



**SEFTRİAKSONUN EKSİTATÖR AMİNOASİT
TAŞIYICI 1 (EAAT1), EAAT2, EAAT3 BLOKERLERİYLE
BİRLİKTE KULLANIMININ SIÇAN GLİOBLASTOMA
MULTİFORME HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kemal Alp NALCI

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Yüksek Lisans Tezi-2016

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEFTRİAKSONUN EKSİTATÖR AMİNOASİT TAŞIYICI 1
(EAAT1), EAAT2, EAAT3 BLOKERLERİYLE BİRLİKTE
KULLANIMININ SIÇAN GLİOBLASTOMA
MULTİFORME HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kemal Alp NALCI

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

ERZURUM

2016

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SEFTRİAKSONUN EKSİTATÖR AMİNOASİT TAŞIYICI 1
(EAAT1), EAAT2, EAAT3 BLOKERLERİYLE BİRLİKTE
KULLANIMININ SIÇAN GLİOBLASTOMA MULTİFORME
HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kemal Alp NALCI

Tez Savunma Tarihi: 23.06.2016

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Zekai HALICI

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Damla ÇETİN

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Merkezi Sinir Sistemi	3
2.2. Glial Hücrelerinin Sınıflandırılması	5
2.2.1. Makroglialar.....	6
2.2.1.1. Astrositler.....	6
2.2.1.2. Oligodendro Glialar	8
2.2.1.3. Ependimal Hücreler	9
2.2.1.4. Radyal Glia Hücreleri	9
2.2.1.5. Schwann Hücreleri.....	9
2.2.2. Mikroglia Hücreleri	10
2.3. Glial Hücreler ve Hastalıkları	10
2.4. Glioblastoma Multiforme	11
2.5. Klinik Belirtileri.....	12
2.6. Tanı ve Evreleri	12
2.7. Etiyoloji	13
2.8. GBM Histopatolojisi.....	13
2.9. Tedavide Kullanılan Preparatlar	14

2.10. U-87MG Hücre Hattı	16
2.11. Glutamat.....	16
2.11.1. Glutamin – Glutamat Döngüsü	17
2.11.2. Glutamat Reseptörleri	18
2.11.3. Glutamat Taşıyıcıları	20
2.11.4. EAAT 1-2-3 Blokerleri	21
2.11.4.1. UCPH-101	21
2.11.4.2. TFB-TBOA.....	22
2.11.4.3. L-sistein	22
Şekil 2.11. L-Sistein.....	22
2.11.4.4. Seftriakson	22
Şekil 2.12. Na-Seftriakson	22
2.12. REAL TIME PCR.....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Malzemeler	25
3.1.1. Hücre Kültürü Cihazları.....	25
3.1.2. Sarf malzemeler	25
3.1.3. U-87MG Kültürü	25
3.1.4. MTT sitotoksisite Testi.....	26
3.2. Kanser Kültürü.....	26
3.3. MTT ile Sitotoksisite Testi	28
3.4. Gen Ekspresyonu	29
3.4.1. RNA İzolasyonu	29
3.4.2. cDNA sentezi.....	30
3.4.3. REAL TIME PCR.....	30

4. BULGULAR.....	31
4.1. Hücre Kültürü	31
4.1.1. Kanser Kültürü MTT Testi	31
4.2. REAL TIME PCR Analiz Sonuçları.....	33
4.3. Real-Time PCR Analiz Sonuçları.....	34
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR	43
EKLER	55
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	55
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	56

TEŞEKKÜR

Tezimin yapılmasında büyük desteğinden dolayı TÜBİTAK 113S083 nolu projeye en içten teşekkürlerimi bildiriyorum. ÖYP birimine iki genetik materyalin alımında verdiği destekten dolayı teşekkür ediyorum. Tezimin primer ve prob materyallerinin alımında, PCR ve RNA izolasyonunda kullanılan Qiagen cihazını kullanmamda bana verdiği büyük desteklerinden dolayı TÜBİTAK 113S083 nolu projeye en içten teşekkürlerimi bildiriyorum. ÖYP birimine tezimin yapımında kullandığım kimyasalların alımında verdiği destekten dolayı teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasında ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi ve desteği benden esirgemeyerek, her an yanımda olan tez yöneticim ve değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na sonsuz teşekkür ederek, kişisel ve akademik hayatta kendisine sağlıklar ve başarılar diliyorum.

Van yüzüncü yıl üniversitesinden Sayın Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR'a kanser hücrelerinin hazırlanmasında yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim. Bu tezi, yanımda dimdik duran ve her zaman destekleriyle ilerlememi sağlayan sevgili eşime hediye ediyorum. Her zaman bana umut ve öğütler ile bir hayat yaşatan, sevgili Annem ve değerli Babama sağlık ve mutluluk dolu bir yaşam arzu eder teşekkür ederim. Tezimin farklı kısımlarında yardımcı olan ekip arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Kemal Alp NALCI

ÖZET

Seftriaksonun Ekzitatör Aminoasit Taşıyıcı 1 (EAAT1), EAAT2, EAAT3 Blokerleriyle Birlikte Kullanımının Sıçan GBM Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı; seftriaksonun EAAT1,EAAT2 ve EAAT3 blokerleri ile birlikte kullanımının, GBM hücrelerindeki SLC1A1, SLC1A2 ve SLC1A3 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılması ve MTT testi ile kanser hücreleri üzerindeki sitotoksitenin incelenmesidir.

Mataryel ve Metod: Bu çalışmada, Slc1a-1, Slc1a-2 ve Slc1a-3 genlerinin ekspresyon düzeyleri Real-TimePCR ile ve sitotoksitate testleri ise MTT yöntemiyle ile belirlendi. İstatistiksel analiz One-Way ANOVA SPSS 20.0 ile değerlendirildi.

Bulgular: In-vitro sonuçlarımıza göre kullandığımız inhibitörler en yüksek canlılık oranını göstermektedirler. En düşük canlılık seftriakson ve tüm grupların birlikte kombinasyonlarında görülmektedir. Gen ekspresyonu sonuçlarımıza göre tranporter ekspresyonları tüm inhibitör ilaçlarımızda kontrole göre büyük düşüş göstermektedir. Saf sektriakson grubunda EAAT1 hariç diğer transporterların ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Seftriaksonun EAAT2 üzerindeki aktive edici etkisine rağmen TFB-TBOA grubu seftriaksonla birlikte kullanıldığında ekspresyonu arttırmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Seftriakson grubunun hücre canlılığı bakımından diğer gruplara kıyasla en çok hücre ölümüne sebep olan grup olduğunu gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre Seftriakson özellikle SLC1A2 ve kısmen SLC1A1 geninin ekspresyonlarını artırmıştır. Zıt özellikler gösteren iki madde olan Seftriakson ve TFB-TBOA birlikte kullanıldığında TFB-TBOA'nın bloke edici etkisinin seftriaksonun aktive edici etkisine baskın geldiğini gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: EAAT1, EAAT2, EAAT3, GBM, MTT, REAL TIME PCR, Seftriakson.

ABSTRACT

In-Vitro Evaluation the Effects of Ceftriaxone With/Without Excitatory Amino Acid Transporter(EAAT1), EAAT2, EAAT3 Blockers on GBM Cell Line

Aim: The aim of this study is in-vitro evaluation the effects of ceftriaxone with/without Excitatory Amino Acid Transporter(EAAT1), EAAT2, EAAT3 blockers on GBM cell line, to figure out the SLC1A1, SLC1A2 ve SLC1A3 expression levels and to determine cell survival with MTT test.

Matherial and Method: In this study Slc1a-1, Slc1a-2 ve Slc1a-3 gene levels measured with REAL TIME PCR and the cytotoxicity measured with MTT test. The statistical analyze is evaluated with One-Way ANOVA SPSS 20.0.

Results: According to our in-vitro results our inhibitors showed the highest survival rate. Other hand the least survival rate is observed at ceftriaxone and it's combination with other groups. In accordance with our gene expression results, the transporter expressions showed big decrease with inhibitör drugs compare to control group. In alone ceftriaxone group all transporter expressions increased but EAAT1 . In spite of ceftriaxone's activator effect on EAAT2, in TFB-TBOA+Ceftriaxone group the EAAT2 expression didn't increase.

Conclusion: Compare to other groups ceftriaxone showed the least cell survival rate. Considering our results ceftriaxone specially SLC1A2 expression and relatively SLC1A1 expression. When two controversial compound ceftriaxone and TFB-TBOA are used at the same time the inhibitor effect of TFB-TBOA is potent to the activator affect of ceftriaxone.

Key Words: Ceftriaxone, GBM, EAAT1, EAAT2, EAAT3, MTT, Real-Time PCR

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMP	: Adenozin mono fosfat
AMPK	: AMP Kinaz
CCND1	: cycline D1
CT	: Bilgisayar Tomografi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FBS	: Fetal Dana Serum
FDA	: Food and drug administration
GBM	: Glioblastoma Multiforme
Gy	: Gray
HDL	: High Densiti Lipo Protein Colestrol Seviyesini
HIF1a	: Hipoksi indüklenabilir faktör 1a
IC50	: İnhibitör Doz
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IR	: İnsülin reseptörü
KBE	: Kan Beyin Engeli
LDL	: Low Densiti Lipo Protein Colestrol Seviyesini
MAPK	: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MET	: Metformin HCL
MRI	: Manyetik Resonans Görüntüleme
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mTOR	: Mamalian Target Of Rapamisin

MTT	: [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid]
NBM	: Nöro Bazal Medyum
PBS	: Fosfat İle Tamponlanmış Tuz Çözeltisi
PI3K	: Phosphoinositide 3-Kinase
PKB	: Protein Kinaze B
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
S6K1	: Ribozomal S6 kinaz; hücre metabolizmi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. MSS ve PSS.....	3
Şekil 2.2. Makroglia ve Mikroglia.....	4
Şekil 2.3. Glial hücrelerin değişik görüntüleri	5
Şekil 2.4. Değişik morfolojideki astrositler.....	8
Şekil 2.5. GBM doku kesiti	14
Şekil 2.6. Ucph-101	21
Şekil 2.7. TFB-TBOA	22
Şekil 2.8. L-Sistein	22
Şekil 2.9. Na-Seftriakson.....	22
Şekil 3.1. U-87MG hücrelerin görünümü.....	27
Şekil 4.1. U-87MG hücreleri için % canlılık oranları- MTT test grafiği	32

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. İn-vitro deneyi için kullanılan dozlar.....	28
Tablo 4.1. U-87MG hücreleri için % canlılık ve istatistiksel verileri.....	33
Tablo 4.2. U-87MG hücrelerin SLC1A1 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri	34
Tablo 4.3. U-87MG hücrelerin SLC1A2 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri	36
Tablo 4.4. U-87MG hücrelerin SLC1A3 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri	37

1. GİRİŞ

GBM (Glioblastoma multiforme), son derece saldırgan bir kanser türü olmakla beraber, sinir sistemi kapsamında değerlendirilen glial hücrelerden köken almaktadır. Primer bir beyin tümörü olan GBM, beyin kanseri nedeniyle meydana gelen ölümlerin %77'sinin sebebi olarak kaydedilmiştir. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi gibi pek çok işlemi kapsayan bir tedavi yaklaşımı ile GBM tümörüne sahip hastaların tedavi edilmesi amaçlanmaktadır.

Her ne kadar multidisipliner bir yaklaşımla tedavi edilmeye çalışılıyor olsa da GBM tümörünün kesin olarak bir tedavisi ortaya konulmuş değildir. Bir veya daha fazla kimyasal nitelikteki ilacın kullanılmasıyla kanser hücrelerini ortadan kaldırmayı hedefleyen kemoterapi tedavi yönteminde, kemoterapötiklerin sağlıklı hücreler üzerinde de olumsuz etkileri olması bu tedavi yönteminin kullanımını sınırlandırmaktadır. Neden olduğu bu yan etkiler sebebiyle kemoterapötiklerle yapılması hedeflenen tedavi şekilleri üzerine çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Sağlıklı hücreler üzerine olumsuz etkilerde bulunmayacak, tümör hücresi hedefli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar son dönemlerde büyük önem kazanmıştır.

Tümör hücrelerine yönelik spesifik bir tedavi yaklaşımı kapsamında, öncelikli olarak GBM hücrelerinin glutamatla ilişkisinin anlaşılmasının önemli olduğu açıkça görülmektedir. Bu doğrultuda yaptığımız çalışmada, GBM U87-MG kanser hücre hattının öncelikle glutamat taşıyıcılarının bloklanması, ardından bu taşıyıcıların seftirakson ile aktif hale getirilmesi amaçlandı. Hemen akabinde bu işlemin sonucu olarak glutamat taşıyıcılarını ifade eden genlerin ekspresyon seviyesinde değişiklik olup olmadığına bakılarak, bu sürecin hücre toksisitesi üzerine etkisinin incelenmesi hedeflendi.

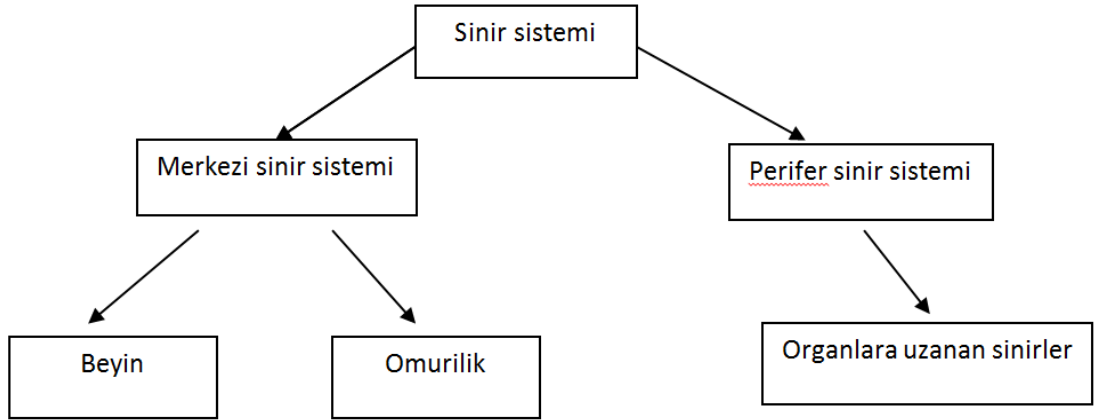
Elde edilen veriler doğrultusunda GBM hücrelerinin hücre hedefli yok edilmesi noktasında, glutamat taşıyıcılarının gen ekspresyon seviyelerinin anlaşılması sağlanabilecek, bu kapsamda yeni tedavi yaklaşımları geliştirilebilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Merkezi Sinir Sistemi

İnsan vücudunda yer alan sinir sistemi temelde ikiye ayrılarak, merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olarak ifade edilmektedir (Şekil 1.1). PSS'nin asıl görevi, dış dünyadan insan vücuduna ulaşan algı ve duyuları, gelen uyarıya özgü olan MSS bölgesine iletmektir.

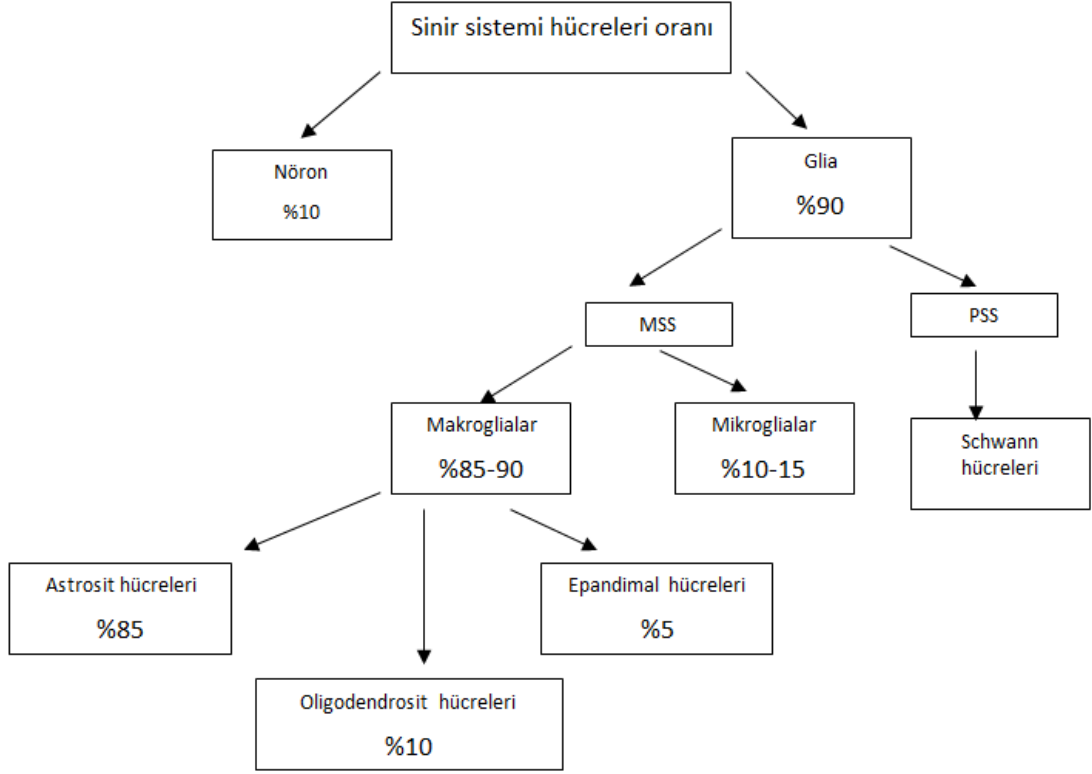


Şekil 2.1. MSS ve PSS

İnsan sinir sistemi kapsamında iki farklı hücreden temel anlamda söz etmek mümkün olmaktadır: Nöron ve glial hücreler. Sinir sisteminde hücre kitle oranına baktığımızda bu sistemin %10'unu nöronlar ve %90'nını glial hücreleri oluşturmaktadır (Şekil 2.2)¹ Glial hücrelerin isimleri, Yunanca bir kelime olan “Gli” kelimesinden gelmekte, bu kelimenin de Yunan dilindeki karşılığı yapışkan, yapışkan görünümlü olarak ifade edilmektedir. İlk kez 1858 yıllarında bu kelime patolog Rudolf Ludwig Karl Virchow tarafından sinir macunu terimi olarak kullanılmıştır².

Glia hücreleri canlılar aleminde yer alan omurgasızlar sınıfından, memelilere kadar oldukça geniş bir aralıkta canlı grubunda yer almaktadır. Bu hücrelerin farklı canlılarda değişik biçim, form ve şekillere sahip olduğu görülmektedir. Bir canlının büyüklüğü ne kadar fazla ise, sahip olduğu glial hücre miktarı da bu büyüklükle doğru

orantılı bir biçimde artış göstermektedir. İplik kurdunda birkaç adet glial hücresi, meyve sineği beyninin %25'i, rat beyninin %65'i, insan beyninin %90'ı ve fil beyninin %97'sinin glial hücre olduğu saptanmıştır ². Gelişmişlik oranına paralel olarak canlılarda yer alan glial hücrelerin miktarı kadar çeşitliliği, fonksiyonu ve gerekliliği de doğru orantılı bir biçimde artış göstermektedir.



Şekil 2.2. Makroglia ve Mikroglia

Nöronların çevresini çepeçevre saran, nöronlara fiziksel destek sağlayan glial hücreler, oksijen ve besin alımı konusunda da nöronlara yardımcı olmaktadır. Ayrıca, atıkların uzaklaştırılması, nöron iletişimi, patojenlerden ortadan kaldırılması, ölen hücre ve nöronların temizlenmesine kadar çeşitli görevlerde yer almaktadırlar³.

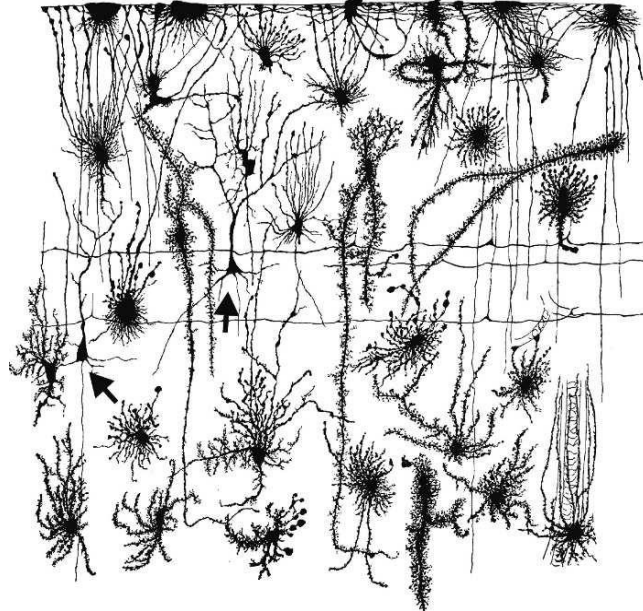
Sinir sisteminde yer alan bu iki temel hücrenin birbirinden farklı olduğu pek çok nokta söz konusudur. Nöronlar gelen uyarılara karşılık olarak bir aksiyon potansiyeli oluşturmaktadır. Ancak glial hücrelerin böyle bir fonksiyon gerçekleştiremediği bilinmektedir. Glial hücreler mitoz evreyi tamamladıklarından bölüne bilmektedirler

ancak nöronlar post-mitotik evrede kaldıklarından mitoz bölünmeyi tamamlayamazlar dolayısıyla bölünmeleri gerçekleşmez ^{3,4}.

Bu iki hücre türünün tek ortak yönü ektodermden köken almalarıdır³. Embriyogenezin ilk aşamasında, glial hücreler farklı prekürsör moleküller salgılayarak akson ve dendrit gelişimine, nöron göçüne ve nöronların lokalizasyonuna rehberlik ederler ^{1, 5}. Glial hücreler çok daha dinamik bir yapıya sahip olması ve plastisitesi ile diğer hücrelerden ayrılmaktadır. Glial hücreler, hücre-hücre, hücre-matriks ilişkisi bakımından da farklılık göstererek, nöronlara kıyasla çok daha esnek bir iletişim yapısında olduğunu ortaya koymaktadır. Bu özellik onların MSS içerisinde, kemokinlerin sinyallerine göre göç edebilmelerini sağlamaktadır ⁵.

2.2. Glial Hücrelerinin Sınıflandırılması

Glial hücrelerin sınıflandırılmasında kullanılan parametreler; hücrenin morfolojisi, fonksiyonu ve yerleşim gösterdiği konumu olarak belirlenmiştir. Bu üç parametreye göre glial hücrelerin sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Glial hücrelerin değişik görüntüleri ³

MSS kapsamında yer alan iki hücre grubu vardır: Makroglia ve mikroglia. PSS kapsamında ise yalnızca Schwann hücreleri yer almaktadır. MSS’nde yer alan makroglia hücre grubu beyin % 90’ını oluşturmakta olan glial hücrelerin %85-90’lık kısmını teşkil etmektedir. Mikroglialar ise, sinir sisteminde yer alan glial hücrelerin %10-15’ini oluşturmaktadır. Makroglialar ile mikroglialar embriyonik köken açısından farklılık arz etmektedir. Makroglialar ektodermden gelişmişken, mikroglialar hematopoetik dokudan köken almışlardır. PSS ‘nin yegane hücrelerinden olan ve omurilikte yer alan schwann hücreleri ile satellit hücrelerinin kökeni ise nöronal kresttir.

2.2.1. Makroglialar

2.2.1.1. Astrositler

Glial hücrelerin büyük bir çoğunluğunu oluşturmakta olan makrogliaların büyük bir bölümünü astrositler teşkil etmektedir. Glial hücrelerin %80’ini oluşturmakta olan astrositlerin fonksiyonel açıdan beyin en önemli grubunu oluşturduğu bilinmektedir (Şekil 1.4). Yunancada yıldız anlamına gelen ‘astro’ kelimesinden türetilmiş isme sahip olan astrositler, beyin farklı bölümünde yer alan diğer astrositlerle iletişim kurabilme kapasitesindedirler. Bu iletişim kabiliyeti elektriksel iletiden değil, yarattıkları Ca^{+2} iyon dalgasından ileri gelmektedir. Elde edilmiş olan bu bulgular dolayısıyla, astrositlerin beyinde düşünülenden çok daha fazla role sahip olması durumu son zamanlarda yapılan araştırmalara konu olmaktadır.

Bazı fonksiyonlar:

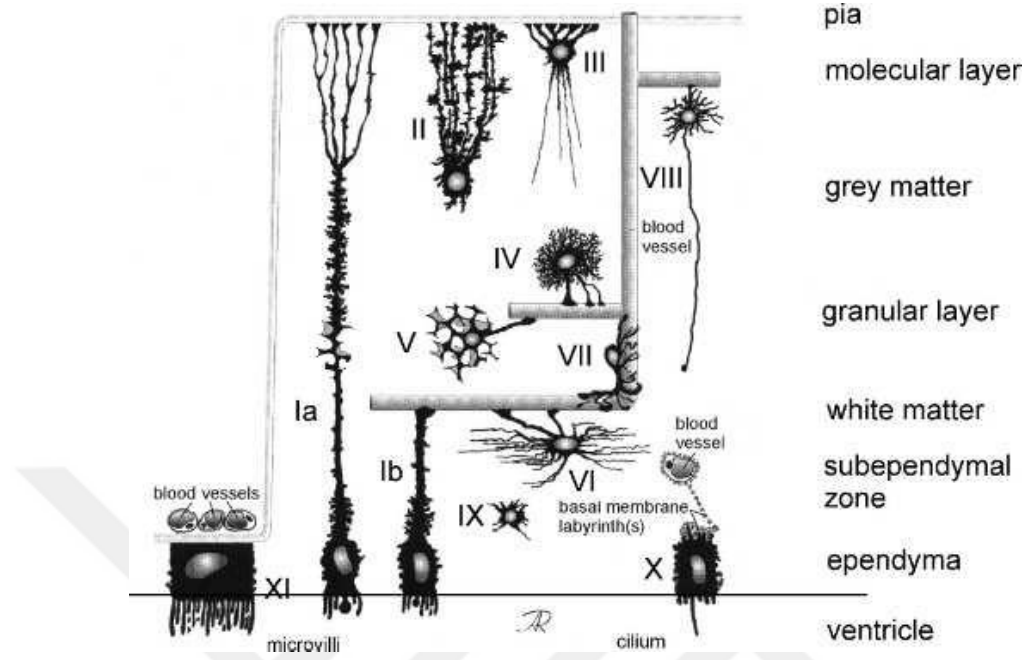
- 1- Pek çok hormon ve sitokin salgılayarak embriyonik dönemde nöronların beyin farklı bölgelerine göç edip yerleşmelerini sağlamaktadır.
- 2- Nöron hücrelerine destek vererek, ihtiyaç duydukları O_2 ve besini tedarik etmektedir.

- 3- Nöron-astrosit iletişimini düzenlemek adına, astrositler hücre zarlarında yer alan nörotransmitter ve hormon reseptörlerine bağlanan Ca^{+2} iyon yolağını aktif ederler.
- 4- Bilgi süreci.
- 5- Sinaps plastisitesini düzenler.
- 6- Beyne girecek olan kan miktarını ayarlamak adına kan beyin bariyeri (KBB) dengesini sağlamak adına pek çok madde salınımı sağlayarak damar çapında gerçekleşecek genişliği kontrol altında tutarlar ve bunun yanında nöron aktivitesinin artışında denge sağlayabilmek adına kan akışını artırırılar.
- 7- Beyinde yer alan K^{+} iyon seviyesini korurlar.
- 8- Daha önce salgılanmış olan nörotransmitter maddelerin yeniden nöronal iletim sirkülasyonuna katılımını sağlarlar.
- 9- Fonksiyonları dolayısıyla pek çok hastalıkla ilişkilidirler: Depresyon, Alzheimer, nöronal dejenerasyon ve rejenerasyon, Multipl Skleroz, Amyotrofik Lateral Skleroz, hepatik ensefalopati, hafıza kaybı ve çeşitli metabolik hastalıklar gibi.

Morfolojik olarak farklılık göstermesi dolayısıyla protoplazmik ve fibroz şeklinde iki farklı astrosit türü vardır. Dış görünimleri farklı olsa dahi, protoplazmik ve fibroz astrositlerin görevleri birbirilerine oldukça benzerdir. Morfolojileri bakımından protoplazmik astrositler, çok sayıda, kısa, kalın uzantılara sahip olan ve gri cevherde kendine yer edinen hücrelerdir. Sahip oldukları bu uzantılar ile nöronların hücre gövdesinden sinaptik kısımlarına doğru uzama sergilemektedirler.

Protoplazmik astrositler de kendi içlerinde morfolojik olarak çeşitlilik arz etmektedir. Bulundukları konumlar, sahip oldukları reseptör ve transporterler

bakımından ön beyin ve arka beyinde yer almakta olan astrositlerin birbirinden farklı olduğu görülmektedir.



Şekil 2.4. Değişik morfolojideki astrositler⁶

*Ia-pial tanisit, Ib damar tanisiti, II radyal astrositi, III marginal astrosit, IV protoplasmik astroit, V valet astrositi, VI fibroz astrosit, VII pre vaskular astrosit, VIII interlaminar astrosit, IX imaçür astrosit, X epandim hücreleri ve XI kroid pleksus hücreleri.

Protoplasmik astrositlerin tersine, fibroz astrositler üzerinde dallanmanın az olduğu, tek ve uzun bir dala sahip oldukları ve yerleşkelerinin de genellikle ak cevher olduğu görülmüştür. Fibroz astrositler çoğunlukla beyaz maddede bulundukları için nöronların aksonlarıyla irtibat halindedirler³.

2.2.1.2. Oligodendro Glialar

Oligodendro glialara oligodendrosit de denilmektedir. Bu hücreler makroglia hücre grubunun %15'lik bir kısmını oluşturmaktadır. Nöronların yalıtımını sağlayan lipid yapısındaki myelin maddesiyle aksonları örtme görevine sahiptirler. Elektriksel iletim hızını artıran bu yalıtım işlemi, myelinleşme adı verilen bir olayla gerçekleşmektedir. Bu olayın temelinde akson üzerinde yer almakta olan iyon kanallarının kümeleşmesi yer almaktadır. Olası hasar durumunda, myelinleşme bozulur

ve dolayısıyla bazı hastalıkların gelişmesine (örneğin Multipl skleroz ve kalıtsal nöropati) neden olur³.

2.2.1.3. Ependimal Hücreler

Makroglia hücre grubu kapsamında yer almakta olan ependimal hücreler, yani ependimositler, bu hücre grubunda %5'lik bir yer kaplamaktadır. Bu hücrelerin görevi kapsamında ventriküllerin çeperlerini kaplamak yer almaktadır. Bunun yanında beyin omurilik sıvısını üretmektedirler. Ayrıca üretimini gerçekleştirdikleri bu sıvının ventriküllere salınımını sağlamaktadırlar. Bu fonksiyonlar genel olarak beyin basıncının dengede kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu hücreler, beyni mekanik darbelere karşı koruma görevine de sahiptirler. Nöron hücreleri ile glial hücreler arasında kalan sıvının yeniden kan dolaşımına katılmasını sağlayan hücreler de ependimositlerdir.

2.2.1.4. Radyal Glia Hücreleri

Nöroepitel hücrelerden köken almakta olan radyal hücreler, nöroepitel hücrelere kıyasla çok daha az miktarda farklılaşma kabiliyetine sahiptir. Bu hücreler embriyogenik sinir sisteminin gelişim sürecinde nöronların göç etmesinde sorumluluk üstlenmiştir. Nöron hücrelerinin yerleşimi tamamlandıktan sonra bu hücreler protoplazmik astrositlere dönüşürler³. Evrimi tamamlanmış beyinde, radyal glia hücreleri beyincikte (bregmann glial hücreleri) ve retinada (Müller hücreleri) bulunurlar⁷.

2.2.1.5. Schwann Hücreleri

Glial hücre grubu kapsamında yer alan hücrelerin omurilikte yer alan kısmıdır. PSS grubu içerisinde sayılan bu hücreler, aynı zamanda oligodendrositlerin de üstlendikleri akson yalıtımı görevi yerine getirmektedir. Sinaps oluşumunda yardımcı hücre tipidir³.

2.2.2. Mikroglia Hücreleri

MSS kapsamındaki hücre grupları arasında yer almakta ve bu hücre gruplarının %10-15'lik kısmını oluşturmaktadırlar. Nörondan gelişmemişlerdir. Mikroglialar mezodermden gelişmiştir ve hematopoetik kökene sahiptir. Morfolojileri dikdörtgen yapıda ve heterojen bir görünüm sergilemektedir. İsminden de anlaşılacağı gibi bu hücrelerin boyutları makroglialara kıyasla çok daha küçüktür. Erken gelişim evrelerinde beyne yerleşen makrofajlar, mikrogliaların kökenini teşkil etmektedir. Fagosit özelliği ve göç edebilme yeteneğine sahiplerdir ³. Beyin parankimasında bir hasar oluşum durumu söz konusu olduğunda, mikroglialara o çevrede yer almakta olan hücrelerden gönderilen sinyaller neticesinde bu hücreler fonksiyon göstermektedir. Ortaya çıkan hasarı tespit eder, enfeksiyon olup olmadığını saptar ve bu doğrultuda çoğalarak hasarlı dokuyu, ölü hücreleri ortadan kaldırır. Bağışıklık sisteminde yer alan makrofajların sahip olduğu fagositoz kabiliyeti, bu hücrelerde aynı oranda yer almamaktadır. Mikrogliaların bu hasarlı dokuyu ortadan kaldırma özelliği, özellikle sinir sisteminin gelişimi sırasında ortaya çıkan anormal ve doğru olmayan sinaptik oluşumlarını yok etmede önem kazanmaktadır. Bu durumun akabinde sinapsları yeniden şekillendiren ve nöronal ağı yapılandıran yine mikroglia hücreleridir. Bu fonksiyonları kapsamında dejeneratif nöronal hastalıkların ortaya çıkması halinde mikrogliaların da efektif bir form kazandığı belirlenmiştir. Ama aktif hale gelen mikrogliaların bu hastalıkların iyileşme sürecine nasıl katkı sağladıkları tam olarak bilinmemektedir ³.

2.3. Glial Hücreler ve Hastalıkları

Sinir sisteminde yer alan hücrelerin %90'lık kısmını glial hücreler oluşturmaktadır. Bu yüzden sinir sistemi ile ilgili her türlü hastalığın (glial kanserler, travmatik hasarlar, felce neden olan hastalıklar, omurilik hasarları, epilepsi nöbetleri, Alzheimer hastalığı, Parkinson, otizm vb.) patogenezinde yer almaktadırlar⁸. Omurilikte

bir hasar oluşması halinde, astrositlerin bağ dokusuna dönüştüğü ve bu durumun aksonların yenilenmesinin önüne geçtiği anlaşılmıştır. ALS hastalığında ise astrositlerin salgıladıkları toksik etkiye sahip bir madde dolayısıyla motor nöronları yok ettiği görülmüştür. Otoimmün hastalıkların sinir sisteminde vuku bulan halleri söz konusu olduğunda, en çok zararı oligodendrosit hücreleri görmektedir. Ayrıca astrositlerin hasarı sonucu ortaya çıkan en ölümcül hastalıkların başında “gliomalar” gelmektedir^{1, 3, 7, 8}.

2.4. Glioblastoma Multiforme

1863 yılında Virchow tarafından Glioblastoma multiforme (GBM) ilk defa tanımlanmıştır. 1914’te Mallory tarafından spongioblastoma, 1926’da yılında Bailey ve Cushing tarafından GBM terimi kullanılmaya başlandı. GBM, 1940 yılından itibaren, Hans-Joachim tarafından primer ve sekonder olarak 2 alt tipe ayrılmıştır⁹. Beyin kanser vakalarının %90-95’lik kısmını GBM oluşturmaktadır. Ortaya çıkmasıyla başlayan ilk üç aylık süre içerisinde klinik belirtileri oldukça hızlı bir şekilde kendini gösterir. Sekonder GBM ise %5-10’luk kısımda yer almaktadır. Bunun yanında sekonder GBM vakalarının genel olarak kökeni, düşük dereceli astrositom ve anaplastik astrositomadır. Nispeten genç bireylerde görülen sekonder GBM’in klinik belirtilerinin ortaya çıkış süresi ayları, hatta bir yılı dahi bulabilmektedir. Her sene, 100,000 kişiden 5-6 kişiye beyin tümörü teşhis konulur ve bu vakaların %80’ini GBM teşkil eder¹⁰.

Beyin kanserleri içerisinde GBM oldukça önemli bir yere sahiptir. World Health Organization (WHO)’e göre habis GBM’ler grad III.IV. içinde yer almaktadır. WHO tanımında belirtilen seviyeler çekirdek yapısı, mitotik aktivite, damarlanma, nekroz, çoğalma hızı, klinik belirtileri ve tedaviye verilen yanıtı göre belirlenmiştir¹¹. GBM, Amerika’da her yıl teşhisi yapılan 10.000 vakada yer almakta ve her 100.000 kişiden 3’ünün ölümüyle sonuçlanan bir hastalık olarak anılmaktadır. GBM’in diğer beyin

kanserleri içerisindeki yerine bakılacak olursa, MSS habis tümörlerinin %45,5'lik kısmını, primer habis tümörlerin tamamını ve habis gliomaların %54,4'lük kısmını kapsadığı açıkça görülebilmektedir. GBM'in görülme sıklığı 45-70 yaş arasındadır¹². 64 yaşlı olan erkeklerde teşhis edilen GBM vakaları aynı yaşta olan kadınlara göre 1,5 kat daha fazladır ve beyaz ırklarda görülme sıklığı siyah ırklara göre 2 kat daha fazladır¹³.

2.5. Klinik Belirtileri

GBM teşhisine sahip hastaların sahip olduğu ilk klinik belirtiler; baş ağrısı, bulantı, kusma, görsel bozukluklar (çift görme, odaklanma bozuklukları vb.), hafıza kaybı, artmış kafa içi basıncı, motor işlev bozukluğu (kısmi felç, ayakta durmakta zorluk vb.), konuşma bozuklukları, konvülsiyon, kişilik değişikliği ve nöbetler olarak görülmüştür. Kanser dokusunun yer aldığı beyin bölgesine göre GBM teşhisli hastaların klinik belirtileri değişmektedir. GBM'in ilk teşhisi Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) cihazıyla yapılmaktadır¹⁴.

2.6. Tanı ve Evreleri

Klinik olarak kendini gösteren belirtilerin ardından kullanılan ilk görüntüleme sistemi radyografik yöntemlerdir. Bu yöntemler içerisinde; MRI, bilgisayar tomografisi (CT), T1 ve T2 görüntüleme yer almaktadır. Bu yöntemlerde kontrast madde kanser bölgesine tutulur ve hiperdens bir görüntü verir ayrıca kanserin iç bölgesi sıvı veya nekroz olduğu için hipodens bir görüntü verir (Şekil 1.5)¹⁵. Bu yöntemlerle elde edilen filmlerde, kanser çapının yanında, o çap boyutuna sahip ödem de görülmektedir.

Kesin tanının yapılabilmesi patolojik bulgular neticesinde olabilmektedir. Bu amaçla cerrahi işlemler yapılmakta, GBM dokusu olabildiğince temizlenmekte ve çıkarılan kanserli dokunun bir kısmı patoloji bölümüne gönderilmektedir (Şekil 1.6).

2.7. Etiyoloji

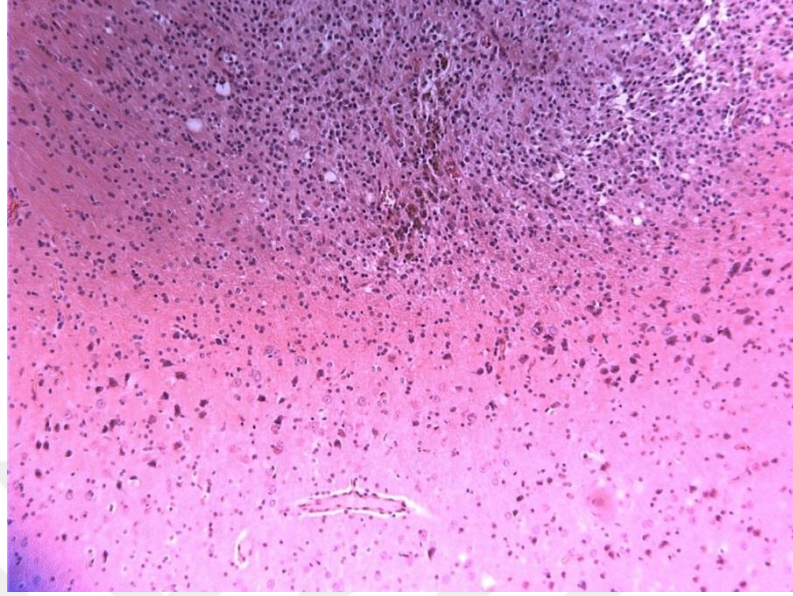
Beyin kanseri, beyin dokusunun oldukça karışık bir yapı olması dolayısıyla çok farklı hücrelerde meydana gelebilmektedir. Beyin dokusunun büyük çoğunluğunu glial hücrelerin oluşturması dolayısıyla, beyin kanserlerinin de büyük çoğunluğunu GBM oluşturmaktadır. GBM'in nedenleri araştırıldığında, kesin bir sonuç elde edilemese de çevresel ve genetik faktörlerin etkilerinin olduğu açıkça görülmüştür. Bu faktörlerin bazıları GBM oluşumu için uygun ortam oluşumuna neden olmaktadır. Faktörlerin çevresel olanları; iyonize ışığa ve pestisit maruziyeti, sigara kullanımı, petrol arındırma ya da sentetik madde üretimi yapan fabrikalarda işçi olmaktır¹⁶. Genetik faktörler ise; 10. kromozomda heterozigosite, 10. kromozomun q kolunda PTEN/MMAC 1 de mutasyon, 7. kromozom EGFR ekspresyonunda artış ve p53 geni mutasyonudur^{17, 18}.

2.8. GBM Histopatolojisi

GBM hücrelerinin görünüşleri daha çok atipik astrosit yapısında, polimorfik, infiltratiftir. Bunun yanında çekirdeği koyu, aktif bir biçimde bölünen, merkezinde nekrotik hücreler barındıran ve bu kapsamda farklı hücre tiplerini de içerisinde ihtiva eden bir yapıdadır. Ayrıca GBM dokusu, damarlı bir yapıya sahiptir.

GBM dokusunun genel olarak görüldüğü beyin bölgeleri; subkortikal bölge, özellikle de parietal, temporal ve frontal bölgenin sınırları olarak bilinmektedir. Frontal lobda yer alan GBM türlerinin diğerlerinde bulunanlara kıyasla daha bening yapıda olduğu kaydedilmiştir. Corpus collusumda bulunan GBM türlerinin daha malign yapıda olduğu görülmüştür. Bu türün morbidite ve mortalitesinin daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Bunun sebebi cerrahi açıdan daha hayatı ve derin bölgeleri işkâl etmesi aynı zamanda tümörün daha invaziv olmasındandır (Şekil 1.7)¹⁹⁻²¹. Metastaz durumu GBM türü kanserde çok sık rastlanılmayan bir durum olsa da, başarısız bir cerrahi

operasyon kanserli dokunun hasar görerek beyin içinde metastaz yapmasına neden olabilmektedir.



Şekil 2.5. GBM doku kesiti

2.9. Tedavide Kullanılan Preparatlar

Günümüzde 70 yaşını geçmemiş GBM teşhisi konulan hastalarında cerrahi yöntem, ışıın tedavisi ve kimyasal tedavi ile rutin olarak tedavi gerçekleştirilmektedir²². Semptom giderici tedavi şekli olarak deksametazon gibi glukokortikoidlerin kullanımı daha çok cerrahi operasyon öncesinde yaygındır. Glukokortikoidler, damar geçirgenliğinin artması sonucu oluşan ödemi ve artan BOS'u dengelemeye yardımcı olur²³.

GBM teşhisi koyulmuş hastalara cerrahi operasyon uygulanmasının nedeni, temelde kanserin daha geniş ölçüde yayılmasının önüne geçmek, artan beyin içi basıncın dengelenmesini sağlamak ve hastada var olan kanser türünün belirlenmesinde kesin bir tanı koyulabilmesidir. Cerrahi yönetime başvuruda dikkate alınacak hususlar; kanser kitlesine erişim, kanser lokalizasyonu, hayatı önem taşıyan nöronal çekirdeklere yakınlık, yayılım şeklidir²⁴. Ayrıca günümüzde kullanılan mikro-cerrahi sayesinde operasyon sırasında ki ölüm oranı %8'den %1,7'ye çekilmiştir^{25, 26}. Beyaz cevher ve gri

cevher sınırına lokalizasyonu sonucu metastatik bir görünüme bürünür²⁷. Ayrıca infiltratif ve 3 boyutlu görünüme sahip olması, cerrahi yöntemle tamamen alınamaması, tedavinin başarısız olması ve GBM'in nüksetmesine neden olan sebeplerdendir²⁸.

Cerrahi operasyonlar neticesinde temizlenemeyen kanser dokuları ve bunun yanında cerrahi olarak ulaşılması zor olan bölgelerde vuku bulan kanserlerin yok edilmesi noktasında ışın tedavisinden yararlanılmaktadır. Verilen nükleer ışın dozu 45-70 Gy arasındadır. Cerrahi yöntemle kombine kullanıldığı zaman sağ kalım süresini ortalama 3-4 ay uzattığı tespit edilmiştir²⁹. Verilen yüksek ışın dozu beyin dokusunda tahrip ve nekroza neden olmakta, bu yüzden total verilen ışın 2 Gy'i, 6 haftada (haftada 5 gün, toplam 6 hafta) toplam 60 Gy'i geçmemektedir^{30, 31}. Ayrıca tedavi seyrinde düşük ve yüksek Gy doz arasında anlamlı bir fark bulunmaması nedeniyle düşük doz Gy verilmesi tavsiye edilmiştir³².

GBM dağılımı ve cerrahi sonrası beyinin farklı bölgelerine yayılan tekli veya çoklu kanser hücreleri sistemik yolla verilen kemoterapi ve adjuvant terapisiyle yok edilmeye çalışılır³³. Günümüzde yaygın olarak temozolamid, karmustin, vinkristin, bevacizumab tek başlarına veya birkaçı kombine olarak kullanılmaktadır^{34, 35}. Temozolamid, sıklıkla kullanılan guanin rezidülerinin N-7 ya da O-6 pozisyonlarını alkiler ve metiller bir ajandır. Kanserli hücrelerde ilaç direncine neden olan MGMT (O-6-metilguanin-DNA metil transferaz) geninin ekspresyonunu baskılayarak etki gösterir³⁶. Temozolamid eş zamanlı olarak ışın tedavisiyle kombine olarak kullanılır, başlangıç dozu günde 75 mg ve 200 mg'a kadar yükseltilir. Yan etki olarak kemik iliği baskılanması (trombositopeni) gözlemlendiği zaman doz düşürülür^{37, 38}.

GBM kanser türü, tüm bu tedavi süreçlerine rağmen yüksek olasılıkla tekrarlanmaktadır. Hastalığın teşhis ve tedavisinde gerçekleştirilen pek çok çalışma

olmasına rağmen bu hastalıkta sağ kalım süresi 12-15 ay ile sınırlıdır (ortalama 14 ay). Ayrıca 2 seneye uzayan sağ kalım oranı %3.3 ve 3. sene için %1.2'dir³⁹⁻⁴¹.

2.10. U-87MG Hücre Hattı

Bu hücre hattı 1966 yılında Kafkasya'da yaşamakta olan 44 yaşındaki bir hastadan elde edilmiştir. U-87MG hücre hattında yer alan hücrelerin kromozom sayısının 44 olduğu ve hücrelerin adherent yapıda olduğu keşfedilmiştir. Bu hücrelerin daha çok epitelyal hücrelerin görünümüne benzediği saptanmıştır. Genetiğine bakıldığı zaman, 512 mutasyon (dislokasyon, delesiyon, insersiyon) gözlemlenmiştir⁴².

2.11. Glutamat

En önemli eksitator aminoasitlerden olan L-glutamat, merkezi sinir sistemindeki en önemli nörotransmitterlerdendir; algı, bellek ve öğrenme gibi birçok önemli beyin fonksiyonundan sorumludur.⁴³ Ayrıca merkezi sinir sisteminin gelişiminde, sinaps indüksiyonu ve eliminasyonu, hücre migrasyonu, farklılaşması ve ölümünde önemli rol oynamaktadır. Sinir sistemindeki birçok nöron ve glial hücrenin plazma membranlarında glutamat reseptörleri bulunmaktadır.^{43, 44}

Beyinde glutamat konsantrasyonunun yaklaşık 2 – 13 mM düzeyinde olduğu tespit edilmektedir.^{45, 46} Ancak bu yüksek miktarın sadece çok küçük bir bölümü ekstraselüler alanda bulunmaktadır. Ekstraselüler sıvı toplam beyin dokusu hacminin %13-22'sini oluşturmaktadır. Ekstraselüler sıvıda glutamat konsantrasyonu 3-4 μ M iken serebrospinal sıvıda yaklaşık 10 μ M'dır. En yüksek glutamat konsantrasyonları sinir terminallerinde izlenmektedir.^{47, 48}

Glutamatın reseptörleri dolayısıyla bu amino asitin neden olduğu durumların sonuçları gözlenmektedir. Glutamatın hücre dışında sahip olduğu yoğunluk yüksek bir seviyede olduğunda olumsuzluklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle hücre dışı glutamat yoğunluğunun düşük bir seviyede olması çok önemlidir. Hücre dışı glutamat seviyesinin

düşük olması, sinaptik ve ekstrasinaptik iletişim için gerekli olan yüksek sinyal/gürültü oranının istenen düzeyde kalması adına gereklidir. Bunun yanında glutamat konsantrasyonlarının çok yüksek seviyede olması, glutamat reseptörlerinin çok fazla uyarılmasına neden olmakta, dolayısıyla toksik etki sergilemektedir.

Glutamati hücre dışı alanda metabolize eden bir enzim bulunmadığı için hücre dışı sıvıdan astrosit hücreler tarafından re-uptake yöntemiyle uzaklaştırılmaktadır. Basit difüzyon ile glutamat sinaptik aralıktan milisaniyeler içinde uzaklaştırılmaktadır.⁴⁹ glutamat konsantrasyonunun azaltılması noktasında, geri alım sürecinde rol oynayan yapılar; glutamat taşıyıcı proteinlerdir. Bu taşıyıcı proteinler güç kaynağı olarak, plazma membranı iç ve dış kısmında oluşmuş olan elektrokimyasal gradienti aktif olarak kullanmaktadır. Bu taşıyıcı proteinlerin bulunduğu beyin dokusu hücreleri ise nöronlar ve astrositler olarak bilinmektedir. Yüksek miktarlarda glutamat salınımını takiben glutamat geri alımının baskılanması, saniyeler içinde hücre dışı glutamat konsantrasyonlarının yükselmesine yol açmaktadır.^{50, 51}

2.11.1. Glutamin – Glutamat Döngüsü

Hücre dışında biriken glutamat astrosit hücreleri tarafından geri alınır. Bu geri alım iki farklı şekilde glutamatın dönüşümüyle sona ermektedir. Glutamat ya glutamine ya da alfa-ketoglutarata dönüşmektedir. Yalnızca astrosit hücrelerinde var olan glutamin sentetaz enzimi sayesinde ve ATP varlığında glutamat glutamine dönüştürülebilmektedir. Alfa-ketoglutarat dönüşüm süreci ise olası iki farklı yoldan vuku bulmaktadır. Bu doğrultuda ilk yol; glutamat dehidrogenaz enzimi ile deaminasyon işlemi sürecini kapsamaktadır. İkinci yol ise, transaminaz enzimi ile gerçekleştirilen transaminasyon işlemi ile meydana gelmektedir. Alfa-ketoglutarat trikarboksilik asit döngüsüne katılarak süksinat, fumarat ve malat'a metabolize edilebilmektedir.⁵²⁻⁵⁴ Malat dekarboksile edilip pirüvata, indirgenerek de laktata

dönüşürken, trikarboksilik asit döngüsünde ise metabolize olma süreci daha ileri düzeyde olmaktadır. Astrositler bu metabolik yollar sonrasında ürettikleri glutamin ve laktatı hücre dışı matrikse gönderebilmektedir. Matriks kapsamında yer alan bu glutamin ve laktat ise nöronlar tarafından kullanılabilir. Nöronlarda nörotransmitter madde olarak kullanılan glutamatın kaynağı yalnızca glutamin değildir. Ancak glutamat sentezi için, matriksten glutamini nöronlar sahip oldukları spesifik glutamin taşıyıcıları (GlnT (SAT1) ve SAT2 (ATA2)) ile taşımaktadır. Bu taşıyıcılar glutaminerjik nöronlarda bol miktarda eksprese edilmektedir.^{55, 56} Laktatın astrositlerden hücre dışı sıvıya atılması ve nöronlar tarafından alınması ise farklı monokarboksilik asit taşıyıcıları (MCT1, MCT2 ve MCT4) ile gerçekleşmektedir.^{57, 58}

2.11.2. Glutamat Reseptörleri

Glutamat reseptörleri kapsamında listelenmekte olan glutamat reseptörlerinin en büyüğü glutamat analogu olan N-metil-D-aspartat (NMDA) olarak bilinmektedir. NMDA reseptörleri dahilinde NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A VE NR3B reseptörleri yer almaktadır. Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) ve kainat ile aktive olan diğer bir grup reseptör proteinine AMPA/Kainat reseptörleri denilmektedir. Bu grup AMPA ve kainat reseptörleri olarak ikiye ayrılmaktadır. GluR1-4 reseptörleri AMPA reseptörleri iken GluR, KA1 ve KA2 reseptörleri kainat reseptörlerini oluşturmaktadır.^{49, 59, 60} İyon kanal türevi olan reseptörler içerisinde NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri yer almaktadır. Bu reseptörlere iyonotropik reseptörler adı verilmektedir. NMDA reseptörü Ca^{+2} iyonuna daha hassas olmakta ve bu noktada bu iyonla karşı geçirgenliği daha fazla olmaktadır. AMPA reseptörlerinin afinitesi son derece düşüktür. Ayrıca glutamat ile uyarılması sonucunda AMPA reseptörlerinin hızlı bir biçimde açıldığı ve bunun sonucunda çabuk açılıp, çabuk sönen bir depolarizasyona neden oldukları bilinmektedir. Buna karşın

NMDA reseptörlerinin AMPA ile kıyaslandığında glutamata yönelik afinitelerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Ayrıca NMDA reseptörlerinin inaktivasyon süreçleri daha yavaş gerçekleşmektedir. mGluR1-8 koduyla bilinen metabotropik reseptörler G proteinine bağlı reseptörler olarak bilinmektedir.

NMDA reseptörü glutamatın bağlanması ile iyon kanalını açmaktadır ancak kanal içine bağlı bulunan Mg^{2+} iyonu nedeniyle hücre içine iyon girişi gerçekleşmemektedir. Bu Mg^{2+} iyonu sadece, hızlı glutamat reseptörleri veya diğer hızlı reseptörlerin aktifleşmesi sonucunda oluşan depolarizasyon nedeni ile bağlanma bölgesinden ayrılıp kanalı açmaktadır.^{50, 51, 61, 62} AMPA reseptörleriyle kıyaslandığında NMDA reseptörleri çok daha uzun süre açık durumda bulunmaktadır. (AMPA reseptörlerinin açık kalma süreleri milisaniye olarak ölçüm karşılığı bulurken, NMDA reseptörlerinin açık kalma süreleri yüzlerce milisaniyedir.) Yüksek miktarda Ca^{+2} geçiren AMPA reseptörlerinin bellek oluşumu, hareket regülasyonu gibi süreçler için uygun olmadığı görülmektedir. AMPA reseptörlerinin böyle özellikler sergilemesi NMDA reseptörlerinin bahsi geçen sinaptik plastisite içeren süreçler için uygun olabilme ihtimalini kuvvetlendirmektedir. NMDA alt üniteleri içerisinde yer alan NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A ve NR3B genleri içerisinde yalnızca NR3B kısmi genomik dizi olarak ifade edilmektedir. Temel alt ünite olan NR1 tüm NMDA reseptörlerinin bir parçasıdır. NR2 alt üniteleri kanalın açık kalma süresini, kanal geçirgenliğini ve Mg^{2+} duyarlılığını belirlemektedir.^{63, 64}

AMPA reseptörlerinin genel işlevleri arasında merkezi sinir sistemi dahilinde birçok sinapta eksitator iletişimi sağlama görevi de yer almaktadır. Bu reseptörlerin GluR 1-4 alt üniteleri bulunmaktadır. Bu alt ünitelerin birlikteliği sonucunda AMPA reseptörlerinin bir heteromer olduğu ifade edilebilmektedir. AMPA reseptörünün Ca^{+2} iyonuna daha az geçirgen olmasını GluR2 alt ünitesi sağlamaktadır. Hipokampal CA1

bölgesindeki glutaminerjik sinapslarda, kainat reseptörü aracılı en yüksek sinaptik cevap, AMPA reseptör cevabının onda birinden daha küçüktür.⁶⁵⁻⁶⁷

Yavaş gerçekleşen aksitasyon, membran potansiyelinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yavaş eksitasyon kainat reseptörleri tarafından başlatılırken, membran potansiyelinin ise aksiyon potansiyelinin başlatılma eşğine yakın olduğu bilinmektedir. Bu reseptörlerin gerçekleştirdiği yavaş eksitasyon hareketi sinaptik aktivite ile birlikte gerçekleşmektedir. Kainat reseptörlerinin de homomerik ve heteromerik yapıları olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda kainat reseptörlerini oluşturan alt üniteler içerisinde mGluR5-9, KA1 ve KA2 yer almaktadır. KA1 hipokampal CA3 piramidal hücreleri ile dentat granül hücrelerinde eksprese edilirken KA2 tüm beyinde orta düzeyde bulunmaktadır. KA1 ayrıca glial hücreler ve korpus kallosumda da görülmektedir.⁶⁸⁻⁷⁰

G proteinleri ile ilişkili olan metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) uyarıldığında hem elektriksel hem de metabolik olayları tetiklemektedir. Farmakolojik özellikleri, amino asit benzerlikleri ve sinyal iletim sistemleri göz önünde bulundurularak mGluR reseptörleri üç gruba ayrılmıştır. Bu üç grup içerisinde sekiz farklı klonlanmış mGluR yer almaktadır. Grup I (mGluR1 ve 5) fosfolipaz C ile ilişkili iken, grup II (mGluR2-3) ve grup III (mGluR4, 6-8) ise iyon kanalları ve adenilat siklazin (AC) inhibisyonu ile ilişkilidir. Grup I reseptörlerinin uyarılması fosfoinositollerin hidrolize olmasına ve membranın depolarizasyonuna neden olmaktadır.

2.11.3. Glutamat Taşıyıcıları

Glutamatın taşınmasından beyin hücreleri tarafından üretilmekte olan pek çok taşıma proteini sorumludur. Bu proteinlerin hücredeki lokasyonu değişiklik gösterirken bazıları membranda yer almakta, bazıları ise intrasellüler lokasyon sergilemektedir.

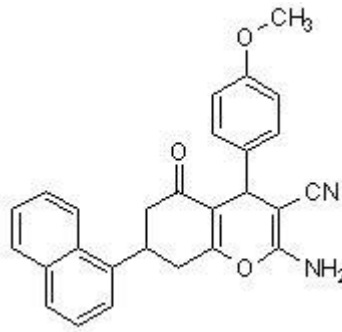
Hücre membranında yer alan glutamat taşıyıcıları (Eksitator Amino Asit Taşıyıcısı = EAAT); a- EAAT1 (GLAST), b- EAAT2 (GLT1), c- EAAT3 (EAAC), d- EAAT4, e- EAAT5'ten ibarettir. Bu taşıyıcıların hepsi Na^+ ve K^+ kenetli olarak L-glutamat taşımaktadırlar.⁷¹ Aynı gen ailesinde yer almakta olan bu taşıyıcı proteinlerin protein dizilimlerinin de % 50-60 oranında benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Bu beş farklı glutamat taşıyıcısı bilinen başka bir protein ailesiyle dikkate değer bir benzerlik oranı sergilememektedir.

Glutamat taşıyıcılarının ne şekilde fonksiyon sergileyeceği, lokalize oldukları yere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. EAAT3, 4 ve 5 taşıyıcı proteinleri nöronlarda bulunurken, EAAT1 ve 2 ise glial hücrelerde yer almaktadır. Bulundukları yere bağlı olarak, eksitator nörotransmisyonunu düzenlemek, hücre dışı glutamat konsantrasyonunun düşük seviyede kalmasını sağlamak, glutamat-glutamin siklusunu içeren metabolik süreçler için glutamat tedarik etmek gibi görevleri bulunmaktadır.

2.11.4. EAAT 1-2-3 Blokerleri

2.11.4.1. UCPH-101

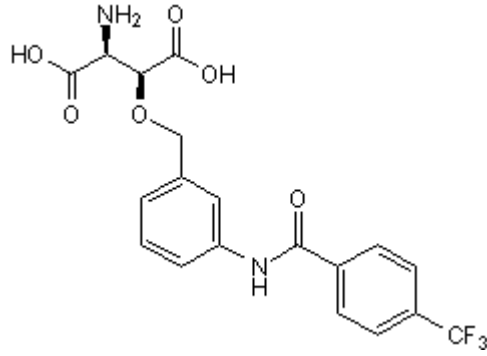
Selektif EAAT 1 blokeridir.⁷²



Şekil 2.6. UcpH-101

2.11.4.2. TFB-TBOA

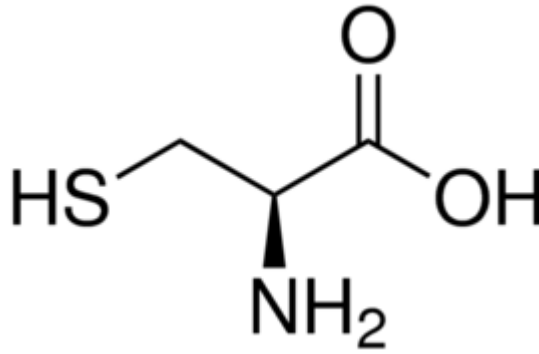
EAAT 2 blokeridir.⁷³



Şekil 2.7. TFB-TBOA

2.11.4.3. L-sistein

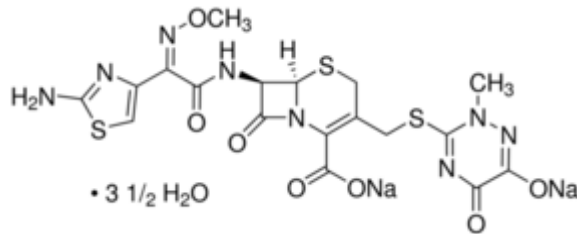
EAAT 3 blokeridir.⁷⁴



Şekil 2.8. L-Sistein

2.11.4.4. Seftriakson

EAAT 2 aktivatörüdür.⁷⁵



Şekil 2.9. Na-Seftriakson

2.12. REAL TIME PCR

Real-Time PCR floresans sinyal temelli bir kantitatif ölçüm sistemidir. Floresans sinyal nükleik asit çoğalmasıyla simültane bir şekilde ortaya çıkmakta ve ölçülebilen bu sinyaller ile kantitatif sonuçların elde edildiği bir yöntemdir. Çift zincirli DNA'ya bağlanması neticesinde floresans ışıma veren FAM (6-fluorescein amidite (6-FAM)) boyaları kullanılmaktadır. DNA miktarı PCR ile arttıkça, floresans ışımının da artması bu PCR sürecinin temel mekanizmasını oluşturmaktadır. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan FAM boya miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir.^{76, 77}

PCR'ın üretim sürecinde taklit edilen işlem hücre içerisinde oluşan DNA replikasyonudur. Bu mekanizma dahilinde çift zincirli DNA'nın önce tek zincirli forma dönüştürüldüğü, sonrasında kopyalanarak çoğaltıldığı ve son işlem olarak da yeniden çift zincirli forma dönüştürüldüğü bilinmektedir.

Bu teknik;

- Çift zincirli DNA'nın yüksek bir sıcaklığa maruz bırakılarak tek zincirli forma dönüştürülmesi (denatürasyon),
- Primer olarak adlandırılan iki oligonükleotit fragmentlerinin hedef alınan DNA'nın spesifik bir bölgesini tanıyarak bağlanması (primer eşleşmesi)
- Katalizörü Mg^{+2} iyonlarının ortamda bulunmasıyla DNA polimeraz enziminin primerlere bağlanarak nükleotit ekleme işlemine başlaması ve akabinde üretilen kopya DNA'nın gittikçe uzaması (primer uzama) şeklindeki üç basamaklı bir döngünün çok sayıda tekrar etmesi işlemlerini içermektedir.

Primer olarak kullanılmakta olan oliganükleotit fragmentlerini birbirinden dizilim olarak farklıdır. Primerlerin sahip oldukları bu dizilim, DNA'da çoğaltılacak

olan dizilimin öncesinde yer almakta olan promotör bölgelerinin komplementidir. Denatürasyon, primer birleşmesi, primer uzaması şeklinde ifade edilen basamaklar PCR sürecindeki tek bir döngüyü ifade etmektedir. Bir döngüde üretilen kopya DNA'lar, bir sonraki PCR döngüsünde çoğaltılma hedefiyle primerin bağlandığı hedef DNA parçası olabilmektedir. PCR reaksiyonları ile primerler arası bölgeye ek olarak 5' ucu primerlerin 5' ucu olan bir çift zincirli DNA parçası üretilmektedir. Başarılı bir amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri, bir primerin bağlanma bölgeleri arasındaki uzaklıktan daha fazla uzunluğa sahip, farklı boyutlarda DNA molekülleridir. İkinci döngüde, istenen uzaklıktaki DNA zincirleri oluşturulur⁷⁸.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Hücre Kültürü Cihazları

Sıra	Cihaz
1	İnkübatör: su ısıtmalı Co ₂ inlütatör, 37 c, %5 Co ₂ , %95 nem
2	Santrifüj: Allegra X-30R +4c 1200 rpm
3	Kabin: class I hepa filtreli tek kişilik
4	Otoklav: Lica
5	+4, -20 ve -80 buz dolaplar: Nu Aire
6	İnvert floresan mikroskop: Leica ebq 100-04
7	Distilatör: mega home MH943
8	Spectrofotometre: BİOTEK
9	Çalkalayıcı: Heidolph Titramax 100

3.1.2. Sarf malzemeler

Sıra	Sarf malzeme
1	Mikro pipet ve üç 1ml, 200 µl, 10 µl
2	Petri kabı
3	Gazlı bez
4	Povi iyodin
5	%70 metiol alkol
6	Pastör pipet
7	14-50 ml falkon
8	96 ploystyaren poly lisine kaplı plate
9	0.22 µm PVDF filtre
10	Pamuk

3.1.3. U-87MG Kültürü

Bu hücre hattının kültüre edilmesinde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (Fetal Bovine Serum), Penisilin – Streptomisin, amphotricin B (Life

Technology Gibco 15240-062), %1 L-Glutamine (Life Technology 25030-081) maddeleri kullanılmıştır.

3.1.4. MTT sitotoksisite Testi

MTT [3- (4,5- Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid] tozu: sigma aldrich, No: MKBR4419V

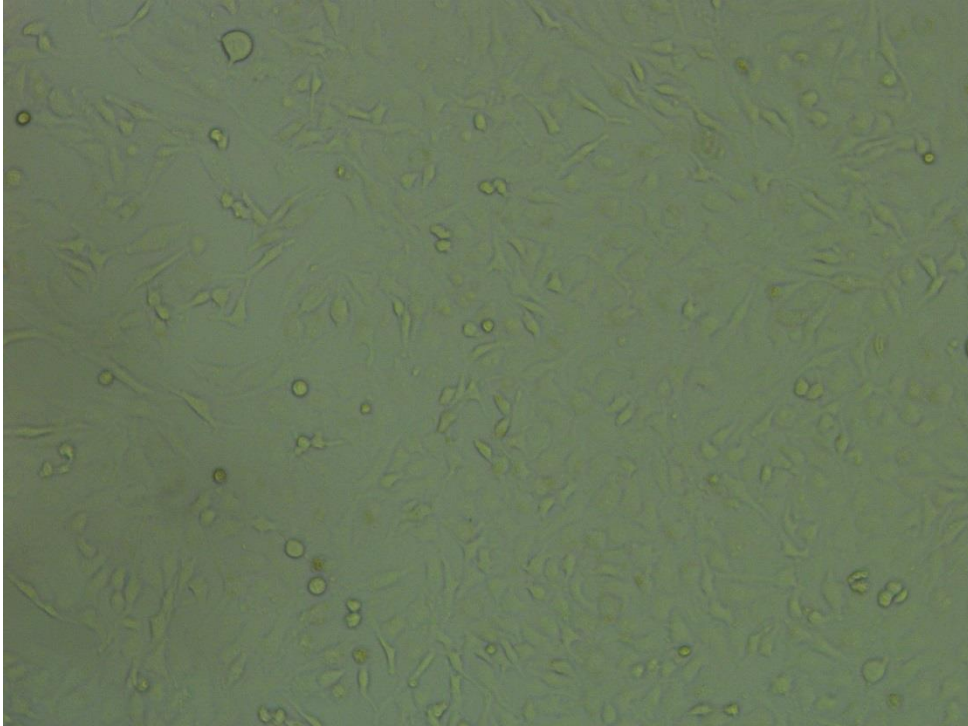
Toz halinde MTT ürününden solüsyon hazırlama işlemi için öncelikle 5 mg toz halinde MTT tartılır. Akabinde 1 ml arındırılmış PBS ilavesi yapılır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra 0.22 µm çapında porlara sahip filtreler kullanılarak sterilize edilir.

MTT çözeltisi olarak kullanılan DMSO (dimethyl sulfoxide) W29A01596 numaralı Sigma Aldrich ürünüdür.

3.2. Kanser Kültürü

U-87MG kanser hücre hattının temin edildiği yer; Van Yüzüncüyıl Üniversitesi'dir. Kanser kültürü için ilk aşama olarak, donmuş halde krayo falkonlarda gelen hücreler oda sıcaklığında hızlı bir biçimde çözündürüldü. Bu aşama sonunda hücreler sıvı hale getirildi. Hemen akabinde hücreleri barındıran sıvı 2 ml yeni besi ortamı ile karıştırılarak 1200 rpm çevirme hızında +4° C sıcaklığında 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücrelerin pellet olarak dibe çöktüğü, süpernatantta ise medyumun biriktiği gözlemlendi. Bu aşamada süpernatant atıldı. Hücrelerin üzerine yeni medium(DMEM, 1/ FBS, %1 antibiyotik (pensilin-streptomisin-amfotrisin B), %1 L-Glutamat) eklendi. Bu karışım, 25 cm²'lik flaslara ekildi. Bu işlemin akabinde her üç günde bir defa olmak üzere hücrelerin besi ortamları değiştirildi. Hücrelerin hızlı gelişimini destekleyen bu uygulamalar sonrasında hücreler flaskın %70'ini kapladığı zaman, alt kültür işlemi olarak da adlandırılan pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem için ilk olarak hücrelerin medyumunu atılarak uzaklaştırıldı⁷⁹. Flask bu aşamada

Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen steril PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi ardından PBS uzaklaştırıldı. 25 cm²'lik flaska 0.4 ml Tripsin/EDTA ilave edilerek 5 dakika inkübasyon süresi beklendi. Bu süre içerisinde enzimin hücreleri flask yüzeyinden kaldırması beklendi. FBS 1:1 oranında eklenerek hücrelerin taşıma işlemine hazırlanması amaçlandı. FBS içerisinde yüzen hücreler steril tüpe alınarak 1200 rpm hızında 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Yine hücrelerin pellet olarak dipte, FBS ve medyumun ise süpernatant olarak üst kısımda yer aldığı görüldü. Bu noktada süpernatant atıldı. Hücreler üzerine yeni medium eklenerek 96'lık plate sistemine ekim işlemine geçildi. Her bir plate için 100 µl olacak şekilde ekim yapıldı. Bu işlem esnasında tüpte yer alan karışımda hücrelerin homojen dağılmasına özellikle özen gösterildi. Ekim işlemi ardından toma lamıyla sayım yapılarak, her kuyucuk için 1×10^5 hücre ilavesi yapıldığı teyit edildi. Plateler 37 derece, %5 CO₂ inkübatörde tutuldular (Şekil 3.1)^{80, 81}.



Şekil 3.1. U-87MG hücrelerin görünümü

3.3. MTT ile Sitotoksisite Testi

Ucph-101, L-Sistein, Tfb-Tboa ve Seftriakson maddelerinin oluşturduğu sitotoksisite düzeyini ölçme amacıyla MTT testi yapıldı. (Çizelge 3.1).

Ekim sonrasında flask tabanına yapışan hücrelerin üzerinde yer alan besi ortamı alındı. Akabinde TFB-TBOA 1 μm^{73} Ucph-101 5 μm^{82} , L-sistein 1 mM^{83} , seftriakson 10 μm^{84} etken maddelerini içeren besi ortamları flasklara ilave edildi. Etken maddelerini içeren ortamlarda hücrelerin 24 saat süreyle maruz kalmaları sağlandı.

Tablo 3.1. İn-vitro deneyi için kullanılan dozlar

Deney grupları	Dozlar
Kontrol	-
Ucph-101	5 μm
L-sistein	1 mM
TFB-TBOA	1 μm
Seftriakson	10 μm
Ucph-101+Seftriakson	5 μm + 10 μm
L-Sistein+Seftriakson	1 mM +10 μm
TFB-TBOA+Seftriakson	1 μm +10 μm
Ucph-101+L-Sistein+TFB-TBOA+Seftriakson	5 μm +1 mM +1 μm +10 μm

Tüm bu konsantrasyonlarda yapılan uygulama işleminin yanı sıra, kontrol olarak hazırlanan kuyucuklara kullanılan maddelerin hazırlanmasında kullanılan çözücünden de aynı oranda uygulandı. Kullanılan her bir etken maddenin farklı konsantrasyonlarda uygulama işlemi kapsamında her bir madde için en az 6 kuyucuk kullanıldı. Maruziyet süresi sonunda hücreler üzerinde yer alan besiyeri 90 μl 'ye tamamlandı. Akabinde daha önceden hazırlanmış olan MTT solüsyonu (5mg/ml) kuyucukların her birine 10 μl ilave edilerek kuyucukların hacimleri 100 μl 'ye tamamlandı. Bunun ardından hazırlanan plateler 37°C'de, %5 CO_2 'li inkübatörde 4 saat bekletildi. Bu işlemin sonundan kuyucuklarda yer alan sıvı boşaltılarak yerine 100 μl DMSO ilave edildi.

DMSO ilavesi ardından hemen spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda okuma işlemine geçildi.

Spektrofotometre ölçümü sonunda hem boş, hem de hücre içeren kuyucuklardan elde edilen değerlerin analizinde ise SPSS 20.0 programı kullanıldı.

3.4. Gen Ekspresyonu

24 saatlik etken madde inkübasyonu ardından hücreler Tripsin enzimi kullanılarak flask yüzeyinden kaldırıldı. Steril bir tüpe alınarak 1200 rpm hızında 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atılmış ve dibe çöken hücreler RNA izolasyonu işlemi için alındı.

3.4.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy Mini Kit kullanıldı. Flask yüzeyinden kaldırılarak tüp dibine santrifüjle çöktürülen hücreler üzerine 1 ml Qiazole solüsyonu eklendi. Solüsyon içeren hücreler 5 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Akabinde 200 µl kloroform ilavesi yapılarak 15 saniye çalkalama işlemi yapıldı. 2 ya da 3 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletilen numunelerin 12000 g'de 15 dakika süreyle +4° C'de santrifüjü yapıldı. Bu noktada renksiz nitelik taşıyan süpernatant alınarak başka bir tüpe transfer edildi. Sonrasında üzerine 1:1 oranında etanol eklendi ve vortekslenerek karışmaları sağlandı. Bu işlem ardından 700 µl numune alınarak toplama tüpüne koyuldu. Bu numune ürünü oda sıcaklığında 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Bu aşamanın 1 kez daha tekrarlanması sağlandı. Ardından 700 µl RW1 solüsyonu RNeasy kolonuna eklendi. Kolon kapağı kapatılarak 15 saniye süreyle 8000 G'de santrifüj edildi. Akabinde 500 µl RPE solüsyonu RNeasy kolonuna ilave edilerek yeniden 8000 g'de 2 dakika süreyle santrifüj gerçekleştirildi. Bu noktada RNeasy kolonu başka bir 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı. Sonrasında kolon üzerine 30-50 µl RNase free su ilave edilerek kapağı kapatıldı. 1 dakika süreyle 8000 g'de santrifüj edildi.

3.4.2. cDNA sentezi

cDNA sentezinde hazırlanan 14 µl'lik solüsyon içeriğinde; 2 µl genomik DNA wipeout buffer 7x solüsyonu, 1 µl RNA ve 11 µl de RNase içermeyen su olacak şekilde hazırlık tamamlandı. Bu solüsyon 2 dakika süreyle 42° C'de tutuldu, ardından yeniden buz üzerine alındı. Bu işlemin ardından hazırlanan solüsyon içerisine revers transkripsiyon master mixden 1 µl, Quantscript RT buffer 5x'den 4 µl, RT primer mix'den 1 µl alınarak 14 µl'lik diğer karışımla beraber toplam 20 µl'lik bir karışım elde edildi. Bu karışımı içeren tüpler RT PCR cihazına yerleştirilir. 42° C'de 15 dakika, 95°C'de 3 dakika olacak şekilde ısıya maruz bırakıldı. İşlem sonunda tüpler -20° C'ye kaldırıldı.

3.4.3. REAL TIME PCR

cDNA sentezi ardından ekspresyon okuma işlemi için, kullanılacak her bir tüp içerisine 0.25 µl forward, 0.25 µl reverse primer, 0.15 µl prob, 3 µl cDNA, 3 master mix ve 12.75 µl saf su eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlandı. 95° C'de 5 dakika bekletme işlemi ardından 45 döngülük bir süreci kapsayan 95° C'de 10 saniye, 60° C'de 30 saniye olan döngüsel süreç başlatıldı.

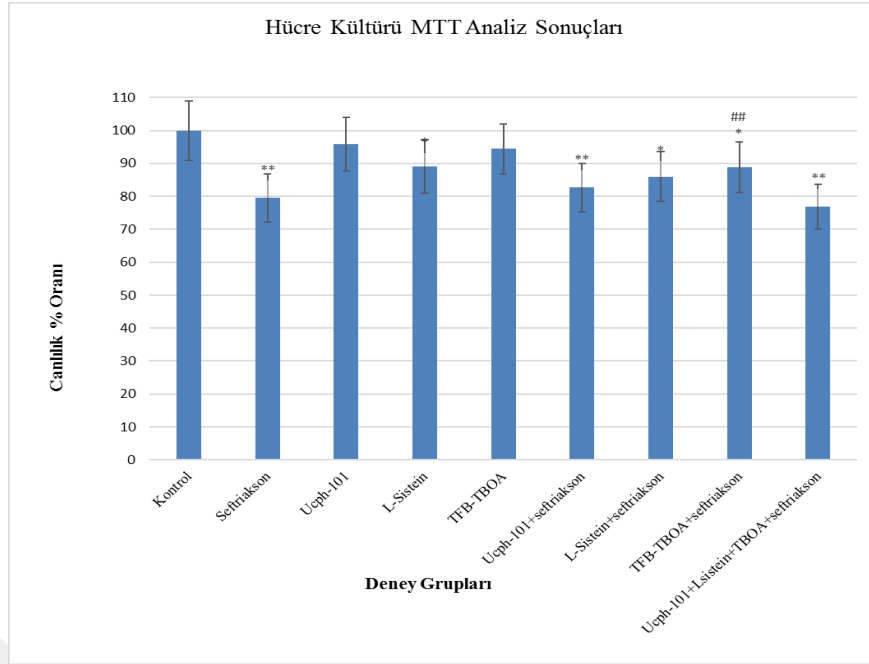
4. BULGULAR

U-87MG kanser hücreleri transporter ekspresyonlarını incelemek amacıyla kültüre edildi. Bu hücrelere 5 μ M Ucph-101, 1 μ M TFB-TBOA, 1mM L-Sistein ve 10 μ M seftriakson ve bu dozların kombinasyonlarına 24 saat boyunca maruz bırakıldı. Kontrol grubuna sadece medyum eklendi. Maruziyet süresi sonrasında hücrelerden elde edilen cDNA'lar Real-Time PCR yöntemiyle ekspresyon seviyeleri belirlendi. Elde edilen buğular SPSS 20.0 programı ile istatistiksel olarak One-Way ANOVA yöntemiyle değerlendirildi.

4.1. Hücre Kültürü

4.1.1. Kanser Kültürü MTT Testi

24 saat ilaç maruziyetinden sonra kültür kaplarına MTT solüsyonu eklenerek hücre canlılığı incelenmiştir. Elde edilen veriler analiz edildikten sonra aşağıda sunulmuştur.



* p<0.05 kontrol grubuna göre anlamlılık # p<0.05 seftriakson grubuna göre anlamlılık
 ** p<0.001 kontrol grubuna göre anlamlılık ## p<0.001 seftriakson grubuna göre anlamlılık

Şekil 4.1. U-87MG hücreleri için % canlılık oranları- MTT test grafiği

Şekil 4.1’de kanser hücrelerinin 24 saatlik ilaç maruziyeti sonrası canlılık oranı MTT testi yardımıyla hesaplandı. Bu amaçla 5 μ M Ucph-101, 1 μ M TFB-TBOA, 1mM L-Sistein ve 10 μ M seftriakson ve bu dozların kombinasyonları U87-MG hücrelerine uygulandı. Tüm grupların anlamlılık sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır, ayrıca seftriaksonla kombine kullanılan ilaçlar tekrar seftriakson grubuyla da karşılaştırıldı. Alınan sonuçlarımıza göre saf seftriakson ve Ucph-101+Lsistein+TBOA+seftriakson grubu en yüksek toksisiteyi gösterdi. En yüksek canlılık oranı ise Ucph-101 ve TFB-TBOA gruplarında gözlemlendi. Ayrıca seçici olarak L-sistein SLC1A1 transporter, TFB-TBOA SLC1A2 transporter ve UCPH-101

SLC1A3 transporterlerinin blokörleridir. Seftriaksonla kombine kullanıldığı zaman en toksik etki SLC1A3 selektif bloküründe görüldü ve toksisitesi az olan TFB-TBOA ilacında gözlemlendi. Bunun nedeni seftriaksonun seçici olarak SLC1A2 transporterleri üzerinden etki göstermesinden dolayıdır. TFB-TBOA inhibitörü baskın olarak transporterleri kapatarak kanser hücrelerin üzerinde koruyucu etki yaptı. Veriler One-Way ANOVA yöntemi ile istatistiksel olarak analiz edildi ve kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Elde edilen verilere göre saf seftriakson, Ucph-101+seftriakson ve Ucph-101+Lsistein+TBOA+seftriakson grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman $p<0.001$ anlamlılık gözlemlendi. Ayrıca L-Sistein+seftriakson ve TFB-TBOA+seftriakson grupları kontrol grubuyla $p<0.05$ anlamlılık gösterdikleri tespit edildi.

Tablo 4.1. U-87MG hücreleri için % canlılık ve istatistiksel verileri

Deney grupları	Canlılık Ort	St.h		
Kontrol	2.806	± 0.174		
Seftriakson	2.232	± 0.117	**	
Ucph-101	2.690	± 0.287		
L-Sistein	2.500	± 0.132		
TFB-TBOA	2.649	± 0.188		
Ucph-101+seftriakson	2.319	± 0.089	**	

Tablo 4.1 (Devamı)

L-Sistein+seftriakson	2.414	± 0.173	*	#
TFB-TBOA+seftriakson	2.494	± 0.302	*	##
Ucph-101+Lsistein+ TFB-TBOA+seftriakson	2.158	± 0.244	**	

* $p<0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılık # $p<0.05$ seftriakson grubuna göre anlamlılık
 ** $p<0.001$ kontrol grubuna göre anlamlılık ## $p<0.001$ seftriakson grubuna göre anlamlılık

Tablo 4.1’de kanser hücrelerinin canlılık oranı ortalama ve standart sapması sunulmaktadır.

4.2. REAL TIME PCR Analiz Sonuçları

Kanser hücrelerinin 24 saatlik ilaç maruziyeti sonrası canlılık oranı MTT testi yardımıyla hesaplanmıştır. Bu amaçla 5 μ M Ucph-101, 1 μ M TFB-TBOA, 1mM L-

Sistein ve 10 μ M seftriakson ve bu dozların kombinasyonları U87-MG hücrelerine uygulanmıştır. Hücreler tripsinle kaldırıldıktan sonra RNS izolasyonu yapıp cDNA sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA'lar ile SLC1A1,2,3 genlerinin ekspresyonlarına bakılarak housekeeping olarak kullandığımız β -aktin geni ekspresyonu ile normalize edildi. Elde edilen sonuçlar SPSS 20.0 programıyla istatistiksel olarak analiz edildi.

4.3. Real-Time PCR Analiz Sonuçları

Tablo 4.2. U-87MG hücrelerin SLC1A1 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri

Deney Grupları	SLC1A1			
Kontrol	1.00	$\pm$	0.185	
Seftriakson	5.26	$\pm$	0.190	*
Ucph-101	1.00	$\pm$	0.164	
L-Sistein	0.47	$\pm$	0.031	
TFB-TBOA	0.04	$\pm$	0.010	*
Ucph-101+seftriakson	7.16	$\pm$	0.100	*
L-Sistein+seftriakson	0.68	$\pm$	0.106	##
TFB-TBOA+seftriakson	8.80	$\pm$	0.069	** #
Ucph-101+Lsistein+ TFB-TBOA+seftriakson	20.5	$\pm$	1.280	** ##

* p<0.05 kontrol grubuna göre anlamlılık # p<0.05 seftriakson grubuna göre anlamlılık

** p<0.001 kontrol grubuna göre anlamlılık ## p<0.001 seftriakson grubuna göre anlamlılık

Tablo 4.2’de U-87MG hücrelerin SLC1A1 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri sunulmuştur. Bu amaçla saf seftriakson, Ucph-101, TFB-TBOA, L-Sistein, Ucph-101+seftriakson, TFB-TBOA+seftriakson, L-Sistein+seftriakson, Ucph-101+L-sistein+ TFB-TBOA+seftriakson gruplarından elde edilen veriler β -Aktin geni ekspresyonuna göre değerlendirilmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Alınan sonuçlarımıza göre SLC1A1 glutamat transporter geninin ekspresyon saf seftriakson, Ucph-101+seftriakson, TFB-TBOA+seftriakson ve Ucph-101+Lsistein+ TFB-TBOA+seftriakson gruplarında yüksek oranda arttığı gözlemlenmektedir. Ayrıca Ucph-101 grubu genin ekspresyonunu değişmezken L-Sistein ve TFB-TBOA grupları SLC1A1 glutamat transporter geninin ekspresyonunu düşürdüğü tespit edilmiştir.

Yapılan statiksel analizimize göre Ucph-101, TFB-TBOA+seftriakson, L-Sistein ve seftriakson ve Ucph-101+Lsistein+ TFB-TBOA+seftriakson grupları kontrol grubuna göre $p<0.001$ anlamlılık gösterdi. Ayrıca saf seftriakson, TFB-TBOA ve Ucph-101+seftriakson grupları $p<0.05$ anlamlılık gösterirken L-Sistein, L-Sistein+seftriakson ve Ucph-101 grupları kontrol gurubuna göre anlamlılık gösterdi. Ayrıca verilerimizin seftriakson kombinasyonlarını saf seftriakson grubuyla da karşılaştırdı. Bu verilere göre L-Sistein+seftriakson ve Ucph-101+L-sistein+TFB-TBOA+seftriakson grupları kontrol grubuna göre $p<0.001$ anlamlılık gösterirken TFB-TBOA+seftriakson gurubu $p<0.05$ anlamlılık gösterdi. Verilerimizde önemli şekilde göze çarpan veri L-Sistein+seftriakson grubuna aittir seftriakson kombinasyonlu gruplar SLC1A1 glutamat transporter geninin ekspresyon artırırken bu grupta düşürdüğü gözlemlendi ve bu sonuç saf L-Sistein gurubunda da gözlemlendi.

Tablo 4.3. U-87MG hücrelerin SLC1A2 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri

Deney Grupları	SLC1A2			
Kontrol	1.00	±	0.103	
Seftriakson	7.29	±	0.450	**
Ucph-101	1.06	±	0.121	
L-Sistein	0.66	±	0.036	
TFB-TBOA	0.48	±	0.045	
Ucph-101+seftriakson	16.8	±	1.680	** #
L-Sistein+seftriakson	1.66	±	0.425	##
TFB-TBOA+seftriakson	0.37	±	0.306	##
Ucph-101+Lsistein+ TFB-TBOA+seftriakson	37.6	±	2.750	** ##

* p<0.05 kontrol grubuna göre anlamlılık # p<0.05 seftriakson grubuna göre anlamlılık

** p<0.001 kontrol grubuna göre anlamlılık ## p<0.001 seftriakson grubuna göre anlamlılık

Tablo 4.3’de U-87MG hücrelerin SLC1A2 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri sunuldu. Bu amaçla saf seftriakson, Ucph-101, TFB-TBOA, L-Sistein, Ucph-101+seftriakson, TFB-TBOA+seftriakson, L-Sistein+seftriakson, Ucph-101+L-sistein+ TFB-TBOA+seftriakson gruplarından elde edilen veriler β -Aktin geni ekspresyonuna göre değerlendirilmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Alınan verileri incelediğimiz zaman saf seftriakson, Ucph-101+seftriakson, L-Sistein+seftriakson ve Ucph-101+L-sistein+ TFB-TBOA+seftriakson guruplarında SLC1A2 glutamat transporter geninin ekspresyonunun arttığı tespit edildi. Ayrıca saf Ucph-101gurubu hariç diğer gruplarda hedef genin ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde saf seftriakson, Ucph-101+seftriakson ve Ucph-101+L-sistein+ TFB-TBOA+seftriakson gruplarında kontrol grubuna göre p<0.001 anlamlılık gösterdi. Seftriaksonla kombine kullanılan olan gurupların verilerini saf seftriakson gurubuyla karşılaştırdığımız zaman Ucph-101+seftriakson gurubu hariç hepsi p<0.001 anlamlılık gösterdi.

Tablo 4.4. U-87MG hücrelerin SLC1A3 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri

Deney Grupları	SLC1A3			
Kontrol	1.00	±	0.156	
Seftriakson	0.71	±	0.040	
Ucph-101	0.29	±	1.510	*
L-Sistein	31.4	±	2.460	**
TFB-TBOA	0.21	±	0.057	
Ucph-101+seftriakson	0.49	±	0.006	
L-Sistein+seftriakson	3.70	±	0.476	* ##
TFB-TBOA+seftriakson	2.44	±	0.020	##
Ucph-101+Lsistein+ TFB-TBOA+seftriakson	0.92	±	0.654	

* p<0.05 kontrol grubuna göre anlamlılık # p<0.05 seftriakson grubuna göre anlamlılık

** p<0.001 kontrol grubuna göre anlamlılık ## p<0.001 seftriakson grubuna göre anlamlılık

Tablo 4.4’de U-87MG hücrelerin SLC1A3 glutamat transporter geninin ekspresyon verileri sunuldu. Bu amaçla saf seftriakson, Ucph-101, TFB-TBOA, L-Sistein, Ucph-101+seftriakson, TFB-TBOA+seftriakson, L-Sistein+seftriakson, Ucph-101+L-sistein+TFB-TBOA+seftriakson gruplarından elde edilen veriler β -Aktin geni ekspresyonuna göre değerlendirilmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Elde edilen verilere bakılırsa Ucph-101 seçici EAAT1 blokörü olduğundan gen ekspresyonu en düşük olarak tespit edildi., L-Sistein ve L-Sistein+seftriakson gruplarında SLC1A3 glutamat transporter geninin ekspresyonu artış gösterdi. Diğer gruplarda bu genin ekspresyonunda yüksek oranda düşüş gözlemlendi. L-Sistein gruplarında kontrol grubuna göre p<0.001 anlamlılık ve Ucph-101 ve L-Sistein+seftriakson grubunda kontrol grubuna göre p<0.05 anlamlılık gösterildi ve diğer gruplarda anlamlı bir fark tespit edildi. Verileri seftriakson grubuna göre değerlendirdiğimiz zaman, sadece L-Sistein+seftriakson ve TFB-TBOA+seftriakson gruplarında p<0.001 anlamlılık tespit edildi.

5. TARTIŞMA

GBM en sık görülen beyin kanser türüdür. Bu hastalığa geliştirilmiş mevcut tedavilerin cevap oranları ise çok düşüktür. GBM, şu an gliomalar içerisinde prognoz ve mortalite açısından en tehlikeli olanıdır. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi birlikte olmasına rağmen cevap oranları tatmin edici düzeyde değildir. Bu alanda yeni moleküllerin/yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin ve acil olarak yeni ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir.

Biz bu çalışmamızda GBM hücrelerinin ölümünden sorumlu olabilecek ve bize yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde ışık tutabilecek hücresel mekanizmaları moleküler düzeyde incelemeyi hedefledik. Daha önceki çalışmalarda GBM hücreleri çoğalıp yayılmalarında aracı olarak glutamati kullandığı gösterilmiştir.⁸⁵ GBM hücreleri tümör dokusu etrafındaki nöronları glutamat ekzotoksitesine maruz bırakarak nöronların ölümüne sebep olup kendilerine yayılacak boşluklar oluşturmaktadırlar.⁸⁵ Biz de GBM hücre kültüründe glutamat taşıyıcılarını ekspresyon seviyelerine göre çeşitli blokör ve aktivatör maddeler kullanarak inceledik. Yaptığımız çalışmada literatürde önceden birlikte etkileri incelenmemiş olan aktivatör ve blokörler yalnız başına ve kombinasyonları şeklinde GBM hücrelerine uygulandı.

Çalışmamız esnasında hücre canlılığını takip etmek için MTT analizi yöntemini kullandık. Biz çalışmamızda ucuz, hızlı, etkili, kolay kullanımlı, güvenilirliği oldukça yeterli ve dünya çapında yaygın kullanıma sahip olduğu için MTT analizi yöntemini kullandık.

MTT analiz sonuçlarımıza göre tüm gruplarda kontrol grubuna göre canlılık düzeyleri azalmış olarak bulunmuştur. Bu azalma seftriakson, L-sistein, UCPH-101+seftriakson, L-sistein+ seftriakson, TFB-TBOA+ seftriakson, UCPH-101+ L-sistein+ TFB-TBOA+ seftriakson gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak

anlamlıdır. Buna göre seftriakson verilen bütün gruplarda kontrole göre anlamlı bir biçimde hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda seftriaksonun SLC1A2 geninin ekspresyonunu artırmak suretiyle GBM hücrelerini sayısal olarak azalttığı gösterilmiştir.⁸⁵ SLC1A2 geninin ekspresyonu arttığında GBM hücrelerinin içine glutamat girişinin artışı bu toksik etkinin esas sebebidir.⁸⁵ Seftriakson içermemekle birlikte saf L-sistein verdiğimiz grupta da hücre sayısı kontrole göre anlamlı bir biçimde düşük bulunmuştur. Bu durum daha önce yapılmış çalışmalarla paralellik göstermektedir. Sistein CDO (sistein dioksijenaz) enzimi ile CSA'ya (sistein sülfonik asit) dönüşür. CSA'nın SSS hücreleri üzerinde toksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.⁸⁶ Sisteinin EAAT1, EAAT2, ve özellikle EAAT3 taşıyıcılarını bloke ettiği bilinmektedir.⁸⁶ Bu blokajın GBM hücreleri üstünde artışa sebep olması gerekirken yukarıda bahsettiğimiz gibi sisteinin metaboliti olan CSA sebebiyle hücre sayısını düşürmüştür.

TFB-TBOA tek başına hücre sayısını anlamlı bir biçimde azaltmazken seftriaksonla yapılan kombinasyonu hücre sayısını anlamlı bir biçimde azaltmıştır. TFB-TBOA esas olarak EAAT2 blokörü olarak görev yaparken seftriakson bunun tam tersi biçimde EAAT2 aktivatörü olarak görev yapmaktadır. Bu durum gen ekspresyonu sonuçlarımıza bakıldığında TFB-TBOA ve seftriakson kombinasyonunda TFB-TBOA'nın bloke edici etkisinin ön plana çıktığı görülmektedir. Aynı grubun MTT analizinde hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Bu sonuç beklenmeyen bir durum gibi gözükse de yapılmış çalışmalarla TFB-TBOA'nın bilinmeyen bir mekanizma ile GBM hücreleri üstünde büyümeyi inhibe ettiği ve hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir.⁸⁷

Çalışmamızda glutamat taşıyıcı gen ekspresyonlarının analizi için Real-Time PCR yöntemini kullandık. Real-Time PCR yöntemi maliyeti düşük, hızlı ve kolay kullanıma sahip, güvenilir ve kantitatif sonuç vermesi, elektroforezde yürütme

basamağının olmaması, tüm dünyada kabul edilen yaygın bir yöntem olması ve yapacağımız çalışmada ölçmek istediğimiz gen ekspresyonları bize en iyi sağlayabilecek yöntem olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Real-Time PCR sonuçlarımıza göre SLC1A1 gen ekspresyonları açısından grupları karşılaştırdığımızda seftriakson grubu kontrol grubuna göre gen ekspresyonunu arttırmıştır. Yapılan çalışmalarda seftriaksonun özellikle SLC1A2 ve daha az olmakla birlikte SLC1A1 gen ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir.⁸⁷ Bizim sonuçlarımız da bu çalışmayla paralellik göstermektedir. UCPH-101 grubu kontrol grubuyla eşit ekspresyon seviyelerine sahip bulunmuştur. Bu durum GBM hücrelerinin halihazırda mevcut bulunan EAAT3 taşıyıcılarını seçici olarak kapatması ile açıklanabilir. Bizim SLC1A3 blokörü olarak verdiğimiz UCPH-101 bu yüzden gen ekspresyonlarında herhangi bir değişime sebep olmamıştır. TFB-TBOA tek başına SLC1A1 gen ekspresyonunu azaltmışken seftriaksonla olan kombinasyonu bilinmeyen bir mekanizma ile seftriaksondan da daha fazla ekspresyona sebep olmuştur. Tüm ilaçlar kombine verildiğinde ise SLC1A1 gen ekspresyonu açısından etkilerinde potansiyalizasyon görülmüş ve en yüksek ekspresyon seviyeleri bu grupta gözlemlenmiştir.

SLC1A2 gen ekspresyonu sonuçlarımıza göre ise bu genin aktivatörü olan seftriakson gen ekspresyonunu artırmıştır. UCPH-101 tek başına istatistiksel olarak anlamlı biçimde olmamakla beraber gen ekspresyonunu artırmıştır ve seftriaksonla yapılan kombinasyonunda gen ekspresyonu açısından etkisi potansiyalize olmuş ve seftriaksonun tek başına yaptığı artıştan daha yüksek bir artış oluşturmuştur. L-Sistein ve TFB-TBOA tek başlarına gen ekspresyonlarını düşürmüşlerdir ve seftriaksonla yapılan kombinasyonlarında seftriaksonun sebep olduğu artışı geri çevirmişlerdir. Tüm ilaçlar kombine verildiğinde ise SLC1A2 gen ekspresyonu açısından etkilerinde

potansiyalizasyon görülmüş ve en yüksek ekspresyon seviyeleri yine bu grupta gözlemlenmiştir.

SLC1A3 gen ekspresyonu sonuçlarımıza göre en düşük ekspresyon, selektif inhibitör olan UCPH-101 grubunda gözlemlenmektedir. seftriakson tedavi gruplarımız diğer genlerden farklı olarak SLC1A3 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı biçimde olmasa da azaltmıştır. Bu durum seftriaksonun EAAT1 üzerinde herhangi bir aktivatör etkisinin bulunmamasıyla açıklanabilir. Seftriakson eklenen kombine tedavi grupları kendi saf gruplarına azalma göstermiştir. Seftriakson yalnızca tek başına değil eklendiği bütün gruplarda SLC1A3 gen ekspresyonunu düşürmüştür. Deney sonuçlarımızda L-Sistein grubu SLC1A3 geni üzerinde en fazla ekspresyona ulaşan gruptur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

GBM hücreleri üzerinde yaptığımız moleküler düzeydeki çalışmalar sonucunda literatürde henüz çalışılmamış olan SLC1A1, SLC1A2 ve SLC1A3 glutamat taşıyıcılarının aktivatör ve blokörlerini tek başına ve bir arada kullanarak hücre canlılığı ve gen ekspresyon düzey değişimlerini inceledik. Seftriakson grubunun hücre canlılığı bakımından diğer gruplara kıyasla en çok hücre ölümüne sebep olan grup olduğunu gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre seftriakson özellikle SLC1A2 ve kısmen SLC1A1 geninin ekspresyonlarını artırmıştır. Zıt özellikler gösteren iki madde olan Seftriakson ve TFB-TBOA birlikte kullanıldığında TFB-TBOA'nın bloke edici etkisinin seftriaksonun aktive edici etkisine baskın geldiğini gözlemledik.

Elde ettiğimiz bulguların ileride yapılacak hayvan çalışmaları ve bu çalışmalardan elde edilecek genetik bulgular ile desteklenmesi GBM tedavisinde umut vadetmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alexei Verkhratsky AB. *glial neurobiology*. Baskı. england, jhon willy & sons ltd, 2007.
2. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*, 2009, 513: 532-41.
3. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 2009, 457: 675-7.
4. Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8: 368-78.
5. van Noort JM. Human glial cell culture models of inflammation in the central nervous system. *Drug Discov Today*, 2006, 11: 74-80.
6. Nedergaard M, Verkhratsky A. Artifact versus reality - How astrocytes contribute to synaptic events? *Glia*, 2012, 60: 1013-1023.
7. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 2008, 60: 430-40.
8. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 2010, 119: 7-35.
9. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*, 2009, 100: 2235-41.
10. Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PMJ, Grabenbauer GG, Ochsenbein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M. Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant

- Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28: 2712-2718.
11. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system (vol 114, pg 97, 2007). *Acta Neuropathologica*, 2007, 114: 547-547.
 12. Quint K, Stiel N, Neureiter D, Schlicker HU, Nimsky C, Ocker M, Strik H, Kolodziej MA. The role of sphingosine kinase isoforms and receptors S1P1, S1P2, S1P3, and S1P5 in primary, secondary, and recurrent glioblastomas. *Tumor Biology*, 2014, 35: 8979-8989.
 13. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen YW, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 2013, 15: 1-56.
 14. Wen PY, Kesari S. Malignant glioma in adults (vol 359, pg 492, 2008). *New England Journal of Medicine*, 2008, 359: 877-877.
 15. Bink A, Gaa J, Franz K, Weidauer S, Yan B, Lanfermann H, Seifert V, Zanella FE. Importance of diffusion-weighted imaging in the diagnosis of cystic brain tumors and intracerebral abscesses. *Zentralbl Neurochir*, 2005, 66: 119-25.
 16. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology*, 2002, 4: 278-299.
 17. Larsen C. Genetic and molecular abnormalities of glioblastomas (GBM). *Bulletin Du Cancer*, 2010, 97: 1389-1407.

18. Watts C, Piccirillo S, Kearney L, Potter N, van Delft F, Coleman S, Lillis S, Carnicer MJ, Greaves M. Interrogation of Sub-Clonal Genetic Diversity of Human Gbm Reveals Genetic Heterogeneity in Tumour-Propagating Cells, Which Display Variable Competitive Capacity for Tumour Propagation in Vivo. *Neuro-Oncology*, 2014, 16.
19. Halperin EC, Bentel G, Heinz ER, Burger PC. Radiation-Therapy Treatment Planning in Supratentorial Glioblastoma-Multiforme - an Analysis Based on Post-Mortem Topographic Anatomy with Ct Correlations. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 1989, 17: 1347-1350.
20. Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P. Topographic Anatomy and Ct Correlations in the Untreated Glioblastoma-Multiforme. *Journal of Neurosurgery*, 1988, 68: 698-704.
21. Burger PC, Shibata T, Kleihues P. Topographic Anatomy and Cytologic Composition of the Untreated Glioblastoma-Multiforme. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1986, 45: 326-326.
22. Schijns VEJC, Pretto C, Devillers L, Pierre D, Hofman FM, Chen TC, Mespouille P, Hantos P, Glorieux P, Bota DA, Stathopoulos A. First clinical results of a personalized immunotherapeutic vaccine against recurrent, incompletely resected, treatment-resistant glioblastoma multiforme (GBM) tumors, based on combined allo- and auto-immune tumor reactivity. *Vaccine*, 2015, 33: 2690-2696.
23. Asgeirsdottir SA, Zwiers PJ, Morselt HW, Moorlag HE, Bakker HI, Heeringa P, Kok JW, Kallenberg CG, Molema G, Kamps JA. Inhibition of proinflammatory genes in anti-GBM glomerulonephritis by targeted dexamethasone-loaded AbEsel liposomes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294: F554-61.

24. Shamisa A, Bance M, Nag S, Tator C, Wong S, Noren G, Guha A. Glioblastoma multiforme occurring in a patient treated with gamma knife surgery: case report and review of the literature. *J Neurosurg*, 2013, 119 Suppl: 816-21.
25. Brzozowska A, Torun A, Mazurkiewicz M. The impact of surgery on the efficacy of adjuvant therapy in glioblastoma multiforme. *Adv Clin Exp Med*, 2015, 24: 279-87.
26. Yano S, Miwa S, Kishimoto H, Toneri M, Hiroshima Y, Yamamoto M, Bouvet M, Urata Y, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM. Experimental Curative Fluorescence-guided Surgery of Highly Invasive Glioblastoma Multiforme Selectively Labeled With a Killer-reporter Adenovirus. *Mol Ther*, 2015, 23: 1182-8.
27. Pasqualetti F, Scotti V, Grandinetti A, Grespi S, Giraldi D, Fabrini MG, Romanini A, Vannozzi R, Salvadori B, Ricci S, Cionini L. Treatment of recurrent glioblastoma multiforme with fotemustine and brachithery. *Annals of Oncology*, 2006, 17: Xi61-Xi61.
28. Simpson L, Golanis E. Recurrent glioblastoma multiforme: advances in treatment and promising drug candidates. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2006, 6: 1593-1607.
29. Pedicini P, Fiorentino A, Simeon V, Tini P, Chiumento C, Pirtoli L, Salvatore M, Storto G. Clinical radiobiology of glioblastoma multiforme: estimation of tumor control probability from various radiotherapy fractionation schemes. *Strahlenther Onkol*, 2014, 190: 925-32.
30. Hashem SA, Salem A, Al-Rashdan A, Ezam N, Nour A, Alsharbaji A, Rejeeth C, Mohamad I, Sughayer M, Elyan M, Al-Hussaini M, Addasi A, Almousa A.

- Radiotherapy with concurrent or sequential temozolomide in elderly patients with glioblastoma multiforme. *J Med Imaging Radiat Oncol*, 2012, 56: 204-10.
31. Balducci M, Chiesa S, Diletto B, D'Agostino GR, Mangiola A, Manfrida S, Mantini G, Albanese A, Fiorentino A, Frascino V, De Bari B, Micciche F, De Rose F, Morganti AG, Anile C, Valentini V. Low-dose fractionated radiotherapy and concomitant chemotherapy in glioblastoma multiforme with poor prognosis: a feasibility study. *Neuro Oncol*, 2012, 14: 79-86.
 32. Dos Santos MA, Pignon JP, Blanchard P, Lefeuvre D, Levy A, Touat M, Louvel G, Dhermain F, Soria JC, Deutsch E, Le Teuff G. Systematic review and meta-analysis of phase I/II targeted therapy combined with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme: quality of report, toxicity, and survival. *J Neurooncol*, 2015, 123: 307-14.
 33. Lai IC, Shih PH, Yao CJ, Yeh CT, Wang-Peng J, Lui TN, Chuang SE, Hu TS, Lai TY, Lai GM. Elimination of cancer stem-like cells and potentiation of temozolomide sensitivity by Honokiol in glioblastoma multiforme cells. *PLoS One*, 2015, 10: e0114830.
 34. van Linde ME, Verhoeff JJ, Richel DJ, van Furth WR, Reijneveld JC, Verheul HM, Stalpers LJ. Bevacizumab in combination with radiotherapy and temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Oncologist*, 2015, 20: 107-8.
 35. Hofland KF, Hansen S, Sorensen M, Engelholm S, Schultz HP, Muhic A, Grunnet K, Ask A, Costa JC, Kristiansen C, Thomsen C, Poulsen HS, Lassen U. Neoadjuvant bevacizumab and irinotecan versus bevacizumab and temozolomide followed by concomitant chemoradiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme: A randomized phase II study. *Acta Oncol*, 2014, 53: 939-44.

36. Welzel G, Gehweiler J, Brehmer S, Appelt JU, von Deimling A, Seiz-Rosenhagen M, Schmiedek P, Wenz F, Giordano FA. Metronomic chemotherapy with daily low-dose temozolomide and celecoxib in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a retrospective analysis. *J Neurooncol*, 2015.
37. Gebhardt BJ, Dobelbower MC, Ennis WH, Bag AK, Markert JM, Fiveash JB. Patterns of failure for glioblastoma multiforme following limited-margin radiation and concurrent temozolomide. *Radiat Oncol*, 2014, 9: 130.
38. Yang LJ, Zhou CF, Lin ZX. Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review. *Cancer Invest*, 2014, 32: 31-6.
39. Voelter V, Zouhair A, Thuerig C, Vuilleumier H, Matter M, Bouzourene H, Leyvraz S, Stupp R. Distant failure remains a major concern in treating locally advanced rectal cancer: Results of preoperative hyperfractionated accelerated radiotherapy (HART) and concomitant CPT-11. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23: 298s-298s.
40. Kerr YH, Chehbouni A, Hipps LH, Schieldge J, Cooper DI, Eichinger WE, Scott R, Goodrich DC, Shuttleworth J, Lee KH, Watts C. Flux aggregation over heterogeneous surfaces in a semi-arid region: Modelling and validation. *Special Symposium on Hydrology*, 1998: 27-32.
41. Dean JLE, Wait R, Mahtani KR, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR (vol 21, pg 721, 2001). *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25: 3400-3400.
42. Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1000832.

43. Spencer S, Chung J, Thompson M, Piedra PA, Jewell A, Avadhanula V, Mei MH, Jackson ML, Meece J, Sundaram M, Belongia EA, Cross R, Johnson E, Bullotta A, Rinaldo C, Gaglani M, Murthy K, Clipper L, Berman L, Flannery B. Factors associated with real-time RT-PCR cycle threshold values among medically attended influenza episodes. *Journal of Medical Virology*, 2016, 88: 719-723.
44. Olivier T, Sveikauskas V, Demonty E, De Jonghe K, Gentit P, Virscek-Marn M, Grausgruber-Groger S, Morio S, Faggioli F, Visage M, Fauche F, Gusina M, Luigi M, Lasner H, Mavric-Plesko I. Inter-laboratory comparison of four RT-PCR based methods for the generic detection of pospiviroids in tomato leaves and seeds. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, 144: 645-654.
45. Tartor YH, El-Naenaeey EY. RT-PCR detection of exotoxin genes expression in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Cellular and Molecular Biology*, 2016, 62: 56-62.
46. Forghani F, Singh P, Seo KH, Oh DH. A novel pentaplex real time (RT)- PCR high resolution melt curve assay for simultaneous detection of emetic and enterotoxin producing *Bacillus cereus* in food. *Food Control*, 2016, 60: 560-568.
47. Dubovsky SL, Thomas M. Beyond specificity: effects of serotonin and serotonergic treatments on psychobiological dysfunction. *J Psychosom Res*, 1995, 39: 429-44.
48. Emrich HM, von Zerssen D, Kissling W, Moller HJ, Windorfer A. Effect of sodium valproate on mania. The GABA-hypothesis of affective disorders. *Arch Psychiatr Nervenkr*, 1980, 229: 1-16.
49. Furukawa T, Hoshino S, Kobayashi S, Asakura T, Takahashi M, Atsumi T, Teramoto A. The glutamate AMPA receptor antagonist, YM872, attenuates cortical tissue loss, regional cerebral edema, and neurological motor deficits after experimental brain injury in rats. *J Neurotrauma*, 2003, 20: 269-78.

50. Hertz L. Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III. *Neurochem Int*, 2006, 48: 416-25.
51. Kanner BI. Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family. *FEBS Lett*, 1993, 325: 95-9.
52. Medina A, Burke S, Thompson RC, Bunney W, Jr., Myers RM, Schatzberg A, Akil H, Watson SJ. Glutamate transporters: a key piece in the glutamate puzzle of major depressive disorder. *J Psychiatr Res*, 2013, 47: 1150-6.
53. Albin RL, Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology*, 1992, 42: 733-8.
54. Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 2000, 32: 1-14.
55. Amara SG, Fontana AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int*, 2002, 41: 313-8.
56. Balcar VJ. Molecular pharmacology of the Na⁺-dependent transport of acidic amino acids in the mammalian central nervous system. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 291-301.
57. Bellesi M, Melone M, Gubbini A, Battistacci S, Conti F. GLT-1 upregulation impairs prepulse inhibition of the startle reflex in adult rats. *Glia*, 2009, 57: 703-13.
58. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 1973, 232: 331-56.
59. Clements JD. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci*, 1996, 19: 163-71.
60. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37: 205-37.

61. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res*, 1999, 57: 417-28.
62. Kalivas PW, Duffy P, Barrow J. Regulation of the mesocorticolimbic dopamine system by glutamic acid receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, 251: 378-87.
63. Kurumaji A, Nehls DG, Park CK, McCulloch J. Effects of NMDA antagonists, MK-801 and CPP, upon local cerebral glucose use. *Brain Res*, 1989, 496: 268-84.
64. Lapidus KA, Soleimani L, Murrough JW. Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2013, 9: 1101-12.
65. Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D, Donnelly D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience*, 2007, 146: 617-29.
66. Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology*, 1998, 18: 135-74.
67. Marsden WN. Stressor-induced NMDAR dysfunction as a unifying hypothesis for the aetiology, pathogenesis and comorbidity of clinical depression. *Med Hypotheses*, 2011, 77: 508-28.
68. McMillian M, Pritchard GA, Miller LG. Characterization of Ca²⁺(+)-mobilizing excitatory amino acid receptors in cultured chick cortical cells. *Eur J Pharmacol*, 1990, 189: 253-66.
69. Mitani A, Tanaka K. Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: an in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1. *J Neurosci*, 2003, 23: 7176-82.
70. Palucha A, Pilc A. Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol Ther*, 2007, 115: 116-47.

71. Ninan PT. The functional anatomy, neurochemistry, and pharmacology of anxiety. *J Clin Psychiatry*, 1999, 60 Suppl 22: 12-7.
72. Huynh THV, Abrahamsen B, Madsen KK, Gonzalez-Franquesa A, Jensen AA, Bunch L. Design, synthesis and pharmacological characterization of coumarin-based fluorescent analogs of excitatory amino acid transporter subtype 1 selective inhibitors, UCPH-101 and UCPH-102. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, 20: 6831-6839.
73. Bozzo L, Chatton J-Y. Inhibitory effects of (2S, 3S)-3-[3-[4-(trifluoromethyl)benzoylamino]benzyloxy]aspartate (TFB-TBOA) on the astrocytic sodium responses to glutamate. *Brain Research*, 2010, 1316: 27-34.
74. Bridges RJ, Esslinger CS. The excitatory amino acid transporters: Pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacology & Therapeutics*, 2005, 107: 271-285.
75. Feng D, Wang W, Dong Y, Wu L, Huang J, Ma Y, Zhang Z, Wu S, Gao G, Qin H. Ceftriaxone alleviates early brain injury after subarachnoid hemorrhage by increasing excitatory amino acid transporter 2 expression via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Neuroscience*, 2014, 268: 21-32.
76. Babu RPA, Manoharan S, Ramadass P, Chandran NDJ. Evaluation of RT-PCR Assay for Routine Laboratory Diagnosis of Rabies in Post Mortem Brain Samples from Different Species of Animals. *Indian Journal of Virology*, 2012, 23: 392-396.
77. de-Paris F, Beck C, Machado ABMP, Paiva RM, Menezes DD, Nunes LD, Kuchenbecker R, Barth AL. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods*, 2012, 186: 189-192.

78. Khoo JS, Chai SF, Mohamed R, Nathan S, Firdaus-Raih M. Computational discovery and RT-PCR validation of novel Burkholderia conserved and Burkholderia pseudomallei unique sRNAs. *Bmc Genomics*, 2012, 13.
79. Wang WX, Sun ZH, Chen HM, Xu BN, Wang FY. Role and mechanism of Sophoridine on proliferation inhibition in human glioma U87MG cell line. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 464-71.
80. Youn P, Chen Y, Furgeson DY. Cytoprotection against beta-amyloid (Abeta) peptide-mediated oxidative damage and autophagy by Keap1 RNAi in human glioma U87mg cells. *Neurosci Res*, 2015, 94: 70-8.
81. Zhu Y, Liu A, Zhang X, Qi L, Zhang L, Xue J, Liu Y, Yang P. The effect of benzyl isothiocyanate and its computer-aided design derivants targeting alkylglycerone phosphate synthase on the inhibition of human glioma U87MG cell line. *Tumour Biol*, 2015, 36: 3499-509.
82. Tse DY, Chung I, Wu SM. Pharmacological inhibitions of glutamate transporters EAAT1 and EAAT2 compromise glutamate transport in photoreceptor to ON-bipolar cell synapses. *Vision Research*, 2014, 103: 49-62.
83. O'Kane RL, Martinez-Lopez I, DeJoseph MR, Vina JR, Hawkins RA. Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem*, 1999, 274: 31891-5.
84. Sari Y, Toalston JE, Rao PSS, Bell RL. Effects of ceftriaxone on ethanol, nicotine or sucrose intake by alcohol-preferring (P) rats and its association with GLT-1 expression. *Neuroscience*, 2016, 326: 117-125.
85. Sattler R, Tyler B, Hoover B, Coddington LT, Recinos V, Hwang L, Brem H, Rothstein JD. Increased expression of glutamate transporter GLT-1 in peritumoral

tissue associated with prolonged survival and decreases in tumor growth in a rat model of experimental malignant glioma: Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*, 2013, 119: 878-886.

86. de Visser SP, Straganz GD. Why do cysteine dioxygenase enzymes contain a 3-His ligand motif rather than a 2His/1Asp motif like most nonheme dioxygenases? *J Phys Chem A*, 2009, 113: 1835-46.
87. Yao PS, Kang DZ, Lin RY, Ye B, Wang W, Ye ZC. Glutamate/glutamine metabolism coupling between astrocytes and glioma cells: neuroprotection and inhibition of glioma growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450: 295-9.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Kemal Alp NALCI Doğum tarihi: 15.09.1991 Doğum Yeri: Osmangazi Medeni Hali: Evli Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji ABD Tel: 531 717 69 03 Faks: E-mail: kemalalpnaici@gmail.com
Eğitim
Lise: Bursa Anadolu Kız Lisesi Lisans: Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: 76,25 İlkbahar YDS Almanca: Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Arş.Gör.Dr.Kemal Alp NALCI
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Seftriaksonun ekzitator aminoasit taşıyıcı 1 (EAAT1), EAAT2, EATT3 blokerleriyle birlikte kullanımının sıçan glioblastome multiforme(GBM) hücre hattı üzerindeki etkilerinin incelenmesi
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 2 Karar No: 17	Tarih: 25.02.2016
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin Kendisi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Hülya AKSOY
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Mustafa GÜL
Üye

Prof.Dr.Hamit ACEMOĞLU
Üye

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Doç.Dr.M. Hamidullah UYANIK
Üye

Doç.Dr.Zeynep ÇAKIR
Üye

Yrd.Doç.Dr.M.Erdem SAĞSÖZ
Üye

Uz.Dr.Sevilay AKALP ÖZMEN
Üye

Arş.Gör.Kamil DURMUŞ
Üye (Hukukçu)

Gülten TEK
Üye