kanser tedavilerinde sıkça çalışılan sitokinlerin başında gelmektedir. Gliomalara karşı özellikle çalışmamızın da konusunu içeren glioamaların invazyonlarına karşı engelleyici etkileri raporlanmıştır (96,101,102). Ayrıca 2011 yılında temozolomid ile kombine edilen IFN tedavisinin faz I sonuçları yayınlanmıştır. Çalışmanın sonucunda bu tedavi rejiminin güvenli ve hastalarca iyi tolere edildiği ve gliobasltomalı hastaların sağ kalımını uzatabileceği sonucuna varılmıştır (103). Bizim çalışmamızda RT-qPCR analiz sonuçlarımızda; uyguladağımız iki ajanın artan dozlarda ve kombinasyonlarında tip II interferonların ekspresyonlarında artış tespit ettik. Aynı zamanda ilgili sitokinlerin reseptörlerinde de artış mevcuttu (Şekil 12). Yine RT-qPCR analiz sonuçlarımızda JAK/STAT sinyal yolağının aktivasyonunda gerileme görüldü (Şekil 13). Western blot çalışmamız da sinyal yolağındaki bu sinyalizasyon kaybını destekler sonuçları oraya koydu. Böylelikle bizim elde ettiğimiz veriler ışığında uyguladığımız iki ajan olan ruksolitinibin ve nifuroksazidinin IFN üzerinden glioma invazyonun da etkili olduğunu düşündürdü.

Tümör hücreleri yüksek besin ve oksijen desteğine ihtiyaçları vardır. İlk başlarda küçük olan tümör dokusu bu ihtiyaçlarını difüzyon ile komşu dokudan sağlar. Ancak büyümeye başladıkça bu ihtiyaçları artar. Artık, yüksek besin ve oksijen ihtiyacını yeni damarların oluşmasını sağlayarak kan yoluyla sağlaması gerekir. İşte başlarda bu mekanizma tümör dokusunda hipoksik bir mikroçevre oluşturur. Hipoksiden kuvvetli bir şekilde etkilenen hipoksiyle indüklenen faktör (HIF) bu şartlarda sentezi artan, oksijen konsantrayonunun ana düzenleyici molekülüdür. HIF1, ihtiyaç olan yeni kan damarlarınınj gelişmesi için VEGF aktivasyonu yapar. Gliomalar için de bu mekanizma söz konusudur ve rutin olarka yüksek anjiogenez özelliği ile bilinirler. Buna paralel olarak gliomalarda yüksek HIF-1α ve VEGF seviyeleri görülür (96,104). Bu yüksekliğin aynı zamanda gliomaların invazyonu ile korelasyon gösterildiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da U87 hücre hatlarında görülen

invazyonun uyguladığımız tedavi ile belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Aynı etki tümöregenezis üzerinde de görüldüğü tespit edilse de tümör invazyonu üzerine daha belirgin bir etki görülmüştür (Şekil 10). Özellikle aynı dozlarda nifuroksazid (12,5 μM) uygulanan grupta ruksolitinibinin 25 μM'den 50 μM doza çıkıldığında ortaya çıkan invazyon üzerine kuvvetli inhibe edici etki göz önüne alındığında; invazyonu önkeyen esas ajanın ruksolitinib olduğu söylenebilir. RT-qPCR analiz elde etiiğimiz gen ifadelerinin sonuçlarıda bu verileri destekler nitelikteydi. Uyguladığımız iki ajanın dozlarınınj arttırılması ile beraber HIF1α ve VEGF'nin gen ifadelerinin benzer bir patern göstererek öncesinde azalma eğilimide iken maksimum dozlarda belirgin şekilde yüksek eksprese oldukları görüldü (Şekil 11). Western blot analiz çalışmaları da yine sonuçlarımızı doğrular nitelikteydi (Şekil 15). Mettaloproteinazlar (MMP), proteinlerin yıkılmasına sebep olarak ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesinde rol oynar. Geniş bir aileye sahip olan MMP'lardan özellikle MMP9 ekpresyonuun primer gliomalar ile yakından ilişkisi bildirilmiştir (105). Gliomalar, MMP ların aktivasyonu ile etraf dokuya yayılma (invazyon) sağlayarak hem tümörgenezisi gerçekleştirirler hem de büyüdüklerinde ihtiyaç duydukları besin ve oksijen gereksinimi için yeni damar oluşumuna imkan sağlarlar (106). Dolayısıyla gliomagenezisin invazyonun etkin rol oynarlar. Çalışmamız kapsamında RT-qPCR ve western blot analiz çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında literatüre benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 10 ve 15).

JAK/STAT sinyalizasyon yolağı ile PI3k/AKT/mTOR yolağı arasında bir "crosstalk" etkilemiş söz konusudur (107). Bu iki yolak arasındaki etkileşimin özellikle immün sistem üzerine etkili olduğu sanılmaktadır. Bu yolak reseptör tirozin kinazlar ile yakından ilişkilidir. Bu yolağın bir üyesi olan AKT'nin, aşağı sinyal iletiminde efektörlerin en önemlisi mTOR'dur. Gliomalarda mTOR aktivasyonu arasındaki yakın ilişkinin olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur (108). Gliomaların tedavisinde yolağın inhibitörlerini içeren pek çok çalışmada mevcut olup tedavide iyi bir moleküler hedef olduğu ileri sürülmektedir (109,110). Ancak halen, mTOR yolağı ile gliomalar arasındaki mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (110). Bu yolağın, JAK/STAT sinyal yolağı gibi, gliomaların moleküler temelinde önemli yer tutan diğer moleküler oyuncular ile ilişkinin anlaşılması, mekanizmayı aydınlatmaya yardımcı olabilir. Bu mantıkla yola çıkarak Miyata ve ark, U87 hücre hattına, bir STAT3 inhibitörü olan STX-0119 ile mTOR inhinitörü olan rapamycini aynı anda uygulamışlardır. Elde ettikleri olumlu veriler nedeniyle bu tedavinin yeni bir moleküler hedef olabileceğini bildirmişlerdir (111). Sunulan bu çalışma da bu görüşe paralel olarak PI3, AKT, MAPK ve mTOR genlerinin RT-qPCR analiz çalışmaları yapılmıştır. Uyguladığımız iki

tedavi ajanı, bu yolağın engelleyici etki gösterdiği özellikle inhibisyonun artan dozlarda ve yolağın son effektörü olan mTOR üzerinde daha belirgin olduğu görülmüştür (Şekil 14). Çalışmanın esas konusu olan JAK/STAT yolağına ait RT-qPCR analiz değerlerine bakıldığında kullandığımız iki ajanın özellikle STAT3 ve STAT4 üzerinde belirgin bir inhibisyona neden olduğu görülmektedir (Şekil 13). Literatüre bakıldığında yedi üyeye sahip STAT ailesinden, STAT1,3 ve 5'in gliomaların da dahil olduğu tümöregenizis ile ilişkili oldukları görülmektedir (112). Bu yolağın inhibisyonu yoluyla yapılan kanser tedavi girişimleri arasındaki çalışmalara göz atıldığında ise, literatür bilgilerinin STAT3 inhibisyonu üzerine yoğunlaştığı dikkat çekmektedir (113). STAT3 inhibisyonun meme, kolorektal, mide ve akciğer kanserleri gibi solid organ kanserlerinde hücre proliferasyonunu engellediği raporlanmıştır (114,115,116). STAT3'ün bu inhibitör etkileri gliomalar üzerindede gösterilmiştir (112,117). Bizim laboraturamızda da yapılan önceki çalışma da yine ruksolitinibin IL6 yoluyla, STAT3 inhibisyonuna neden olduğu raporlanmıştır [95]. Bu çalışmamızda ise benzer şekilde STAT3 ekspresyonunun azalması gösterilmiş, bu genin ifadesinin azalması western çalışmaları ile desteklenmiştir (Şekil 15). Sunulan bu çalışmamızda kullanıldığımız nifuroksazidinin, akciğer kanserinde, STAT3 inhibisyonu yaparak tümör invazyonuna engel olduğu gösterilmiştir (118). Yine melanoma üzerine invazyon engelleyici etkisi ile MMP9 ekspresyonunu azaltma etkisi arasında bir bağlantı öne sürülmüştür (75). Çalışmamızın MMP ekspresyon sonuçlarına bakıldığında, nifuroksazidinin MMP9 ekspresyonu üzerine inhibi edici etkisi ruksolitinib eklenmesi ile arttırıldığı görülmektedir (Şekil 11). Elde ettiğimiz veriler genel olarak bakıldığında ise kullandığımız iki ajanın tek tek ve kombine dozlar uygulanarak etkilerinin arttığı, tümör invazyonunu belirgin şekilde arttırdığı görülmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak bizim projemizden elde ettiğimiz verilere bakıldığında ise kullandığımız iki ajan özellikle yükselen dozlarda JAK/STAT yolağı genlerini inhibe ettiği görülmüştür. Bu inhibisyon invazyonu da engellemiştir. Bu sonuçlar GBM'in tedavisine yönelik yeni bir moleküler hedef belirlenebileceğini ifade ederken, konu üzerine yeni çalışmaların geliştiribileceğine dair umut vaat etmektedir.

ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM), beyin tümörünün en agresif formudur. Tedavi genellikle GBM'nin yüksek anjiyojenik kapasitesi nedeniyle başarısız olur. JAK/STAT sinyalizasyon yolağı bir hücre içi sinyalizasyon yolağı olup, GBM dahil olmak üzere pek çok kanserde etkili bir rol alır. Bu yolak anjiogenez ile yakından ilişkilidir. JAK aktivasyonu, sitoplazmada bulunan STAT'ların seçici olarak fosfatlanmasına ve sitoplazmada STAT dimerlerinin oluşmasına neden olur. STAT dimerler, birçok sitokinin düzenlenmesine neden olan bir transkripsiyon faktörüdür. Ruksolitinib ve nifuroksazid bu yolayın selektif inhibitörleridir. Bu çalışma da ruksolitinib tedavisine nifuroksazid ekleyerek JAK/STAT yolağının genlerinin ekspresyon profiline baktık. Kullandığımız iki ajanın (Nifuroksazid ve ruksolitinib) özellikle yükselen dozlarda JAK/STAT yolak genlerini inhibe ettiği görülmüştür. Bu inhibisyon invazyonu da engellemiştir. Sonuçlarımızı doğrulamak için western blot analizlerini gerçekleştirdik.

Anahtar kelimeler: Glioblastoma multiforme, Anjiogenez, JAK/STAT

IN GLIOBLASTOMA (U-87) THREE-DIMENSIONAL TUMOR MODEL, TWO DIFFERENT LEVELS OF INHIBITION OF RUKSOLITINIB AND NIFUROXAZID AND JAK/STAT SIGNAL PATHWAY AND ITS ANGIOGENESIS EFFECT ON ANGIOGENESIS

SUMMARY

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive form of the brain tumor. The treatment often fails due to the high angiocenic capasity of GBM. JAK / STAT (janus kinase / signal transducer and activator of transcription-STAT-) pathway is an intracellular signaling pathway that plays an essential role in many cancers inculiding GBM. This pathway strongly associated with angiogenesis. JAK activation causes STATs located in the cytoplasm to be selectively phospated and STAT dimers to form in the cytoplasm. STAT dimers are a transcription factor that caused up regulation many cytokines. Ruxolitinib ve nıfuroxazid are selective inhibitors of this pathway. In this study, we looked at the expression profile of the genes of the JAK / STAT pathway by adding nifuroxazide to ruxolitinib treatment. The two agents we used (Nifuroxazid and ruxolitinib) were found to inhibit JAK / STAT pathway genes, especially at increasing doses. This inhibition also prevented invasion. We performed western blot analysis to verify our results.

Key words: Glioblastoma multiforme, Angiogenesis, JAK / STAT

KAYNAKLAR

1. Raizer J, Parsa A. Current Understanding and Treatment of Gliomas. Cancer Treatment and Research 2015;163:1–14.

2. Lee E, Yong RL, Paddison P, Zhu J. Comparison of glioblastoma (GBM) molecular classification methods. Seminars in Cancer Biology 2018;53(July):201–11.

3. Avşar T, Kiliç T. Yüksek Gradeli Gliomların Moleküler Biyolojisi Molecular Biology of High Grade Gliomas. Türk Nöroşirürji Dergisi 2017;27(2):162–8.

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

5. Cecchetto G, Bajanowski T, Cecchi R, Favretto D, Grabherr S, Ishikawa T, Kondo T, Montisci M, Pfeiffer H, Bonati MR, Shokry D, Vennemann M, Ferrara SD. Back to the Future - Part 1. The medico-legal autopsy from ancient civilization to the post-genomic era. International Journal of Legal Medicine 2017;131(4):1069–83.

6. De Angelis LM, Mellinghoff IK. Virchow 2011 or how to ID(H) human glioblastoma. Journal of Clinical Oncology 2011;29(34):4473–4.

7. Buckely RC. the Tissue 1929;467–72.

8. Castillo M. History and evolution of brain tumor imaging: Insights through radiology. Radiology 2014;273(2):111–25.

9. Ali MY, Oliva CR, Noman ASM, Allen BG, Goswami PC, Zakharia Y, Monga V, Spitz DR, Buatti JM, Griguer CE. Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. Cancers 2020;12(9):2511.

10. Kirkpatrick DB. The first primary brain-tumor operation. Journal of Neurosurgery 1984;61(5):809–13.

11. Naderi S, Erbengi A. History of neurosurgery and neurosurgical applications in

Turkey. Surgical Neurology 2005;64(suppl. 2):115–22.

12. Howells JG, Kay EI. Cerebral Hemispherectomy. The Lancet 1951;258(6685): 683.

13. Noch EK, Ramakrishna R, Magge R. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. World Neurosurgery 2018;116:505–17.

14. Zorzan M, Giordan E, Redaelli M, Caretta A, Mucignat-Caretta C. Molecular targets in glioblastoma. Future Oncology 2015;11(9):1407–20.

15. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. Neuro-Oncology 2014;16(7):896–913.

16. Çetin NK. Santral Sinir Sistemi Tümörlerinin Histopatolojik Dağılımı ve İnsidansı: Tek Merkezin 10 yıllık Retrospektif Analizi. Dicle Tıp Dergisi 2020;47:178–93.

17. Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT, Cote D. Epidemiology of Brain Tumors. Neurologic Clinics 2018;36(3):395–419.

18. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: A review of where we have been and where we are going. Expert Opinion on Investigational Drugs 2009;18(8):1061–83.

19. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. Neuro-Oncology 2020;30(22)(1): iv1–iv96. 21.

20. Silverstein MD, Cascino TL, Harmsen WS. High-grade astrocytomas: Resource use, clinical outcomes, and cost of care. Mayo Clinic Proceedings 1996;71(10):936–44.

21. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 2013;61(1):25–41.

22. Todorova PK, Fletcher-Sananikone E, Mukherjee B, Kollipara R, Vemireddy V, Xie XJ, Guida PM, Story MD, Hatanpaa K, Habib AA, Kittler R, Bachoo R, Hromas R, Floyd JR., Burma S. Radiation-induced DNA damage cooperates with heterozygosity of TP53 and PTEN to generate high-grade gliomas. Cancer Research 2019;79(14):3749–61.

23. Özduman K, M. Hacihanefioğlu M, Pamir N. "Glioblastom Glioblastoma," Turk Nöroşir Derg 2019;29(3):305–34.

24. DeAngelis LM. "Brain tumors," N Engl J Med 2001;114(2):114–23.

25. Vanan I, Dong Z, Tosti E, Warshaw G, Symons M, Ruggieri R. Role of a DNA

damage checkpoint pathway in ionizing radiation-induced glioblastoma cell migration and invasion. Cellular and Molecular Neurobiology 2012;32(7):1199–208.

26. Inskip PD, Sigurdson AJ, Veiga L, Bhatti P, Ronckers C, Rajaraman P, Boukheris H, Stovall M, Smith S., Hammond S, Henderson TO, Tanya C, Mertens AC, Leisenring W, Stratton K, Whitton J, Donaldson SS, Armstrong GT, Robison LL, Neglia JP. Radiation-Related New Primary Solid Cancers in the Childhood Cancer Survivor Study: Comparative Radiation Dose Response and Modification of Treatment Effects. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2016;94(4):800-7.

27. Amirian ES, Zhou R, Wrensch MR, Olson SA, Scheurer ME, Il'yasova D et al. "Approaching a scientific consensus on the association between allergies and glioma risk: A report from the glioma international case-control study," Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2026:25(2):282–90.

28. Stathis A. Treatment overview. Handbook of Lymphoma 2016;20(5):33–44.

29. Coureau G, Bouvier G, Lebailly P, Fabbro-Peray P, Gruber A, Leffondre K, Guillamo JS, Loiseau H, Mathoulin-Pélissier S, Salamon R, Baldi I. Mobile phone use and brain tumours in the CERENAT case-control study. Occupational and Environmental Medicine 2014;71(7):514–22.

30. Wei Y, Zou D, Cao D, Xie P. Association between processed meat and red meat consumption and risk for glioma: A meta-analysis from 14 articles. Nutrition 2015;31(1):45–50.

31. Alexander BM, Cloughesy TF. Adult glioblastoma. Journal of Clinical Oncology 2017; 35(21):2402–9.

32. G. Shukla et al., "Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: A review," Chinese Clin. Oncol., 2017;6(4)1–12.

33. Ruff MW, BhargavAG, Raghunathan A. A case of epidural glioblastoma metastasis presenting with a cervical myelopathy, torticollis, and L'hermitte's phenomenon. Brain Tumor Pathology 2018;35(3):181–5.

34. Awan M , Liu S, Sahgal A, Das S, Chao ST, Chang EL, Knisely JPS, Redmond K, Sohn JW, Machtay M, Sloan AE, Mansur DB, Rogers LR, Lo SS. Extra-CNS metastasis from glioblastoma: A rare clinical entity. Expert Review of Anticancer Therapy 2015;15(5):545–52.

35. Liu C, Xu W, Liu P, Wei Y. A Mistaken Diagnosis of Secondary Glioblastoma as Parasitosis. In Frontiers in neurology 2019;10:952.

36. Lavrador JP, Reis JH, Belo D, Acharya S, Faria CC, Pimentel J, Carvalho MH. Cerebellar cystic glioblastomas: An uncommon presentation of a rare disease and clinical review. ENeurologicalSci 2018;14:60–61.

37. Taghipour ZS, Mortaz M, Baghi YM, Sefidrokh SN, Shabani M. Calvarium mass as the first presentation of glioblastoma multiforme: A very rare manifestation of high-grade glioma. Neurochirurgie 2018;64(1):76–8.

38. D. H. Ciocon and A. B. Kimball. “Psoriasis and psoriatic arthritis: separate or one and the same?” Br J Dermatol 2007;157(5):850-60.

39. Le Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, Reifenberger G, Weller M. “Molecular targeted therapy of glioblastoma.,” Cancer Treat. Rev., 2019;80:101896.

40. C. Gzell, M. Back, H. Wheeler, D. Bailey, M. Foote. “Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future.,” Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol). 2017; 29(1):15–25.

41. J. A. Wilcox, R. Ramakrishna, R. Magge. “Immunotherapy in Glioblastoma.,” World Neurosurg., 2018;116:518–28.

42. I. Trogrlić, D. Trogrlić, D. Trogrlić, A. K. Trogrlić, “Treatment of glioblastoma with herbal medicines.,” World J. Surg. Oncol., 2018;16(1):28.

43. E. Soetrisno, G. Tjahjadi, “Pathological aspects of brain tumors.,” Gan To Kagaku Ryoho., 2000;27(2):274–8.

44. E. N. Danyeli, “Santral Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflaması- Geçmişten Güncele The Classification of Central Nervous System Tumors- From Past to Date,” Turk Nöroşi Derg 2019;29(3):217–25.

45. Louis DN, PerryA, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary Acta Neuropathol. 2016;131(6):803-20.

46. Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. Neuropathology and Applied Neurobiology 2018;44(2):139–50.

47. Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I. Angiogenesis and invasion in glioma. Brain Tumor Pathology 2011;28(1):13–24.

48. Plate KH, Risau W. Angiogenesis in malignant gliomas. Glia 1995;15(3):339–47.

49. Zagzag D, Goldenberg M, Brem S. Angiogenesis and blood-brain barrier breakdown modulate CT contrast enhancement: An experimental study in a rabbit brain-tumor model. American Journal of Roentgenology 1989;153(1):141–6.

50. Zagzag D, Hooper A, Friedlander DR, Chan W, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Grumet M. In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. Experimental Neurology 1999;159(2):391– 400.

51. Y. Reiss, “Angiopoietins 2,” Recent Results Cancer Res. 2010;180:3-13.

52. Vanmeter TE, Rooprai HK, Kibble MM, Fillmore HL, Broaddus WC, Pilkington GJ. The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: Co-dependent and interactiveproteolysis. Journal of Neuro-Oncology 2001;53(2):213–35.

53. Jain RK, Di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. Nature Reviews Neuroscience 2007;8(8):610–22.

54. J. S. B. C. T. Kresge , M. E. Leonowicz , W. J. Roth , J. C. Vartuli, "Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism," Nature, 1992;359:710–3.

55. Saidi A, Javerzat S, Bellahcène A, De Vos J, Bello L, Castronovo V, Deprez M, Loiseau H, Bikfalvi A, Hagedorn M. Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma. International Journal of Cancer 2008;122(10):2187–98.

56. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. Critical Reviews in Oncology Hematology 2005;54:53–61.

57. Kim WY, Lee HY. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: Mechanism and therapeutic intervention in brain tumors. FEBS Journal 2009;276(17):4653–64.

58. Ekenel M. Beyin Tümörlerinde Hedefe Yönelik Tedaviler Targeted Treatments for Brain Tumors. Türk Nöroşirürji Dergisi 2017;218(272):218–22.

59. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. Clinical Cancer Research 2007;13(4):1253–59.

60. Linkous AG, Yazlovitskaya EM. Angiogenesis in Glioblastoma Multiforme : Navigating the Maze. Anti - Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2011;11:712–8.

61. Wesseling P, van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. Acta Neuropathologica 2015;129(6):809–27

62. Williams Parsons D, Jones S, Zhang X, Cheng J, Lin H, Leary R J, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, Mclendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Kinzler KW. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. Science 2008;26;321(5897):1807-12.

63. Toedt G, Barbus S, Wolter M, Felsberg J, Tews B, Blond F, Sabel MC, HofmannS, Becker N, Hartmann C, Ohgaki H, Von Deimling A, Wiestler OD, Hahn M, Lichter P, Reifenberger G, Radlwimmer B. Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. International Journal of Cancer 2011;128(5):1095–103.

64. H. Ohgaki, P. Kleihues, "The definition of primary and secondary glioblastoma," Clin. Cancer Res., 2013;19(4)764–72.

65. A. Chakravarti, A. Chakladar, M. A. Delaney, D. E. Latham, and J. S. Loeffler, "The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Mediates Resistance to Sequential Administration of Radiation and Chemotherapy in Primary Human Glioblastoma Cells in a RAS-dependent Manner The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway

Mediates Resistance to S," 2002;62:4307–15.

66. T Kilic 1, J A Alberta, P R Zdunek, M Acar, P Iannarelli, T O'Reilly, E Buchdunger, P M Black, C D Stiles. "Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class," Cancer Res., 2000;60(18):5143–50.

67. Sun Y, Han Y, Wang X, Wang W 1, Wang X, Wen M, et al. "Correlation of EGFR Del 19 with Fn14/JAK/STAT signaling molecules in non-small cell lung cancer.," Oncol. Rep., 2016;36(2):1030–40.

68. Fan QW, Cheng C, Gustafson WC, Charron E, Zipper P, Wong RA, Chen J, Lau J, KnobbeThomsen C, Weller M, Jura N, Reifenberger G, Shokat KM, Weiss WA. EGFR phosphorylates tumor-derived EGFRvIII driving STAT3/5 and progression in glioblastoma. Cancer Cell 2013;24(4):438-49.

69. P. Dutta and W. X. Li, "Role of the JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer," eLS, 2013;1-9.

70. Nicolas CS, Amici M, Bortolotto ZA, Doherty A, Csaba Z, Fafouri A, Dournaud P, Gressens P, Collingridge GL, Peineau S. The role of JAK-STAT signaling within the CNS. JAKSTAT 2013;2(1):e22925.

71. Esposito CL, Nuzzo S, Catuogno S, Romano S, de Nigris F, de Franciscis V. STAT3 Gene Silencing by Aptamer-siRNA Chimera as Selective Therapeutic for Glioblastoma. Molecular Therapy. Nucleic Acids 2018;10:398–411..

72. Begovic B, Ahmedtagic S, Calkic L, Vehabović M, Kovacevic SB, Catic T. Open Clinical Trial on Using Nifuroxazide Compared to Probiotics in Treating Acute Diarrhoeas in Adults. Mater Sociomed 2016;28(6):454–8.

73. Luo Y, Zeng A, Fang A, Song L, Fan C, Zeng C et al. Nifuroxazide induces apoptosis, inhibits cell migration and invasion in osteosarcoma. Invest. New Drugs 2019;37(5):1006–13.

74. Ye TH, Yang FF, Zhu YX, Li YL, Lei Q, Song XJ et al. Inhibition of Stat3 signaling pathway by nifuroxazide improves antitumor immunity and impairs colorectal carcinoma metastasis. Cell Death Dis. 2017;8(1):e2534.

75. Zhu Y, Ye T, Yu X, Lei Q, Yang F, Xia Y et al. Nifuroxazide exerts potent anti-tumor and anti-metastasis activity in melanoma. Sci. Rep. 2016;2(6)20253.

72. A. Ganetsky. "Ruxolitinib: A new treatment option for myelofibrosis," Pharmacotherapy, 2013;33(1):84–92.

73. Deeb M, Beach RA. A Case of Topical Ruxolitinib Treatment Failure in Alopecia Areata. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery 2017;21(6):562-3.

74. Q. Xu, G.-M. Liu, F.-Y. Wang, L.-J. Zhang, W.-T. Liang, and Z.-Y. Cheng, "The Effect of Ruxolitinib on the Expression of VEGF and HIF-1α in Leukemia HEL Cells," Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban, 2016;47(5):669–73.

75. T. Zhao et al., “Nifuroxazide prompts antitumor immune response of TCL-loaded DC in mice with orthotopically-implanted hepatocarcinoma,” 2017;37(6):3405–14.

76. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. International Journal of Cancer 2019;144(8):1941–53.

77. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2000;50(1):7–33.

78. Wolf A, Agnihotri S, Guha A. Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. Oncotarget 2010; 1(7):552–62.

79. Davis ME, Stoiber AMM. Glioblastoma multiforme: enhancing survival and quality of life. Clinical Journal of Oncology Nursing 2011;15(3):291–7.

80. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention 2014;23(10):1985–96.

81. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. The New England Journal of Medicine 2005;352(10):997–1003

82. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. British Journal of Cancer 2015;113(3):365–71.

83. Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN, “SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity.,” Trends Immunol., 2009;30(8):392–400.

84. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, McQuitty M, Hunter DS, Levy R, Knoops L, Cervantes F, Vannucchi AM, Barbui T, Barosi G. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. The New England Journal of Medicine 2012;366(9):787–98.

85. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. Cell 2009;139(4): 693–706.

86. West AJ, Tsui V, Stylli SS, Nguyen HPT, Morokoff AP, Kaye AH, Luwor RB. The role of interleukin-6-STAT3 signalling in glioblastoma. Oncology Letters 2018;16(4):4095–104.

87. Rolhion C, Penault-Llorca F, Kémény JL, Lemaire JJ, Jullien C, Labit-Bouvie, C, FinatDuclos F, Verrelle P. Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas. Journal of Neurosurgery2001;94(1):97–101.

88. Tchirkov A, Khalil T, Chautard E, Mokhtari K, Véronèse L, Irthum B, Vago P,

Kémény JL, Verrelle P. Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. British Journal of Cancer 2007;96(3):474–6

89. Kudo M, Jono H, Shinriki S, Yano S, Nakamura H, Makino K, Hide T, Muta D, Ueda M, Ota

91. Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Béliveau R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. Experimental Cell Research 2012;318(8):925–35.

91. Delen E, Doganlar O, Doganlar ZB, Delen O. Inhibition of the invasion of human glioblastoma U87 Cell line by ruxolitinib: A molecular player of miR-17 and miR-20a Regulating JAK/STAT Pathway. Turkish Neurosurgery 2020;30(2):182–9.

92. Delen E, Doğanlar O. The dose dependent effects of ruxolitinib on the invasion and tumorigenesis in gliomas cells via inhibition of interferon gamma-depended JAK/STAT signaling pathway. Journal of Korean Neurosurgical Society 2020;63(4):444–54.

93. Liu Q, Li G, Li R, Shen J, He Q, Deng L, Zhang C, Zhang J. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. Journal of Neuro-Oncology 2010;100(2):165–76.

94. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R, Huang S. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. Oncogene 2004;23(20):3550–60.

95. Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H. Kanser Yolakları. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2011;20(4):187–229

96. Silginer M, Nagy S, Happold C, Schneider H, Weller M, Roth P. Autocrine activation of the IFN signaling pathway may promote immune escape in glioblastoma. Neuro-Oncology 2017;19(10):1338–49.

97. Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. Current Medicinal Chemistry 2017;24(27):3002–9.

98. Knüpfer MM, Poppenborg H, Van Gool S, Domula M, Wolff JE. Interferon-gamma inhibits proliferation and adhesion of T98G human malignant glioma cells in vitro. Klinische Padiatrie 1997;209(4):271–4

99. Wakabayashi T, Kayama T, Nishikawa R, Takahashi H, Hashimoto N, Takahashi J, Aoki T, Sugiyama K, Ogura M, Natsume A, Yoshida J. A multicenter phase I trial of combination therapy with interferon-β and temozolomide for high-grade gliomas (INTEGRA study): the final report. Journal of Neuro-Oncology 2011;104(2):573–7

100. Clara CA, Marie SKN, de Almeida JRW, Wakamatsu A, Oba-Shinjo SM, Uno M, Neville M, Rosemberg S. Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1α in human glioblastoma. Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology 2014;34(4):343–52.

101. Choe G, Park JK, Jouben-Steele L, Kremen TJ, Liau LM, Vinters HV, Cloughesy TF, Mischel PS. Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. Clinical Cancer Research 2002;8(9):2894–901.

102. Nakada M , Okada YJY. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. Journal of the American Dietetic Association 2003;103(9):1099.

103. Zhao F, Noll DC, Nielsen JF, Fessler JA. "Intersection of mTOR and STAT signaling in immunity Diana," 2013;31(9):1713–23.

104. Gini B, Zanca C, Guo D, Matsutani T, Masui K, Ikegami S, "The mTOR kinase inhibitors, CC214-1 and CC214-2, preferentially block the growth of EGFRvIII-activated glioblastomas.," Clin. Cancer Res., 2013;19(20):5722–32.

105. C. Mecca, I. Giambanco, R. Donato, and C. Arcuri, "Targeting mTOR in glioblastoma: Rationale and preclinical/clinical evidence," 2018; 18;2018:9230479.

106. Z. Duzgun, Z. Eroglu, Avci CB. "Role of mTOR in glioblastoma," Gene 2016;575(2):187–90.

107. Miyata H, Ashizawa T, Iizuka A, Kondou R, Nonomura C, Sugino T, Urakami K, Asai A, Hayashi N, Mitsuya K, Nakasu Y, Yamaguchi K, Akiyama Y. Combination of a STAT3 inhibitor and an mTOR inhibitor against a temozolomide-resistant glioblastoma cell line. Cancer Genomics and Proteomics 2017;14(1):83–92.

108. Z. G. Ouédraogo, J. Biau, J.-L. Kemeny, L. Morel, P. Verrelle, E. Chautard, "Role of STAT3 in Genesis and Progression of Human Malignant Gliomas.," Mol. Neurobiol., 2017;54(8):5780–97.

109. H. Lee, A. J. Jeong, S. K. Ye, "Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy," BMB Rep., 2019;52(7):415–23.

110. Chen H, Yang Z, Ding C, Chu L, Zhang Y, Terry K, Liu H, Shen Q, Zhou J. "Discovery of O-Alkylamino Tethered Niclosamide Derivatives as Potent and Orally Bioavailable Anticancer Agents.," ACS Med. Chem. Lett., 2013;4(2):180–5.

111. Kanai M, Konda Y, Nakajima Y, Izumi Y, Kanda N, Nanakin A, Kubohara Y, Chiba T. "Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) inhibits STAT3 activity involved in gastric cancer cell proliferation via MEK-ERK-dependent pathway.," Oncogene, 2003;22(4):548–54.

112. F. Pancotti, L. Roncuzzi, M. Maggiolini, A. Gasperi-Campani, "Caveolin-1 silencing arrests the proliferation of metastatic lung cancer cells through the inhibition of STAT3 signaling.," Cell. Signal. 2012;24(7):1390–7.

113. C. Piperi, K. A. Papavassiliou, A. G. Papavassiliou, "Pivotal Role of STAT3 in Shaping Glioblastoma Immune Microenvironment," Cells, 2019;8(11):1–14.

114. Yang F, Hu M, Lei Q, Xia Y, Zhu Y, Song X et al. "Nifuroxazide induces apoptosis and impairs pulmonary metastasis in breast cancer model.," Cell Death Dis. 2015;6:.

115. Zhu Y, Ye T, Yu X, Lei Q, Yang F, Xia Y et al. “Nifuroxazide exerts potent anti-tumor and anti-metastasis activity in melanoma.,” Sci. Rep., 2016;6:20253.

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

PROJE NO:	2020/72
PROJE NİTELİĞİ:	TIPTA UZMANLIK

1-PROJE BAŞLIĞI

Glioblastoma (U-87) üç boyutlu tümör modelinde ruksolitinibin ve nifuroksazid ile JAK/STAT sinyal yolağının iki farklı düzeyde engellenmesi ve bunun anjiogenezisi engelleyici etkisi

2-PERSONEL BİLGİLERİ

	Adı ve Soyadı	Unvanı	Telefon
Proje Yöneticisi	Doç.Dr. Metin ORAKDÖĞEN	Doç.Dr.	(284)235-7641
Araştırmacılar	Arş.Gör.Dr. Merve YAZICI	Arş.Gör.Dr.	(284)235-7641

3-PROJE BÜTÇESİ

Teçhizatın Tanımı :	**Detay listesi ektedir.**
Ekonomik Kod	**Toplam Fiyatı (TL)**
03.05 Hizmet Alımı	
03.02 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımı	39,993.00
03.07 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım, Bakım ve Onarım Giderleri	
06.01 Mamul Mal Alımı	
TOPLAM ÖDENEK	39,993.00

3-PROJE GELİŞİMİ

1.Projenin Kabul Tarihi: 29-05-2020	**1.Ara Rapor** : 14-12-2020	**Sonuç :** ..... (+ / -)
2.Projenin Başlama Tarihi :15-06-2020	**2.Ara Rapor** : 14-06-2021	**Sonuç :** ..... (+ / -)
3.Projenin Bitiş Tarihi : 15-06-2022	**3.Ara Rapor** : 14-12-2021	**Sonuç :** ..... (+ / -)
4.Projenin Süresi: 24 Ay	**Sonuç Raporu** : 14-06-2022	**Sonuç :** ..... (+ / -)

5.İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE:

TIP FAKÜLTESİ / CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ

6.PROJENİN UYGULAMASI

1. Bu proje 2547 sayılı YÖK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58.maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi çerçevesinde yürütülür.
2. Proje süresinde ve harcama fasıllarında Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılamaz.
3. Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüm Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Enstitü Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe iletmekle yükümlüdür.
4. Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır.
5. Bir ay geçtiği halde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmamış projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, BAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır.

	Adı-Soyadı	**Tarih**	**İmza**
Proje Yöneticisi :	Doç.Dr. Metin ORAKDÖĞEN	12.06.2020	

Komisyon Başkanı

Prof. Dr. Osman Nuri HATİPOĞLU

Rektör Yardımcısı