T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Achillea biebersteinii AFAN.'NIN EPENDİMAL TÜMÖR KÜLTÜR HÜCRELERİNDE ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ERKAN ÖZBAY

BİYOFİZİK

ANABİLİM DALI

MERSİN

NİSAN-2023

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Achillea biebersteinii AFAN.'NIN EPENDİMAL TÜMÖR KÜLTÜR HÜCRELERİNDE ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ERKAN ÖZBAY
ORCID ID: 0000-0002-8781-3877

DANIŞMAN
PROF.DR. ÜLKÜ ÇÖMELEKOĞLU

BİYOFİZİK

ANABİLİM DALI

MERSİN
NİSAN- 2023

ÖZET

Achillea biebersteinii AFAN.'NIN EPENDİMAL TÜMÖR KÜLTÜR HÜCRELERİNDE ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanser tedavisinde umut vadeden gelişmeler olsa da beyin kanserlerinden gliomaların oldukça kötü prognozlu bir türü olan ependimomaların tedavisi konusunda bilinenler sınırlıdır.

Bu çalışmada *Achillea biebersteinii* su ekstresinin ependimomaların alt formu olan DKFZ-EPN1 hücre hattı üzerine anti-kanser etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla *Achillea biebersteinii*'nin ultrasonik yöntemlerle su ekstresi elde edilmiş, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) analiziyle sitotoksik etkileri saptanmış ve kontrol (ekstre eklenmeyen), düşük (0,115 mg/mL), orta (IC50=0,241 mg/mL) ve yüksek doz (0,482 mg/mL) olmak üzere gruplar oluşturulmuştur. Tüm gruplarda, akım sitometri yöntemiyle apoptotik aktivite ve hücre döngüsü analizleri yapılmıştır. Ekstrenin Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB) ve Geçici Reseptör Potansiyel Katyon (TRPC)6 kanalları gen ekspresyona etkisi gerçek zamanlı PCR analiziyle belirlenmiştir. Geçici Reseptör Potansiyel (TRP) kanal akımları üzerine etkisi yama kenetleme yöntemiyle analiz edilmiş, alınan kayıtlarda maksimum akım ve iletkenlik değerleri ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca malondialdehit (MDA) seviyeleri ile oksidatif stres belirteci olan katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri incelenmiştir.

Sitotoksisite analizlerinde hücre canlılığında tüm gruplarda kontrole göre azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hem TRPC6 hem de NF-κB için gen ekspresyon değerlerinde tüm gruplarda kontrole göre azalma görülmüştür ($p<0,01$). Yama kenetleme analizlerinde tüm gruplarda maksimum akım ve iletkenlik değerlerinde kontrole göre azalma belirlenmiştir ($p<0,05$). Akım sitometri deneylerinde ekstrenin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunda inhibisyon etkisi olduğu, apoptozu indüklediği ve G1-fazında hücre siklusu tutuklanmasına yol açtığı belirlenmiştir. Katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksitdismutaz ve malondialdehit düzeylerinde ise anlamlı değişiklik gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak *Achillea biebersteinii* su ekstresinin doza bağlı olarak DKFZ-EP1NS hücreleri için sitotoksik olduğu, TRPC6 ve NF-κB gen ekspresyonlarını azalttığı, TRP kanal akımlarını bloke ettiği, bunlara bağlı olarak da hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar *Achillea bie*bersteinii su ekstresinin ependimoma için küratif bir fitoterapötik ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmekle birlikte bu konuda *in vivo* ve klinik çalışmaları da içeren daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Ependimoma; TRPC6; Fitoterapi; *Achillea biebersteinii*; Antikanser, Sitotoksisite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECT Of *Achillea biebersteinii* AFAN in EPENDYMAL TUMOR CULTURE CELLS

Although there are promising developments in cancer treatment, the treatment of ependymomas, a type of glioma with a very poor prognosis among brain cancers, is limited in terms of what is known.

In this study, the anti-cancer effects of *Achillea biebersteinii* aqueous extract on the DKFZ-EPN1 cell line, which is a subtype of ependymomas, have been investigated. For this purpose, aqueous extract of *Achillea biebersteinii* was obtained by ultrasonic methods, the cytotoxic effects were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) analysis, and groups were formed including control (no extract added), low (0,115 mg/mL), medium (IC50=0,241 mg/mL) and high (0,482 mg/mL). Apoptotic activity and cell cycle analyses were performed by flow cytometry method in all groups. The effect of the extract on Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) and Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)6 channel gene expression was determined by real-time PCR analysis. The effect of the extract on Transient Receptor Potential (TRP) channel currents was analyzed by patch clamp method, and the evaluation was made by measuring the maximum current value in the recordings. In addition, malondialdehyde levels and oxidative stress markers such as catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities were analyzed.

In cytotoxicity analyses, a decrease in cell viability compared to the control was detected in all groups ($p<0,05$). A decrease in gene expression values for both TRPC6 and NF-κB compared to the control was observed in all groups ($p<0,01$). A decrease in maximum current and conductance values compared to the control was determined in all groups in patch clamp analyses ($p<0,05$). In flow cytometry experiments, it was determined that the extract had a dose-dependent inhibitory effect on cell proliferation, induced apoptosis, and caused cell cycle arrest at the G_1 phase. No significant changes were observed in the levels of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA).

As a result, it was observed that *Achillea biebersteinii* aqueous extract was dose-dependently cytotoxic to DKFZ-EP1NS cells, decreased TRPC6 and NF-kB gene expressions, blocked TRP channel currents, depending on these results inhibited cell proliferation and induced apoptosis. Although these results suggest that *Achillea biebersteinii* aqueous extract can be used as a curative phytotherapeutic agent for ependymoma, more comprehensive studies including *in vivo* and clinical studies are needed.

Keywords: Ependymoma; TRPC6; Phytotherapy; *Achillea biebersteinii*; Anticancer, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince iyi bir akademisyen olarak yetişmem için yoğun çaba harcayan, bu yolda bana yol gösteren, insana verdiği değer ve akademik kişiliği ile de kendime örnek aldığım danışman hocam Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na hem eğitimim ve fikirlerim konusunda, hem de tezimin hazırlanma sürecinde göstermiş olduğu titizlikten ve bilimsel katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Anabilim dalımızda görev alan değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten ERDAL ve Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI'ya lisansüstü eğitimim boyunca verdikleri her türlü desteklerinden, bilimsel ve akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Her türlü bilimsel fikrimde ve çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan, tecrübe ve bilgi birikimiyle destek olan Tıp Fakültesi öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Derya Ümit TALAS'a ortaya koyduğum her türlü fikirde manevi desteğinden ve verdiği cesaretten, ayrıca tezime, bilgi birikimime ve akademik kişiliğime yapmış olduğu katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Yoğun programına rağmen ilgi alanlarımda kendimi geliştirmemde ve tezimin olgunlaşmasında desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Vural HAMZAOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamın uygulama ve analiz basamaklarında özverili çalışmalarından dolayı Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN'a ve doktora öğrencisi Ümmühan ÜNLÜ'ye, Tarsus Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi Dr. Metin YILDIRIM'a, Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi Dr. Fatma SÖĞÜT'e, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Hatice ORUÇ DEMİRBAĞ'a, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Serkan KÜÇÇÜKTÜRK'e, Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Tuğçe DURAN'a ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Dr. Mehmet Ali KARASELEK'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Dursun ODABAŞ'a vermiş olduğu her türlü desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Öğretim görevlisi olarak çalışmaya başladığım günden itibaren lisansüstü eğitimim ve bilimsel araştırmalarım konusunda verdikleri destekten dolayı Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Rektörlüğü ve Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Müdürlüğü'ne, ayrıca birlikte çalıştığım öğretim elemanı görev arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hem şahsi ve akademik yaşantım ve hem de tezimin her basamağında verdikleri manevi ve akademik desteklerinden dolayı Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi Dr. Sami KARAGÖZ'e ve Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Bülent IŞIK'a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca birlikte ders aldığım ve laboratuvarda birlikte çalıştığım arkadaşlarımın hepsine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Dünyaya gözümü açtığım ilk andan itibaren hayatımın her aşamasında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan, insani ve mesleki öğretileriyle yol gösteren kıymetli babam ve annem Ömer Tuncay ÖZBAY ve İnci ÖZBAY'a, çok sevdiğim kardeşim Ecem ÖZBAY'a, hayatım boyunca bana yol arkadaşlığı yapacak olan, hayat arkadaşım Ayşe ÖZBAY'a verdikleri ve verecekleri desteklerden ötürü sonsuz teşekkürlerimle...

Erkan ÖZBAY

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2021-2-TP3-4488.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi Kanserleri	4
2.1.1.1. Glioma	4
2.1.1.1.1. Glioma Çeşitleri	6
2.1.1.1.1.1. Ependimal Tümör/Ependimoma	7
2.1.1.1.1.1.1. Ependimal Hücreler ve Ependimal Tümör/Ependimoma	7
2.1.1.1.1.1.2. Ependimal Tümörler/Ependimoma	9
2.1.1.1.1.1.3. 2016 Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Ependimal Tümörlerin Histolojik Sınıflandırılması	11
2.1.1.1.1.1.4. 2016 Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Ependimal Tümörlerin Moleküler Sınıflandırılması	12
2.1.1.1.1.1.5. 2016 Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre RELA Füzyon Ependimal Tümörler	13
2.1.1.1.1.1.6. Dünya Sağlık Örgütü 2021 Merkezi Sinir Sistemleri Sınıflandırmasında Ependimal Tümörler İçin Yapılan Değişiklikler	13
2.1.1.1.1.1.6.1. Supratentoryal Ependimal Tümör	13
2.1.1.1.1.1.7. Ependimal Tümörlerin Tedavileri	14
2.1.1.1.1.1.8. Ependimal Tümörler ve Nükleer Faktör Kappa B Sinyal Yolağı	15
2.1.2. Apoptoz ve Kanser	18
2.1.3. Apoptoz ve Kalsiyum	18
2.1.4. Kalsiyum Kanalları ve Kanser	19
2.1.4.1. Glioma Hücrelerinde Kalsiyum Sinyali ve Geçici Reseptör Potansiyel Kanalları	21
2.1.4.2. Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanalları	21

	Sayfa
2.1.4.2.1. Geçici Reseptör Potansiyel Katyon 6 Kanalları	23
2.1.4.2.2. Glioma Hücrelerinde Geçici Reseptör Potansiyel Katyon 6 Kanalları	24
2.1.5. Antioksidan Savunma Sistemler	27
2.1.5.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Biyolojik Etkileri	28
2.1.5.2. Lipidperoksidasyonu ve Malondialdehit	31
2.1.5.3. Glutatyon	32
2.1.5.4. Glioma ve Reaktif Oksijen Türleri	32
2.2. Fitoterapi	33
2.2.1. Kanser ve Fitoterapi	34
2.2.2. Asteraceae Familyası	35
2.2.2.1. *Achillea biebersteinii* Afan.	35
2.2.2.1.1. *Achillea biebersteinii* İçeriği	35
2.2.2.1.1.1. *Achillea biebersteinii* Fenolik İçeriklerinin Terapötik Etkileri	37
2.2.2.1.1.2. Luteolin	37
2.2.2.1.1.3. Kuersetin	38
2.2.2.1.1.4. Kafeik Asit	39
2.2.2.1.1.5. Ferulik Asit	41
2.2.2.1.1.6. Kaempferol	42
2.2.2.1.1.7. Myrecetin	42
2.2.2.1.1.8. Rutin	43
2.2.2.1.2. *Achillea biebersteinii* ve Geleneksel Tıp	44
2.2.2.1.3. *Achillea biebersteinii* ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar	44
2.2.2.1.4. *Achillea biebersteinii*'nin Kansere Karşı Terapötik Etkileri Üzerine Bilimsel Çalışmalar	47
3. MATERYAL ve YÖNTEM	49
3.1. Bitkisel Materyal	49
3.2. Ekstraksiyon ve İzolasyon	50
3.3. Hücre Kültürü	51
3.3.1. Hücrelerin Çözdürülmesi, Çoğaltılması ve Pasajlanması	51
3.3.2. Hücre Sayımı	52
3.3.3. Hücrelerin Dondurularak Saklanması	53
3.4. Sitotoksisite Analizi	53
3.4.1. Hücrelerin Hazırlanması	53
3.4.2. Hücrelerin Sayımı	54
3.4.3. Sitotoksisite Testi	55
3.5. Uygulanacak Dozlar ve Grupların Belirlenmesi	59

	Sayfa
3.6. Akım Sitometrisi	60
3.6.1. Akım Sitometrik Hücre Yüzeyinde Annexin-V-FITC ile Apoptoz Ölçülmesi	60
3.6.2. Akım Sitometrik DNA Hücre Döngüsü Analizi	60
3.7. Elektrobiyofiziksel Analiz	61
3.7.1. Yama Kenetleme Yöntemi ile Geçici Reseptör Potansiyel Kanal Akımlarının Ölçülmesi	61
3.7.1.1. Hücrelerin Hazırlanması	61
3.7.1.2. Banyo ve Pipet Çözeltileri	62
3.7.1.3. Pipetlerin Hazırlanması	62
3.7.1.4. Tüm Hücre Yama Kenetleme Analizi	62
3.8. Antioksidan Aktivitenin Ölçümü	63
3.8.1. Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi	63
3.8.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	65
3.8.3. Katalaz Aktivitesi	65
3.8.4. Malondialdehit Ölçümü	66
3.9. Gen Ekspresyonu Deneyleri	67
3.9.1. RNA İzolasyonu	68
3.9.2. cDNA Sentezi	68
3.9.3. Gerçek Zamanlı PCR	69
3.10. İstatistiksel Analiz	69
3.10.1. Gerçek Zamanlı PCR İstatistiksel Analizi	69
4. BULGULAR	70
4.1. Tüm Hücre Yama Kenetleme Yöntemi ile Geçici Reseptör Potansiyel Kanal Akımlarının Kayıtlanması	70
4.2. Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi	74
4.3. Gen Ekspresyonu Analizi	76
4.4. Akım Sitometrisi	77
4.4.1. Akım Sitometrisi ile Apoptoz Analizi	77
4.4.2. Akım Sitometrisi ile Hücre Döngüsü Analizi	79
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	82
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	111

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. 2021 Dünya Sağlık Örgütü Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması	5
Tablo 2.2. 2021 Dünya Sağlık Örgütü Bazı Gliomaların Derecelendirilmesi	6
Tablo 2.3. 2021 Dünya Sağlık Örgütü Gliomalar, Glionöral Tümörler ve Nöronal Tümörlerinin Sınıflandırılması	8
Tablo 2.4. Ependimomaların 2016 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırmasına Göre Derecelendirilmesi	11
Tablo 2.5. İntrakranyal Ependimal Tümörlerin Ana Gruplarının Özelliklerinin Özeti	14
Tablo 3.1. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) Uygulaması Sonuçları	56
Tablo 3.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Ölçüm Protokolü	64
Tablo 3.3. Malondialdehit Ölçüm Protokolü	67
Tablo 3.4. Gen Ekspresyon Deneyleri İçin Dizayn Edilen Primerler	67
Tablo 3.5. Steril Nükleaz-Free Tüpe Eklenen Reaktifler	68
Tablo 3.6. Soğutulan Karışıma Eklenen Bileşenler	69
Tablo 4.1. Kontrol ve Doz Gruplarının Maksimum Akım ve İletkenlik Değerleri	70
Tablo 4.2. Gen Ekspresyon Deneyi Sonuçları	76
Tablo 4.3. Kontrol ve Doz Gruplarına Göre Nekrotik, Geç Apoptotik, Canlı Hücre ve Erken Apoptotik Ortalama Yüzde Oranları ve Standart Sapma Değerleri	78
Tablo 4.4. Kontrol ve Doz Gruplarına Göre G_0, G_1, S ve G_2hücre Döngüsü Fazlarındaki Ortalama Hücre Oranları ve Standart Sapma Değerleri	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Farklı Birincil ve İkincil Malign Beyin Tümörlerinin Genel Özeti	7
Şekil 2.2. Posterior Fossa Ependimal Tümör ve Supratentoryal Ependimal Tümörlerin Bulunduğu Bölge ve Köken Aldıkları Hücre Orijini	8
Şekil 2.3. İntrakranyal Pediatrik Ependimomada Tümörler Arası ve Tümör İçi Heterojenitenin Ortaya Çıkarılmasına Katkıda Bulunan En Önemli Moleküler Bulguların Zaman Çizelgesi	10
Şekil 2.4. Nükleer Faktör Kappa B Alt Birim Yapıları ve Dimerik Kombinasyonlar	16
Şekil 2.5. Nükleer Faktör Kappa B Sinyal Yolakları	17
Şekil 2.6 Apoptozisten Kaçınma ve Karsinogenezis Mekanizması	18
Şekil 2.7. Memeli Hücrelerinde Başlıca Kalsiyum Kanallarının, Pompaların, Değiştokuşçuların ve Sensörlerin Şematik Gösterimi	20
Şekil 2.8. Beyin Kanseri Hücrelerinde Kalsiyum Sinyal Proteinleri Tarafından Desteklenen Biyolojik Süreçlerin Şematik Gösterimi.	20
Şekil 2.9. Geçici Reseptör Potansiyel Kanalları Yapı Şeması	22
Şekil 2.10. Geçici Reseptör Potansiyel Kanal Katyon 6 ve Glioma Metabolizması	27
Şekil 2.11. Reaktif Oksijen Türlerinin İndükleyicileri ve Temizleyicileri Aracılığıyla Hücresel Homeostazın Sürdürülmesi	29
Şekil 2.12. Reaktif Oksijen Türleri ve Apoptoz Arasındaki İlişki	30
Şekil 2.13. Reaktif Oksijen Türleri-Kanser İlişkisi ve Antioksidan Bağlantı Noktaları	31
Şekil 3.1. Bitkinin Toplandığı Bölgelerden Birindeki Yayılım Örnekleri	49
Şekil 3.2 *Achillea biebersteinii* Örneklerinin Kurutulması	50
Şekil 3.3. *Achillea biebersteinii* Örneklerinin Toz Haline Getirilmesi	51
Şekil 3.4. Ekstraksiyon Cihazları	51
Şekil 3.5. Çoğalmış DKFZ-EP1NS Hücrelerinin Farklı Büyütmelerde Görüntüleri	52
Şekil 3.6. Ekstrelerin Sitotoksisitelerinin Belirlenmesinde Uygulanan Doz Miktarları	55
Şekil 3.7. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) Analizi için 72 Saatlik Farklı Dozlarda *Achillea biebersteinii* Su Ekstresi Uygulanmış Hücre Görüntüleri	56
Şekil 3.8. Konsantrasyona Karşı Hücre Canlılığı (%) Grafiği	57
Şekil 3.9. Konsantrasyona Karşı Sitotoksisite (%) Grafiği	57
Şekil 3.10. Sitotoksisite Testi	58
Şekil 3.11. IC_{50} Değerinin Hesabı İçin Elde Edilen Konsantrasyona Bağlı Hücre Ölümü Eğrisi	58
Şekil 3.12. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) Uygulaması Sonrası Belirlenen Dozlarda *Achillea biebersteinii* uygulanmış Gruplar ve Kontrol Grubu Görüntüleri	59

Sayfa

Şekil 3.13. Deney Grubu Hücrelerin Görüntüleri 60

Şekil 3.14. Yama Kenetleme Analizi 61

Şekil 4.1. Kontrol Grubu İçin Tüm Hücre Yama Kenetleme Geçici Reseptör Potansiyel Kanal Akımı Kaydı Ortalaması 71

Şekil 4.2. Düşük Doz Grubu İçin Tüm Hücre Yama Kenetleme Geçici Reseptör Potansiyel Kanal Akımı Kaydı Ortalaması 71

Şekil 4.3. Orta Doz Grubu İçin Tüm Hücre Yama Kenetleme Geçici Reseptör Potansiyel Kanal Akımı Kaydı Ortalaması 72

Şekil 4.4. Yüksek Doz Grubu İçin Tüm Hücre Yama Kenetleme Geçici Reseptör Potansiyel Kanal Akımı Kaydı Ortalaması 72

Şekil 4.5. Doz Grubuna Göre Tüm Hücre Yama Kenetleme ile Elde Edilen Maksimum Akım Kayıtlarının Karşılaştırılması 72

Şekil 4.6. Doğru Denklemine Fit Edilmiş Kontrol Grubu Akım-Voltaj Eğrisi 73

Şekil 4.7. Doğru Denklemine Fit Edilmiş Düşük Doz Grubu Akım-Voltaj Eğrisi 73

Şekil 4.8. Doğru Denklemine Fit Edilmiş Orta Doz Grubu Akım-Voltaj Eğrisi 73

Şekil 4.9. Doğru Denklemine Fit Edilmiş Yüksek Doz Grubu Akım-Voltaj Eğrisi 74

Şekil 4.10. Ortalama Katalaz Aktivitesinin Doza Bağımlı Değişimi 74

Şekil 4.11. Ortalama Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi 75

Şekil 4.12. Ortalama Malondialdehit Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi 75

Şekil 4.13. Ortalama Glutatyon Aktivitesinin Doza Bağlı Değişimi 76

Şekil 4.14 *Achillea biebersteinii* Su Ekstresinin DKFZ-EP1NS Hücre Hattı Üzerinde Kontrol ve Doz Gruplarına Göre Apoptotik Etkisi 77

Şekil 4.15. DKFZ-EP1NS Hücre Hattına *Achillea biebersteinii* Su Ekstresi Uygulandıktan 72 Saat Sonra Yapılan Akım Sitometrisi ile Hücre Döngüsü Analizi Faz Dağılımları. 79

Şekil 5.1. *Achillea biebersteinii* Su Ekstresinin DKFZ-EP1NS Hücreleri Üzerine Etkileri 88

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
$[Ca^{+2}]i$	Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonu
α-KG	α-Ketoglutarat
A172	Glioblastoma Hücre Hattı
AB	*Achillea biebersteinii* Afan.
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ADP	Adenozin Difosfat
Akt	Protein Kinaz B
AMPK	Aktive Edici Protein Kinaz
ANK	Anakrin Yinelenme Domaini
Apaf	Apoptotik Peptidaz Aktive Edici Faktör
ATP	Adenozin Trifosfat
Ba^{2+}	Baryum
BAX	B-Hücreli Lenfoma İlişkili X Protein
Bcl	B-hücreli Lenfoma
c-Myc	Çok İşlevli Transkripsiyon Faktörü
C11orf95	Kromozom 11 Açık Okuma Çerçevesi 95
C6	Sıçan Glioma Hücre Hattı
Ca	Kalsiyum
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
CAT	Katalaz
CCND1	İnsanda Siklin D1 Proteini Kodlayan Bir Gen
CD40	Farklılaşma Kümesi 40
CD40L	Farklılaşma Kümesi 40 Ligandı
CDC25C	Hücre Bölünme Döngüsü Protein 25C
CDK	Sikline Bağlı Kinaz 1
CIRB	Kalmodulin/IP3 Reseptörü Bağlama
CO_2	Karbon Dioksit
CsCl	Sezyum Klorür
D54MG	Glioblastoma Multiform Hücre Hattı
DAG	Diaçilgliserol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol

Kısaltma/Simge	Tanım
DDG	Düşük Doz Grubu
dH_2O	Distile Su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle' Medium
DMEMhg	Dulbecco's Modified Eagle' Medium with High Glucose
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNC6	Dominant Negatif Mutant Geçici Reseptör Potansiyel Katyon 6
DNMT1	Deoksiribonükleik Asit Metilaz-
DPBS	Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	Epitelden Mezenkime Geçiş
EPN	Ependimal Tümör
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
Fas	Tümör Nekröz Faktör Süper-Ailesi Üye-6
FBS	Fetal Bovine Serum
Fe^{2+}	Demir
FITC	Flüoresan İzotiyosiyanat
GBM	Glioblastoma
Gd^{3+}	Gadolinyum
GLUT	Glikoz Taşıyıcı
GPCR	G Protein-Kenetli Reseptör
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
GSSG-Rd	Glutatyon Redüktaz
GTPas	Rho Guanozin Trifosfat Hidrolaz Enzimi
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HEPES	10 4-(2-Hidroksietil)-1-Piperazinetanesulfonik Asit
HIF	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
HKG	Hücre Kontrol Grubu

Kısaltma/Simge	Tanım
IκB	IkappaB
IDH	İzositrat Dehidrojenaz
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGF1-R	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü
IKK	IκB-Kinaz
IL	İnterlökin
IP3	İnositol 1,4,5-trifosfat
JAK	Janus Kinaz
JNK	c-jun N-Terminal Kinaz
L1CAM	L1 Hücre Adezyon Molekülü
LDH	Laktat Dehidrogenaz
Li	Lityum
LPS	Liposakkarit
LZ	Lösin Fermuarı
MAPK	Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz
MDA	Malondialdehit
Mg^{2+}	Magnezyum
MgCl	Magnezyum Klorür
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MMP	Matris Metalloproteinaz
Mn^{2+}	Manganez
MPE	Miksopapiller Ependimoma
MPU	Mitokondriyal Kalsiyum Uniporter
mRNA	Mesajcı RNA
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür
MYB	Myeloblastosis
MYBL	Myeloblastosis Proto-Onkogen Benzeri
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NBT	Nitroblue Tetrazolyum
NCLX	Sodyum/Kalsiyum/Lityum Değiştokuşçusu
NCX	Sodyum-Kalsiyum Değiştokuşçusu

Kısaltma/Simge	Tanım
NEMO	Nükleer Faktör Kappa B Temel Modülatörü
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NFAT	T-hücrelerini Aktive Eden Nükleer Faktör
NIK	Nükleer Faktör Kappa B İndükleyen Kinaz
NO	Nitrik Oksit
$^1O_2$	Tekli Oksijen
OD	Optik Dansite
OAG	1-Oleoil-2-Asetil-Sn-Gliserol
ODG	Orta Doz Grubu
OH^-	Hidroksi Radikal
ORAI1	Kalsiyum Salınımı İle Aktive Olan Kalsiyum Kanal Proteini 1
Ort	Ortalama
OS	Oksidatif Stres
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCR	Çok Katlı Baskılayıcı Kompleks
PDGF	Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
PF	Posterior Fossa
PI	Propidyum İyodür
PI3K	Fosfoinositol-3 Kinaz
PIP	Fosfatidilinozitol-4,5-Bifosfat
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz-C
PMCA	Plazma Membran Kalsiyum ATPaz
PS	Fosfatidilserin
RAS	Retiküler Aktive Sistemi
RELA	V-Relavian Retiküloendotelyozis Viral Onkogen Homolog A
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SE	Subependimom
SERCA	Sarkoplazmik Retikulum Kalsiyum-ATPaz
shRNA	Kısa-Hairpin Ribonükleik Asit
SKF96365	Seçici Olmayan Bir Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanal Blokeri
SOD	Süperoksit Dismutaz

Kısaltma/Simge	Tanım
SP	Spinal Kord
ss	Standart Sapma
ST	Supratentoryal
STAT	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
STIM1	Stromal Etkileşim Molekülü 1
T98G	İnsan Glioblastoma Hücre Hattı
TAK1	Transforme Büyüme Faktörü B-Aktive Kinaz 1
TLR	Toll-benzeri Reseptör
TM	Transmembran
TMZ	Temozolomid
TNF	Tümör Nekröz Faktörü
TNFR	Tümör Nekröz Faktör Reseptörü
TPC	Çift Porlu Kanal
TRP	Geçici Reseptör Potansiyel
TRPA	Geçici Reseptör Potansiyel Ankrin
TRPC	Geçici Reseptör Potansiyel Katyon
TRPM	Geçici Reseptör Potansiyel Melastin
TRPML	Geçici Reseptör Potansiyel Mukolipin
TRPN	Geçici Reseptör Potansiyel Mekanoreseptör Potansiyeli Olmayan C
TRPP	Geçici Reseptör Potansiyel Polikistik
TRPV	Geçici Reseptör Potansiyel Vanilloid
TÜK	Toprak Üstü Kısımları
U251	Glioblastoma Hücre Hattı
U87	Astrositoma Hücre Hattı
UHRF1	Plant Homeodomain ve RING Parmak İçeren Ubiquitin Benzeri Domain-1
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VGCC	Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları
XIAP	Apoptoz Proteininin X'e Bağlı İnhibitörü
YAP1	Yes İlişkili Protein 1
YDG	Yüksek Doz Grubu
ZFTA	Çinko Parmak Translokasyonu İlişkili

1. GİRİŞ

Kanser, hücrenin ölümü ve çoğalması arasındaki düzenin bozulmasının neden olduğu, gen ekspresyonunda meydana gelen değişimlerden kaynaklanan, hücrenin yapısı ile birlikte fonksiyonunun da değiştiği anormal hücre çoğalmasıdır. Oluşan hücre topluluğu çevredeki dokulara ilerleyerek uzak bölgelere metastaz yapabilir. Bu durum da gerekli tedavi yapılmadığında bireyin ölümüne sebep olabilir [1]. Beyin tümörlerinin en yaygın şekli olan gliomalar oldukça agresif ve invaziv, nörolojik olarak da yıkıcı malign primer beyin tümörleridir. Morbidite oranı 6/100.000 ve beş yıllık sağkalım oranı % 20-30'dur. Bu kötü prognozu terapötik direnç ve rezeksiyon sonrası tümör nüksü oluşturmaktadır [2-4]. Gliomalı birçok hasta geleneksel radyoaktivite ve kemoterapiye zayıf yanıt verirler. Buna ek olarak insan malign gliomalarının nüks oranı da oldukça yüksektir [5]. Glial tümörler (gliomalar) oligodendroglial hücreler, astrositik hücreler ve ependimal hücrelerden kaynaklanırlar ve oligodendrogliom, astrositom ve ependimoma (ependimal tümör) (EPN) isimlerini almaktadırlar. EPN'ler, tüm merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri içinde % 6,8'lik bir dilimi oluştururlar [6, 7]. Çocukluk çağında ise EPN'ler, MSS'de astrositom ve medullablastomadan sonra en yüksek insidansa sahip olan tümör formudur [8].

Gün geçtikçe çoğalan bilimsel çalışmaların sonuçları ve moleküler mekanizmalar hakkında elde edilen yeni bilgiler hastalığın gelişimi ve karmaşıklığı konusunda rol oynayan faktörlerin regülasyonunun daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Bazı durumlarda, bu regülasyonlar tümör mikroçevresinde sinyallerin iletilmesi yoluyla gerçekleşir. Özellikle kalsiyum (Ca) kanallarının bulunduğu süreçler kanser mekanizmalarında kilit rol oynamaktadır. Giderek artan kanıtlar iyon kanallarının tümör biyolojisinde önemli bir yeri olduğunu ve kontrolsüz büyüme, sürekli anjiyogenez, metastaz ve apoptoza direnç gibi tümör hücresi özelliklerinin regülasyonunda rol oynadığını düşündürmektedir [9].

Araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmış olan birçok tıbbi biyolojik aktivite tabiatta doğal olarak yetişen bitkilerden kaynaklanmaktadır. Geliştirilen ilaçlar ve kişisel sağlık ürünleri bu bitkilerden temel alınmaktadır [10]. Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin tarihçesi muhtemelen insanlık tarihinin başlarına kadar uzanmaktadır. Çoğu yüksek aktivite ilaçların ortaya çıkması, çok sayıda aktif fitobileşiklerin bitkilerden ekstraksiyon ve karakterizasyonu ile gerçekleştirilmiştir [11]. Literatürdeki gün geçtikçe çoğalan kanıtlar, insan sağlığı ve beslenmesi konusunda bitkilerdeki primer ve sekonder metabolitlerin oldukça önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

Son 50 yılda kanser tedavisinde kayda değer ilerlemeler başarılmış olsa da bu hastalık, günümüzde halen en önemli tıbbi sorun olarak yerini korumaktadır. Bu nedenle yeni terapötik çözümlerin geliştirilmesi konusunda çok sayıda bilimsel çalışmalar yapılmaya devam

edilmektedir. Bu açıdan kanser tedavisinde bitkilerden elde edilen bileşikler vazgeçilmez bir kaynak olarak yerlerini korumaktadır. Onaylanmış kanser ilaçlarının neredeyse % 75'i bitkisel kaynaklı ajanlardan fikir alınarak geliştirilmiştir [12]. Tüm kanser evrelerinde tedaviye katkı sağlamaları, toksik olmamaları ve çok hedefli olmaları, ayrıca kanser tedavilerinde kullanılan çoğu ilaç ile sinerjik etki göstermeleri bitkisel terapötikleri oldukça önemli bir konuma taşımaktadır [13].

Asteraceae familyası bitki floramızın tür ve cins açısından en zengin familyasıdır. Türkiye Florası bu familyanın 136 cins ve 1195 türüne ev sahipliği yapmaktadır Ayrıca Asteraceae familyası en fazla endemik türe sahip familyalar arasında yer almaktadır. Bu familyada 446 endemik tür mevcuttur ve familyanın endemizm oranı % 37,3'tür [14]. *Achillea biebersteinii* Afan. (AB) Asteraceae ailesinin bir üyesidir ve birçok ülkede yüzlerce yıldır geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Bitkinin pek çok hastalığa karşı halk tıbbında kullanılmasının yanı sıra bu konuda yapılan bilimsel araştırmalar da gün geçtikçe artmaktadır [15]. Bu araştırmalar ile gösterilen özelliklerinden biri de bitkinin anti-kanser etkisidir [16-19].

Bu çalışma ile yetişmekte olduğu her bölgede farklı içerik özellikleri gösteren ve bilimsel çalışmalarla da etkisi gösterilmiş olan farklı geleneksel tedavi yöntemleri için kullanılan AB'nin Karaman ilinin yüksek rakımlı ve iklimsel geçiş kuşağında yetişen örneklerinin ilk defa olarak EPN'ler üzerine anti-kanser özellikleri araştırılmıştır. AB su ekstresinin EPN hücrelerine sitotoksik ve biyokimyasal, geçici reseptör potansiyel (TRP) kanal akımları üzerine elektrobiyofiziksel, geçici reseptör potansiyel katyon (TRPC) 6 kanalları ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) yolağı üzerine de moleküler yöntemlerle etkileri incelenerek açığa çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tedavi konusunda henüz küratif bir ilerleme kaydedilememiş olan EPN'ler için terapötik bir ipucu elde edilmiştir. Ek olarak ülkemizde yaygın olarak yetişebilen AB bitkisinin kanser konusunda farmakolojik bir etken olarak ekonomiye kazandırılması yolunda da çalışmamızın sonuçlarının katkısı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca EPN'ler üzerine AB bitkisinin anti-kanser etkisi konusunda yapılan ilk araştırma olarak çalışmamızın sonuçları literatüre de olumlu bir katkı sağlayacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Kanser

Kanser dünyada ve ülkemizde ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yerini almaktadır. Dünyada ortalama her 6 ölümden, ülkemizde ise her 5 ölümden biri kanser kaynaklıdır [20, 21].

Kanser, hücre ölümü ve çoğalması arasındaki düzenin bozulmasının neden olduğu, gen ekspresyonunda meydana gelen değişimlerden kaynaklanan, hücrenin yapısı ile birlikte fonksiyonunun da değiştiği anormal hücre çoğalmasıdır. Oluşan hücre topluluğu çevredeki dokulara ilerleyerek uzak bölgelere metastaz yapabilir ve gerekli tedavi yapılmadığında bu durum bireyin ölümüyle sonuçlanabilir [1].

Hücrede mutasyonların artmaya başlaması, o hücrede ve bölünme sonucunda oluşan yeni hücrelerdeki anormalliğin artmasına neden olur. Bu mutasyonlar anormal hücrelerde normal hücrelerden çok daha hızlı çoğalma durumu ortaya çıkarır. Çoğalma hızı artan hücreler de benign veya malign tümörleri oluştururlar. Benign tümörler nadiren yaşamı tehdit ederler. Daha yavaş gelişme gösterirler ve vücudun diğer bölgelerine metastaz yapmazlar. Sadece boyutları büyüdükçe bulundukları bölgedeki organlara bası yaparak rahatsızlık oluştururlar. Malign tümörlerin ise büyüme hızı çok daha yüksektir ve diğer dokulara da metastaz yaparak onları da tahrip ederler [22].

Kanserle ilgili moleküler mekanizmayı açıklamaya yönelik yapılan çalışmalar, hastalığın ilerlemesinde ve karmaşıklığında rol oynayan çeşitli faktörlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Hanahan ve Weinberg'in yayınladığı derlemede, hastalığın altında yatan karmaşık biyolojiyi basitleştirmek amacıyla, neoplastik hücrelerin on temel özelliğini tanıtmışlardır. Bunlar, uzun vadeli büyüme sinyalinin korunması, hücre ölümüne direnç, anjiyogenez indüksiyonu, metastaz teşviki, büyüme baskılayıcısına direnme, kontrolsüz proliferasyon potansiyeli, kararsız genom ve mutasyon, enerji metabolizması yeniden programlanması, bağışıklık sistemine direnme ve inflamasyona neden olan tümörün varlığıdır [23]. Kanser patolojisi, büyüme sinyallerinde sıkı bir şekilde düzenlenmiş normal hücre homeostazını bozan, normal hücrelerin kontrolsüz proliferatif potansiyele sahip malign tipe dönüşmesine yol açan genetik değişiklikleri ortaya çıkarır [24]. Giderek artan kanıtlar iyon kanallarının tümör biyolojisinde önemli bir rolü bulunduğunu ve kontrolsüz büyüme, sürekli anjiyogenez, metastaz ve apoptoza direnç gibi tümör hücresi özelliklerinin düzenlenmesinde rol oynadığını düşündürmektedir [9]. Bazı durumlarda, bu düzenleme tümör mikroçevresinden sinyallerin iletilmesi yoluyla gerçekleşir. Örnek olarak, kanser metastazı için kritik bir süreç olan epitelden mezenkime geçiş (EMT)'in düzenlenmesinde Ca^{+2} kanallarının yer aldığı ve aynı zamanda ilaç direncine de katkıda bulunduğu gösterilebilir [25].

Kanser insidansı dünya çapında dramatik bir şekilde artmaktadır ve kanser 21. yüzyılda ölüm nedeni olarak önde gelmeyi sürdürmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2022 rakamlarına göre en yaygın kanser vakaları, meme kanseri (2,26 milyon vaka), akciğer kanseri (2,21 milyon vaka), kolon ve rektum kanseri (1,93 milyon vaka), prostat kanseri (1,41 milyon vaka), cilt kanseri (melanom hariç, 1,20 milyon vaka) ve mide kanseri (1 milyon vaka) olarak sıralanmaktadır [20]. 2018 yılında yapılan bir araştırmada yeni kanser vakalarının yaklaşık % 1,6'sını (296.851 adet) MSS kanserlerinin oluşturduğu belirtilmiştir [26]. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan bir araştırmada ise, tahmini 700.000 kişinin birincil beyin tümörü ile yaşıyor olduğu (% 71 benign, % 29 malign) ve 2022 yılında yaklaşık 88.970 kişiye daha teşhis konulacağının öngörüldüğü bildirilmiştir [27]. Ülkemizde ise yıllar içinde (2013-2017) histolojik doğrulaması ve yalnız ölüm bildirimi olan kanser vakaları içerisinde beyin ve MSS olgu sayısı 9833 olarak bildirilmiştir (Yıllara göre vaka sayısı: 2013/2058, 2014/1834, 2015/1891, 2016/2071, 2017/2207). Tüm kanser olgu sayılarını göz önüne alırsak beyin ve MSS kanserleri ülkemizde 2016 yılı için % 2'lik bir paya sahiptir [28].

MSS kanserlerinin insidansı diğer kanser türlerine göre yüksek olmasa da agresif seyri, postoperatif dönemde takip ve tedavisindeki zorluklar nedeniyle önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır [29].

2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi Kanserleri

Beyin tümörleri primer tümörler ve metastatik tümörler adı altında iki ana başlıkta toplanabilir. 20. yüzyılda beyin tümörleri mikroskop görüntülemelerindeki hücre tiplerinin benzerliğine ve kaynak aldığı hücreye göre sınıflandırılmaktaydı. Son 20 yılda tümör gelişimi konusundaki genetik temelli çalışmalarda artış olması ile sınıflandırmada yenilenmeye ihtiyaç duyulmuştur. Uluslararası Nöropatoloji Cemiyetinin 2014 yılında yayınladığı rehberde moleküler bulgular ile beyin tümörleri tanısının nasıl birleştirileceği açıklanmıştır. 2016 yılında DSÖ tarafından ilk kez MSS tümörlerinin histolojik verilere ek olarak moleküler parametreler kullanılarak sınıflandırması yapılmıştır [7]. 2021 yılında bu sınıflandırmalarda güncellemeye gidilerek daha fazla moleküler özellik ile güncellenmiş patolojik tanılar eklenmiş ve MSS tümörleri sınıflandırılmasının beşinci versiyonu, (beyin ve omurilik tümörlerinin sınıflandırılması için uluslararası standardın altıncı versiyonu) yayınlanmıştır [30, 31]. Yapılan en güncel sınıflandırma Tablo 2.1'de yer almaktadır.

2.1.1.1. Glioma

Tüm kanserli glial hücrelere topluca glioma denir. Beyin tümörlerinin en yaygın şekli (yaklaşık % 80'ini oluştururlar) olan gliomalar agresif, oldukça invaziv ve nörolojik olarak yıkıcı malign primer beyin tümörleridir. Morbidite oranı 6/100.000 ve beş yıllık sağkalım oranı % 20-30'dur [2-4]. Bu kötü prognoz büyük ölçüde terapötik dirençten ve rezeksiyonu takiben tümör

nüksünden kaynaklanmaktadır. Gliomalı birçok hasta geleneksel radyoaktivite ve kemoterapiye zayıf yanıt verir ve insan malign gliomalarının nüks oranı oldukça yüksektir [5].

Tablo 2.1. 2021 DSÖ MSS Tümörlerinin Sınıflandırılması (5. Baskı) [30]

Gliomalar, Glionöral tümörler ve nöronal tümörler
Koroid pleksus tümörleri
Embriyonal tümörler
Pineal tümörler
Kranyal ve paraspinal sinir tümörleri
Meningiomalar
Mezenkimal, meningotelyal olmayan tümörler
Kondro-osseöz tümörler
Melanositik tümörler
Hematolenfoid tümörler
Germ hücre tümörleri
Sellar bölgesinin tümörleri
MSS'ye metastazlar

Malign gliomalar, MSS'de sinir hücresi fonksiyonunun korunmasında oldukça önemli rolleri olan glial hücrelerden kaynaklanan birincil beyin kanserleridir [6].

2016 yılında yapılan sınıflandırmaya göre glioma, düşük dereceli (Sınıf I-II) ve yüksek dereceli (Sınıf III-IV) olarak dört derece malignite olarak sınıflandırılmıştır. Bu dereceler astrositom, oligodendroglioma ve EPN'yi içerir. Yüksek dereceli gliomalar arasında % 25'i anaplastik astrositoma (Derece III) ve % 75'i glioblastoma (GBM) (Derece IV)'dır. 2021 yılında yapılan düzenlemelerle gliomaların sınıflandırılması önemli değişikliklere uğramıştır. Şu anda 14 yeni tanınan glioma ve glionöronal tümör bulunmaktadır [30; 31]. 2021 DSÖ sınıflandırmasına göre gliomaların derecelendirilmesi Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. 2021 DSÖ Bazı Gliomaların Derecelendirilmesi [30]

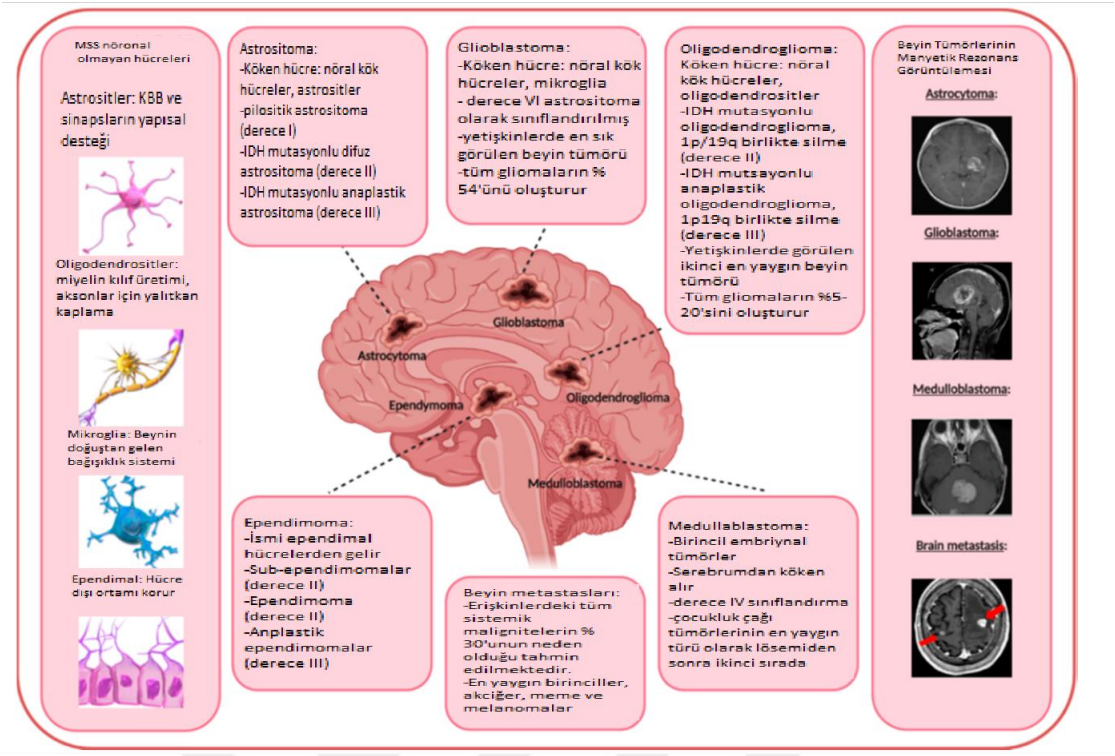
Glioma	Anaplazi Derecesi
Astrositoma, izositrat dehidrojenaz (IDH) mutant	2, 3, 4
Oligodendroglioma, IDH-mutant ve 1p/19q-kodlanmış	2,3
GBM, IDH-vahşi tip	4
Diffüz astrositoma, myeloblastosis (MYB)- veya myeloblastosis proto-onkogene benzeri (MYBL)1-değiştirilmiş	1
Diffüz hemisferik glioma, H3 G34-mutant	4
Supratentoryal (ST) EPN	2, 3
Posterior fossa (PF) EPN	2, 3
Miksopapiller ependimoma (MPE)	2

2.1.1.1.1. Glioma Çeşitleri

Düşük dereceli glial tümörler astrositik, oligodendroglial, ependimal ve miks hücresel alt formlar gibi çeşitli histolojik formları kapsamaktadır. Glioma tanılı hastaların ortalama 6,5 ile 8 yıl arasında değişiklik gösteren yaşam süreleri bulunmaktadır. Klinik davranışlarındaki değişiklikler düşük dereceli glial kitlenin histopatolojik anatomik çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır [32].

Düşük dereceli astrositomalarda p53 genindeki mutasyon tek genetik değişikliktir. Ancak bazı GBM'lerde de p53 mutasyonu görülebilir. Eğer daha büyük bir alt form ise epidermal büyüme faktör (EGF) reseptörü amplifikasyonu göstermektedir. Bu özellik de tümör gelişiminde daha farklı bir genetik yolağın aktif olduğunu düşündürmektedir. Oligodendrogliomlarda ise 19. kromozomun kısa kolunda ve 1. kromozomun uzun kolunda kayıplar tespit edilmiştir [32].

Malign astrositomlar erişkinlerde en fazla görülen malign MSS tümörleridir. Gliablastom, gliosarkom ve anaplastik astrositom alt tiplerini içerir. Optimal tedavi uygulanmasına rağmen 2 ile 5 yıl arasında değişen yaşam süreleri bulunmaktadır. Artan glioma derecesi ve EGF gibi büyüme faktörleri maruziyeti hücre hareketliliğini artırmaktadır. Bu sebeple cerrahi rezeksiyon sonrası bile çevre beyin dokularında proliferasyon ve nüks görülen lezyonlar mevcuttur [32]. Şekil 2.1'de farklı birincil ve ikincil malign beyin tümörleri genel olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Farklı birincil ve ikincil malign beyin tümörlerinin genel özeti [33]'den uyarlanmıştır.

2021 yılında DSÖ tarafından yapılan sınıflandırma ve isim değişikliklerine göre ganglioglioma, desmoplastik infantil ganglioglioma/astrositom, disembriyoplastik nöroepitelyal tümör ve rozet oluşturan glionöronal tümör gibi diğer karışık glionöronal tümörler değiştirilmemiştir. Yeni netleştirilen ve eklenen tümör varlıkları, oligodendroglioma benzeri özelliklere ve nükleer kümelere sahip diffüz glionöronal tümörü, miksoid glionöronal tümörü, multinodüler ve vakuolize edici nöronal tümörü içermektedir [31]. 2021 yılında DSÖ tarafından yapılan son güncellemelere göre gliomaların sınıflandırılması Tablo 2.3'de verilmiştir.

2.1.1.1.1. Ependimal Tümör/Ependimoma

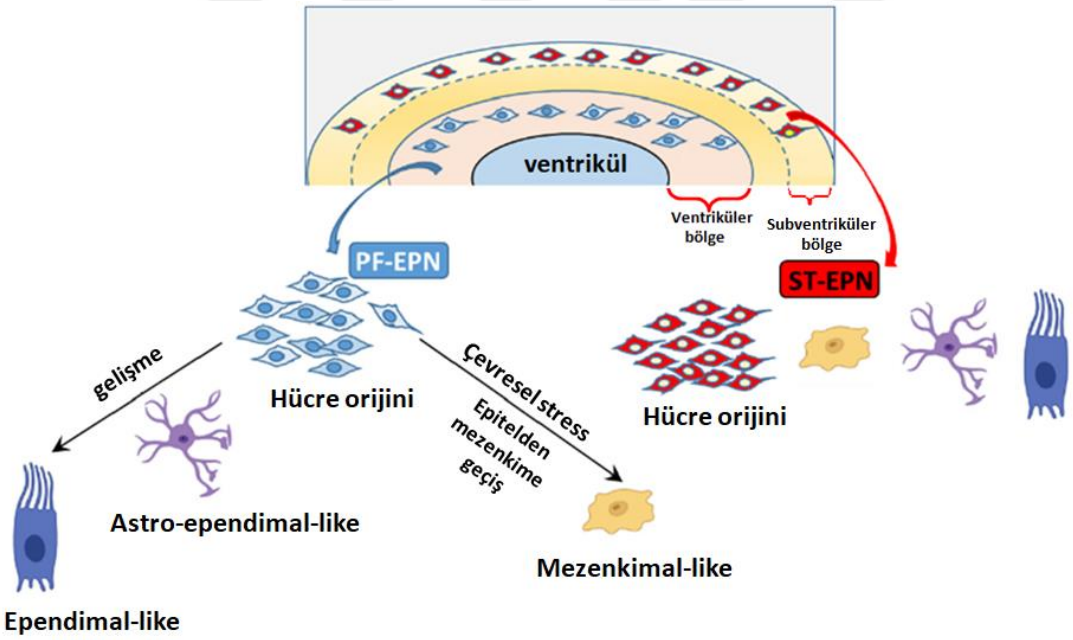
2.1.1.1.1.1. Ependimal Hücreler ve Ependimal Tümör/Ependimoma

Ependimal hücre, MSS'de ventrikül duvarlarını döşeyen, genellikle kuboidal, yuvarlak elonge nükleuslu ve kaba kromatinli hücrelerdir. Çocuklarda daha çok kolumnar ve silyalı görünümdedir. Ultrasitrüktürel incelemede mikrovillus, silya ve hücreler arası kompleks bağlantılar görülür [34]. Yetişkin memeli omuriliğinin merkezi kanalı, parankim ve merkezi kanal arasındaki arayüzde bulunan bir ependimal hücre tabakası ile kaplıdır. Ependimal hücreler, sinyal transdüksiyonu, serebral omurilik sıvısının hareketi, beyin homeostazı sağlanması ve nöral dokuların zarar verici maddelerden yalıtılması gibi önemli duyusal ve mekanik işlevlere hizmet eder [35, 36]. Yapılan çalışmalarda, yetişkin ependimal hücrelerin gizli

nöral kök hücreler olarak işlev görebilen progenitörler olduğunu ileri sürülmüştür [37-40]. Bazı yaralanmalara yanıt olarak, ependimal hücreler glial skar oluşumuna katkıda bulunan oligodendrositler ve astrositler üretir [41-42].

Tablo 2.3. 2021 DSÖ Gliomalar, Glionöral Tümörler ve Nöronal Tümörlerinin Sınıflandırılması (5. Baskı) [30]

Yetişkin tipi diffüz gliomalar
Pediatrik tip diffüz düşük dereceli gliomalar
Pediatrik tip diffüz yüksek dereceli gliomalar
Sınırlı astrositik gliomalar
Glionöronal ve nöronal tümörler
EPN'ler



Şekil 2.2. PF-EPN ve ST-EPN'lerin bulunduğu bölge ve köken aldıkları hücre orijini. [43]'den uyarlanmıştır.

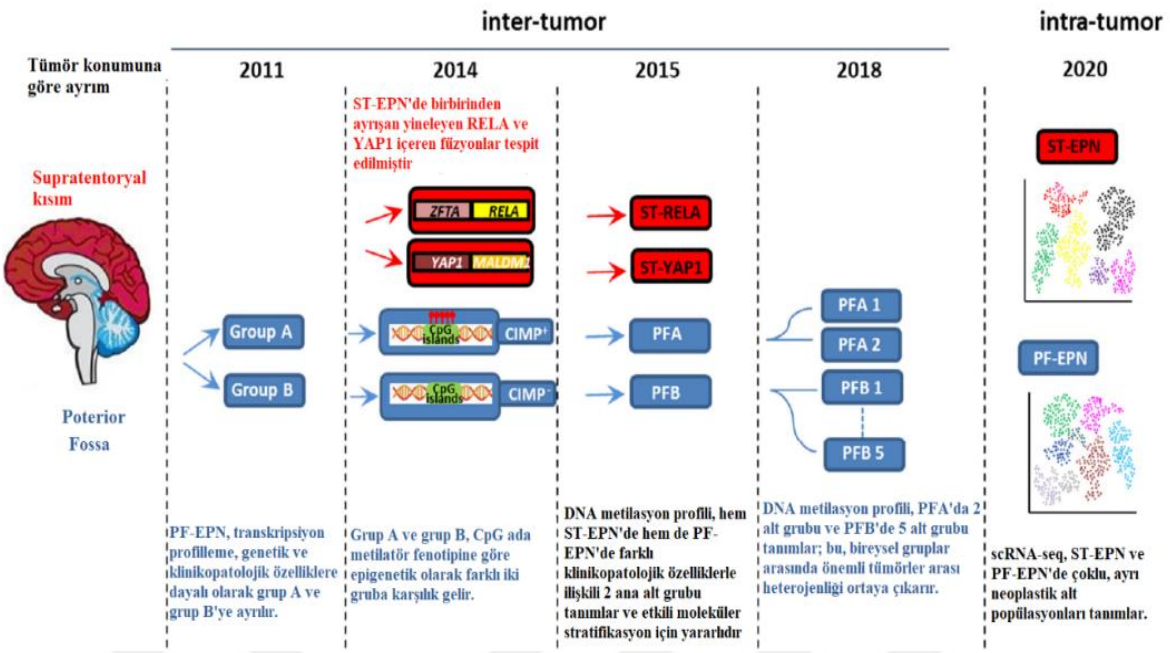
Ependimal hücreler epitelyal görünümlerine karşın glial orjinli hücrelerdir [34]. Yapılan bir çalışmada; ependimal hücrelerin embriyogenez sırasında (14-16. günler arasında) oluştukları, hücresel formasyon ve silya oluşumu gibi matürasyon özelliklerine ise postnatal ilk

haftada sahip oldukları gösterilmiştir. Aynı çalışmada, ependimal hücrelerin embriyogenez sırasında "radial glial hücre" den kaynaklandıkları ve mitoz sonrası oluşan hücreler olduklarından iddia edildiği gibi kök hücre özelliği taşımadıkları bildirilmektedir [36]. Başka bir çalışmada ise; EPN'lerde, radial glial hücre fenotipinde kök hücre izole edilmiş ve radial glial hücrenin bu tümörlerde histogenetik kaynak olabileceği düşünüldüğü belirtilmiştir [44]. Radial glial hücre, embriyoda nöral kök hücre fonksiyonu göstermekte olup erişkin nöral kök hücrenin oluşumuna sebep olmaktadır. Gelişim boyunca MSS'nin farklı bölgelerinde yerleşim gösteren radial glial hücre, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını içeren intrinsik biyolojik farlılıklar göstermektedir [45]. Bu sebeple Johnson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; EPN'lerde anatomik bölgelere spesifik farklı kök hücre grupları tespit etmişlerdir. Serebral EPN'lerde serebral nöral kök hücrenin, spinal EPN'lerde yetişkin spinal nöral kök hücrenin potansiyel hücre orijini olabileceği kanısına varmışlardır [46]. Bu bilgiler ışığında Pajtler ve arkadaşları, EPN'lerde metilasyon profili çalışmaları yaparak anatomik bölgelere spesifik ve sık görülen gen mutasyonuna özgün, EPN alt-gruplarını tanımlamışlardır. Tanımlanan moleküler grupların bölgesel değişiklik gösteren hücre orijininden kaynaklandığı düşünülmektedir [47].

2.1.1.1.1.1.2. Ependimal Tümörler/Ependimoma

EPN, beynin ventriküler sistemini oluşturan ependimal hücrelerden gelişir [48]. Glial tümörler MSS tümörlerinin büyük bir bölümünü kapsamaktadır. Ependimal, astrositik ve oligodendroglial hücrelerden kaynaklanarak sırasıyla EPN, astrositom ve oligodendrogliom isimlerini almaktadırlar. EPN'ler, tüm MSS tümörleri içinde % 6,8'lik bir dilimi oluştururlar [6, 7]. Çocukluk çağında ise EPN'ler, MSS'de astrositom ve medullablastomadan sonra en sık görülen 3. tümör grubudur [8]. Erişkinlerde daha çok spinal yerleşimli EPN'ler olarak tespit edilmekteyken, çocuklarda ise sıklık, intrakranyal yerleşimli EPN'ler olarak belirlenmektedir [7].

EPN'ler nöral aksda her yerde yerleşim gösterebilirler. Sınıflandırılmaları anatomik yerleşimlerine göre yapıldığında, ST, PF ve spinal kord (SP) tutulumları görülmektedir. Histopatolojik benzerlikleri bulunsa da bu 3 yerleşimin genetik farklılıklara sahip oldukları bilinmektedir. DSÖ 2016 sınıflamasına göre 5 alt tipi ifade edilmiştir. Subependimom (SE), MPE, v-relavian retiküloendotelyozis viral onkogen homolog A (RELA) füzyon (+) EPN, anaplastik EPN ve klasik EPN olarak ayrılmıştır [7]. İntrakranyal pediatrik EPN'de tümörler arası ve tümör içi heterojenitenin ortaya çıkarılmasına katkıda bulunan en önemli moleküler bulgularda yapılan değişiklikler Şekil 2.3'de özetlenmiştir.



Şekil 2.3. İntrakranyal pediatrik ependimomada tümörler arası ve tümör içi heterojenitenin ortaya çıkarılmasına katkıda bulunan en önemli moleküler bulguların zaman çizelgesi. [43]'den uyarlanmıştır.

Çoğu EPN'ler, histolojik kriterlere göre DSÖ derecelendirilmesinde derece II veya III olarak verilir [43]. Daha nadir olarak derece I SE ve MPE esas olarak yetişkinlerde ortaya çıkar ve farklı histomorfoloji ile sessiz davranış sergilerler [49]. Bununla birlikte, derece II ve III EPN'ler arasında derece ile klinik sonuç arasında zayıf bir korelasyon görülmektedir [50]. Bu tutarsızlık, büyük ölçüde bu tümörlerin belirgin genetik heterojenliğine atfedilir. Farklı anatomik bölmelerde meydana gelen histolojik olarak benzer EPN'ler, biyolojik davranışlarında bölgeye özgü farklılıklar sergiler ve radial glia benzeri kök hücrelerin farklı alt kümelerinden kaynaklandıkları varsayılır. Birime özgü derecelendirme kriterleri önerilmiş olsa da sınırlı anatomik bölmeler içinde bile var olan heterojenlik, değerini büyük ölçüde sınırlar [43]. Her anatomik bölmede üç, yani ST, PF ve SP çeşitleri olmak üzere, farklı klinikopatolojik özelliklere sahip dokuz moleküler alt grup tanımlamıştır [47]. Üç bölmenin her birindeki bir alt grup, histolojik olarak SE'lere karşılık gelirken ve spinal bölmedeki bir alt grup MPE'lere karşılık gelir, kalan beş moleküler alt grup da hem II. hem de III. derece tümörlerden oluşur [47]. ST bölmesi içinde, ST-EPN-RELA olarak adlandırılan en büyük moleküler alt grup, C11orf95 (Kromozom 11 açık okuma çerçevesi 95) ile NF-κB yolağının düzenlenmesinde rol oynayan bir gen olan RELA arasındaki füzyonlarla karakterize edilir [47, 51, 52]. Bu füzyonu barındıran tümörler, sıklıkla zengin vaskülariteye sahip açık hücre morfolojisi [51, 53, 54] ve proteinler (p-RELA / p65 ve L1 hücre adezyon molekülü (L1CAM)) için immünopozitiflik gösterir [51, 52, 55]. Kötü prognoza sahip agresif tümörler oldukları bulunmuştur [47]. Yes ilişkili protein 1 (YAP1) onkojeninin

füzyonlarını ST-EPN-YAP1 olarak isimlendirilen daha küçük bir alt grup barındırır ve olumlu bir prognozla ilişkilendirilmiştir [47, 51]. Moleküler alt grupların sonuçla nispeten güçlü ilişkileri göz önüne alındığında, mevcut kılavuzlar intrakranyal EPN için tedavi kararlarının histolojik dereceden ziyade bu moleküler alt gruplara dayandırılmasını önermektedir [56]. EPN'lerin 2016 DSÖ sınıflandırmasına göre derecelendirilmesi Tablo 2.4'de özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Ependimomaların 2016 DSÖ Sınıflandırmasına Göre Derecelendirilmesi [7]

Derece I	Derece II	Derece III
SE	Klasik EPN	Anaplastik EPN
	Papiller EPN	EPN, RELA füzyon EPN
	Clear cell EPN	
	Tanisitik EPN	
	EPN, RELA füzyon EPN	

EPN'ler DSÖ MSS tümörleri sınıflandırmasına göre anaplazi dereceleri değerlendirilerek 1., 2. ve 3. derece olarak sınıflandırılırlar. DSÖ'nün MSS tümörleri sınıflamasında ana hedef histolojik dereceleri farklı tümörler için farklı klinik prognozları değerlendirebilmektir [57]. Ancak MSS tümörlerinde, özellikle farklı yaştaki hastalardan oluşan gruplarda ve farklı yerlerde lokalize olan tümörlerde tümör derecesinin prognozunun öngördüğü durumlarla çelişen çalışmaların sayısı artış göstermiştir [58, 59]. Bu durum sınıflandırılması aynı histolojik derecede olan EPN'ler arasındaki genetik heterojenitenin, EPN'lerin biyolojik davranışlarında ve prognozunun öngörülmesinde daha etkili olacağı belirtilmektedir [60].

2.1.1.1.1.1.3. 2016 Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Ependimal Tümörlerin Histolojik Sınıflandırılması

DSÖ'nün MSS tümörleri sınıflandırması, EPN'leri üç derece altında beş alt tipte sınıflandırır [7]. Derece I, iyi huylu olarak kabul edilen ve nadiren derece II veya III tümörlere dönüşen SE ve MPE'yi içerir [61-63]. Bununla birlikte, anaplastik özellikler içeren ve malign davranış sergileyen az sayıda MPE bildirilmektedir [64, 65]. Derece II ve III tümörler, EPN ve anaplastik EPN olarak adlandırılır. Ancak, bu tümörlerin derecelendirilmesi, subjektif kriterleri ve patologlar arasında tekrarlanabilirlik eksikliği nedeniyle eleştirilmiştir. Ayrıca, tümör heterojenliği nedeniyle, pediatrik vakalarda tümör derecesi ile hasta verileri arasında çok az korelasyon vardır [58]. Bu sorunlar, histopatolojik derecelendirmenin yakında geçersiz hale gelebileceğini belirten (2021 sınıflandırmasında değiştirilmiştir [30, 31]) 2016 DSÖ

sınıflandırmasında kabul edilmiştir [7]. Moleküler alt gruplamanın, klinik çalışmaların dışında, evre II ve III EPN'ler için histopatolojik derecelendirmenin artık kullanılmaması önerileriyle birlikte, hasta durumunda daha iyi bir öngörü sunacağı öne sürülmüştür [47, 66].

2.1.1.1.1.1.4. 2016 Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Ependimal Tümörlerin Moleküler Sınıflandırması

EPN'lerin, anatomik bölgelerin her birinde üç alt grup bulunan dokuz alt gruba ayrılan mevcut moleküler sınıflandırması, tüm genom DNA metilasyon profiline dayanmaktadır [47]. ST bölgede, PF'de ve SP'de ortaya çıkan SE'ler sırasıyla ST-EPN-SE, PF-EPN-SE ve SP-EPN-SE olarak etiketlenen bu alt gruplardan üçünü oluşturur. Geri kalan PF alt grupları, daha önce tanımlanmış Grup A ve Grup B PF tümörleri ile tutarlılıklarını vurgulamak için PF-EPN-A ve PF-EPN-B olarak adlandırılır [67]. ST EPN'lerdeki gen füzyonlarına ilişkin daha önceki bulgulara dayanarak [51], kalan ST alt gruplardaki tümörler üzerinde RELA ve YAP1 gen füzyonları için testler yapılmıştır. Daha büyük olan alt grubun yaklaşık % 88'i bir RELA füzyon transkripti içermiş ve bu tümörler ST-EPN-RELA olarak adlandırılmıştır. Daha küçük olan alt grupta sadece 7 (54%) numune test edilirken, her biri bir YAP1 füzyon geni içermiş ve bu alt grup ST-EPN-YAP1 olarak adlandırılmıştır. Örneklerin gen ekspresyonu ile kümelenmesi, alt gruplar arasında önemli farklılıkları ortaya çıkaran kopya sayısı değişikliklerinin analizi ile benzer alt gruplarla sonuçlanmıştır [47]. Klinik özelliklerin alt gruplarla korelasyonu, ST-EPN-RELA ve PF-EPN-A tümörlü hastaların diğer alt gruplara kıyasla önemli ölçüde daha kötü progresyon ve genel sağkalıma sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır [47].

PF-EPN-A ve PF-EPN-B tümör kohortlarından elde edilen metilasyon verilerinin son analizi ile bu ana alt gruplar içinde ek alt gruplar ve alt tipler tanımlanmıştır. PF-EPN-A tümörleri durumunda, farklı kopya sayısı varyasyonları ve transkriptomları olan iki ana alt grup tanımlanmış ve PFA-1 ve PFA-2 olarak etiketlenmiştir [68]. PFA-1 ve PFA-2 tümörlerinin klinik özellikleri benzer iken, yaş, cinsiyet, tümör derecesi, progresyon ve genel sağkalım açısından gruplar içinde dokuz farklı alt tip tanımlanmıştır [68]. PF-EPN-B tümörleri için de PF-B 1-5 olarak etiketlenmiş beş alt tip tanımlanmıştır [69]. Bu alt tipler farklı kopya sayısı varyasyonlarına, gen ekspresyonuna, hasta yaşı ve cinsiyetine göre farklılıklara sahipken, önemli bir sağkalım farkı ortaya çıkmamıştır.

2016 DSÖ sınıflandırması [7] sadece ST-EPN-RELA EPN'leri farklı bir alt tip olarak tanırken, birkaç çalışmada iki farklı dereceli (II ve III) PF tümör grubu tanımlanmıştır [47, 67]. Farklı çalışmalarla da [68, 69] bu daha geniş grupların konformasyonunun, bir sonraki DSÖ sınıflandırmasında farklı alt tipler olarak tanımlanması gerektiği ortaya koyulmuştur (2021 DSÖ sınıflandırmasında değiştirilmiştir [30, 31]).

2.1.1.1.1.1.5. 2016 Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre RELA Füzyon Ependimal Tümörleri

ST-EPN'lerin yaklaşık % 72'si, ST-EPN-RELA alt grubuna giren RELA gen füzyonları içerir [47, 51, 52, 70]. Bu tümörler 48 aylıktan büyük çocuklarda ve erişkinlerde daha sık görülür [46, 51] ve alt gruplar arasında en kötü prognozlardan birine sahiptir [47].

RELA füzyonları, kromozom 11'deki kromotripsis ile tutarlı yapısal varyasyonların sonucudur ve C11orf95'in RELA'ya füzyonu ile sonuçlanır [47, 51]. C11orf95'in işlevi hakkında bilinenlerin sınırlı olmasına rağmen, kanonik NF-κB sinyal yolağındaki NF-κB transkripsiyon faktörü kompleksinin bir alt birimini oluşturan RELA/p65'i RELA'nın kodlağı gösterilmiştir [51, 71, 72]. Bu kompleksin oluşumu, çekirdeğe translokasyonu ve apoptoz, hücre proliferasyonu ve bağışıklık tepkilerinde yer alan genlerin düzenlenmesi ile sonuçlanır [72]. Çalışmalar, RELA gen füzyon proteinlerinin çekirdeğe yer değiştirdiğini, NF-κB sinyal ve NF-κB hedeflerini yukarı regüle ettiğini göstermiştir [53, 73, 74]. C11orf95-RELA füzyon transkripti enjekte edilen farelerde insan ST-EPN-RELA tümörlerine benzer özelliklere sahip tümörlerin oluşumuna dayanarak, füzyonun tümör oluşumu için tek başına yeterli olduğu ileri sürülmektedir [74].

2.1.1.1.1.1.6. Dünya Sağlık Örgütü 2021 MSS Tümörleri Sınıflandırmasında Ependimal Tümörler İçin Yapılan Değişiklikler

EPN'ler, glioma/glionöronal/nöronal tümör gruplamalarının sonuncusudur. Yukarıda da belirtildiği üzere 2016 DSÖ, EPN'yi SE, MPE, EPN ve anaplastik EPN olarak 4 alt gruba ayırmıştır [7].

2016 DSÖ sınıflandırmasından sonra 2021'de alınan kararlarla, EPN'ler konuma göre çok farklı bir şekilde gruplandırılmıştır. ST, PF ve SP EPN'leri olarak 3 farklı anatomik bölgede tanınmıştır. Her spesifik anatomik bölge içinde, moleküler olarak tanımlanmış alt gruplar, gen ve DNA metilasyon profili ile tanımlanmaktadır. Her biri lokasyon, yaş, prognoz ve klinikopatolojik özellikler bakımından farklılık gösterir [30, 31].

2.1.1.1.1.1.6.1. Supratentoryal Ependimal Tümörler

Çinko parmak translokasyonu ilişkili (ZFTA) füzyon-pozitif EPN (önceden RELA-füzyon EPN olarak tanımlanmıştı), ZFTA (eski adıyla C11orf95) genleri ile partnerlerinin yeniden düzenlenmesini sergileyen ekstraventriküler hemisferik tümörlerdir. Bu tümörler, şu anda tanımlanmış ST-EPN'lerin en büyük grubudur. Hem çocuklarda hem de yetişkinlerde görülürler. 2021 MSS DSÖ sınıflandırmasında derece 2 veya 3 neoplazmalar olarak adlandırılırlar. Görüntüleme çalışmalarında nispeten iyi sınırlı karışık kistik-solid kitleler olarak görünürler. YAP1-füzyon ST-EPN'leri çoğunlukla 36 aylıktan küçük çocuklarda bulunur ve ZFTA EPN'lerden

daha iyi prognoza sahiptir. ZFTA-füzyon veya YAP1-füzyon olaylarına sahip olmayan tümörler, ST-EPN olarak adlandırılır ve histolojik özelliklerine göre tanımlanırlar [30, 31].

PF-EPN'ler moleküler açıdan PF-EPN-A ve PF-EPN-B olarak 2 alt gruba ayrılmıştır. Daha detaylı değerlendirilemeyen tümörler PF EPN olarak adlandırılır ve histolojik özellikleri ile tanımlanır [30, 31].

İntrakranyal EPN'lerin ana gruplarının genetik/epigenetik değişikliklerinin ve klinikopatolojik özelliklerinin genel olarak bir özeti Tablo 2.5'de verilmiştir.

Tablo 2.5. İntrakranyal EPN'lerin ana gruplarının özelliklerinin özeti. [43]'den uyarlanmıştır

Grup	**ST-RELA**	**ST-YAP1**	**PFA**	**PFB**
Lokasyon	ST, serebral	ST, periventriküler	PF	PF
Yaş	Çocuklar/Ergenler Ortalama yaş 8	Küçük çocuklar Ortalama yaş 1,4	Küçük çocuklar Ortalama yaş 3	Tüm yaşlar Ortalama yaş 30
Erkek	%65	%25	%65	%41
Kadın	%35	%75	%35	%59
Patojenik etki	NF-κB yolağı Hücre döngüsü Hücre migrasyonu	Hippo yolağı	Anjiyogenez Reseptör tirozin kinaz (RTK) yolağı Hücre döngüsü Hücre migrasyonu	Siliogenez Oksidatif metabolizma
Sonuç	Kötü	Olumlu	Kötü	Olumlu

2.1.1.1.1.1.7. Ependimal Tümör Tedavileri

EPN tedavilerinde şu anda, prognoz ve adjuvan tedaviler sadece patolojik derecelendirmeye ve cerrahinin kapsamına dayanmaktadır [75]. Lokal rekürrens baskın başarısızlık modu olduğundan, lokal adjuvan radyoterapi genellikle daha iyi bir sonuç beklentisiyle eklenir [76, 77]. Adjuvan kemoterapinin rolü, radyoterapiyi bir tedavi yöntemi olarak ertelemeyi amaçlayan pediatrik olgular dışında net değildir [78, 79].

EPN'lerde ameliyat sonrası radyoaktivite tedavisi, nüks eden olgulara ve malign özellikteki EPN tiplerine uygulanır [80, 81].

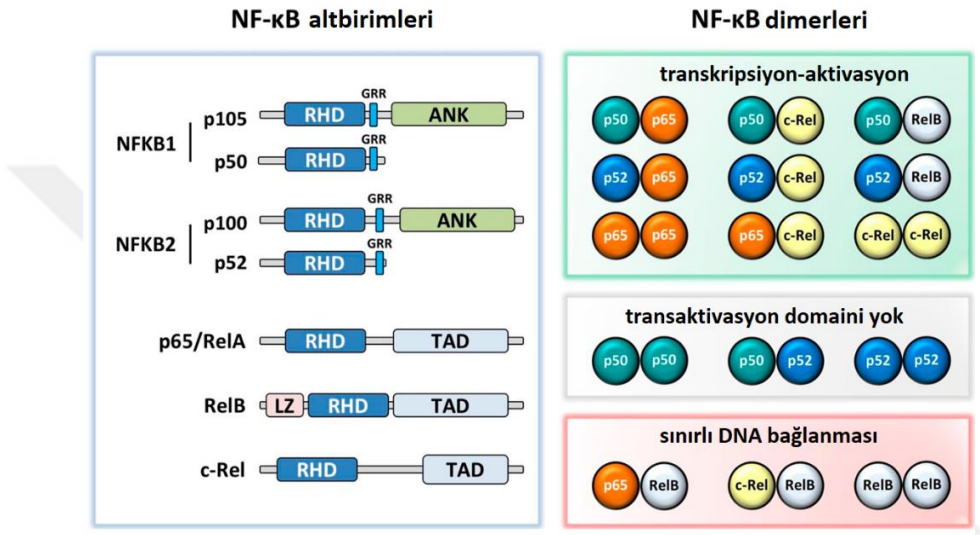
Derece I EPN'ler iyi sınırlı olma eğilimindedir ve tam cerrahi eksizyon tipik olarak küratiftir [7, 82]. Derece II ve III intrakranyal tümörlerin tedavisi genellikle maksimum cerrahi eksizyon [56, 83-85] ve ardından radyoterapiyi içerir (3 yaşın üzerindeki hastalarda) [86]. Ancak, derece II EPN'lerin tamamen rezeke edildiği durumlarda radyoaktivite her zaman uygulanmaz [80, 85]. 36 aylıktan küçük hastalar için, nörobilişsel ve nörolojik etkilere zarar verme riski nedeniyle [87] ışınlamadan genellikle kaçınılır veya ışınlama ertelenir [85, 88]. Bununla birlikte, son zamanlarda 12 ila 36 aylık arasındaki hastalar da ışınlama ile tedavi edilmiştir ve bu popülasyonda sağkalım açısından olumlu etkilerini belirten çalışmalar mevcuttur [84, 89, 90]. İkinci bakış cerrahisi, ameliyat sonrası görüntülemenin tümörü ortaya çıkardığı eksizyon yapılabilen pediatrik vakalarda da kullanılmıştır [91, 92]. Beyin omurilik sıvısı yoluyla tümör yayılımı vakalarında tipik olarak kranyospinal ışınlama uygulanır [85]. Hem birincil hem de tekrarlayan EPN'ler için çeşitli sitotoksik kemoterapi rejimlerini kullanan klinik deneyler, karışık sonuçlar ve sağkalımda sınırlı iyileşmeler gösterdiğinden [83, 93], kemoterapi EPN'ler için standart tedavinin parçası değildir [56, 94]. Bu denemelerin çoğu, rezidüel tümörün olduğu yerde ışınlamadan önce ve ileri veya ikinci bakış cerrahisinden önce, irradyoaktiviteyi geciktirmek veya önlemek için adjuvan tedavi olarak kemoterapi verilen pediatrik hastaları içermiştir [88, 95, 96]. Ayrıca 12 aylıktan büyük hastalarda idame kemoterapisini (NCT01096368), radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonlarını ve bu 12 ay ve altındaki hastalarda tek başına kemoterapiyi araştıran devam eden iki faz II ve III pediatrik çalışma vardır (NCT02265770, SIOP Ependymoma II) [94].

Cerrahi rezeksiyonun kapsamı progresyonsuz ve genel sağkalım ile güçlü bir şekilde ilişkili iken [47, 91], intrakranyal EPN'lerin kritik beyin yapılarına yakınlığı [90], faydalarının önemli nörolojik defisit potansiyeli ile dengelenmesi gerektiği anlamına gelir [98]. Bu sebeple, hastaların sadece % 40-60'ında tam cerrahi eksizyon sağlanır [99]. Bununla birlikte, tam rezeksiyon ve radyoterapi durumlarında bile, pediatrik hastaların yarısı kadarının tümör nüksü yaşayacağı öngörülmektedir [100, 101]. Daha ileri cerrahi, ışınlama/yeniden ışınlama ve sitotoksik kemoterapi denemelerine rağmen, nüks eden EPN'lerin uzun süreli kontrolü nadirdir ve pediatrik hastaların yaklaşık % 90'ı sonunda hastalığa yenik düşer [102, 103].

2.1.1.1.1.1.8. Ependimal Tümörler ve Nükleer Faktör Kappa B Sinyal Yolağı

NF-κB yolağı, proliferasyon, anti-apoptoz, inflamasyon ve metastaz dahil olmak üzere çeşitli kanser hücresi fonksiyonlarında yer alan karmaşık bir sinyalleme yolağıdır [104, 105]. NF-complexB kompleksi, NF-κB1 (p50) veya NF-κB2 (p52) ile bir heterodimer oluşturan RELA (p65), RelB ve c-Rel [82] olmak üzere 5 alt birim içerir. Aktif olmayan durumunda, dimer

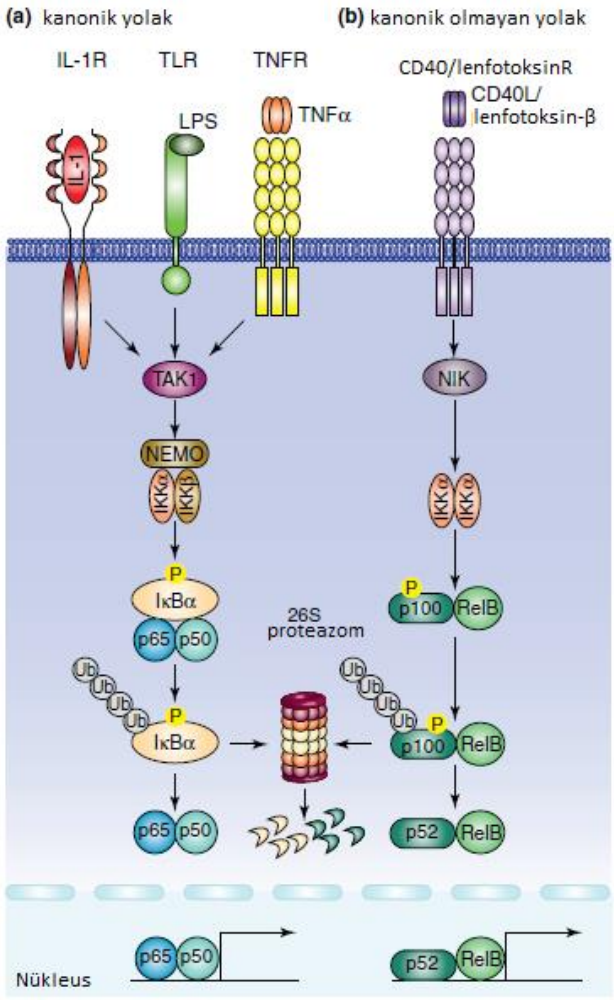
sitoplazma ile sınırlıdır. Aktivasyon üzerine dimer, inter lökin (IL)-6 dahil inflamatuar yanıt genlerinin transkripsiyonunu başlatmak için çekirdeğe taşınır. NF-κB ve IL-6 arasındaki ilişki, bir başka agresif MSS tümörü olan GBM'de açıklanmıştır [106]. Yapılan bir çalışmada, NF-sinyalB sinyallemesinin, yapısal olarak aktif bir NF-κB yolağına yol açan bir RELA füzyon proteini yoluyla ST-EPN bir Hallmark imzası olduğu gösterilmiştir [51, 54]. Bununla birlikte, 2 PF EPN alt grubunda hiçbir füzyon proteini tanımlanmamıştır. NF-κB alt birim yapıları ve dimerik kombinasyonları şekil 2.4'de özetlenmiştir.



Şekil 2.4. NF-κB alt birim yapıları ve dimerik kombinasyonlar. [107]'den uyarlanmıştır. (RHD: Rel homoloji domaini, GRR: Glisin zengin bölge, ANK: Anakrin yinelenme domaini, TAD: Transaktivasyon domaini, LZ: lösin fermuarı)

RELA, NF-κB yolağındaki merkezi sinyalleşme kompleksinde IkappaB (IκB) ve p50 ile etkileşime giren bir protein (65-kDa) olan RELA'yı kodlar. Hücre yüzeyi reseptörlerinin aktivasyonundan sonra sinyal, IκB'yi fosforile eden IκB-kinaz (IKK) kompleksi tarafından iletilir ve böylece RELA/p50'nin çekirdeğe translokasyonunu ve spesifik hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol eder [108].

Ribo nükleik asit (RNA)seq ve Affymetrix gen ekspresyon profili, translokasyon pozitif EPN'lerde artan C11orf95 ve RELA ekspresyonunun yanı sıra tümörlerde anormal hücre-hücre adezyonu, invazyon ve NF-κB aktivasyonu ile ilişkili yüksek seviyelerde insanda siklin D1 proteini kodlayan bir gen (CCND1)-NF-κB sinyallemesinin doğrudan transkripsiyonel hedefi [109] ve L1CAM tespit etmiştir [110, 111]. Yukarı yönde uyaranlar, örneğin Tümör Nekroz Faktörü (TNF), RELA içeren heterodimerlerin çekirdeğe yer değiştirmesine ve gen transkripsiyonunu yönlendirmesine neden olarak NF-κB yolağını etkinleştirir [112]. NF-κB sinyal yolaklarının özeti Şekil 2.5'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.5. NF-κB sinyal yolakları [111]'den uyarlanmıştır. TLR: Toll-benzeri reseptör, TNFR: TNF reseptörü, LPS: Liposakkarit, CD40: Farklılaşma kümesi 40, CD40L: CD40 ligandı, TAK1: Transforme büyüme faktörü B-aktive kinaz 1, NEMO: NF-κB temel modülatörü, NIK: NF-κB indükleyen kinaz

Pietsch ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma sonucunda, C11orf95-RELA füzyonlarının, ST-EPN'lerde NF-κB sinyallemesinin patolojik aktivasyonuna yol açan benzersiz bir yeni mekanizmayı temsil ettiği sonucunu bildirmişlerdir [53].

Yapılan bir çalışma ile C11orf95-RELA translokasyonları, hücre canlılığı açısından henüz işlevsel olarak karakterize edilmemiş MSS'nin birincil bir neoplazmı olan ST-EPN'de en yaygın genetik değişiklik olarak rapor edilmiştir [51]. C11orf95-RELA translokasyonlarından kaynaklanan yedi farklı füzyon proteininin, NF-κB sinyalleşme kompleksinin aktif bileşeni olan RELA'yı (p65) kurucu bir şekilde aktive ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, bu yeni tanımlanan genetik değişiklik, ST-EPN'nin tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef anlamına gelir. Ligandları, NF-κB sinyal yolağındaki farklı noktaları hedefleyerek NF-κB'yi aktive etme veya inhibe etme işlevi gören çok çeşitli NF-κB aktivitesi küçük molekül modülatörleri bildirilmiştir

[113, 114]. Buna göre, bu küçük molekülleri karakterize eden ilişkili veriler heterojendir ve bir molekülü diğeriyle karşılaştırmak zordur.

2.1.2. Apoptoz ve Kanser

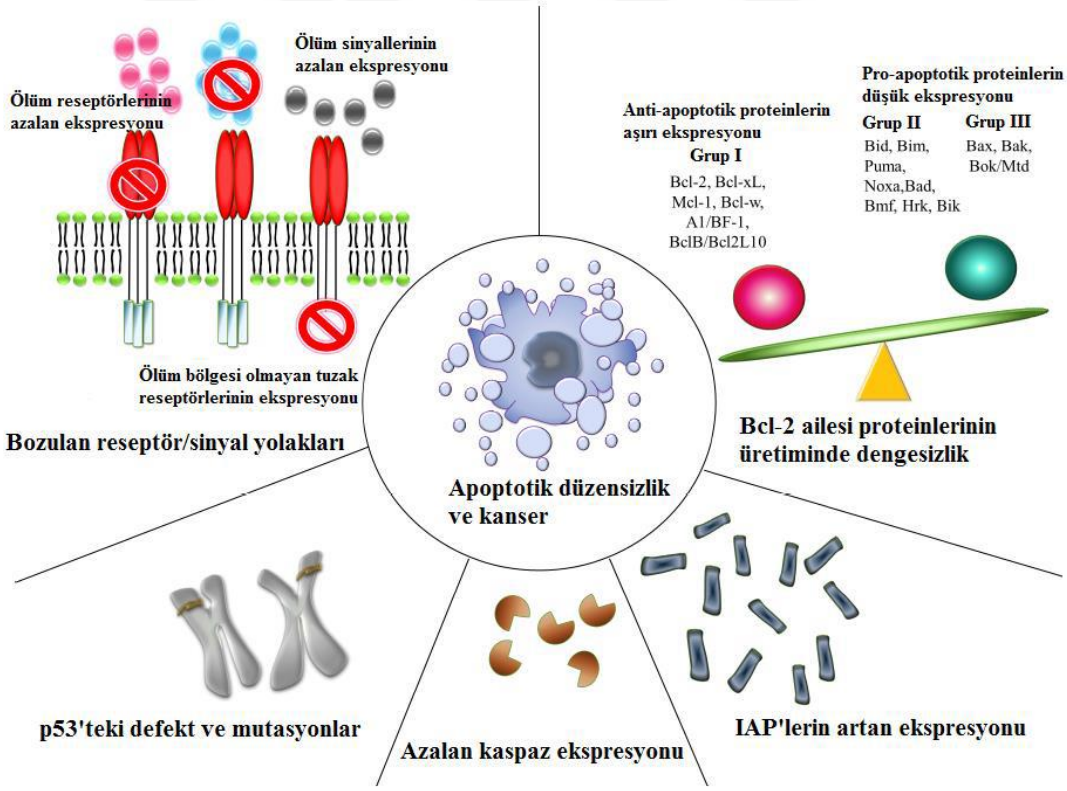
Sağlıklı bir hücrenin malign hale dönüşümünde, hücre ölümünden kaçınma en önemli değişikliklerden birisidir. Bu yüzden karsinogenezde apoptozis oranının düşük olması veya apoptozise direnç oldukça önemlidir. Malign bir hücrede apoptozise direnç oluşmasının çok sayıda yolu vardır [115]. Apoptozisten kaçınma nedenleri genel olarak aşağıda gibi sıralanır;

I. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arası dengede bozulma,

II. Kaspaz fonksiyonlarında azalma,

III. Ölüm reseptörünün bozulmuş sinyal mekanizması.

Karsinogenez ile hücrenin apoptozisten kaçınması arasında bulunan ilişki Şekil 3'de özetlenmiştir [115].



Şekil 2.6. Apoptozisten kaçınma ve karsinogenezis mekanizması. [115]' den uyarlanmıştır. Bcl: B-hücreli Lenfoma,

2.1.3. Apoptoz ve Kalsiyum

Gliomagenez ve gelişme, sadece kısmen anlaşılan karmaşık süreçlerdir. Hücre içi Ca^{+2} homeostazının korunması çok sayıda hücresel işlem için gereklidir [116]. Ca^{+2} hücresel büyüme

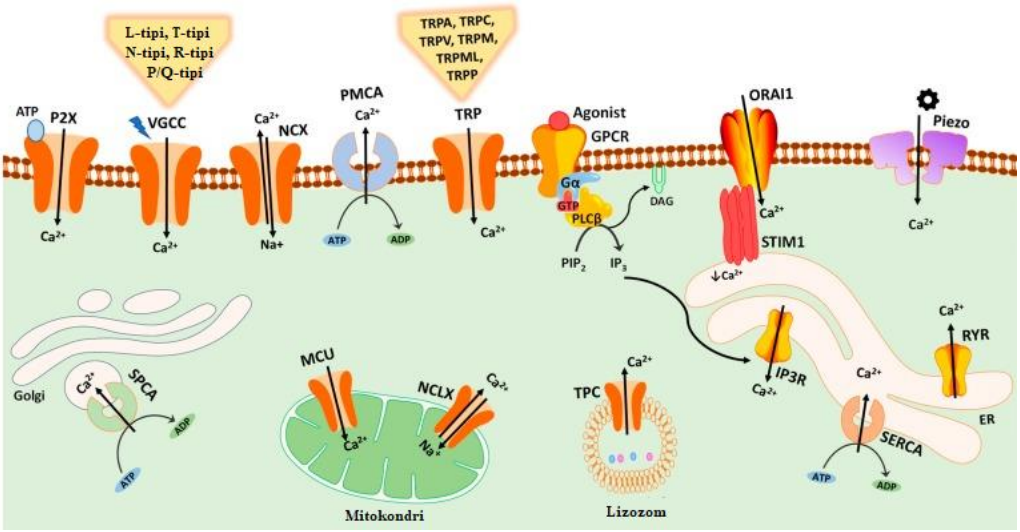
üzerinde bifazik etkiler uygular. Örneğin, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]i$)'nda ılımlı bir artış hücre proliferasyonunu teşvik edebilirken, yüksek $[Ca^{+2}]i$ yüksek mitokondriyal Ca^{+2} seviyelerine ve nihayetinde pro-apoptotik faktörlerin salınmasına yol açarak hücre ölümüne sebebiyet verecektir [117]. $[Ca^{+2}]i$'yi düzenlemek için, hücreler esas olarak Ca^{+2} kanallarının fonksiyonunu düzenleyerek çoklu mekanizmalar geliştirmiştir. Bu düzenlemedeki önemli oyuncular, iyon kanallarının TRP süper ailesinin (TRPC, TRPV (TRP Vanilloid), TRP Melastin (TRPM), TRP Mukolipin (TRPML), TRP Polikistik (TRPP), TRP Ankrin (TRPA), TRP mekanoreseptör potansiyeli olmayan C (TRPN)) üyeleridir. Kanser hücreleri, anormal biyolojik davranışlarıyla sonuçlanan anormal olarak düzenlenmiş Ca^{+2} homeostazına sahiptir [118]. Düzensiz aktivite gösteren TRPC kanalları bu malignitelere yol açan suçlulardan biridir.

2.1.4. Kalsiyum Kanalları ve Kanser

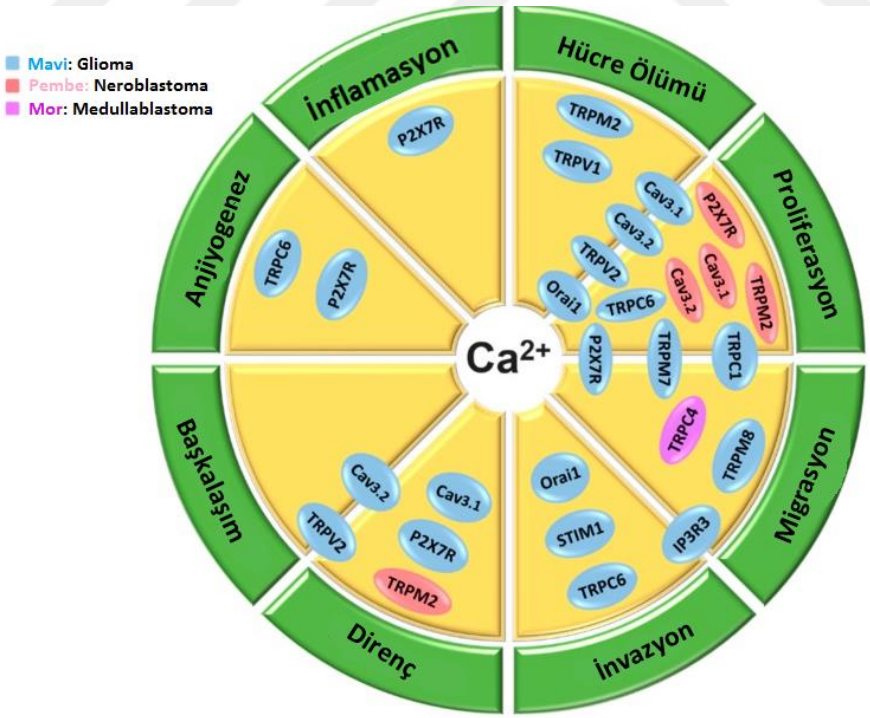
Hücreler tarafından üretilen hücre içi Ca^{+2} sinyalleri, büyüklük, zaman akışı ve lokasyon açısından spesifiktir ve kanallar, pompalar, değiştokuşcular, sinyal proteinleri ve bağımlı efektörler dahil olmak üzere çeşitli kalsiyum sinyalizasyon araçlarını içerir. Şekil 2.7'de, hücre içinde veya dışında ve hücre içi organellerin içi ya da dışına Ca^{+2} aktarımına aracılık eden Ca^{+2} aktarıcı proteinlerin temel bileşenlerine genel bir bakış gösterilmektedir. Ca^{+2} sinyalindeki değişimler hücre fizyolojisinde değişiklikler oluşturabilir. Bu nedenle, hücreler içindeki Ca^{+2} seviyeleri üzerinde sıkı bir kontrol gereklidir [119].

Artan kanıtlar, iyon kanallarının tümör biyolojisinde oldukça önemli bir rolü olduğunu ve kontrolsüz büyüme, sürekli anjiyogenez, metastaz ve apoptoza direnç gibi tümör hücresi özelliklerinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir [9]. Bazı durumlarda, bu düzenleme, tümör mikroçevresinden gelen sinyallerin iletilmesi yoluyla gerçekleşir. Örneğin, Ca^{+2} kanallarının EMT düzenlenmesinde yer alması, kanser metastazı için kritik bir süreçtir ve aynı zamanda ilaç direncine katkıda bulunur [25].

Tümör hücrelerinde, değişmiş Ca^{+2} hareketi sıklıkla anormal ifadeler, hücresel lokalizasyon ve sınırsız büyüme, metastaz ve apoptoza direnç gibi tümöre özgü özelliklere katkıda bulunan Ca^{+2} taşıyan proteinlerin aktivitesini içerir [120, 121]. Ca^{+2} sinyallerinin normal hücre fonksiyonlarında hayati önemi olduğu için, bu sinyallerdeki değişiklik, tümörjenik davranışı tetikleyebilen modifiye kalsiyum kodlarına yol açabilir. Ca^{+2} pulsları büyüklük, zaman ve frekans bakımından farklılık gösteren "kalsiyum kodları" olarak fonksiyon gösterirler. Uzun süreli Ca^{+2} pulsları, kanser hücrelerinde hücre bölünme süreci, anjiyogenez, farklılaşma ve genomik kararsızlıkta rol oynar [122]. Beyin kanseri hücrelerinde Ca^{+2} sinyal proteinleri tarafından desteklenen biyolojik süreçler Şekil 2.8'de şematize edilerek özetlenmiştir.



Şekil 2.7. Memeli hücrelerinde başlıca kalsiyum kanallarının, pompaların, değiştokuşçuların ve sensörlerin şematik gösterimi. [123]'den uyarlanmıştır. (Kısaltmalar: NCX: Sodyum (Na)-Kalsiyum değiştokuşcular, VGCC: Voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları, GPCR: G protein-kenetli reseptör, DAG: Diaçilgliserol, PLC: Fosfolipaz C, PIP: Fosfatidilinozitol-4,5-Bisfosfat, IP3: İnositol 1,4,5-trifosfat, ORAI1: Kalsiyum salınımı ile aktive olan kalsiyum kanal proteini 1, STIM1: Stromal etkileşim molekülü 1, ADP: Adenozin difosfat, ATP: Adenozin Trifosfat, MPU: Mitokondriyal kalsiyum uniporter, NCLX: Na/Ca/Lityum (Li) değiştokuşçusu, TPC: Çift porlu kanal, ER: Endoplazmik retikulum, SERCA: sarkoplazmik retikulum Ca-ATPaz, PMCA: Plazma Membran Ca^{+2} ATPaz)



Şekil2.8. Beyin kanseri hücrelerinde Ca^{+2} sinyal proteinleri tarafından desteklenen biyolojik süreçlerin şematik gösterimi. [123]'den uyarlanmıştır.

Çeşitli fizyolojik rollerine ek olarak, Ca^{+2} sinyalleşmesi, patolojik durumlarda olduğu gibi kanserlerde de rol oynar. Kanserin ilerlemesi için kritik olan çeşitli hücresel süreçler olan proliferasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastaz Ca^{+2} sinyaline bağımlıdır [120]. Ca^{+2}'nın hücre içine akışında yer alan plazma membran kanalları arasında VGCC ve TRP iyon kanalları bulunur. Çeşitli kanser türlerinde farklı şekilde düzenlenmiş çok sayıda kalsiyum kanalı vardır. TRPC3 bazı meme ve yumurtalık tümörlerinde yüksek seviyelerde eksprese edilir ve susturulması yumurtalık kanseri hücre hattı proliferasyonunu (*in vitro* çalışma sonucu) ve tümör oluşumunu (*in vivo* çalışma sonucu) azaltır [124]. TRPC6 ekspresyonu meme, karaciğer, mide kanserleri ve gliomada yükselir. TRPC6'nın susturulması, bazı özofagus ve meme kanseri hücre dizilerinin ve glioma hücrelerinin çoğalmasını azaltır [125].

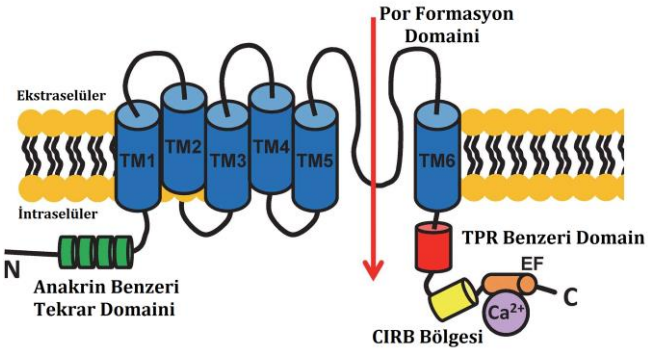
2.1.4.1.Glioma Hücrelerinde Kalsiyum Sinyali ve Geçici Reseptör Potansiyel Kanalları

Ca^{+2} sinyali, hücre proliferasyonunda hayati bir role sahiptir ve hücre döngüsünün birçok aşamasında gereklidir [126]. Sinyalleme, reseptörleri, kanalları, Ca^{+2} efektörlerini, Ca^{+2} duyarlı enzimleri, Ca^{+2} pompalarını ve Ca^{+2} değiştokuşçularını içerir [125]. Bu Ca^{+2} sinyal proteinleri, hücrelerin çoğalma kapasitesine katkıda bulunur.

2.1.4.2. Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanalları

TRP üst ailesi arasında, TRPC alt ailesi, Drosophila TRP ile en yüksek homoloji derecesine sahiptir. Yapısal ve işlevsel benzerliklere dayanarak, bugüne kadar bilinen yedi TRPC kanalı TRPC1, TRPC2, TRPC4/5 ve TRPC3/6/7 olarak dört gruba ayrılabilir. TRPC kanalları her yerde eksprese edilir, homomerik ve heteromerik katyon kanalları oluşturur.

TRPC kanalı, iyon kanalı gözeneğinin TM5 ve TM6 alanları arasında yer aldığı altı transmembran (TM) domaininden oluşan TRP ailesinin en önemli üyelerinden biridir. TRPC kanalları, TM4'te bir voltaj sensörüne sahip olmadıklarından, voltajla kontrol edilmezler. TRPC'lerin amino terminali, ankirin tekrarları içerir. TM6'ya yakın karboksil terminalinde PIP2 regülasyonu için TRP benzeri alan olarak bilinen, kanal aktivitesi ve desensitizasyon için kısa bir PIP2 düzenleyici bölge vardır. Ek olarak, bir kalmodulin/IP3 reseptörü bağlama (CIRB) bölgesi ve bir Ca^{+2} bağlama EF-eli (Parvalbumin'in E ve F sarmalı) karboksil ucunda yer alır [127]. Şekil 2.9'da TRPC kanallarının genel yapısı şematize edilmiştir.



Şekil 2.9. TRPC kanal yapı şeması. [127]'den uyarlanmıştır.

TRPC kanalları, PLC yolundan aşağı yönde etkinleştirilebilir. Bunlar reseptör kontrollü kanallardır ve hormonların, nörotransmiterlerin ve büyüme faktörlerinin hücresel efektörleri olarak işlev görürler. Homomerik ve heteromerik TRPC3/6/7 kanalları DAG tarafından aktive edilebilir. Ayrıca homomerik TRPC1, TRPC2 ve heteromerik TRPC1-TRPC3, TRPC3-TRPC4, TRPC3-TRPC5 de DAG tarafından aktive edilebilir [128, 129]. Bir grup TRPC5'in DAG tarafından aktive edilebileceğini bildirmiş [129] olsa da genel olarak TRPC4 ve TRPC5'in DAG'ye duyarlı olmadığı kabul edilmektedir [130]. Bu kanalları aktive eden kesin sinyal henüz bilinmemektedir.

Beynin yerleşik bağışıklık hücreleri olarak görev yapan mikroglia hücrelerinde, TRP'ler hakkında sadece birkaç çalışma yapılmıştır. Aktifleştirilmiş mikrogliadaki TRPC3'ün, Nitrik Oksit (NO) üretimini baskılamak için beyin kaynaklı nötrofilik faktör ile indüklenen sürekli hücre içi Ca^{+2} yükselmesinin korunmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir [131].

Anjiyogenez, glioma ilerlemesinde önemli bir mekanizmadır [132]. Glioma hücreleri, neovaskülarizasyon sürecindeki ihtiyaçlarını desteklemek için yeni kan damarlarının büyümesini uyarır. Beyin tümörlerinde neovaskülarizasyon, biyolojik agresiflik, malignite derecesi ve klinik nüks ile pozitif, gliomalı hastaların postoperatif sağkalımı ile negatif korelasyon gösterir [133]. Tümör anjiyogenezi, artan tümör kütlesine yanıt olarak sadece hipoksiye adaptasyondan değil, aynı zamanda anjiyogenez için gen transkripsiyonunu aktive eden genetik mutasyonlardan da kaynaklanmaktadır. Plazma membranından Ca^{+2} girişi anjiyogenezi etkiler ve birçok rapor TRPC kanallarının glioma anjiyogenezi sırasında aktive olduğunu gösterir [134].

Yukarıdaki bulgulara dayanarak, TRPC kanallarının glioma tedavisinde potansiyel ilaç hedefleri olabileceği söylenebilir. Reseptör aracılı Ca^{+2} girişi ve voltaj kapılı Ca^{+2} girişinin bir inhibitörü olarak bilinen SKF96365, TRPC kanallarının yanı sıra diğer birçok Ca^{+2} kanalı tipini de inhibe ederek güçlü spesifik olmayan etkilere yol açabilir [135]. Yapılan çalışmalarda, TRPC kanalları da dahil olmak üzere Ca^{+2} kanallarını özel olarak hedefleyen ajanların araştırılması için

büyük çaba gösterilmiştir. Güçlü ve seçici bir TRPC4/5 antagonisti, ML204 tanımlanmıştır ve seçiciliği şu anda TRPC araştırmalarında kullanılan diğer farmakolojik blokerlerden çok daha üstündür [136]. Bununla birlikte, TRPC1 veya TRPC6 kanalları için bu tür ajanlar rapor edilmemiştir. Bu nedenle, gliomanın klinik tedavisini kolaylaştırmak için, TRPC1 ve TRPC6 kanallarını hedefleyen spesifik blokerlerin geliştirilmesi acil bir ihtiyaçtır.

2.1.4.2.1. Geçici Reseptör Potansiyel Katyon 6 Kanalları

TRPC6 kanallarını, çeşitli doku ve hücrelerde eksprese edilen DAG-aktive edilmiş seçici olmayan katyon kanalları oluşturur. Hücresel Ca^{+2} görüntüleme deneyleri, kültürde tutulan kortikal nöronlarda DAG'ye duyarlı plazma zarı katyon kanallarının varlığını göstermektedir. Bu kanallar Ca^{+2}, Na^{+}, Baryum (Ba^{+2}) ve Manganez (Mn^{+2}) için geçirgendir. Protein kinaz C (PKC) tarafından kontrol edilmeyen Ca^{+2} girişi Gadolinyum (Gd^{+3}) ve SKF96365 tarafından bloke edilir, ancak flufenamik asit tarafından da güçlendirilir. Diğer TRPC izoformlarına etki etmeden TRPC6 kanallarını aktive eden Hiperforin, seçici olmayan katyon kanalları aracılığıyla Ca^{+2} girişini tetikler [137-139]. TRPC ailesi içinde yapısal olarak bölünmüş iki alt grup vardır: TRPC3, TRPC6, TRPC7 kanalları (TRPC3/6/7) ve TRPC1, TRPC4, TRPC5 (TRPC1/4/5). Bu iki alt grubu birbirinden ayıran bir fonksiyonel özellik, DAG'ın TRPC1/4/5 kanallarını aktive etmeden TRPC3/6/7 kanallarını aktive etme yeteneğidir [129, 137-142].

TRPC kanalları, hücre tipleri arasında her yerde eksprese edilirken, doğal TRPC kanallarının fonksiyonel rolünü tarif eden şaşırtıcı derecede az sayıda rapor vardır. TRPC6 kanalı, bir dizi farklı düz kas hücre tipinde yüksek oranda eksprese edilir [143-145] ve düz kasta reseptör kaynaklı Ca^{+2} sinyalleşmesinde rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır [143-146]. Primer portal ven miyositlerinde, aşırı eksprese edilen TRPC6 kanallarına yakından karşılık gelen akım, TRPC6 antisens (çeşitli genlerin protein oluşturmadan susturulması amacıyla oligodeoksiribonükleotidlerin kullanılması) oligonükleotitleri ile tedavi edilerek azaltılmıştır [148]. Pulmoner vasküler düz kas hücrelerinde antisens dizileri tarafından TRPC6'nın aşağı regülasyonu, depo kontrollü Ca^{+2} girişinin azalmasıyla sonuçlanmıştır [144]. Klonal A7r5 aortikten türetilen düz kas hücre hattının kullanıldığı bir çalışmada, DAG analoğu 1-Oleoil-2-Asetil-Sn-Glisero (OAG) tarafından aktive edilen TRPC6 benzeri bir akım tanımlanmıştır. Bu durumda akım, PLC-bağlı reseptör aktivasyonu ile arttırılmıştır, ancak Ca^{+2} deposunun tükenmesi ile değişmemiştir [145]. TRPC6 nakavt farelerin kullanıldığı çalışmalarda, düz kasta artmış arteriyel kan basıncı, artmış arteriyel tonus, artmış agonist ve DAG kaynaklı akımın bir fenotipi gözlenmiştir [137, 138].

Katyon kanallarının TRP ailesinin, hormonlar ve parakrin faktörler, sıcaklık, pH, ozmolarite ve oksidatif stres (OS) gibi çeşitli uyaranlara karşılık yanıt olarak sinyal iletiminde temel bir rolü vardır [147]. TRPC6, PLC'ye bağlı GPCR'nin uyarılmasının ardından aktive edilir.

TRPC3 ve TRPC7 ile birlikte TRPC6, DAG ekzojen uygulamasıyla aktive edilebilir, ancak hücrenin IP3 ile hücre içi diyalizi veya dahili Ca^{+2} depolarının tükenmesi ile aktive edilemez [141, 148]. Bu nedenle, TRPC6, depo kontrollü bir kanal olarak kabul edilmez. TRPC6 için mesajcı RNA (mRNA), beyin, böbrek, akciğer, kalp, yumurtalık ve testis gibi dokularda bulunur [149, 150]. Knock-down stratejileri, tavşan portal ven düz kas hücreleri [143], sıçan serebral arterleri [151], sıçan pulmoner arterinden düz kas [144] ve Jurkat T lenfositlerinde [152] reseptöre bağlı tepkilerde TRPC6 kanalını ve TRPC6 kanallarının aktivitesi ile ilişkili olabilecek tepkileri etkilemiştir. Ayrıca düz kastan türetilen adrenal kromatin hücre hattı olan PC-12 hücreleri [153], hava yolu düz kas hücreleri [154], köpek böbrek hücresi olan MDCK hücreleri [155], trombositler [156] ve aortik kas hücresi olan A7r5 hücrelerinde [145] de tanımlanmıştır. Fare birincil eritroid hücrelerinde, TRPC6, eritropoietin tarafından uyarılmaya yanıt olarak Ca^{+2} akışından sorumlu kanal olan TRPC2 ile etkileşime girer [157]. Bu nedenle, TRPC6 kanalı yaygın bir dağılıma sahiptir ve şüphesiz çeşitli uyaranlara karşı oluşan hücresel ve doku yanıtlarında kanalın önemli bir rolü vardır. Ancak, yerel TRPC kanallarının gerçek bileşimi bilinmemektedir. TRPC kanallarının TRPC ailesinin diğer üyeleriyle ve belki de daha büyük TRP süper ailesinin diğer üyeleriyle heteromultimerler oluşturduğuna dair kanıtlar vardır ve yardımcı proteinler kanal ekspresyonu, hedefleme ve düzenlemede önemli olabilir [155, 158, 1159].

2.1.4.2.2. Glioma Hücrelerinde Geçici Reseptör Potansiyel Katyon 6 Kanalları

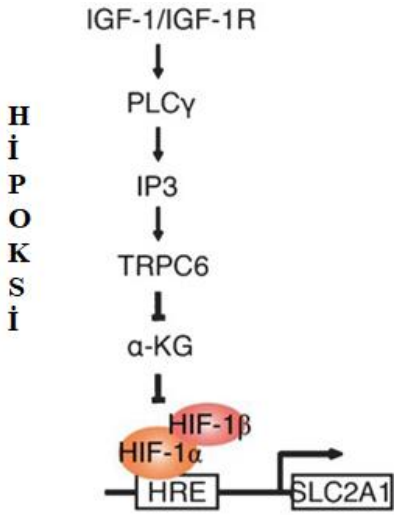
Bir TRPC kanal üyesi olan TRPC6 glioma hücre döngüsünün ve proliferasyonunun kontrolünde rol oynar. Çalışmalar, TRPC ailesi arasında TRPC6'nın mRNA'sının ve protein seviyelerinin, normal beyin dokularına kıyasla insan glioma dokularında spesifik olarak arttığını göstermiştir [125]. TRPC6'nın artan ekspresyonu, glioma malignite dereceleri ile ilişkilidir. Ayrıca, fonksiyonel TRPC6 kanalları insan glioma hücre hattı (U251), astrositoma hücre hattı (U87) ve insan GBM hücre hattı (T98G) hücrelerinde de bulunur. Bu hücrelerde, TRPC6 aktivitesinin veya ekspresyonun sırasıyla dominant negatif mutant TRPC6 (DNC6) veya kısa hairpin RNA (shRNA) formu kullanılarak inhibisyonu, hücre büyümesini baskılayan trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) tarafından uyarılan Ca^{+2} akışında bir azalmaya neden olur, hücre döngüsünün G2/M-fazında durmasını sağlar ve ışınlamanın anti-proliferasyon etkisini arttırır. İlave analizler, TRPC6'nın inhibisyonunun, hücre döngüsü durmasından sorumlu olan hücre bölünme döngüsü protein 25C (CDC25C) ekspresyonunun aşağı regülasyonu yoluyla sikline bağlı kinaz (CDK)1'in aktivasyonunu baskıladığını gösterir [125]. Ek olarak, TRPC6 aktivitesinin inhibisyonu çıplak farelerde subkütan ksenograft modelinde tümör hacimlerini önemli ölçüde azaltır ve kafa içi ksenograft modelinde ortalama sağkalımı arttırır [125]. Ayrıca başka bir çalışma, T-hücrelerini Aktive Eden Nükleer Faktör (NFAT) yolunun kalsinörin-nükleer

faktörünü aktive ederek hipoksi sırasında gliomanın çoğalmasını ve malign büyümesini destekleyebileceğini göstermektedir [160].

TRPC6 yoluyla Ca^{+2} girişi endotel geçirgenliğini ve anjiyogenezi arttırır [161]. TRPC6 vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) tarafından etkinleştirilebilir. İnsan vasküler endotelyal hücrelerinde baskın negatif bir TRPC6 yapısının aşırı ekspresyonu, hücre içi Ca^{+2} seviyelerinde VEGF'nin aracılık ettiği artışı, yer değiştirmeyi, filizlenmeyi ve proliferasyonu baskılar. Buna karşılık, vahşi tipte bir TRPC6 yapısının aşırı ekspresyonu, İnsan vasküler endotelyal hücrelerin çoğalmasını ve göçünü arttırır [162]. Ek olarak, farmakolojik veya genetik yaklaşımlarla insan umbilikal kord endotelyal hücrelerinde TRPC6'nın inhibisyonu, hücreleri G2/M-fazında durdurmuş ve anjiyogenezde önemli adımlar olan VEGF'nin neden olduğu proliferasyonu ve tüp oluşumunu baskılamıştır. Ayrıca, TRPC6'nın inhibisyonu, tavuk embriyo korioallantoik membranında VEGF'nin neden olduğu anjiyogenezi ortadan kaldırmıştır [163]. Yukarıdaki raporlar VEGF'nin anjiyogenezi düzenlemek için TRPC6 kanallarını aktive ettiğini göstermektedir. Tersine, endotelyal hücrelerde TRPC6 aktivasyonu, anjiyogenezi uyaran VEGF gibi anjiogenik büyüme faktörlerinin transkripsiyonunu ve salınmasını uyarabilir. Örneğin, hipoksi Notch aktivasyonunu indükler, TRPC6 ekspresyonunu arttırır ve böylece kalsinörin-NFAT yolunun aktivasyonuna bağlı $[Ca^{+2}]$i yükselir ve glioma anjiyogeneziyle sonuçlanır [160]. Ayrıca Notch sinyallemesinin hipoksiye bağlı tümör göçü ve invazyonuna aracılık ettiği bildirilmektedir. TRPC6 bu agresif fenotipin geliştirilmesi için de gereklidir, çünkü TRPC6'nın gen ekspresyonunun durdurulması glioma invazyonunu azaltır [164]. İnvazyonun son aşaması, sitoskeletal yeniden düzenlemeleri ve Rho guanozin trifosfat hidrolaz enzimi (GTPas)'nin kritik bir rol oynadığı lamellipodia ve filopodia oluşumunu gerektirir. TRPC6'nın Rho aktivasyonu ve aktin sitoskeletal yeniden düzenlemelerinde rolü çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [165]. Bu nedenle, TRPC6 aracılı Ca^{+2} akımı, göç için önemli olan aktin-miyozin etkileşimlerini ve hücre-substrat adezyon düzeneğini teşvik ederek glioma invazyonuna katkıda bulunur [164, 166].

Tüm büyük tümör baskılayıcıların ve onkogenlerin metabolik yollarla yakın bağlantıları olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir [167]. Genetik değişiklikler (Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF)-1, Aktive edici protein kinaz (AMPK), p53, çok işlevli transkripsiyon faktörü (c-Myc) ve Fosfoinositid-3 kinaz (PI3K)'ı etkileyen), metabolik girdileri, yalnızca hücresel enerji (yani ATP) sağlayan değil, aynı zamanda biyosentetik süreçler ve redoks düzenlemesi (Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)) için indirgeme gücünün yanı sıra makromoleküler öncüler (yani riboz ve asetil-CoA) sağlayan çoklu yolaklara yönlendirir. Her geçen gün daha fazla çalışma ile değişen hücresel metabolizmanın onkogenlerin tümör oluşumunu ve ilerlemesini teşvik ettiği ana yollardan biri olabileceği ortaya koyulmaktadır [168]. Tümör ilerlemesinde anahtar bir oyuncu olmasına rağmen, Ca^{+2}'nın tümör metabolizmasındaki rolü konusunda henüz kesin bir kanıt yoktur. Bununla birlikte, tümör

metabolizmasında rol oynayan bazı anahtar moleküllerin (yani HIF-1, AMPK, p53, c-Myc) Ca^{+2}'ya duyarlı olduğu belirtilmelidir [169]. Bu nedenle Ca^{+2}'nın bu metabolik regülatörleri düzenleyerek tümör metabolizmasını etkilemesi mümkündür. Yapılan bir çalışma ile bu hipotez doğrulanmıştır [170]. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 hipoksi sırasında insan glioma hücrelerinden spesifik olarak salınır. İnsan glioma dokularındaki spesifik olarak yukarı regüle edilmiş TRPC üyesi TRPC6 daha sonra IGF-1 reseptörü (IGF-1R)/PLC/IP3R yolu ile hızla aktive edilir. Hipokside salınan IGF-1, PIP2, DAG ve IP3'e hidrolize olan PLC'nin aktivasyonuna yol açan IGF-1R'yi uyarır. IP3, Ca^{+2} akımına aracılık etmek için TRPC6'yı aktive ederek dahili depolardan Ca^{+2} salınımını indükler. TRPC6 aktivasyonu, α-ketoglutarat (α-KG) seviyelerini azaltır ve HIF prolil hidroksilaz aktivitelerini inhibe ederek HIF-lα birikmesine yol açar. HIF-1, metabolik ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek tümör hücresi glikoz metabolizmasında kritik bir rol oynar [170]. TRPC6'nın HIF-1α yoluyla glikoz alımını arttırdığı gösterilmiştir. TRPC6'nın DNC6 kullanılarak inhibisyonu, hipoksinin neden olduğu glikoz taşıyıcı (GLUT)1 (SLC2A1 olarak da bilinir) ekspresyonunu önemli ölçüde bastırır. Eksojen HIF-1'in eksprese edilmesi gerçekten de GLUT1 ekspresyonunun DNC6 inhibisyonunu tersine çevirir. Önemli olarak, HIF-1 eksprese edilmesi hipokside glukoz alımında DNC6 supresyonunu tersine çevirir. Ayrıca, hücrelerin TRPC6 yoluyla Ca^{+2} girişini indüklediği bilinen membran geçirgen DAG analoğu olan OAG ile muamele edilmesi, hipokside GLUT1 mRNA ve protein seviyelerini arttırır, bu da DNC6'yı eksprese ederek önemli ölçüde azaltır [170, 171]. Enerji metabolizmasında rol oynayan diğer iki gen laktat dehidrogenaz (LDH)A ve LDHB'nin TRPC6'dan etkilenmediği belirtilmelidir. Toplu olarak, bu sonuçlar TRPC6'nın aktivasyonunun hipokside glikoz metabolizmasını desteklediğini, ancak enerji üretmek için glikolizi uyarmadığını düşündürür. Bu nedenle, TRPC6, HIF-1α'nın hızlı hidroksilasyonunu ve stabilitesini düzenlemek ve hipoksi sırasında ortaya çıkan glikoz metabolizmasını etkilemek için metabolit seviyelerini kontrol eder. Bu bağlamda, TRPC6 yoluyla Ca^{+2} girişi önemli bir metabolik regülatör olarak işlev görebilir. Ek olarak, DNC6'nın GLUT1 ekspresyonu üzerindeki önleyici etkisinin, glioma hücresi gelişimini baskıladığını kısmen açıklayabilir [125, 160, 170]. Bu nedenle, TRPC'nin glioma metabolizmasının düzenlenmesinde olası rolünün incelenmesi büyük bir klinik öneme sahiptir. TRCP6'nın hipoksi esnasında glioma metabolizmasındaki rolü Şekil 2.10'da şematize edilerek özetlenmiştir.



Şekil 2.10. TRPC6 ve glioma metabolizması [172]'den uyarlanmıştır

Kalsiyum sinyali, hipoksi ile ilişkili yolları düzenler ve birkaç Ca^{+2} taşıyıcı proteinin, hipoksi transkripsiyonel yanıtlarının ana düzenleyicisi olan HIF-1 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir [173]. Glioma hücrelerinde, TRPC6, hücre içi Ca^{+2}'nın hipoksik yükselmesine katkıda bulunduğu hipoksi ile aktive edilir. TRPC6'nın shRNA veya DNC6'nın ekspresyonu ile inhibisyonu, HIF-lα hidroksilasyonunun desteklenmesi yoluyla U251 insan GBM hücrelerinde hipoksi ile indüklenen HIF-1α protein birikimini ortadan kaldırmıştır [170]. TRPC6'nın hipoksik aktivasyonunun, GLUT1 ekspresyonu ve glukoz alımının düzenlenmesi yoluyla hücre metabolizmasına katkıda bulunduğu da gösterilmiştir [170]. Başka bir çalışmada, TRPC6 ekspresyonunun (Notch sinyali yoluyla) hipoksik yukarı regülasyonu, NFAT aktivasyonu, GBM hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve anjiyogenezi ile sonuçlanmıştır [160].

2.1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Biyolojik sistemler, hücrelere ve hücrenin çeşitli bileşenlerine serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin verebilecekleri zararları engellemek için çeşitli savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bu savunma sistemlerinden biri de substratların oksidasyonunu çok düşük konsantrasyonlarda bile geciktirebilen, inaktif duruma getiren ve lipid peroksidasyonunu önleyebilen "antioksidan" mekanizmalarıdır. Bu antioksidanlardan Süperoksit Dismutaz (SOD), süperoksit radikali O_2^{-}'nin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijen O_2'e dönüşümünü katalizler, bu sayede de intraselüler konsantrasyonunun azalmasını sağlar [174]. Bu antioksidanlardan biri de katalaz (CAT)'dır. Özellikle peroksizom olmak üzere ER ve sitozolde oldukça yoğun bulunur. Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2, metil ve etil hidroperoksitleri gibi molekülleri ortamdan uzaklaştırmakla görevlidir [174, 175]. Diğer bir antioksidan ise glutatyon peroksidaz (GPx)'dır. Tetramerik yapıda olan ve lipitleri peroksidasyona karşı koruyan bir

enzimdir. Redükte glutatyon (GSH)'u yükseltirken, H_2O_2'yi parçalayarak membran lipitleri ve hemoglobini OS'den korur [176].

2.1.5.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Biyolojik Etkileri

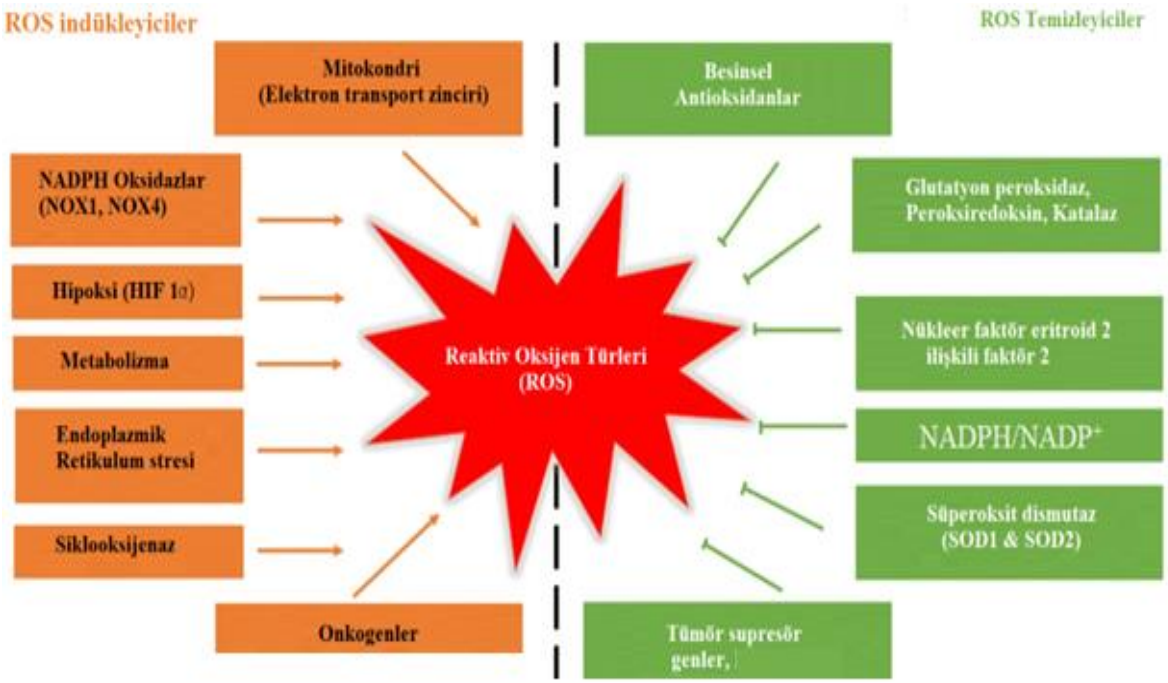
Reaktif oksijen türleri (ROS) biyolojik sistemlerde metabolik olayların normal işleyişi sonucunda da oluşabilirken, yüksek OS de serbest radikallerin veya ROS'un aşırı üretimini tetikleyebilir. Farklı hedefleri bulunan ve sitotoksik oldukları bilinen O_2^-, hidroksi radikaller (OH^-), H_2O_2 gibi serbest radikal olmayanlar ve tekli oksijen ($^1O_2$) serbest radikal olan ROS çok çeşitli hastalıklar ile birlikte kanser etiyolojisinde de yer alırlar [177].

Serbest radikaller polisakkaritlerin depolimerizasyonuna, proteinlerin denatürasyonu ve peptit zincirlerinde kopmaya, doymamış yağlarda lipitlerde, organel zarlarında, hücre zarlarında çapraz bağlanmalara, kolestrol ve yağ asitlerinde oksidasyona, nükleik asit bazlarında mutasyonlara, kimyasal modifikasyonlara ve hidroksilasyonlara, nükleik asitlerde baz içermeyen bölgeler oluşmasına, tek ve çift iplikçik kırılmalarına ve proteinlerde çapraz bağlara, kükürtlü amino asitlerde ve enzimlerde inhibisyona, protein denatürasyonu ve çaprazlanmalara sebep olmaktadırlar [178].

Hücrelerde metabolik aktiviteler sonucunda en çok O_2^- ve H_2O_2 üretilir [179]. O_2^-, SOD isimli enzimlerce hızla H_2O_2'ye dönüştürülür ve birikimi engellenir [180]. O_2^- birikimi OS ile ilgilidir. H_2O_2, hücre proliferasyonunda bir dizi hücresel yolağın aktive olmasında ihtiyaç duyulan bir bileşiktir. H_2O_2, redoks sinyallenmesinin başlaması için proteinlerde bulunan sistein rezidülerini oksitleyebilmektedir. Buna ek olarak CAT, peroksiredoksinler ve GPx gibi hücrede bulunan antioksidan proteinlerce H_2O'ya dönüştürülebilirler. H_2O_2 miktarı kontrolsüz olarak arttığında OH, metal katyon olan demir (Fe^{2+}) ile reaksiyona girer ve hücredeki makromoleküllere geri dönüşümsüz zararlar verir. Bu sebeple hücrelerde Fe^{2+} homeostazını korumak ve de toksik hidroksil radikalleri oluşmasını engellemek için birçok mekanizma bulunmaktadır. ROS'daki küçük bir artış sonucu meydana gelebilecek OS altında hücrelerde geliştirilmiş olan bu mekanizmalar antioksidan enzimler ve redoks tamponlama sistemlerince gerçekleştirilir. İlk olarak redoks dengesini sağlamak için SOD, CAT, perdoksidazlar gibi enzimlerin ekspresyonu artırılır. Daha sonra da en önemli aşama olan GPx sistemi aktif hale getirilir [181].

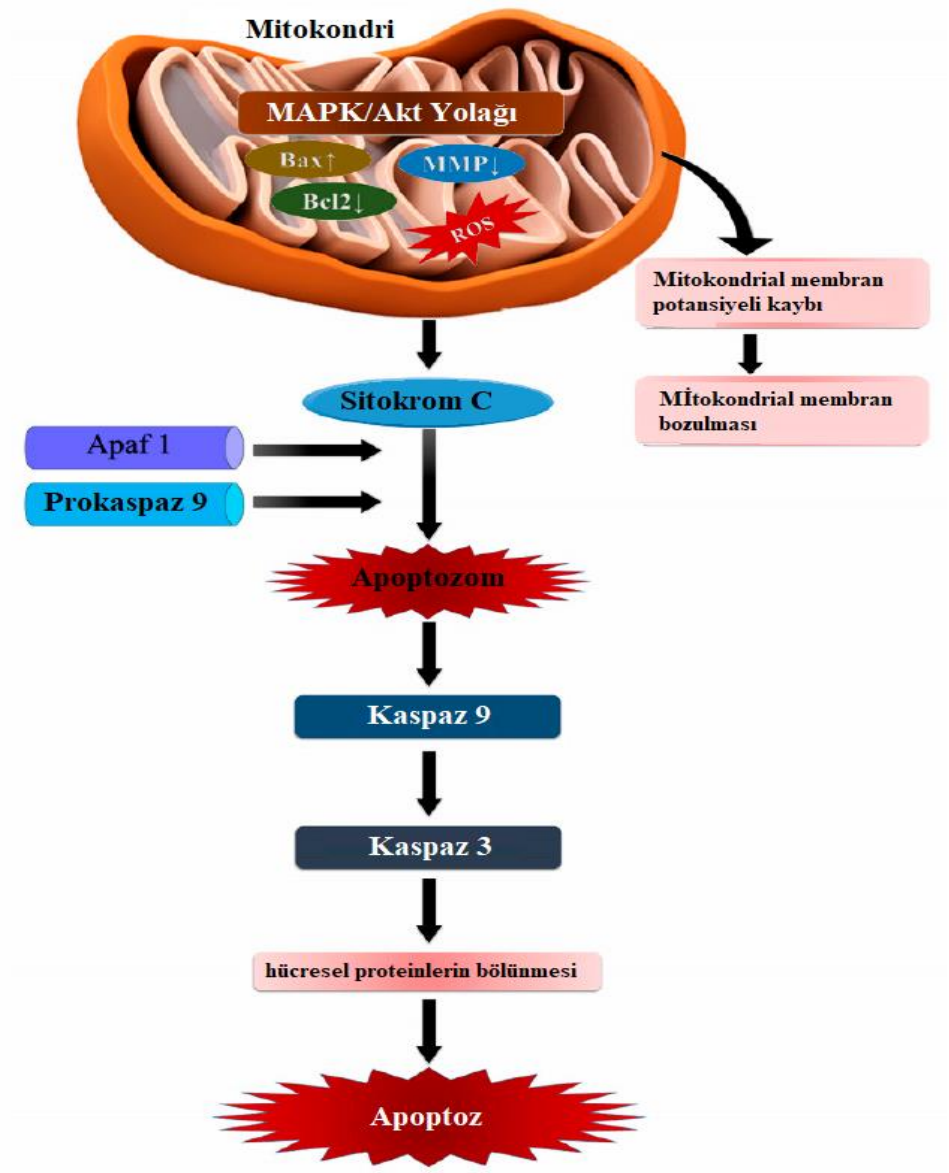
Kanser hücrelerinde ise yüksek miktarlarda ROS üretilerek tümörjenik faaliyetler gerçekleştirilir. Ancak bu olay antioksidan seviyeleri ile ROS arasındaki karmaşık dengenin kurulması ile mümkündür. Çünkü ROS'un orta seviyelerdeki üretimi stresli kanser hücrelerinde büyüme mekanizmasında görev alan sinyal yolaklarını aktif hale getirerek hücre sağkalımı ile hücre proliferasyonunu teşvik eder. Bunun yanında aşırı ROS birikimi, süpürme mekanizmalarındaki başarısızlık ya da antioksidan seviyelerindeki yetersizlik sebebiyle

hücredeki biyomoleküllerin zarar görmesine, dolayısıyla da apoptoza neden olabilir. Bu sebeple kanser hücreleri OS'den kaynaklanan apoptoza karşı kendilerini korumak için yüksek seviyelerde antioksidanları (SOD, GSH, GPx) düzenlerler [182]. Yapılan çalışmalar ile kanser hücrelerinde OS'nin glutatyon-S-transferaz, CAT ve SOD gibi enzimlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir [183]. Bu sebeple, OS ile birlikte ROS'da oluşan artış antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırmaktadır (Şekil 2.11).



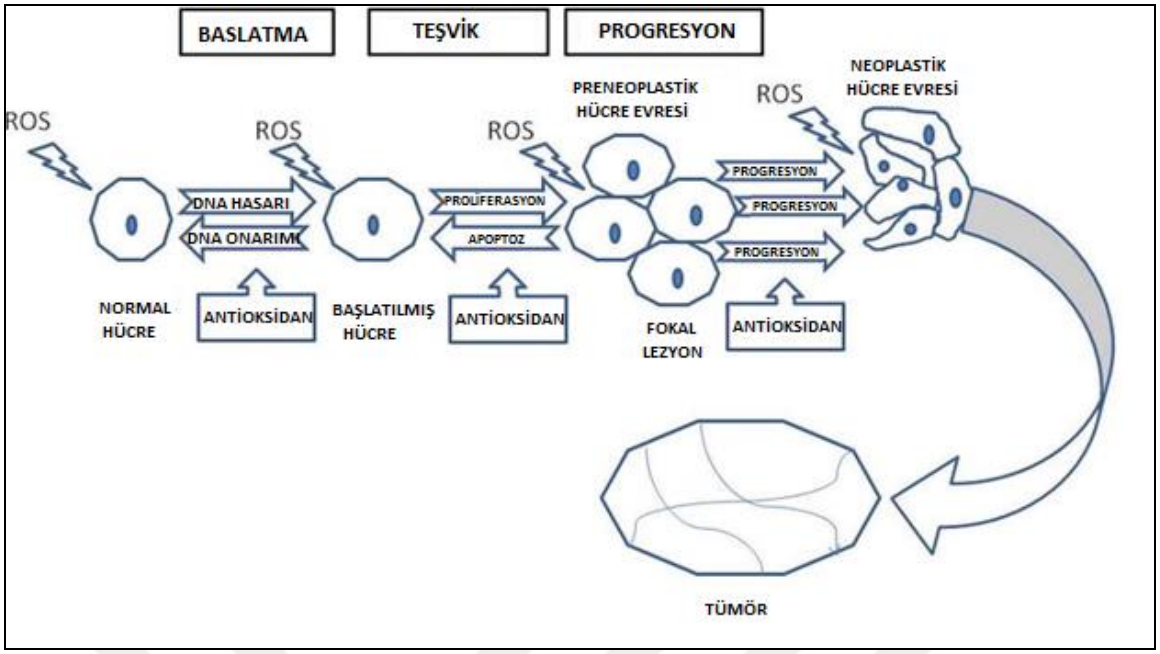
Şekil 2.11. ROS'un indükleyicileri ve temizleyicileri aracılığıyla hücresel homeostazın sürdürülmesi [184]'den uyarlanmıştır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi baz modifikasyonları, sarmal kırılması, DNA çapraz bağlanması ve proteinler gibi hemen hemen tüm DNA hasarı biçimleri, kanserin başlaması ve gelişmesiyle ilişkili olan ROS tarafından indüklenir. Bununla birlikte, biyolojik sistemlerdeki bir paradoks, ROS'un kanser terapötiklerinde önemli bir yaklaşım olan apoptotik hücre ölümüne neden olabilmesidir. ROS, mitokondriyal zarı bozar ve mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerini açar ve böylece mitokondriyal elektron transfer zincirine müdahale eder ve Sitokrom-c salınımını indükler. Sitozolde, apoptotik peptidaz aktive edici faktör (Apaf)-1 ve prokaspaz-9 ile birlikte Sitokrom-c, kaspaz-9'un aktivasyonuna yol açan 'apoptozomlar' oluşturur. Bu daha sonra hücresel proteinlerin bölünmesi ve apoptotik hücre ölümü ile sonuçlanan kaspaz-3 gibi efektör kaspazları aktive eder (Şekil 2.12) [185].



Şekil 2.12. ROS ve apoptoz arasındaki ilişki. [185].'den uyarlanmıştır.

Sonuç olarak ROS, oksidatif hasara sebep olmakla birlikte, hücre fonksiyonlarında oldukça fazla potansiyel eyleme sahiptir. ROS tipi, ROS'a maruz kalma süresi ve ROS seviyesine bağlı olarak ROS, hücre döngüsünde durağanlık, nekroz, apoptoz ve hücre yaşlanması olaylarını inhibe ederek anti-kanser etki ortaya koyabilir. Ancak bunun yanında proliferasyon, anjiyogenez, metastaz ve invazivlik olaylarını tetikleyerek pro-kanser etki de ortaya çıkarabilir (Şekil 2.13) [186].



Şekil 2.13. ROS-kanser ilişkisi ve antioksidan bağlantı noktaları [187]'den uyarlanmıştır.

2.1.5.2. Lipidperoksidasyonu ve Malondialdehit

Yarı ömürlerinin kısa, reaktif özelliklerinin ise yüksek olması nedeniyle ROS miktarlarının analizi oldukça zordur. Daha kararlı ve OS büyüklüğü gösterebildikleri için ROS'un oksidasyon ürünleri daha fazla araştırılmaktadır [188]. Hücre zarının yapısında bulunan fosfolipitlerin çoklu yağ asidi rezidüleri, oksidasyona oldukça duyarlıdır. Bu sebeple, ROS'un verdiği hasarın araştırılmasında en çok zarar verdiği membran zarındaki fosfolipidlerin analizinin yapıldığı lipid peroksidasyonu kullanılmaktadır [189].

Lipid perdoksidasyonunun en yaygın ürünleri malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal ve akrolein gibi bileşiklerdir. Bunların antimikrobiyal, kimyasal direnç, termal kararlılık, optik elektrik, yarı-iletkenlik ya da iletkenlik ve kataliktik özellikleriyle DNA ile Schiff bazı boyunca protein çapraz bağı ürettikleri bilinmektedir [190-192]. MDA OS'nin en büyük göstergesi olarak kabul edilir [193]. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan MDA, reaktif ve toksik özellikleri oldukça yüksek bir aldehittir [194]. Lipit kategorisine girmeyen protein ve karbonhidratlar da MDA üretebilmektedirler. MDA iyon trafiğine etki ederek membran bileşiklerinin çapraz bağlanmasına sebep olur ve bu yolla hücre içerisine kolay bir şekilde girebilmektedir. İyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinde olumsuz değişikliklere sebep olan MDA, intraselüler ortamdaki Schiff bazlarıyla birleşerek lipofusin formunda sitoplazmada birikebilmektedir. MDA birikimi hücre membranının çift katlı yapısını, permeabilitesini ve akışkanlığını değiştirebilir [195]. Ayrıca DNA'da nükleotid trifosfatlar ile de reaksiyona girerek ortaya mutajenik DNA eklentilerinin çıkmasına sebep olmaktadır [196, 197].

Lipid peroksidasyonu, kanserin ilerlemesinde yüksek ROS üretimi, hücre membranı dejenerasyonu ve DNA hasarı konularını da kapsamaktadır [190]. Yapılan çalışmalarda sağlıklı dokularda lipid peroksidasyon çok düşük miktarlarda bulunurken, yüksek miktarlarda bulunması ROS kaynaklı doku hasarının göstergesi olarak ifade edilmektedir [198]. Ayrıca özellikle kanser hücrelerinde ROS üretimindeki artış, ROS aracılı reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin kanser hücrelerinde birikmesi, bunların plazmada ve idrarda saptanma ve de OS'ye yanıt olarak antioksidan enzimlerinin kanser hücrelerinde yüksek seviyelerde eksprese edilmesi gibi veriler ele alındığında genel olarak sağlıklı hücrelere göre kanser hücrelerinin daha fazla OS altında olduğu gösterilmiştir [199]. Çeşitli türlerde kanseri olan hastalar üzerinde yapılan farklı çalışmalarda (akciğer, larenks, meme, kolorektal, prostat, gastrointestinal sistem, oral kavite kanserleri) MDA düzeylerinde sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir [200]. Bu sonuçlar lipid peroksidasyonu ürünlerinin kanser türlerinde yüksek seviyelerde olduğunu ve bu ürünlerin kanser etiyolojisindeki rolünü ortaya koymaktadır.

2.1.5.3. Glutatyon

GSH hücrelerde sentezlenen ve enzimatik olmayan bir antioksidan çeşididir [176]. Hücrenin redoks durumunun stabilizasyonunda, hücre içi sinyal yolaklarının regülasyonunda, apoptozda, gen ekspresyonunda ve detasifikasyon sisteminde görev alan GSH, OS altında yaygın olarak üretildiği tespit edilen bir metabolittir [201]. GHS seviyesi çoğu kanser türünde (meme, akciğer, baş-boyun, yumurtalık, akciğer kanserleri) yapılan çalışmalarda yüksek seviyelerde bulunmuştur. Kanser hücrelerinin hızla bölünmesi sırasında artan OS ile birlikte hücrelerde GSH sevilerinin de arttığı, aynı zamanda tedavi amaçlı kullanılan kemoterapötik ajanlara karşı da kanser hücrelerinin GSH düzeylerinin artırarak kendilerini OS'ye karşı korudukları bilinmektedir [202]. Sonuç olarak GSH seviyelerindeki artışın tümör büyümesi ve metastatik aktivite ile doğrudan ilişkili olduğu, ayrıca kanser hücrelerinin bu artış ile kemo/radyoterapiye direnç oluşturarak hücre sağkalımını artırdığı gözlemlenmektedir [203-205].

2.1.5.4. Glioma ve Reaktif Oksijen Türleri

Beyin dokusu, ağırlıklı olarak araşidonik asit ve dekosaheksaenoik asit olmak üzere birçok yağ asidine sahiptir ve lipit zarının ana yapısı olarak işlev görür. Enzimatik metabolizma proinflamatuvar medyatör üretebilir ve ROS üretimine yol açarak lipid peroksidasyon seviyesini artırabilir [206]. Gliomagenesis hala bilinmeyen, tedavi edilemez ve ölümcül bir süreçtir. Yeni ve etkili tedavi stratejileri gerekliliktir ve bu seçenekleri geliştirmek için gliomagenezin anlaşılması esastır. Deneysel kanıtlar, antioksidanların bazen dost, bazı durumlarda ise düşman olduklarını göstermektedir [187].

Çeşitli glioma türleri üzerinde antioksidanların etkilerini belirlemek için pek çok çalışma yapılmıştır. Güçlü bir antioksidan olan ve Brezilya fındığı, kabuklu-kabuksuz deniz ürünleri,

yağlı tohumlar, kabuklu yemişler ve karaciğer gibi organ etlerinde bulunan sodyum selenitin hem A172 insan glioblastoma hücreleri hem de C6 sıçan glioblastoma hücreleri üzerine etkileri araştırılan bir çalışmada, sodyum selenitin anti-proliferatif etkilere sahip olduğu ancak insan glioblastoma hücreleri üzerinde daha etkili olduğu belirtilmiştir [207]. Ayrıca selenit insan astrositom hücrelerinde epitelyal EGF reseptörü (EGFR) ekspresyonunu azaltarak anti-metastatik etkiler göstermektedir [208]. Çoklu doymamış yağ asitleri olan gama-linoleik asit (kenevir tohumu yağı, frenk çekirdeği üzümü yağı ve hodan yağında bulunur), eikosapentanoik asit ve dokosaheksaenoik asit (Omega 3 yağ asitleri) takviyelerinin sıçan astrositom hücrelerinde radyoaktivite tepkisini artırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [209]. Yumurta, süt, beyaz/kırmız et, soğan, sarımsak, karnabahar ve lahanada bulunan n-asetil-sistein ise U373 astrositom hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe etmekte ve H_2O_2'yi indüklemektedir [210]. Bir narenciye flavonoidi olan nobiletin'nin EPN, oligoastrositom, anaplastik astrositom ve GBM üzerine anti-invaziv ve anti-proliferatif etkilerinin incelendiği bir çalışmada matriks metalloproteinaz-2 ve -9 sekresyonlarını azalttığı gösterilmiştir [211]. Kuşkonmaz, vişne, çilek, kiraz, elma, domates gibi mor-kırmızı renkli meyve ve sebzelerde bolca bulunan quercetin ile yapılan çalışmalarda, quercetinin GBM hücre hatlarında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı, apoptozu tetiklediğini, başka bir çalışmada ise Akt/ERK/kaspaz-3 sinyal yolağını aktive ederek otofajiyi ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir [212, 213].

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda retinoidlerin (retinal, retinoik asit, retinil asetat ve retinil palmitat) ve karotenoidlerin (beta-karoten, likopen ve krosetin) C6 glioma hücreleri aşılanmış sıçanlarda tümör büyümesini inhibe ettiği [214], narigenin kullanımının lipid peroksidasyonunu azalttığı ve hücre proliferasyonunu modüle ettiği gösterilmiştir [215].

2.2. Fitoterapi

Şifalı bitkilerden elde edilen içerikler, yeni keşfedilen ilaçların ve kişisel sağlık ürünlerinin temel hammaddesini oluşturmaktadır [10]. Bitkilerin tıbbi amaçla kullanımı muhtemelen insanlık tarihinin başlangıcına kadar uzanmaktadır. Çoğu yüksek aktivite profilli ilaçların keşfi, çok sayıda aktif fitobileşiklerin bu bitkilerden ekstraksiyonu ve karakterizasyonu sonucu gerçekleşmiştir [11]. İnsan sağlığı ve beslenmesi açısından bitkilerdeki sekonder metabolitlerin kritik rolü artan çalışmalarla gösterilmektedir

Özellikle halk tarafından hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkiler üzerine yapılan araştırmalara olan ilgi artmıştır. Günümüzde kullanılan geleneksel halk ilaçlarına yıllardır insanlar üzerinde test edilerek ulaşılmıştır. Batıl inançlardan oluşanlara ek olarak, kanıtlanmış etkileri de vardır. [216].

Bitkiler canlı organizmalardır. Bu organizmanın yaşamsal faaliyetlerinin devamı için ihtiyacı olan madde ve enerjiyi üreten kimyasal reaksiyonlar metabolizmayı oluştururlar.

Bitkiler, primer ve sekonder metabolitler şeklinde sınıflandırılan oldukça çeşitli organik bileşikler sentezlerler. Bu bileşiklerden fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme fonksiyonlarında temel rol oynayan bileşikler primer metabolitlerdir. Bu bileşiklere örnek olarak fitosteroller, açil lipitler, nükleotidler, aminoasitler, karbonhidratlar ve proteinler verilebilir. Sekonder metabolitler ise, özellikle bazı bitkilerde oldukça yüksek konsantrasyonlarda depolanabilen diğer fitokimyasallardır. Yapılarında birçok farklılıklar bulunan sekonder metabolitler bitki aleminde kemotaksonomik olarak tanısal olabilecek şekilde dağılım gösterirler [217, 218]. Biyosentetik kökenleri dikkate alındığında sekonder metabolitler, fenolikler, terpenoidler, azotlu alkalotidler ve kükürtlü bileşikler şeklinde dört ana gruba ayrılırlar.

Son 50 yılda kanser tedavisinde kayda değer ilerlemeler başarılmış olsa da bu hastalık, günümüzde halen en önemli tıbbi sorunlardan biri olarak yerini korumaktadır. Bu nedenle yeni terapötik çözümlerin geliştirilmesi konusunda büyük çaba harcanmaktadır [219]. Bu açıdan kanser tedavisinde bitkisel kaynaklı bileşikler vazgeçilmez bir unsur olarak yerini almaktadır. Onaylanmış kanser ilaçlarının neredeyse % 75'i bitkisel kaynaklı ajanlardan fikir alınarak geliştirilmiştir [12]. Tüm kanser evrelerinde tedaviye katkı sağlamaları, non-toksik ve çok hedefli olmaları, ayrıca çoğu kanser tedavisinde kullanılan pek çok ilaç ile sinerjik etki göstermeleri bitkisel terapötikleri oldukça önemli bir konuma taşımaktadır [13].

2.2.1. Kanser ve Fitoterapi

Son dönemlerde bitkiler üzerine tedaviye yönelik yapılan (fitoterapik) araştırmaların sayısında artış gözlemlenmektedir. İçeriklerinde barındırdıkları flovonoid, terpenoid, steroid, glikozit ve alkaloid çeşitleri gibi önemli sekonder metabolitler sebebiyle bitkilerin, tarih boyunca insanların beslenmesi ve geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılmasına ek olarak gün geçtikçe modern tıpta pek çok hastalığın tedavisinde veya profilaktik tıpta kullanım alanları artmaktadır. Bitkilerin fitofarmasötik olarak da kullanımına imkan sağlayan özütlerinde barındırdıkları zengin bileşenler ve bunların aktif bileşenleri farklı gen, protein, lipid ve sinyal yolaklarının reseptörlerini hedefleyebildiğinden kanser, immün sistem ve kardiyovasküler hastalıklarının tedavisinde de kullanıldığı birçok yayın ile gösterilmiştir [220-224]. Hartwell yaptığı çalışmalarda kansere karşı kullanılan 3000'den fazla bitki çeşidi olduğunu bildirmektedir [225].

Günümüzde kemoterapötik olarak kullanılan vinka alkaloidleri olan vinblastin, vinkristin ve vindesine, epipodofillotoksinler olan etoposide ve teniposide, taksanlar olan paklitaksel ve dosetaksel, komptotesin türevi olan kamptotesin ve ektinotekin ilaçlarının bitkilerden izole edilen anti-kanser ajanlarından elde edildiği bilinmektedir [226].

2.2.2. Asteraceae Familyası

Asteraceae familyası tür ve cins açısından Türkiye florasının en zengin familyasıdır. Ülkemizde 140 cins ve 1195 türü tespit edilmiştir. Aynı zamanda toplam 446 endemik türü ile endemik tür içeriği (% 37,3 oranında) açısından da en zengin familyalardandır [14].

2.2.2.1. *Achillea biebersteinii* Afan.

AB odunsu olmayan, çok yıllık, aromatik bir bitkidir. Boyu 0,3 ila 0,6 m arasındadır, gövdesi tüylüdür ve çiçeklenme dönemi Nisan-Mayıs aylarıdır. AB yöresel olarak Sarıçiçek ve Civanperçemi gibi isimlerle de adlandırılır. Bu bitkinin yaprakları 10 cm uzunluğa kadar olup, tüylü bir yapıyla dar parçalara ayrılmıştır. Başlar, yoğun, düz, tepelidir ve çiçeklenme sarı kümelenmeler olarak görünür [227].

AB'nin taksonomisi şu şekildedir

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Asteridae

Takım: Asterales

Aile: Asteraceae

Cins: Achillea

Tür: *Achillea biebersteinii* Afan.

Bulgaristan, Orta Asya ve Orta Doğu'da yayılış gösteren AB bitkisi Anadolu'da da geniş yayılım sergiler. 350-3450 m. rakım aralıklarında, konifer ormanlarında, step, kurak çayırlık, kayalık yamaç ve nadas tarlalarda yetişmektedir [228].

2.2.2.1.1. *Achillea biebersteinii* İçeriği

İçerik açısından farmakolojik olarak oldukça zengin olan bitkinin uçucu yağlarının, 1,8-sineol (%16,5), kafur (% 11,7), heksadekanoik asit (% 11,2), p-Simen (% 18,6), β-ödesmol (% 10,1) içeriğe sahip olduğu bildirilmiştir [229].

Pek çok çalışmada bitkinin içeriği incelenerek rapor edilmiştir.

AB'den izole edilen seskiterpen laktonlar, diterpenler ve tripenler olarak 3β-klora-1α, 2α-epoksi-4α, 10α-dihidroksi-5αH, 6βH, 8α, 7αH-guaya-11(13)-en-12, 6α-olit [230] elde edilen flavonoidler 6-hidroksikemferol-3,6-dimetil eter, Kaseidin, Krizosplenetin, Krizosplenol D, Penduletin, Sentaureidin ve Aksillarin olarak tespit edilmiştir [230-233].

Hormonzi ve arkadaşlarının yaptığı fitokimyasal taramanın ardından AB ekstresinin hidroksikamptotesin açısından zengin olduğu bulunmuştur [233].

Yener ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada AB'nin içerik sonuçlarına bakıldığında, 18 uçucu yağ bileşeni bulunmuş ve bu türün üç ana bileşeni piperiton, p-Simen ve 2-carene olarak tanımlanmıştır [234].

Azizi ve arkadaşlarının çalışmasında bu türün p-Simen ve okaliptol içeriklerinin mevsimsel olarak değiştiği tespit edilmiştir [235]. Ayrıca, aynı türün yakın yöreden ve farklı yıllarda toplanan örneklerinde yapılan bir çalışmada p-Simen, 1,8-sineol ve kafur ana bileşenler olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak özellikle bu türün ana bileşenlerinin toprak yapısı ve iklim koşulları gibi nedenlerle değiştiği söylenebilir [229].

Yukardaki araştırmalarda belirtilen içeriklere ek olarak bitkinin farklı bölgelerinin içerikleri konusunda da pek çok araştırma yapılmıştır.

AB örneklerinin toprak üstü kısımları (TÜK) kullanılarak elde edilen uçucu yağlarda yapılan Gaz Kromotografi-Kütle Spektrometresi analizleri sonucunda, Ağrı Dağı'nda toplanan örneklerden 70 bileşik izole edilmiştir. Majör bileşenler olarak 1,8-sineol (% 30,6), piperiton (% 28,9) ve kafur (% 11,7) tespit edilmiştir. Aynı ekibin Dumluca-Mardin'den topladıkları örneklerden ise 61 bileşik izole edilerek majör bileşenler olarak aynı bileşikler farklı oranlarda (1,8-sineol-% 31,1, kafur-% 14,4, α-tuyon-% 12,9) tespit edilmiştir [236]. Erzurum'da toplanan örneklerde piperiton, kamfor ve 1,8-sineol (ökaliptol) olduğu görülmüştür [15]. Örneklerin Batı ve Güneybatı Anadolu'dan toplandığı belirtilen bir çalışmada majör bileşenler olarak 1,8-sineol, askaridol, kamfor ve izoaskaridol belirlendiği rapor edilmiştir [237]. Başka bir çalışmada elde edilen n-hekzan ekstrelerinde ise % 24-1,8 sineol ve % 28-kafur elde edildiği bildirilmiştir. Etil-asetat ekstresi içeriğinin analiz edildiği bir çalışmada germakranolit (mikrantin ve sintenin) ve gayanolit (4β, 10α-dihidroksi-5β, 7β, 8βH-gaya-1,11 (13)dien-12,8α-olit) yapılarında seskiterpen laktonlar izole edildiği bildirilmiştir [238].

AB bitkisinin yaprakları kullanılarak elde edilen uçucu yağ ile yapılan analizlerde, İran'da toplandığı belirtilen örneklerden 39 bileşik tespit edilmiş ve kafur -% 23, α-terpinol-% 14 ve spatulenol-% 12 ana bileşenler olarak belirtilmiştir [239].

Türkiye'nin farklı bölgelerinden (Konya, Isparta, Ankara) toplanan beş farklı AB örneği kullanılarak elde edilen uçucu yağlarda analiz yapıldığı belirtilen bir çalışmada, tüm örneklerde ana bileşen olarak 1,8-sineol, kamfor ve p-Simen tespit edilmiş, iki örnekte farklı olarak piperiton ve askaridol'ün yüksek bulunduğu belirtilmiştir [240].

Mirahmadi ve arkadaşları vejetatif, tomurcuklanma, tamamen çiçeklenme ve meyve verme olmak üzere farklı fenolojik evrelerde topladıkları AB TÜK'den su distilasyonu ile uçucu yağlar elde etmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda her evrede yoğun oksijenli monoterpen türevleri olduğunu, vejetatif evrede limonen, 4α-7β-7α-nepetalakton, p-Simen ve 1,8-sineol; tomurcuklanma evresinde limonen, 1,8-sineol, 4aα-7β-7aα-nepetalakton; meyve verme

evresinde de γ-terpinen, p-simen ve cis-krisantenil asetat bileşiklerinin yüksek miktarlarda belirlendiğini belirtmişlerdir [241].

Bitkinin sulu ekstreleri üzerine yapılan araştırmalarda ise ortak sonuç olarak yaklaşık oranlarda polifenolik içerikler bildirilmiştir. Fenolik içerik standart olarak gallik asit (galatamin) eşdeğeri cinsinden bildirilmektedir. Bu çalışmalarda AB sulu ekstresinin gallik asite eşdeğer ya da gallik asitten yüksek bulunduğu bildirilmiştir [242-245]. Fenolik içerik olarak da kafeik asit, ferulik asit, luteolin, kuersetin, mirisetin, kaempferol, rutin ve kuersetin 3-β-D-glukozid bileşiklerinin bulunduğu rapor edilmiştir [245, 246].

2.2.2.1.1.1. *Achillea biebersteinii* Fenolik İçeriklerinin Terapötik Etkileri

Yüksek bitkiler, fotosentez sürecinde oluşan serbest radikallerin saldırılarına ve doku hasarlarına karşı savunma sağlayan çok çeşitli fenolik bileşikler biriktirir ve sentezler. İhmal edilebilir besin değerlerine sahip olsalar da biyolojik olarak aktif bileşikler olarak kabul edilirler. Fenolik bileşikler, enzim inhibisyonu, protein fosforilasyonu ve gen ekspresyonunun değiştirilmesi gibi farklı seviyelerde hücresel mekanizmaları düzenleyerek hastalıklara karşı savunma sağlar. Fenolikler, genellikle meyvelerde, tahıllarda, baklagillerde ve sebzelerde bulunan temel bileşenlerdir. Bitkilerde, büyüme, pigmentasyon, üreme ve ayrıca patojenlere karşı direnç dahil olmak üzere çok çeşitli işlemlerde rol oynarlar. Fenolik bileşiklerin anti-kanser etkisi için gerekli olan yapısal motifleri aromatik halka, doymamış, ornatık zincirler ve serbest hidroksil grupları içerir. Fenolikler, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın tedavisinde ve yönetiminde tıbbi bileşikler olarak etkinlikleri nedeniyle araştırmalara konu olmaktadır [247]

AB bitkisinin sulu ekstresi üzerine yapılan içerik çalışmalarında genel olarak fenolik bileşikler bildirilmiştir. Literatürde kafeik asit, ferulik asit, luteolin, kuersetin, mirisetin, kempferol, rutin ve kuersetin 3-β-D-glukozid olarak yer alan bu içeriklerin [245, 246] aşağıda da açıklanacağı gibi hem içeriğinde bulunduğu diğer bitkiler ile hem de sadece bileşik ile pek çok kanser çeşidi üzerine yapılan çalışmalarla da anti-kanserojik özellikleri kanıtlanmıştır.

2.2.2.1.1.2. Luteolin

Çin'de kullanılan ilaçların birçoğunun aktif bileşenlerden biri, luteolin olarak da bilinen 3',4',5,7-tetrahidroksiflavondur [248]. Bileşik havuç, lahana, kekik ve şizonepeta, kereviz, yeşilbiber ve perilla yapraklarında yaygın olarak bulunur [249]. Luteolinin nöroprotektif, kardiyoprotektif, anti-inflamatuar, anti-diyabetik, anti-mikrobiyal, anti-oksidan ve pro-oksidan etkiler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca kan-beyin bariyerini geçme yeteneği lüteolini glioma dahil olmak üzere MSS hastalıkları için potansiyel bir ilaç adayı konumuna getirmektedir [248-252].

Pek çok kanser tipi üzerine anti-kanser etkisi gösterilmiş olan luteolinin [248] gliomalar üzerine de etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda luteolinin genel olarak glioma hücre göçünü ve istilasını inhibe ettiği ve anjiyojenik ve hayatta kalma yollarını bloke ettiği, ER stresi ve mitokondriyal disfonksiyonu indükleyerek glioma apoptozunu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca EGF sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonu azalttığı bildirilmiştir. Luteolinin U87 glioma hücrelerinde mikro RNA (miRNA) aracılı anti-kanser aktivasyonu bulunmaktadır [248]. Sıçan C6 glioma hücrelerinde luteolin ile tedavinin doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu, aşırı inflamatuar sitokin salınımını ve ER stresini inhibe ettiği gösterilmiştir [253]. Başka bir çalışmada luteolinin mitojenle etkinleşen protein kinaz (MAPK) yoluyla hücresel apoptozu indüklediği gösterilmiştir [252]. Hem *in-vitro* hem de *in-vivo* olarak luteolin yüklü misellerin glioma tedavisindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, serbest luteolinin veya luteolin yüklü misellerin hiçbir belirgin yan etki göstermeden apoptozu indüklediği ve kemoprevensiyon için mükemmel bir intravenöz enjekte edilebilir formülasyon olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [249]. Luteolinin miRNA üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada, miRNA-7-1-3p ekspresyonunu düzenleyerek GBM'de apoptozu indüklediği, hepatomdaflotilin 1'i hedefleyerek miRNA-6809-5p'nin luteolin kaynaklı anti-kanser etkilere aracılık ettiği keşfedilmiştir. U251 glioma hücre hatları üzerine yapılan bir çalışmada ise luteolinin glioma hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, hücresel apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada ölüm reseptörü ve MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonu ve miRNA-124-3P yukarı regülasyonu yoluyla hücresel otofajiyi de teşvik ettiği belirtilmiştir [248].

2.2.2.1.1.3. Kuersetin

Kuersetin (3,3',4',5,7- pentahidroksiflavon) elma, kırmızı üzüm, soğan, ahududu, bal, kiraz, narenciyeler ve yeşil yapraklı sebzelerde bol miktarda bulunan bir flavonoid bileşiktir [254, 255]. Kuersetin, anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-viral ve anti-oksidasyon aktiviteye ve düşük sitotoksisiteye sahiptir [251, 254-256]. Kuersetinin çeşitli kanser tiplerinde hücre döngüsü tutuklanmasını, otofajiyi ve apoptozu indüklediği rapor edilmektedir [256].

Pek çok kanser tipi üzerine anti-kanser etkisi gösterilmiş olan kuersetinin [254] gliomalar üzerine de etkileri araştırılmıştır. GBM üzerine yapılan bir tedavi çalışmasında kuersetin kullanılarak güvenli ve yüksek verimli bir terapötik ilaç geliştirilebileceği bildirilmiştir [257]. U251, A172, LN229 ve U373 malign glioma hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada kuersetinin apoptoz protein survivin inhibitörünün baskılanması yoluyla glioma hücrelerini ölüm reseptörü aracılı apoptoza duyarlı hale getirdiği rapor edilmiştir [258]. Kuersetinin hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemek ve bunun insan glioma hücrelerinde altta yatan mekanizmasını belirlemek için yapılan bir çalışmada, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), Akt ve survivinin aşağı regülasyonunu içeren kaspaz bağımlı mekanizmalar yoluyla

insan glioma hücresini ölüme götürdüğü bildirilmiştir [259]. Kuersetin kaynaklı glioma hücre ölümünün altında yatan mekanizmayı araştırmak için, kuersetinin ERK ve Akt aktivasyonu üzerindeki etkisi incelenen bir çalışmada, ERK ve Akt'nin aşağı regülasyonunun, kuersetin kaynaklı glioma hücre ölümünde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir [259]. Başka bir çalışmada kuersetinin glioma hücrelerinde mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kuersetinin mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir azalmaya yol açtığı tespit edilmiş ve bunun mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonunun indüklendiğini gösterdiği belirtilmiştir [259]. Kuersetin tarafından indüklenen büyüme inhibisyonu ve hücre ölümü, çeşitli kanser hücrelerinde kaspaz aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu bilgiyle uyumlu olarak yapılan bir çalışmada kaspaza bağımlı hücre ölümleri gözlemlenmiştir [259]. İnhibitör apoptoz proteinleri olan survivin ve apoptoz proteininin X'e bağlı inhibitörü (XIAP)ekspresyonunun, gliomalı hastalar için olumsuz klinik prognozun bir göstergesi olduğu iyi bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda XIAP ve survivinin A172 hücrelerinde güçlü bir şekilde ifade edildiği ve survivin ifadesinin (XIAP'nin değil) kuersetin tarafından azaltıldığını gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarla araştırmacılar kuersetinin ERK, Akt ve survivinin aşağı regülasyonunu içeren kaspaz bağımlı mekanizmalar yoluyla insan glioma hücresi ölümüyle sonuçlandığını belirtmişlerdir [259]. U87 GBM hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise kuersetinin kaspaz-3 aracılı apoptozu teşvik ettiği rapor edilmiştir [260]. U87 GBM ve U251 glioma hücre dizilerinin farklı konsantrasyonlarda kuersetin ile tedavisinin yapıldığı bir çalışmanın sonucu olarak kuersetinin hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği ve glioma hücre göçünü önemli bir şekilde azalttığı bulunmuştur. Ek olarak tedaviyi takiben fosforile-Akt, fosforile-ERK, Bcl-2, matris metalloproteinaz (MMP) 9 ve fibronektin protein seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır. Bu nedenle, kuersetinin retiküler aktive sistemi (RAS)/MAPK/ERK ve PI3K/Akt sinyal yollarını baskılayarak glioma hücrelerinin canlılığını ve göçünü engelleyebileceği ve yaşlanmayı ve apoptozu teşvik edebileceği rapor edilmiştir [261].

2.2.2.1.1.4. Kafeik Asit

En yaygın fenolik asitlerden biri olan kafeik asit fenetil ester (2-feniletil (2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)) akrilat, doğal bir bileşiktir ve sıklıkla kinik asit veya sakkaritlerle basit esterler olarak insan tüketimi için meyvelerde, tahıllarda, propoliste, çayda, kahvede, yağda, baharatlarda, sebzelerde ve diyet takviyelerinde bulunur. [247, 251]. Anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanser biyoaktiviteleri ve immünomodülatör ve nöroprotektif aktiviteleri nedeniyle oral olarak biyoyararlıdır. Birçok insan kanserine karşı anti-kanser etkileri vardır. Mükemmel bir anti-oksidan ve anti-inflamatuar ajandır. Kafeik asit, OS'yi azaltmanın tıbbi özelliklerini sergiler ve serbest radikallerin deoksiribonükleik asit (DNA)'e verdiği zararı önemli ölçüde engeller [247].

Kafeik asit kanserin ilerlemesi sırasında histon demetilaz onkoprotein genini inhibe ederek kanser hücresi büyümesini önlemesiyle bilinir. Kalsiyum akışını ve tau fosforilasyonunu bloke ederek amiloid-β aracılı nörotoksisiteye karşı nöroprotektif etkiler ortaya çıkarır. Nörodejenerasyon ve beyin hasarının önlenmesinde de aktif rol oynar [247].

Pek çok kanser tipi üzerine anti-kanser etkisi gösterilmiş olan kafeik asidin [247] gliomalar üzerine de etkileri içeriğinde kafeik asit bulunan bitkiler kullanılarak araştırılmıştır. *Leonurus sibiricus* ekstreleri ile glioma tedavisi yapılan bir çalışmada tedaviyi takiben apoptoz indüksiyonu incelenmiştir. Tedavi sonrasında önemli hücre büyümesi inhibisyonu, S- ve G2/M-fazı hücre döngüsü tutuklanması ve bir dozda apoptoz sonuçları elde edilmiştir [262]. *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae), köklerinin glioma kanser hücreleri üzerindeki anti-kanser potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada bitki ekstresinin pro-apoptotik B-hücreli lenfoma ilişkili X proteini (BAX) proteinini yukarı-regüle ettiği ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinini aşağı-regüle ettiği, böylece BAX/Bcl-2 protein seviyelerinin oranlarını arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca, ekstre ile tedaviden sonra glioma hücrelerinde p53 protein seviyesinde bir artış gözlenmiştir. Sonuç olarak hücre büyümesini inhibe ettiği ve doza bağlı bir şekilde apoptozu indüklediği rapor edilmiştir [263]. Safran veya Crocussativus sulu ekstresinin U-87 hücre hattına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bitki ekstresinin glioma hücrelerine karşı sitotoksik olduğu bulunmuştur [264]. *Leonurus sibiricus* ekstresinin grade IV insan glioma hücreleri ve U87MG hücre hattı üzerindeki anti-kanser potansiyelinin belirlenmesi üzerine yapılan bir araştırmada, test edilen ekstrelerin neden olduğu anti-kanser etki, DNA hasarı, poli ADP riboz polimeraz bölünmesi/artmış histon seviyeleri ve mRNA seviyelerinin Plant homeodomain ve RING Parmak İçeren Ubiquitin Benzeri Domain-1 (UHRF1)/DNA metilaz 1 (DNMT1) aşağı regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir [265]. Yapılan başka bir çalışmada glioma hücrelerinde Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT3)'nü bloke etmenin terapötik potansiyelini araştırmak için bir dizi kafeik asit türevi kullanılmıştır. Sonuç olarak kafeik asit türevlerinin janus kinaz (JAK)/STAT3 sinyalinin inhibisyonunda önemli ölçüde etkili olduğu, fosforlanmış JAK1, JAK2 ve STAT3'ün seviyesini azalttığı ve bilinen STAT3 hedeflerinin ekspresyonunu aşağı doğru düzenlediği bulunmuştur. Tedavi edilen hücrelerde, fokal adezyon kinaz fosforilasyonu ve aktivitesinde azalma ile ilişkili hücrelerin hızlı ayrılması ve yuvarlanması, ardından fosforlanmış p38, c-jun N-terminal kinaz (JNK) ve ERK1/2 seviyelerinin yukarı regülasyonu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak kafeik asit türevlerinin glioma hücrelerine karşı önemli sitotoksik potansiyel sergilediği rapor edilmiştir [266]. Kafeik asit türevlerinin kullanıldığı başka bir çalışmanın sonucu olarak ise U87 ve hastadan türetilmiş GBM tümör modelinin tersine çevrilmesine ilişkin floresan moleküler tomografi verileri yayınlanmıştır. Çalışmada kafeik asit türevleri ile tedaviden sonra sağkalımın önemli ölçüde arttığı, tümör büyümesinin azaldığı belirtilmiştir. Kafeik asit tedavisi uygulaması, tümör hipoksisi,

anjiyogenez, VEGF, IL-17A ve hücre proliferasyonunda önemli azalmalara neden olmuş ve tedavi edilmemiş hayvanlarla karşılaştırıldığında BAX, kaspaz ve Fas artışı tespit edilmiştir. Sonuç olarak kafeik asit türevlerinin gliomalarının tedavisi için yeni bir IL-17A inhibitörü olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir [267].

2.2.2.1.1.5. Ferulik Asit

Ferulik asit ([E]-3-[4-hidroksi-3-metoksi-fenil] prop-2-enoik asit), bitki dokularında yaygın olarak bulunan, kanser de dahil olmak üzere OS ile ilgili bozukluklara karşı faydalı etkileri olduğu iddia edilen doğal olarak oluşan fenolik bir asittir [268, 269]. Ferulik asit vücuda daha kolay emilir ve diğer fenolik asitlere göre kanda daha uzun süre kalır. Bileşik üstün bir antioksidan olarak kabul edilir. Düşük toksisiteye sahiptir ve anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-kanser (örneğin akciğer, meme, kolon ve cilt kanseri), anti-aritmik ve anti-trombotik aktivite dahil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Ayrıca anti-diyabetik etkiler ve immünostimülan özellikler göstermekle birlikte sinir hücresi hasarını azalttığı ve hasarlı hücrelerin onarılmasına yardımcı olduğu da bilinmektedir [269].

Ferulik asidin anti-oksidan aktivitesinin mekanizması, radikal molekülün anti-oksidan molekülü ile reaksiyona girmesiyle kararlı fenoksil radikalleri oluşturma yeteneğidir. Bu yeteneği, serbest radikallerin oluşumuna yol açan karmaşık bir reaksiyon zincirini başlatmayı zorlaştırır. Bu bileşik ayrıca atomları doğrudan radikallere vererek hidrojen donörü olarak da işlev görebilir. Bu durum, hücre zarı lipid asitlerinin istenmeyen otoksidasyon süreçlerinden korunması için özellikle önemlidir. Ayrıca ferulik asitler ve ilgili bileşikleri demir ve bakır gibi geçiş metallerini bağlayabilir. Böylece hücre zarı peroksidasyonuna yol açan toksik hidroksil radikallerinin oluşumunu önler [269].

Pek çok kanser tipi üzerine anti-kanser etkisi gösterilmiş olan ferulik asidin [270] gliomalar üzerine de etkileri serbest ferulik asit ve içeriğinde ferulik asit bulunan bitkiler kullanılarak araştırılmıştır. Kanser önleyici etkiye sahip doğal bir antioksidan olan ferulik asidin insan GBM hücreleri üzerindeki etkisinin moleküler ve gecikmeli lüminesans analizleri ile değerlendirildiği bir çalışmada, ferulik asidin apoptotik yolak aktivasyonu ile birlikte c-Myc ve Bcl-2 ekspresyon seviyelerinde önemli bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir [271]. Kanser önleyici etkisi yüksek olan ve Sibirya, Çin, Kore, Japonya ve Vietnam'da yetişen *Leonurus sibiricus* şifalı bitkisi ile malign glioma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışma, ekstre tedavisinin önemli hücre büyümesi inhibisyonu, S- ve G2/M-fazı hücre döngüsü durması ve apoptoz ile sonuçlandığını göstermektedir [262]. Yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılmakta olan *Menyanthes trifoliata* L. bitkisinin GBM hücrelerine karşı biyolojik etkilerinin çalışıldığı bir araştırmada derece IV glioma hücrelerine karşı sitotoksik etkiler gösterdiği, ancak normal insan astrositlerine karşı etkisinin olmadığı bulunmuştur. Bitki ekstresinin aracılık ettiği insan

dereceli IV glioma hücrelerinin büyümesinin inhibisyonu, apoptoz ve G2/M-fazı hücre döngüsü durması ve pro- ve anti-apoptotik genlerin (BAX, Bcl-2, Kaspaz-3 ve TP53) değişmiş ekspresyonu ve azalmış mitokondriyal membran potansiyeli ile ilişkili görünmektedir. Sonuç olarak bitki ekstresinin insan GBM hücre hatları için bir anti-kanser ajanı olarak umut verici sonuçlar verdiği rapor edilmiştir [270]. ER, protein sentezi, protein katlanması, kalsiyum depolanması ve kalsiyum sinyali için temel bir bölgedir. ER stresinin bir indükleyicisi olan Thapsigargin, ER ile ilişkili Ca^{+2}-ATPaz'ı inhibe eder ve Ca^{+2} homeostazını bozar. *Scrophularia ningpoensis* ekstrelerinin Thapsigargin ile uyarılmış U-87MG hücreleri üzerindeki koruyucu mekanizmalarını değerlendirmek için yapılmış olan bir çalışmada, ekstre uygulamasının önemli iyileşme etkileri gösterdiği belirlenmiştir. Hücre döngüsü, proliferasyon, protein katlanması ve anti-apoptoz ile ilgili genlerin yukarı regüle edildiği, apoptoz, MAPK sinyal yolu ve mitokondri ile ilişkili gen ifadelerinde önemli düşüşler belirlendiği, sonuç olarak da ekstrenin nörodejeneratif hastalıklarda etkili olabileceği bildirilmiştir [272]. İnsan GBM hücre hattı olan LN-229'un yüzey yük yoğunluğu üzerindeki ferulik asidin etkisinin, elektroforetik ışık saçma tekniği ve 24-48 saatlik uygulamalar sonunda metabolik aktivitenin 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) analizi kullanılarak incelendiği bir çalışmada, LN-229 hücrelerinin hücre yaşayabilirliğinin azaldığı belirtilmiştir. Yapılan analizler yüksek pH değerlerinde membranların negatif yükünün azaldığını ve düşük pH değerlerinde membranların pozitif yükünün arttığını göstermiştir. [268].

2.2.2.1.1.6 Kaempferol

Bitkilerde en yaygın flavonoid bileşiklerinden biri, kaempferol (3,4',5,7-tetrahidroksiflavon) olarak bilinen flavonol ailesinden bir tetrahidroksiflavondur. Pek çok bitkide bulunur, yenilebilirdir veya tıbbi açıdan önemlidir. Yapılan epidemiyolojik araştırmalar, kaempferolün çeşitli kardiyovasküler, kanser, inflamatuar, nörodejeneratif ve obez hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Kaempferolün kemopreventif ve terapötik aktivitelerini literatürde yer alan pek çok yayın ile tanımlanmıştır [273].

2.2.2.1.1.7. Myricetin

Myricetin (3, 5, 7, 3', 4', 5'-hekzahidroksiflavonol, MYR) açık sarı kristallerden oluşan ve metanol, asetonitril, etanol ve diğer polar solventlerde kolayca çözünen bir polihidroksiflavonol bileşiğidir. Myricaceae, Vitaceae, Leguminosae, Primulaceae, Rosaceae, Ericaceae gibi birçok familyaya ait doğal bitkilerde yaygın olarak bulunur. Meyvelerde, sebzelerde, balda, kırmızı şarapta, çayda ve diğer günlük gıdalarda yaygın olarak bulunmasının yanı sıra birçok gıdada aktif madde ve katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır [274].

Artmış proliferasyon, kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir, bu nedenle, tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu, kanser araştırmalarında oldukça popülerdir. Raporlara

göre, myricetin, çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmasını çoklu sinyal yolları yoluyla inhibe eder [274].

Pek çok kanser tipi üzerine anti-kanser etkisi gösterilmiş olan myricetinin [274] glioma üzerine etkileri de araştırmalara konu olmuştur. Bcl-2 protein ailesi, sitokrom C'nin salınmasını içeren apoptoz sürecinde anahtar rol oynayan proapoptotik proteinleri (BAX ve Bad) ve anti-apoptotik proteinleri (Bcl-2 ve Bcl-XL) içerir. Yapılan bir çalışmada myricetinin, BAX ve Bad ekspresyonunun yukarı regülasyonu ve Bcl-2 ve Bcl-XL ekspresyonunun aşağı regülasyonu yoluyla insan glioma U251 hücrelerinde mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu indüklediği rapor edilmiştir [274].

2.2.2.1.1.8. Rutin

P vitamini olarak da bilinen rutin çarkıfelek, soğan portakalı, yeşil çay, elma gibi bitkilerde ve özellikle Tatar karabuğdayında bol miktarda bulunan önemli bir flavonoiddir. Yapılan araştırmalar ile rutinin anti-oksidan, anti-tümör, anti-diyabetik ve anti-inflamatuar etkileri gösterilmiştir. Rutinin hem *in vitro* hem de *in vivo* anti-anjiyojenik ve anti-proliferatif aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur. Rutin, geniş kapsamlı farmakolojik özellikleri nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenen doğal bir bileşendir [275-277]

Rutinin pek çok kanser tipi üzerine anti-kanser etkilerinin rapor edildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır [275, 278]. Diğer kanser tipleri dışında gliomalar üzerine de etkileri popüler bir araştırma konusudur. İnsan mikroglial hücre hatları üzerine yapılan bir araştırmada MTT analizleri ile rutinin maksimum sitotoksisiteyi indüklediği gösterilmiştir. Rutin tarafından indüklenen hücre ölümü, P53 yukarı regülasyonu yoluyla apoptozdan kaynaklanmaktadır. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama analizi ile rutinin, nükleer yoğunlaşmayı, parçalanmayı ve zardan taşmayı indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca ROS seviyelerini arttırdığı ve mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına neden olarak insan mikroglial hücrelerinde içsel apoptotik yolu aktive ettiği bildirilmiştir [276]. GBM'de kemoterapötik bir ajan olan Temozolomide ile kombinasyon halinde kullanılan rutinin etkinliğinin ve altında yatan mekanizmanın araştırıldığı bir çalışmada tek başına rutinin genel olarak düşük sitotoksik etkiye sahip olduğunu, ancak Temozolomide'nin etkinliğini doza bağlı bir şekilde arttırdığını gösterilmiştir. Kombine Temozolomide/rutin tedavisi alan farelerde tümör hacimlerinin, tek başına Temozolomide veya rutin tedavisine kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, immünoblotlama analizi ile Temozolomide'nin, rutin tarafından bloke edilen koruyucu yanıt otofajisini indüklemek için JNK'yi aktive ettiği, böylece otofajinin azalmasına ve apoptozun artmasına neden olarak, rutinin GBM'de JNK aracılı otofajiyi inhibe ederek hem *in vitro* hem de *in vivo* Temozolomide etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir [277]. İnsan glioma hücreleri üzerine yapılan başka bir çalışmada rutinin glioma hücre proliferasyonunu ve canlılığını azalttığı, bunun

da ERK1/2 fosforilasyon seviyelerinin düşmesine ve hücre döngüsünün G2-fazında hücre akümülasyonuna yol açtığı belirtilmiştir. Sonuç olarak kültürlenmiş insan glioblastoma hücrelerinde farklılaşmayı ve apoptozu indükleme kapasitesi nedeniyle rutinin, malign glioma tedavisi için potansiyel bir aday olarak düşünülebileceği rapor edilmiştir [279].

2.2.2.1.2. *Achillea biebersteinii* ve Geleneksel Tıp

AB Asteraceae ailesinin bir üyesidir ve birçok ülkede yüzlerce yıldır geleneksel tıpta kullanılmaktadır [15]. Yara iyileştirme [280], inflamasyon [281] ve peritoneal ağrıya karşı kullanılması [282] gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir.

Yapılan araştırmalarda bitkinin, Anadolu'nun çeşitli yerlerinde pelvik kanlanma artırıcı, astrenjan, diüretik, epitelizan/skatrizan, kardiyak kontraktilite artırıcı, gastro intestinal motilite uyarıcı, inflamatuar süreç tamamlayıcı, ekspektoran, flutans ve kolik önleyici olarak kullanılmakta olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, kadın infertilitesi, hepatit, viral üst solunum yolu enfeksiyonları, jinekoloji patolojileri ve astma tedavisinde kullanılmasının yanında ödem ve cilt hiperemisi giderici olarak da kullanılmaktadır [283]. Diğer taraftan, İran'ın kuzeyinde hafif yanık, dispepsi, kardiyak kapasite bozukluğu ve paraziter enfeksiyonlara karşı da iyileştirici olarak tercih edilmektedir [284]. Ülkemizde ise, Isparta'da peptik ulkusa, abdominal ağrıya, viral üst solunum yolu enfeksiyonlarına karşı iyileştirici ve çocuklar için karminatif [285], Orta Anadolu'da abdominal ağrıya karşı iyileştirici ve epitelizan/skatrizan [227], Doğu Anadolu'da epitelizan/skatrizan (Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır) [286], kardiyak kontraktilite artırıcı, pelvik kanlanma artırıcı, astrenjan, gastrointestinal motilite düzenleyici, ekspektoran ve karminatif olarak kullanılmanın yanı sıra astmaya, viral üst solunum yolu enfeksiyonlarına, jinekolojik patolojilere karşı da iyileştirici olarak kullanılmaktadır [283]. Malatya'da romatizmal hastalıklara, sinüzitler ve diş ile ilgili patolojilere karşı iyileştirici [287], Bingöl'de romatizmal hastalıklara, hepatitlere, sinüzitlere, diş hastalıklarına ve dismenoreye karşı iyileştirici [288], Kayseri'de epitelizan/skatrizan ve abdominal ağrıya karşı iyileştirici [227], Kahramanmaraş'ta abdominal ağrıya ve otaljiye karşı iyileştirici [289] Kars'ta inflamatuar süreç tamamlayıcı ve hepatitlere karşı iyileştirici [286] olarak kullanılmaktadır. İlginç bir şekilde, Kuzey İran'da anti-helmintik ve anti-hipertemik olarak [284], Taşkent, Özbekistan, Semerkant'ta ise sefalji giderici ve anti-diyareik [290] olarak geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanıldığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan yöresel sohbetlerde Karaman bölgesinde bitkinin kansere, dismenoreye ve otaljiye karşı iyileştirici olarak kullanılmasının yanı sıra epitelizan/skatrizan olarak da kullanıldığı bilgisine ulaşılmıştır.

2.2.2.1.3. *Achillea biebersteinii* ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar

AB ekstresi ile bitkinin tamamı, çiçekleri ya da TÜK (gövde, yapraklar, çiçekler) ile pek çok bilimsel çalışma gerçekleştirilerek literatüre kazandırılmıştır. Yapılan araştırmaların büyük

çoğunluğu *Achillea millefolium* taksonomisi konusunda olsa da son yıllarda yayınlanan çalışmalar pek çok farklı türü içermektedir. Bu yayınların büyük kısmında bitkilerin halk tıbbında kullanım amaçlarını destekler sonuçlar bulunmuştur. Bir kısmında ise bitkilerin barındırdığı bileşiklerle bağlantılı yeni farmakolojik gelişmelerden bahsedilmektedir. Genel olarak AB ile yapılan bilimsel çalışmalarda hücre migrasyonunu azaltabildiği gösterilmiştir [233]. Yapılan bir çalışmada, AB TÜK kullanılarak elde edilen n-hekzan, etilasetat ve metanol ekstreleri, bitkinin endometriozis tedavisinde uygulanabilirliğini test etmek için analiz edilmiştir. Ekstreye maruziyetin sonuçları histopatolojik olarak ve peritonal sıvıda TNF-α, VEGF ve IL-6 seviyeleri açısından değerlendirilmiştir. Özellikle etilasetat ekstresi uygulamalarında endometrial odaklarda, TNF-α, VEGF ve IL-6 seviyelerinde azalmalar kaydedilmiştir. Sonuç olarak endometrial odak hacimlerinin kayda değer seviyede azaldığı ve intraabdominal herhangi bir adezyon meydana gelmediği bildirilmiştir [291].

Çok sayıda bakteri ve mantar suşu üzerine farklı yöntemlerle elde edilen bileşiklerinin (uçucu yağ, n-hekzan, kloform, metanol ekstreleri gibi) uygulanması ile gerçekleştirilen çoğu çalışma ile bitkinin yüksek anti-fungal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [15, 292, 293].

Bitkinin anti-inflamatuar aktivitesini belirlemek amacı ile yapılan bir çalışmada TÜK'den elde edilen metil clorid/metanol (1:1) ekstresi kullanılmıştır. Elde ettikleri farklı dozlardaki solventlerin RAW264.7 makrofaj hücrelerinde anti-inflamatuar etkisini ve lipolisakkarit kaynaklı NO üretimini inhibe etme seviyelerini değerlendirmişlerdir. Solventlerin yaklaşık % 80 oranında (yüksek seviye) anti-inflamatuar etki gösterdikleri ve ortalama % 40 oranında (orta seviye) NO salınımı inhibe ettiklerini göstermişlerdir [294].

Suudi Arabistan'da toplanan AB örneklerinin *in-vitro* koşullarda analiz edildiği bir çalışmada α-amilaz enzimi üzerine inhibitör etkisi gösterilmiştir. Çalışmada referans ilaç olarak Akarboz kullanılmış ve AB ekstresinin aynı doz aralığında ilaç ile benzer inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir [238].

Yapılan literatür taramasında, AB bitkisi ile ilgi çalışmaların anti-oksidan kapasite üzerine yoğunlaşmış olduğu ve bu çalışmalarda 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazi (DPPH) radikal etki sonuçları ile indirgeme gücü kapasitelerinin değerlendirildiği gözlemlenmiştir. Bashi ve arkadaşları, İran'da topladıkları AB toprak üstü kısımlarından maserasyon ve ultrason dalgaları kullanarak metanol ekstresi elde etmişlerdir. Ultrason tekniği kullanılarak elde edilen ekstrenin radikal süpürücü etkisinin referans olarak kullandıkları bütillenmiş hidroksianisoldan bile yüksek olduğunu ve indirgeme gücünün diğer ekstrelere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [295]. Hidroglikolik AB ekstrelerinin kullanıldığı bir çalışmada 4:1'lik ekstrelerin yüksek seviyede anti-radikal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [19]. Doğu Anadolu Bölgesinden toplanan AB örneklerinden elde edilen su ekstreler kullanılarak yapılan bir çalışmada, propil gallat (% 95,0)

pozitif kontrol olarak kullanılmış, sonuç olarak ise su ekstrenin % 87,1 oranında DPPH radikali inhibe ettiği ve indirgeme gücünün 17,7 µg/mL askorbik asit ile eşdeğer olduğu sonuçları bildirilmiştir [244]. AB çiçeklerinden ve çiçek tomurcuklarından elde edilen metanol ekstresinin kullanıldığı iki çalışmanın her ikisinin sonucunda da DPPH radikalleri üzerinde en yüksek IC_{50} değerinde süpürme etkisine sahip olduğu gösterilmiştir [296, 297]. Metanol ekstresi kullanılan diğer bir çalışmada ise analiz için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmış, sonuç olarak fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir [15]. ABTS yönteminin AB metanol ve su ekstrelerinin kıyaslanması için kullanıldığı iki çalışmada ise sonuçlar birbirleri ile tutarlı çıkmış ve metanol ekstresinin su ekstreye göre daha güçlü anti-oksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [245, 298].

Bitki içeriklerindeki fenolik bileşikler, anti-oksidanlar olarak önemli ölçüde katkıda bulunur. Araştırmalar fenolik bileşikler ile anti-oksidan aktivite arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir [242]. AB su ekstrelerinde de içerik çalışmalarında fenolik içerikler bildirilmektedir [245, 246]. AB su ekstreleri ile yapılan BHA bütillenmiş hidroksiyanozil ve bütillenmiş hidroksitoluen temizleme etkinliği belirleme çalışmalarında en yüksek konsantrasyon olan 500 µg/mL'de söndürme aktivitesi % 75,21 gibi oldukça yüksek bir değer olarak rapor edilmiştir [242]. Ayrıca yapılan DPPH ve ABTS radikal yakalama aktivitesi analizlerinde µmol troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesinin sırasıyla 221,20 µmol/g ve 352,72 µmol/g bulunduğu [245], yapılan başka bir çalışma da AB su ekstresinin Askorbik asit eşdeğeri (AaE) olarak 55,3 mg AaE/g gibi yüksek bir DPPH radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir [243].

AB'nin lipid peroksidasyon, protein oksidasyonu, DNA hasarı ve oksidatif hasar üzerine etkilerini konu alan çalışmalar da literatürde öne çıkan çalışmalar arasındadır. Kızıl ve arkadaşları etanol ekstresi kullanarak yaptıkları analizler ile AB'nin Fe^{+3}/askorbat nedenli serbest radikal oluşumu ile Fe^{+3}/H_2O_2 ve askorbik asit nedenli sığır serum albümininde oluşan oksidatif hasarı inhibe ettiği sonuçlarını elde etmişlerdir. Ayrıca AB'nin hidroksil nedenli protein oksidasyonu ve H_2O_2'in ultraviyole fotolizizi nedenli DNA hasarı üzerinde de inhibitör etkili olduğunu bildirmişlerdir [299]. *İn-vitro* olarak uygulanan başka bir çalışmada AB yaprakları kullanılarak ekstreler elde edilmiş ve insan sünnet derisi fibroblast hücreleri olan HFF3 hücreleri üzerinde analizler yapılmıştır. Bitkinin koruyuculuk etkisi ilk olarak MTT testi ile gösterilmiş ve 1 µg/mL dozunda uygulanan AB ekstresinin oksidatif hasarı önemli seviyede inhibe ettiği çalışma sonucu olarak bildirilmiştir [300]. Histamin H2 reseptör antagonisti olan Ranitidin'in (100mg/kg) referans olarak kullanıldığı ve sıçanlarda gastrik ülser modelinde AB toprak üstü kısımları kullanılarak elde edilen asetat ekstresinin (200 mg/kg) oral uygulaması ile koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, AB ekstresinin artan ülser indeksi ve OS

parametreleri olan MDA, GSH, SOD seviyeleri üzerinde belirgin bir seviyede tedavi edici etkisi olduğu gösterilmiştir [238].

AB özlerinin yara iyileşmesi konusunda da etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Örnek olarak Akkol ve arkadaşlarının AB toprak üstü kısımlarını kullanarak elde ettikleri n-hekzan, kloform, etilasetat ve metanol ekstrelerini sıçan çizgisel insizyon ve dairesel eksizyon modellerine uygulayarak yaptıkları bir çalışmada özellikle n-hekzan ekstresinin % 84,2 oranla konstraksiyon oluşturduğu ve insizyon yara modelinde % 0,1 oranla yara gerilme direncini arttırdığı sonuçlarını histopatolojik kanıtlarla da destekleyerek göstermişlerdir [280]. Buna ek olarak AB ekstresinin dermal enfeksiyonlara sebebiyet verebilen *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* patojenlerine karşı anti-oksidan ve anti-mikrobiyal özellikleri ile kozmetik uygulamalar için de uygun olduğu gösterilmiştir [301].

2.2.2.1.4. *Achillea biebersteinii*'nin Kansere Karşı Terapötik Etkileri Üzerine Bilimsel Çalışmalar

Bitkinin pek çok hastalığa karşı halk tıbbında kullanılmasının yanı sıra bu konuda yapılan bilimsel araştırmalar da gün geçtikçe artmaktadır. Bu araştırmalar ile gösterilen özelliklerinden biri de anti-kanser etkisidir [16].

AB ile sentezlenen Ag-nanopartiküllerin insan meme kanseri hücreleri üzerindeki toksisite potansiyeli, MCF-7 hücre hattı kullanılarak incelenmiştir. Hücreler, 24 saat ve 48 saat boyunca çeşitli gümüş-nanoparçacığı konsantrasyonlarına maruz bırakılmış, ardından gümüş-nanoparçacıklarının toksisite etkileri, MTT deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir. MTT sonuçları, gümüş-nanoparçacıklarının doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını göstermiştir [18].

AB özütünün A375 melanom hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada özütlerin, topikal olarak uygulanan formülasyonların melanomu önleyici bileşenleri potansiyel olarak yararlı olabileceğini düşündürdüğü belirtilmiştir. Ayrıca AB hidroglikolik (6:1) özütünün A375 melanom hücresi ve aynı seviyede HaCaT keratinositler için sitotoksik olduğu rapor edilmiştir [19].

Bu çalışmada Asteraceae familyası, Achillea L. cinsine ait olan *Achillea biebersteinii* Afan. türünün su ekstresinin intrakranyal tümör türlerinden ependimal tümör üzerine anti-kanser özellikleri, bu tümör tipinde hücre kültürleri üzerine sitotoksik ve biyokimyasal, TRP kanalları üzerine etkisinin elektrobiyofiziksel, TRPC6 kanalları ve NF-κB yolağı üzerine moleküler yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Yetişmekte olduğu her bölgede farklı içerik özellikleri gösteren ve bilimsel çalışmalarla da etkisi kanıtlanmış olan farklı geleneksel tedavi yöntemleri için kullanılan AB'nin Karaman ilinin yüksek rakımlı ve iklimsel geçiş kuşağında yetişen örneklerinin ilk defa olarak ependimal tümörler için anti-kanserojen etkisi ile moleküler ve

elektrobiyofiziksel etkileri araştırılmıştır. Böylece çıkan sonuçlara göre tedavi konusunda henüz küratif bir ilerleme kaydedilememiş olan ependimal tümörler için terapötik ipucu elde edilmesi ve AB'nin etki mekanizmasına ilişkin bilgilerin edinilmesiyle bu konuda literatüre katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Bitkisel Materyal

Çalışmamızda kullanılan AB türünün yetiştiği bölgelerin, herbaryum örneklerinin, Türkiye Florası'nın ve literatürde geçen AB üzerine çalışmaların değerlendirilmesi sonucu belirlenmiştir. AB örnekleri, bahar mevsimi başları itibari ile daha önceden belirlenen koordinatlarda bulunan Kalaba Köyü/Kalaba Yaylası/KARAMAN civarından (36°54'08.3"N 32°52'02.8"E), Oyuklu Dağı/KARAMAN, Azı Tepesi/KARAMAN, Mahram Dağı/ KARAMAN-KONYA eteklerinde belirli aralıklarla kontrol edilmiş, mayıs ayı itibari ile çiçeklenme döneminde farklı safahatlarda toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bitkinin toplandığı bölgelerden birindeki yayılım örnekleri

Toplanan bitki örneklerinden iki adet herbaryum örneği yapılmak için ayrılmıştır. Bu örnekler Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi olan Prof. Dr. Kuddusi ERTUĞRUL tarafından incelenerek bitkinin *Achillea biebersteinii* olduğu doğrulanmıştır.

3.2. Ekstraksiyon ve İzolasyon

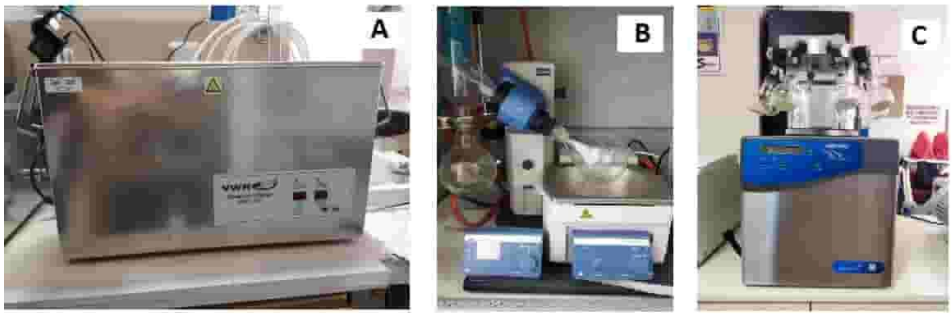
Bitki su ekstresini hazırlamak için ultrasonik yöntem kullanılmıştır. Herbaryum örnekleri ayrıldıktan sonra ekstre edilecek AB örnekleri iyi havalanan gölge bir ortamda kurutularak toz haline getirildi (OZLM 01 Öğütücü Makinesi, Özlem Madeni Eşya, İstanbul/TÜRKİYE) (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3). Toz halindeki 20 gr örnek 200 mL distile su (dH_2O) içerisine eklendi ve hazırlanan bu karışım 37-45 ^{0}C sıcaklıkta ultrasonikasyon (VWR Ultrasonic Cleaner USC-TH, Japonya) (Şekil 3.4-A) ile 90 dakika işleme tabi tutuldu. Süre tamamlanınca Whatman no:1 filtre kağıdı kullanılarak süzüldü. Pellet kısma aynı işlem iki kez tekrarlandı. 3 tekrar sonunda elde edilen süpernatantlar toplanarak Rotary Evaporatör'de (Heidolph Laborota 4000, Almanya) (Şekil 3.4-B) 40 ^{0}C'nin altında ve düşük basınçta çözücü uzaklaştırıldı. Ekstre içerisindeki çözücü kalıntılarının uzaklaştırılması için liyofilizatörde (Labconco FreeZone 2,5 L, ABD) (Şekil 3.4-C) düşük basınç altında 110 ^{0}C'de 3 gün sürede kurutularak toz halinde ekstreler elde edildi. Liyofilize halindeki ekstreler verimleri hesaplanarak kullanılıncaya kadar -20 ^{0}C'de saklandı [302].



Şekil 3.2. AB örneklerinin kurutulması



Şekil 3.3. AB örneklerinin toz haline getirilmesi



Şekil. 3.4. Ekstraksiyon Cihazları. **A.** VWR Ultrasonic Clenaner **B.** Rotary Evoporatör **C.** Liyofilizatör

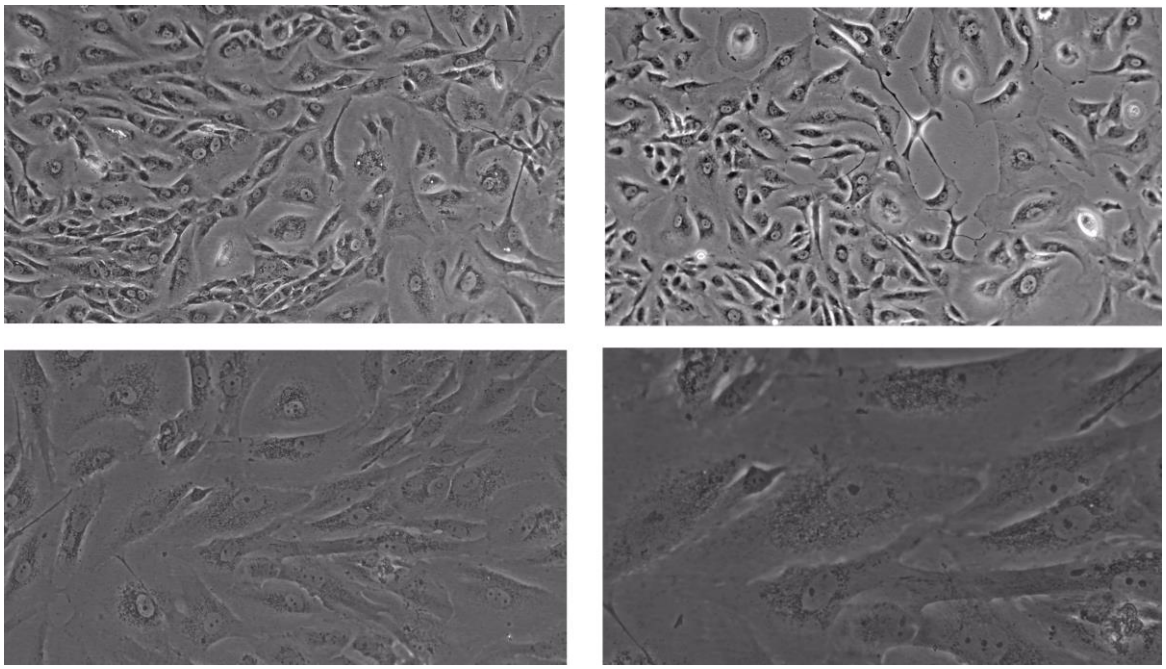
3.3. Hücre Kültürü

Bu çalışmada EPN kökenli ve C11orf95-RELA tanısı alınmış hastalardan izole edilerek türetilmiş olan DKFZ-EP1NS hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler Northwestern Üniversitesi Feinberg Tıp Fakültesi Robert H. Lurie Kapsamlı Kanser Merkezi direktörü Prof. Dr. Xiao-Nan Li tarafından karakterize edilmiştir [303].

3.3.1. Hücrelerin Çözdürülmesi, Çoğaltılması ve Pasajlanması

Dondurulmuş olarak temin edilen hücreler ilk olarak 37 ^{0}C'de su banyosunda çözdürüldü ve 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj işlemi yaptırılarak çöktürüldü. Hücre pelleti steril 1xfosfat tamponlu salin (PBS; Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD) ile bir kez yıkandı ve santrifüj koşullarında tekrar çöktürüldü. DKFZ-EP1NS hücreleri % 10 fetal bovine serum (FBS) (Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD), % 1 L-glutamin ve % 1 antibiyotikli (Penicilin/Streptomisin 1:1; Sigma-Aldrich, ABD) Dulbecco's Modified Eagle' medium with High Glucose (DMEM with High Glucose (DMEMhg), Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD) kültür

vasatında, T25 kültür flasklarında 37 ^{0}C'de ve % 5 karbon dioksit (CO_2)'li etüvde inkübe edilerek kültüre edildi. Tutunan ve sağlıklı çoğalan hücrelerin kültür ortamı 2-3 günde 1 x PBS ile yıkandıktan sonra taze kültür vasatı ile değiştirildi. Hücreler T25 kültür flaskında % 90 -% 95'lik yüzey alanını doldurduktan sonra 5 ve 10 mL steril 1 x PBS ile yıkandı. Ardından % 0,25 2 mL Trypsin-Etilendiamin tetra asetik asit (Trypsin-EDTA, Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD) ile muamele edildi. Flask 5 dakika 37 ^{0}C'de inkübe edildikten sonra invert mikroskop ile hücrelerin kaldırılması incelendi. Tripsin enziminin inaktivasyonu için en az iki kat hacminde (4 mL) kültür vasatı flaska eklendi ve hücre solüsyonu 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldı. Daha sonra hücre solüsyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutularak çöktürüldü. Hücre pelleti 1 mL kültür vasatı içinde çözdürülerek hücre süspansiyonu elde edildi.



Şekil 3.5. Çoğalmış DKFZ-EP1NS hücrelerinin farklı büyütmelerde görüntüleri

3.3.2. Hücre Sayımı

Oluşturulan hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak 1,5 mL'lik ependorf tüpe aktarıldı ve dilüsyon faktörü 2 olan 100 µL % 0,4 trypan blue stain (Sigma-Aldrich, ABD) boya solüsyonu eklendi. Nazikçe pipetaj yapıldıktan sonra boyanmış olan hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ardından Thoma lamına 20 µL boyanmış hücre süspansiyonundan yüklendi ve hücreler (sadece canlı olanlar) invert mikroskop altında sayıldı. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıda formül uygulanarak hesaplandı (Formül 1).

1 mL'de hücre sayısı = sayılan bölgelerin ortalama sayısı × dilüsyon faktörü × 10 (1)

3.3.3. Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Analizlerde kullanılacak olan hücreler T75 kültür flasklarına pasajlanarak etüvde inkübasyona bırakıldı, kalan hücreler ise dondurularak saklandı % 10 Dimetil sülfoksit (DMSO; Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD) ve % 90 taze kültür vasatı (% 20 FBS, % 1 L-glutamin, % 1 Penicilin/Streptomisin, DMEMhg) karıştırılarak dondurma medyumu elde edildi. Mililitrede yaklaşık 10^6 ya da 10^7 sayıda hücre yer alacak şekilde hücre pelleti dondurma medyumu ile karıştırıldı ve cryo-tüplere dağıtıldı. Daha sonra bu cryo-tüpler ilk olarak +4 °C'de, daha sonra da -20 °C'de bekletilerek soğuk ortama adapte edilmiş ve -80 °C'de saklandı.

3.4. Sitotoksisite Analizi

3.4.1. Hücrelerin Hazırlanması

AB su ekstresinden 0,45 gr (450 mg) tartılarak 10 mL % 10 FBS'li DMEMhg içinde çözüldü. 10 dakika 9000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant sırası ile 1.2, 0.8, 0.45 ve 0.2'lik filtrelerden geçirilerek 45 mg/mL stok solüsyon hazırlandı.

96 kuyucuklu bir mikropleyt analiz için kullanıldı. Mikropleytin 1. kolonu hücre kontrol grubu (HKG) için kullanılmıştır, 2. kolon hariç tüm kuyucuklara % 10 FBS'li DMEMhg'den 100 µL koyuldu. 2. kolonun 8 kuyucuğuna ana stok ekstreden 200 µL koyuldu ve 2. kolondan başlayıp 12. kolona kadar 100'er µL aktarılarak ekstre seri dilüsyonları (mg/mL olarak 45, 22.5, 11.25, 5.625, 2.813, 1.406, 0.703, 0.352, 0.176, 0.088, 0.044) hazırlandı.

DKFZ-EP1NS hücreleri 2,5 × 10^5 hücre konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan her kuyucuğa 50'şer µL konuldu (kuyucuk başına yaklaşık 12500 hücre). Böylece; ekstrenin kuyucuklardaki son konsantrasyonu (mg/mL olarak 30, 15, 7.5, 3.75, 1.88, 0.94, 0.47, 0.235, 0.117, 0.058, 0.029) olmuştur.

Mililitre başına 2,5 × 10^5 hücre bulunan süspansiyondan (15 mL) elde etmek için, ilk olarak 75 cm^2'lik flaskda bulunan vasat ortamdan uzaklaştırıldı. Flaska 10 mL Dulbecco's fosfat tamponlu salin (DPBS) eklenerek hücreler yıkandı. Serum içeriğinde tripsin inhibitörleri bulunmaktadır, bu sebeple şişede kalan vasatın PBS kullanılarak yıkanması ve ortamdan uzaklaştırılması önemlidir. Ardından flaska 2 mL tripsin-EDTA (Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israil) eklenerek hücrelerin yüzeyi yıkandı. Enzimin aktif hale gelmesi için karışım 5–6 dakika süresince inkübatörde bekletildi. Hücrelerin kalktığı gözlemlendikten sonra yine yapışmamaları için flaska nazikçe vuruldu. Daha sonra, tripsin-EDTA'nın inaktive olması için 4 mL kadar üretme vasatı (% 10 FBS'li DMEMhg) flaska eklendi, flaskdaki içerik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 800 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve oluşan hücre pelletinin üzerine 5 mL DMEMhg (% 10 FBS'li) eklenerek hücre sayımına geçildi.

3.3.2. Hücre Sayımı

Hücre sayımı için ilk olarak 100 µL hücre süspansiyonu ile 400 µL Trypan Blue (% 0.4'lük) ependorf tüpünde iyice karıştırıldı (1:5 dilüsyon) ve hücre sayımına başlamadan önce karışım en az 5 dakika süresince bekletildi. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra otomatik pipet kullanılarak hemositometrenin her iki sayım kamarasına da 15 µL hücre süspansiyonu konuldu. Kapiller hareket ile sayım kamarasının dolmasına ve sayım işlemine başlamadan önce 1 dakika süresince hücrelerin yerleşmesine izin verildi. Daha sonra 10× objektif ile sayım odasının ızgara çizgilerine odaklanıldı. Sayım kamaralarındaki 16 küçük karede bulunan canlı hücreler (mavi olmayan) sayıldı. Çizgilerin üzerinde gözlenen hücreler sayıma dahil edilmedi. Üst ve alt kamaralarda sayılan hücrelerin ortalaması alındı (Formül 2). Formül 2'ye göre hücre süspansiyonunda mililitre başına bulunan canlı hücre sayısı belirlendi.

Canlı hücre/mL = ortalama hücre sayısı × dilüsyon faktörünün tersi × 10^4 (2)

Canlı hücre/mL = 30 × 5 × 104 = 15 × 10^5 hücre/mL olarak bulunmuştur.

Hücre sayımının hemen ardından, 2,5 × 10^5 konsantrasyonda 15 mL hücre süspansiyonu elde etmek için, istenilen sulandırılmış hücre süspansiyonunun mL olarak hacmi (V1) ile istenilen konsantrasyon (C1) (hücre sayısı/mL)'un çarpımının orijinal hücre süspansiyonunun mL olarak hacmi (V2) ile orijinal hücre süspansiyonunun konsantrasyonu (C2) (hücre sayısı/mL)'nun çarpımının eşitliğine dayanan aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (Formül 3). Formül 3'de yer alan V2 sulandırılması gerekecek olan orijinal hücre süspansiyonuna ait hacimdir ve hesaplanarak bulunacaktır.

$V1 \times C1 = V2 \times C2$ (3)

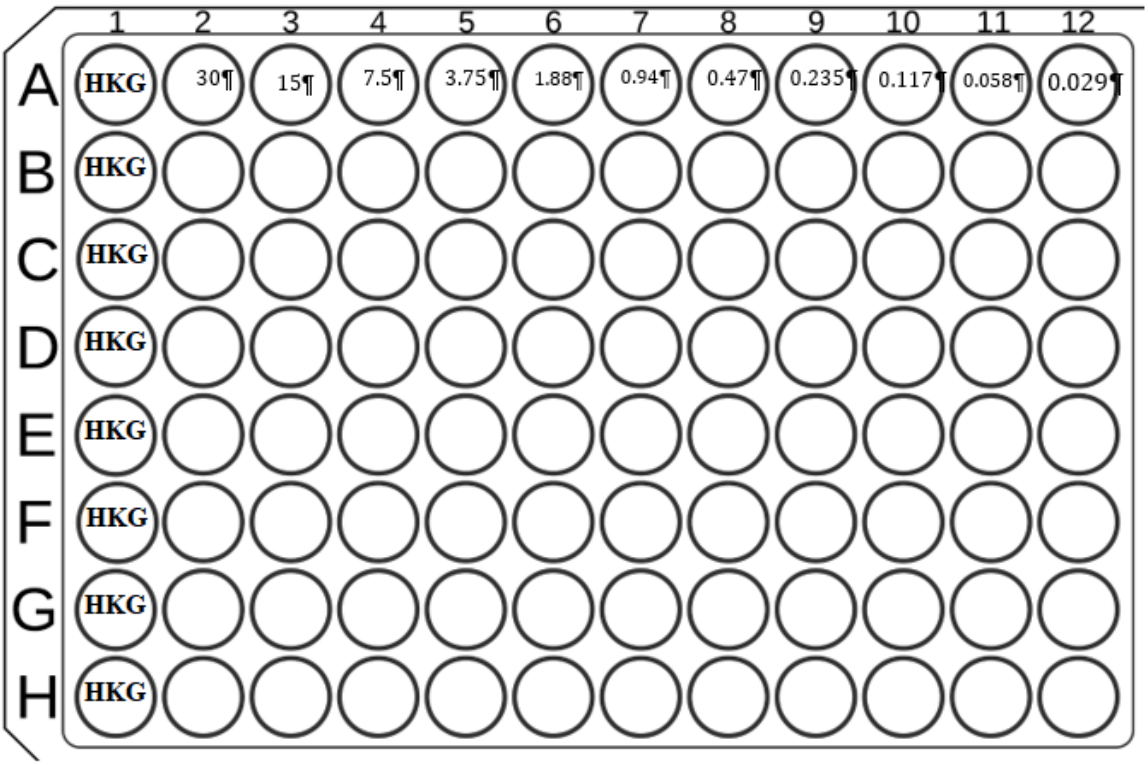
Böylece, V2 + sulandırıcı= istenilen konsantrasyonda V1 sonucuna ulaşılmıştır.

Analizin gerçekleştirilebilmesi için 15 mL 1 × 10^5 hücre/mL konsantrasyonunda süspansiyona ihtiyaç olduğu ve hazırlanmış olan hücre süspansiyonu 15 × 10^5 hücre/mL konsantrasyonunda olduğu için, ihtiyaç duyulan orijinal hücre süspansiyonunun hacmi (V2) Formül 3'den yararlanılarak aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

15 mL × (2,5 × 10^5 hücre/mL) = V_2 × (15 × 10^5 hücre/mL)

$$V_2 = \frac{15 \times 10^5}{15 \times 10^5} \times 2{,}5 = 2{,}5\text{mL} = 2500\ \mu\text{L}$$

Buradan yola çıkılarak, 15 mL (V1) 1 × 10^5 hücre/mL elde etmek için, 12,5 mL besiyeri (% 10 FBS'li DMEMhg)'ne 2,5 mL (V2) orijinal hücre süspansiyonu ilave edildi.



Şekil 3.6. Ekstrelerin sitotoksisitelerinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

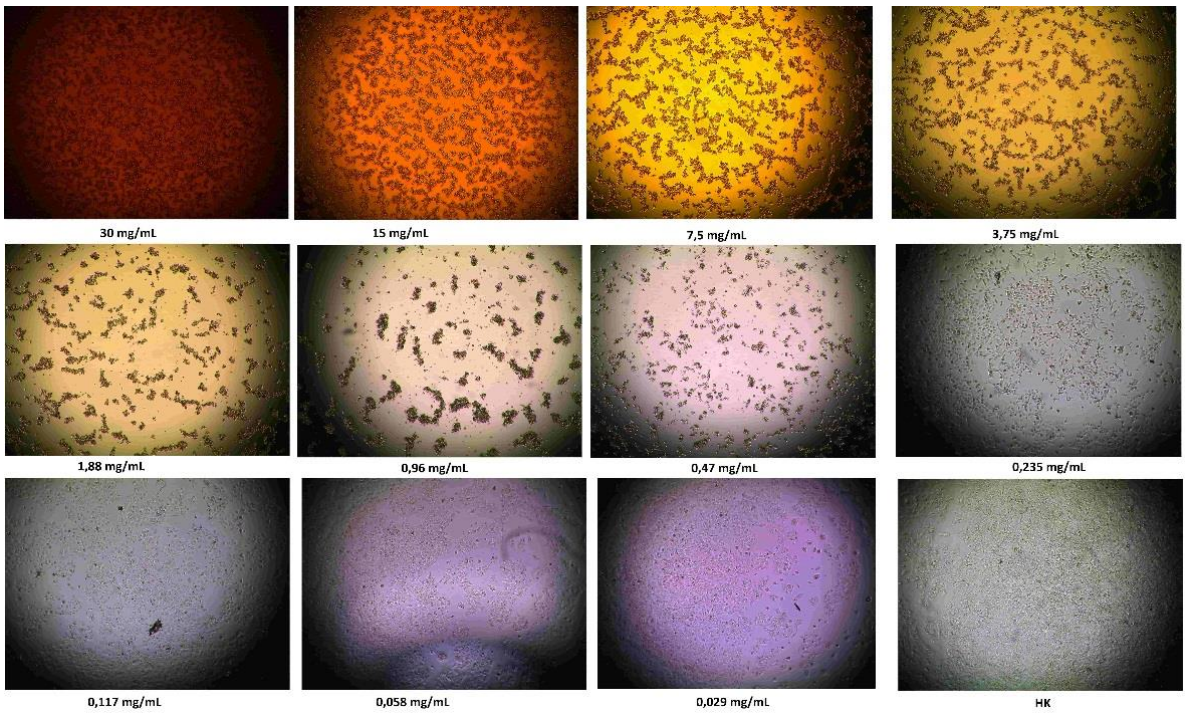
3.4.3. Sitotoksisite Testi

Mikropleytlerin 2 gün süresince % 5 CO_2'li ve nemli inkübatörde 37 ^{0}C sıcaklıkta inkübasyonu gerçekleştirildikten sonra, MTT yöntemiyle sitotoksisite testi uygulandı. Test için PBS içinde MTT çözeltisi 5 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklar boşaltılarak 150 µL besiyeri ve üzerine 15 µL (5 mg/mL) MTT çözeltisi eklendi. Kültürlerin tekrar 37 °C'de 4 saat süreyle inkübasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 150 µL DMSO (filtre edilmiş) eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi için 37 °C etüvde 50 dakika bekletildi. Çözünen ve homojen dağılım gösteren formazan boyanın optik dansite (OD)'leri 570 nm dalga boyunda ve referans dalga boyu 630 nm olacak şekilde spektrofotometrede okutularak 3 kuyucuktan okunan absorbans değerlerinin ortalama (ort)'ları kaydedildi. Sonuçlar tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. MTT uygulaması sonuçları

	Ort OD 1	Ort OD 2	Ort OD 3	STx 1	STx 2	STx 3
HK Ort	1,327	1,233	1,234			
30 mg/mL	0,106	0,108	0,108	91,986	91,208	91,199
15 mg/mL	0,108	0,110	0,110	91,828	91,024	91,058
7,5 mg/mL	0,119	0,119	0,118	91,037	90,335	90,437
3,750 mg/mL	0,120	0,121	0,122	90,901	90,137	90,113
1,875 mg/mL	0,122	0,123	0,123	90,773	89,966	89,962
0,93 mg/mL	0,123	0,127	0,126	90,698	89,659	89,728
0,46 mg/mL	0,124	0,129	0,127	90,635	89,537	89,647
0,23 mg/mL	0,657	0,665	0,677	50,492	46,012	45,083
0,115 mg/mL	1,315	1,273	1,252	0,935	-3,271	-1,478
0,0575 mg/mL	1,344	1,314	1,331	-1,280	-6,630	-7,860
0,0285 mg/mL	1,362	1,347	1,347	-2,629	-9,278	-9,157

OD:Optik dansite, STx: Sitotoksisite



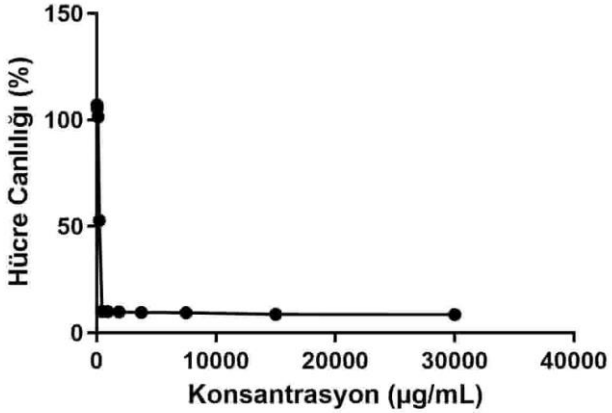
Şekil 3.7. MTT analizi için 72 saatlik farklı dozlarda AB su ekstresi uygulanmış hücre görüntüleri

Uygulanan en yüksek dozdan (30mg/mL) başlayarak doz azalmasına bağlı hücrelerin kontrol grubu hücrelerinin görüntüleri şekilde verilmiştir. HKG ve MNTK konsantrasyonunda ekstre uygulanan kuyucuklardaki hücre sayısında bir azalma görülmezken MNTK değerinin üzerindeki kuyucuklardaki hücre sayılarında doza bağlı bir azalma görüldü.

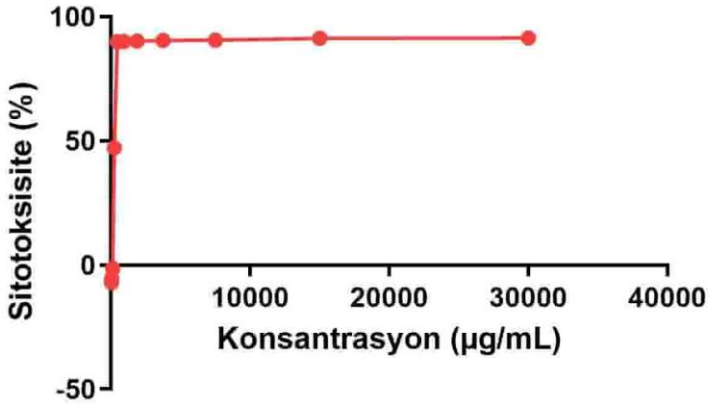
Test 8 kopya olarak yapıldı ve test sonuçları HKG'ye göre ortalama sitotoksisite % oranı şeklinde hesaplandı. DKFZ-EP1NS hücrelerinin sitotoksisite % oranlarının hesaplanması için, A'nın HKG'nin absorbansını, B'nin doz grubu ekstrelerine maruz bırakılmış hücrelerin absorbans değerlerini temsil ettiği aşağıdaki formül kullanıldı (Formül 4).

$$\text{Sitotoksisite } (\%) = \frac{A - B}{A} \; x \; 100 \qquad (4)$$

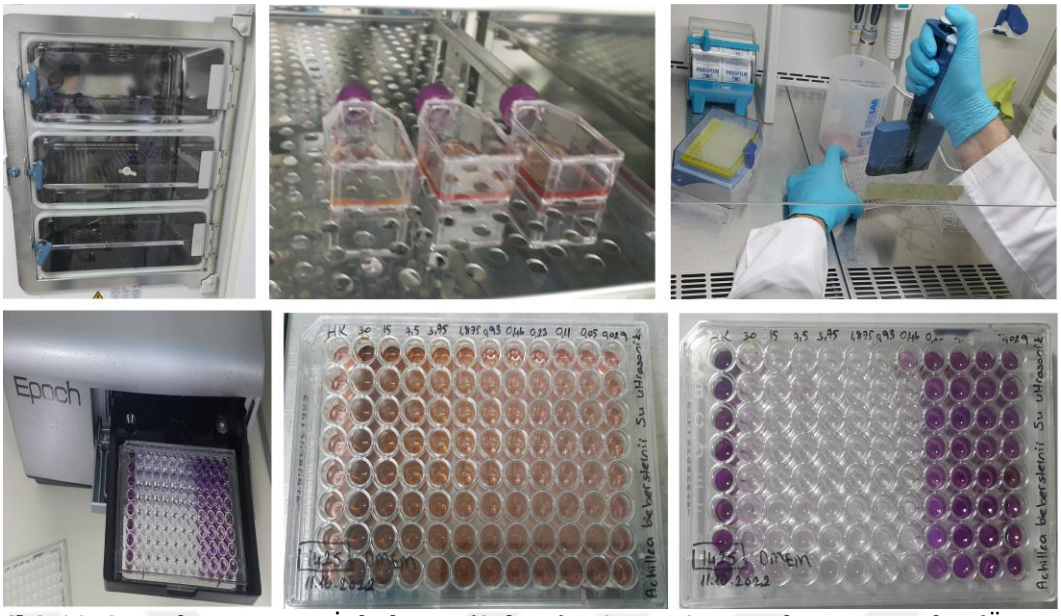
Hesaplanacak inhibisyon %'lerinin ekstre konsantrasyonlarına karşı grafiği çizildi (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Konsantrasyona karşı hücre canlılığı (%) grafiği

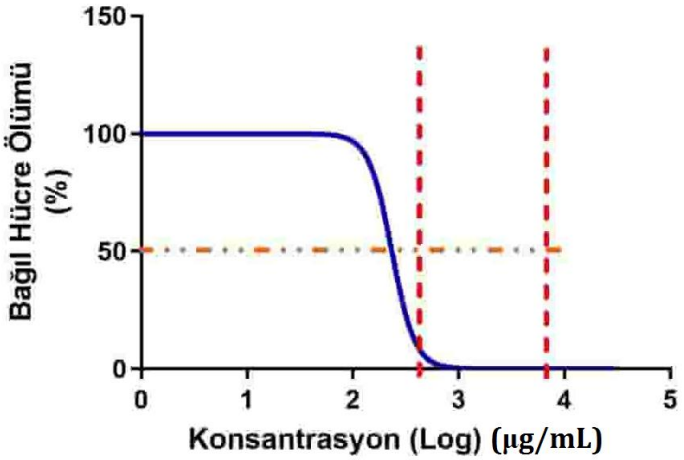


Şekil 3.9. Konsantrasyona karşı sitotoksisite (%) grafiği



Şekil 3.10. Sitotoksisite testi. İnkübatör (Sol üst), 72 saat AB uygulanmış gruplar (Üst orta), 96'lık plakanın hazırlanması (Sağ üst), sitotoksisite analizi (Sol alt), MTT uygulanması hemen sonrası doz grupları (Alt orta), MTT uygulama süresi sonrası doz grupları (Sağ alt)

Ekstrelerin DKFZ-EP1NS hücrelerine karşı IC_{50} değeri, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analizi uygulanması ile belirlendi. HKG ile karşılaştırma yapılarak ekstrelerin MNTK (maksimum toksik olmayan konsantrasyon)'ları ve yarı maksimum IC_{50} hesaplanmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. IC_{50} değerinin hesabı için elde edilen konsantrasyona bağlı hücre ölümü eğrisi. (Belirlenen konsantrasyonların logaritması alınmıştır)

Bu sonuçlara göre HKG sadece vasat (AB ekstresi uygulanmayan), DDG (0,115 mg/mL (MNTK) konsantrasyonda AB ekstresi-vasat karışımı), ODG (0,241 mg/mL (IC_{50} değeri)

konsantrasyonda AB ekstresi-vasat karışımı) ve YDG (0,46 mg/mL konsantrasyonda AB ekstresi-vasat karışımı) olacak şekilde gruplara uygulanacak karışımlar stok olarak hazırlandı.

3.5. Uygulanacak Dozlar ve Grupların Belirlenmesi

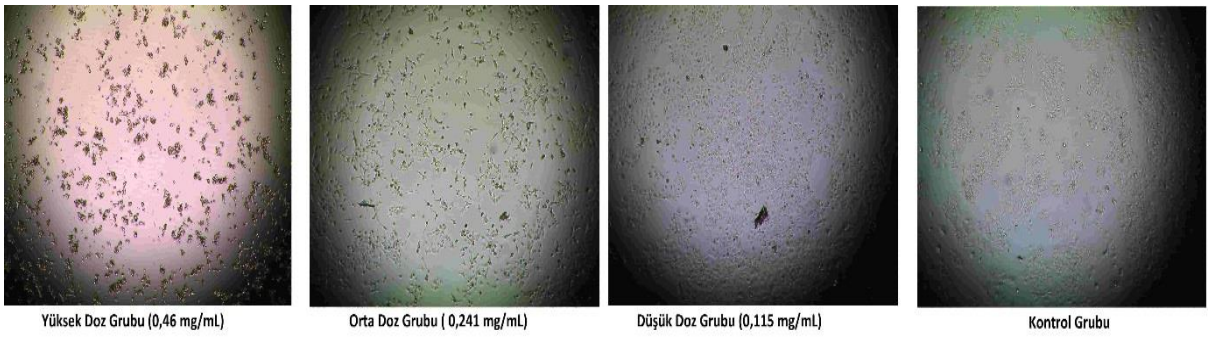
MTT uygulanarak yapılan sitotoksisite analizinde sitotoksisiteyi belirlemek için hücre sayısı ile orantılı OD değerleri DKFZ-EP1NS ependimal tümör hücre hattı üzerine AB ekstresinin 30, 15, 7.5, 3.75, 1.88, 0.94, 0.47, 0.235, 0.117, 0.058, 0.029 mg/mL farklı dozlarının 72 saatlik maruziyetine göre ölçüldü. Veriler ort ± standart sapma (ss). şeklinde belirlenerek çalışma gruplarına uygulanacak AB su ekstresi konsantrasyon değerleri belirlendi. Bu sonuçlara göre 1 kontrol ve 3 deney grubu oluşturuldu (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).

Grup 1. HKG, bu gruptaki DKFZ-EP1NS (C11ofr95-RELA füzyon) ependimal tümör hücre hattı üzerine sadece vasat eklendi

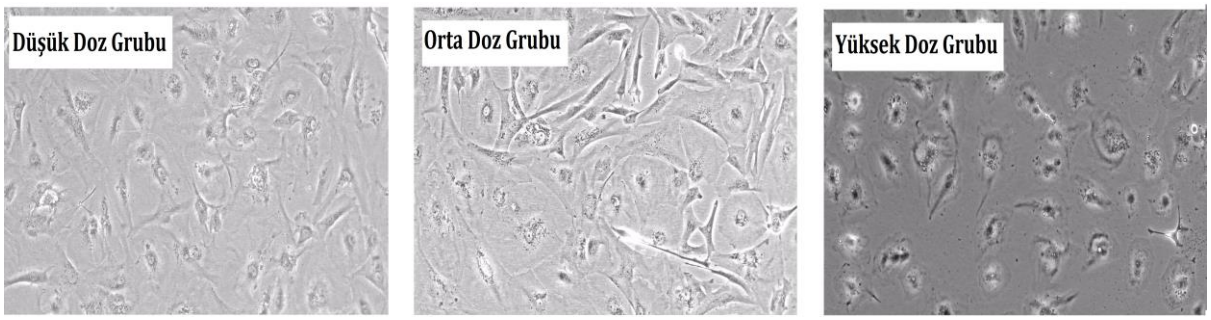
Grup 2. Düşük doz grubu (DDG), bu gruptaki DKFZ-EP1NS (C11ofr95-RELA füzyon) ependimal tümör hücre hattı üzerine düşük doz olarak belirlenen (MNTK) 0,115 mg/mL AB ekstresi-vasat karşımı uygulandı.

Grup 3. Orta doz grubu (ODG), bu gruptaki DKFZ-EP1NS (C11ofr95-RELA füzyon) ependimal tümör hücre hattı üzerine orta doz olarak belirlenen (IC_{50} değeri) 0,241 mg/mL AB ekstresi-vasat karşımı uygulandı.

Grup 4. Yüksek doz grubu (YDG), bu gruptaki DKFZ-EP1NS (C11ofr95-RELA füzyon) ependimal tümör hücre hattı üzerine yüksek doz olarak belirlenen (MNTK değerinin 4 katı) 0,482 mg/mL AB ekstresi-vasat karşımı uygulandı.



Şekil 3.12. MTT uygulaması sonrası belirlenen dozlarda AB uygulanmış gruplar ve kontrol grubu görüntüleri



Şekil 3.13. Deney grubu hücrelerin görüntüleri

3.6. Akım Sitometrisi

3.6.1. Akım Sitometrik Hücre Yüzeyinde Annexin-V-FITC ile Apoptoz Ölçülmesi

Apoptozun en erken özelliği, plazma zarı fosfatidilserin (PS)'in plazma zarının iç tarafından dış katmana translokasyonudur. Annexin V, Ca^{+2} varlığında hücrenin dış yüzeyinde açığa çıkan PS'ye bağlanarak apoptotik hücreyi sağlıklı hücreden ayırır. PS'nin hücrenin dış yüzeyine translokasyonu, hücre nekrozu sırasında da meydana gelir, ancak erken apoptoz sırasında hücre zarı bozulmadan kalırken, nekrotik hücrede hücre zarı bozulur. Bu nedenle, erken apoptoz ve nekroz arasında ayrım yapmak için Annexin V boyaması, hücreye ancak membran bozulmasının ardından girebilen propidyum iyodür (PI) gibi bir DNA interkalasyon boyası ile birlikte yapılmalıdır. Sağlıklı hücrelerde Annexin V ve PI negatiftir, erken apoptotik hücrelerde sadece Annexin V pozitiftir, geç apoptotik hücrelerde Annexin V ve PI birlikte pozitiftir ve nekrotik hücrelerde ise sadece PI pozitiftir [304]. Akım sitometri yöntemi ile hücrelerdeki apoptoz oranını tespit etmek için APC-Annexin V Apoptosis Detection kiti (Biolegend Ürün Kat. No: 640932) kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Analiz için DKFZ-EP1NS (C11orf95-RELA) hücreleri soğuk PBS ile 5 dakika 400rpm'de iki kez santrifüj edilerek yıkandı. Pellet Cell Staining Buffer, solüsyonu ile iki kez yıkandı. Daha sonra 100 µl Annexin V Binding Buffer içinde hücreler süspanse edildi. 5 µL Annexin V ve 10 µL PI eklendi. Hücreler hafifçe vortekslendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 400 µL Annexin V Binding Buffer ilave edilip Becton Dickinson Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Almanya) akım sitometri cihazında hücre sayımı yapılıp FACSDiva yazılımı (version 6.1.3, BD Biosciences)'nda analizi yapıldı.

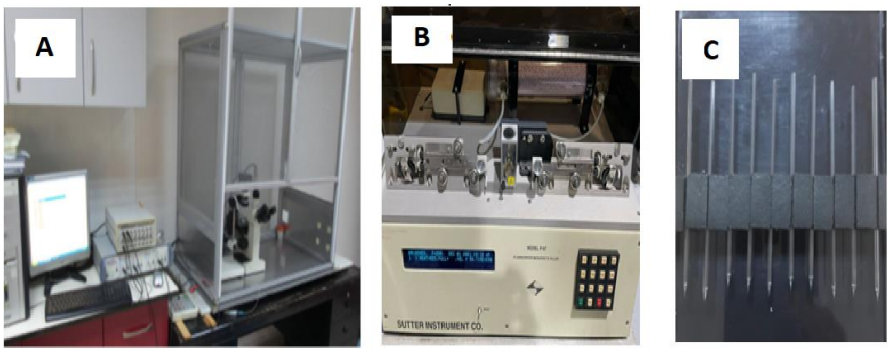
3.6.2. Akım Sitometrik DNA Hücre Döngüsü Analizi

AB sulu ekstresinin DKFZ-EP1NS hücrelerinin bölünme döngüsü üzerindeki etkilerini tespit etmek için BD CycleTestTM Plus DNA Reagent Kit (Lot No: 9183628, Ref: 340242) kullanılarak analizler yapılmıştır. Bu kit, hücre süspansiyonlarından hücre çekirdeklerini izole etmek ve boyamak için bir dizi reaktif sağlamaktadır. Diferansiyel olarak boyanmış hücrelerin

akım sitometrik analizi, anormal DNA köklerinin tamamlanmasında araştırma yapmak ve bu köklerin DNA indeksini ve hücre döngüsü faz dağılımlarını tahmin etmek için kullanılmaktadır.

Analiz için ilk olarak belirlenen dozlara göre (0.115, 0.241 ve 0.482 mg/mL) T75 flasklarına hazırlanmış olan hücrelere AB ekstresi maruziyeti gerçekleştirildi ve ardından 24 saatlik inkübasyon uygulandı. İnkübasyon sonrası tripsinizasyon yöntemi ile kaldırılan hücreler tüplere alındı. 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen pellet üzerine ticari olarak alınan kit içerisinde gelen buffer solüsyonu 1'er mL olarak ilave edildi ve 5 dakikalık 1500 rpm'de santrifüj 2 kez daha uygulandı. Cedex XS cihazında hücre sayımı yapılarak hücreler $1x10^6$ hücre/mL olacak şekilde tüplere dağıtıldı. Bu aşamada tekrar santrifüj işlemi uygulandı ve oluşan süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı. Tüplere 250 µL Solüsyon A (Trypsin buffer) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirildi. Solüsyon A ortamda iken üzerine 200 µL Solüsyon B (Tyripsin inhibitör ve RNase buffer) eklenerek karıştırıldı ve tekrar 10 dakikalık oda sıcaklığında inkübasyon sağlandı. Karışımın üzerine soğutulmuş halde olan (+2 ^{0}C - +8 ^{0}C) Solüsyon C (Propidium Iodide Stain Solution) eklendi ve 10 dakika süresince + 4^{0}C'de (buzdolabında) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücreler Becton Dickinson Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Almanya) akım sitometri cihazında hücre sayımı yapılıp FACSDiva yazılımı (version 6.1.3, BD Biosciences)'nda analizi yapıldı.

3.7. Elektrobiyofiziksel Analiz



Şekil 3.14. Yama kenetleme analizi. **A.** Yama kenetleme düzeneği **B.** Otomatik pipet çekici **C.** Uygun şekilde çekilmiş borosilikat cam pipetler

3.7.1. Yama Kenetleme Yöntemi İle TRP kanal akımlarının ölçülmesi

3.7.1.1. Hücrelerin Hazırlanması

AB sulu ekstresinin DKFZ-EP1NS hücrelerinin TRP kanal akımları üzerine etkilerinin analiz edilmesi için tüm hücre yama kenetleme metodu kullanılmıştır. Kayıtlar kontrol grubu ve tüm doz grupları (0.115, 0.241 ve 0.482 mg/mL) için hücrelere 72 saatlik ekstre uygulaması sonrası alındı. Tripsinizasyon ile kaldırılan hücrelere pipetaj uygulaması yapıldı ve tek hücreler

kendi vasatları ile birlikte (doz grubuna göre uygulanmış AB ekstreli vasat) 35 mm'lik petri kaplarına ekildi. Ekim işlemi ekstre uygulamasının 48. saatinde yapılarak hücrelerin petri tabanına tutunması için gerekli olan süre de ekstre uygulama süresinin (72 saat) içerisine dahil edilmiştir. Uygulama süresi sonunda petri kapları içindeki vasatlar boşaltılarak banyo çözeltisi ile hücreler yıkandı. Böylece ölü ya da tutunamamış olan hücreler ortamdan uzaklaştırılarak kayıt için hazır hale getirildi.

3.7.1.2. Banyo ve Pipet Çözeltileri

Tüm hücre yama kenetleme sırasında hücre canlılığının devamlılığının sürmesi ve hücrelerden kayıt alınabilmesi için literatürde yer alan K akımlarını bloke eden (CsCl içeren) çözeltiler hazırlanmıştır [305, 306]. Bu bağlamada (mM) 130 sodyum klorür (NaCl), 2 magnezyum klorür ($MgCl_2$), 5 sezyum klorür (CsCl), 2 kalsiyum klorür ($CaCl_2$), 10 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonik asit (HEPES) ve 5 D-glukoz, (pH 7.3 Sodyum hidroksit (NaOH)) içerikli banyo çözeltisi, kayıt için kullanılacak olan cam pipetlerin doldurulması için de (mM) 140 CsCl, 2 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 2,5 etilen glikol tetra asetik asit (EGTA) ve 10 HEPES, (pH 7.3 NaOH) içerikli pipet çözeltisi hazırlanmıştır.

3.7.1.3. Pipetlerin Hazırlanması

Elektrobiyofiziksel kayıtların alınması için 1B150F-4 model filamentli borosilikat cam pipetler (World Precision Instruments, ABD) kullanılmıştır. Pipetlerin kayıtlara uygun şekilde (iç çapı 0,84 mm ve dış çapı 1,5 mm) çekilebilmesi için programlanabilir (basınç, hız ve sıcaklık) otomatik pipet çekici (P97 model, Sutter Instruments CO, ABD) kullanılmıştır. Pipetler çekilerek uygun şekle getirildikten sonra içleri pipet çözeltisi ile doldurularak yama kenetleme sisteminin pipet tutucu kısmına takıldı. Direnç aralığı 2-6 megaohm (MΩ) değer aralığında olmayan pipetler kullanılmamıştır.

3.7.1.4. Tüm Hücre Yama Kenetleme Analizi

Tüm hücre yama kenetleme tekniği DKFZ-EP1NS hücre membranlarının belirlenen bir voltaj değerine kenetlenerek membranda oluşan akımların kayıtlanması için kullanılmıştır. Bu amaçla, bilgisayar kontrollü iki kanallı Multiclamp 700B (Axon Instruments, ABD) yama kenetleme amplifikatörü ve bu sistemle uyumlu olan Digidata 1322A sayısal çevirici (Axon Instruments, ABD) kullanılmıştır. Multiclamp 700B amplifikatörü bilgisayar üzerinden Multiclamp 700B Commander (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile yönlendirilmiştir. Hazırlanan pipetler CV-7B (Axon Instruments, ABD) model gerilim takibi yapabilen bir operasyonel yükselticinin pipet tutucu kısmına takılıp Multiclamp 700B yükselteci ile bağlantısı gerçekleştirilmiştir. Kayıtların alınması sırasında hücre ile pipetin takibinin yapılabilmesi için BM-37XB (U-Therm International (H. K.) Limited) invert mikroskop kullanılmıştır. Kenetleme

direncinin takibi, hücre membranına gerilim protokolünün uygulanması ve akım kayıtları bilgisayarda bulunan Clampex 9.2 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile sağlanmıştır. Elde edilen akım kayıtları ise Clampfit 10 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile analiz edilerek değerlendirilmiştir. Analizlerde sadece maksimum akım kayıtları alınarak değerlendirme yapılmıştır.

Uygulanacak olan kenetleme protokolü yapılan literatür taraması sonrası belirlenmiştir [305, 306]. Oda sıcaklığında (22 - 25 °C) alınan kayıtlar için kenetleme potansiyeli -40 mV olarak belirlendi. Stimulasyon için 500 ms süreli rampa -140 mV'dan başlayıp +60 mV'a kadar arttırıldı. Rampa protokolü ile Na akımları elemine edilmiştir. Kayıtlar sırasında sadece 1-10 GΩ aralığında mühürleme direncine sahip olan hücrelerin kayıtları analiz için değerlendirmeye alınmıştır.

Elde edilen veriler ile her grup için Akım-Zaman grafiklerinden maksimum akım değerleri okunarak kaydedildi. Akım-Zaman grafiklerinden Clampfit 10 (Axon Instruments, ABD) yazılımı kullanılarak Akım-Voltaj grafikleri çizdirildi. Bu grafikler yine Clampfit 10 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile fit edildi ve eğrilerin eğimleri aynı yazılım ile hesaplanarak (Formül 5) gruplara göre iletkenlik değerleri hesaplandı.

$$f(x) = mx + b \tag{5}$$

3.8. Antioksidan Aktivitenin Ölçümü

Tüm guruplardaki DKFZ-EP1NS hücreleri (her analizde her grup için 1 milyon hücre) RIPA (Radyoimmünopresipitasyon) lizis ve ekstraksiyon tamponunda (Sigma Aldrich, Chemical Co, St Louis, MO, USA) çözüldü, ardından hücre lizatları IKA homojenleştirici (T 25 Ultra-Turrax, IKA Werke GmbH, Staufen, Germany) ile homojenleştirildi ve son olarak 4 °C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi (Hettich Mikro 22 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany). Elde edilen süpernatant, GSH-Px, CAT ve SOD analizleri ile hücrelerin antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü ve lipid peroksidasyonu tayini için MDA düzeylerinin analizinde kullanıldı.

3.8.1. Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi

GSH-Px ile katalizlenen reaksiyonda GSH'nin H_2O_2 oksidasyonu (Formül 6) sonucunda ortaya çıkan okside glutatyon (GSSG) 'un glutatyon redüktaz (GSSG-Rd) katalizi (Formül 7) ile tekrar GSH'a dönüşmesi esnasında tüketilen NADPH konsantrasyon değeri üzerinden 340 nm'de kaydedilen absorbans değerinde meydana gelen azalmanın 4 dakika süresince izlenmesi prensibine dayanır.

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH-Px} 2H_2O_2 + GSSG \quad (6)$$

$$HGSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSSG-Rd} NADP^+ + 2GSH \quad (7)$$

Analiz için, fosfat tamponu (0,05 M (pH 6,8) (5 mM EDTA içerir)), redükte L-glutatyon çözeltisi (0,15 M), NADPH çözeltisi (7,2 mM), GSSG-Rd çözeltisi (100 U/mg protein/mL), sodyum azid çözeltisi (2 m) ve H_2O_2 çözeltisi (30 Mm) hazırlandı.

Tablo 3.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Ölçüm Protokolü

	Örnek (Hücre Homojenizatı)
Fosfat Tamponu	2,65 mL
Redükte Glutatyon çözeltisi	0,1 mL
NADPH çözeltisi	0,1 mL
GSSG-Rd çözeltisi	0,01 mL
Sodyum Azid çözeltisi	0,01 mL
Numune	0,1 mL
H_2O_2 çözeltisi	0,1 mL

Elde edilen karışım 2 dakika 25 °C'de inkübe edildi. 340 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans değeri ölçüldü ve kaydedilen bu değere karşı spektrofotometre sıfırlandı. Bu çözeltiye 0,1 mL H_2O_2 çözeltisi eklendi ve 2 dakika süresince enzim aktivitesindeki düşüş analiz edildi. HKG dahil tüm gruplar için 2. dakika ve 4. dakikada elde edilen OD değerleri kullanılarak ΔOD/dakika değerleri hesaplandı. Ardından doz grupları ΔOD /dakika değerlerinden kontrol ΔOD /dakika değerleri çıkarılarak net ΔOD/dakika değerler hesaplandı. DKFZ-EP1NS hücreleri GSH-Px aktivitesi, miligram protein başına (U/mg protein) spesifik aktivite cinsinden verilmiştir.

3.8.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Bir süperoksit radikalinin O_2 molekülüne yükseltgenip, diğer bir süperoksit radikalinin ise daha az reaktif bir molekül olan H_2O_2'ye indirgenmesini katalize eden SOD enzim aktivitesinin ölçümü, ksantin varlığında ksantin oksidaz tarafından üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolyum (NBT) ile 560 nm'de absorbe edilen renginin ölçülmesi prensibine dayanır.

Stok ksantin çözeltisi (3mM)'nin 4,6 mg ksantinin 1mL 0,1 M NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek bidistile su ile 10 mL'ye tamamlanması, ksantin çözeltisi (0,3 mM)'nin 1 mL stok ksantin çözeltisinin 1 mL bidistile su ile 10 mL'ye tamamlanması (her analiz için taze olarak hazırlanmıştır), etilendiamintetraasetik asit çözeltisi (0,6 mM)'nin 22,32 mg $Na_2EDTA.H_2O_2$'nin bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanması, sodyum karbonat çözeltisi (400 mM)'nin 4,24 g Na_2CO_3'ün bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanması, bovin serum albümin çözeltisi (1 g/L)'nin 10 mg bovin serum albüminin bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanması, nitro blue tetrazolium klorid çözeltisi (0,15 mM)'nin 1,226 mg nitro blue tetrazolium kloridin1 mL bidistile su ile 10 mL'ye tamamlanması (her analiz için taze olarak hazırlanmıştır), SOD çalışma reaktifinin10 mL 0,3 mM ksantin, 5 mL 0,6 mM Na_2EDTA, 3 mL 400 mM Na_2CO_3, 1,5 mL 1 g/L BSA, 5 mL 0,15 mM nitro blue tetrazolium klorid karıştırılması (her analiz için taze olarak hazırlanmıştır), amonyum sülfat çözeltisi (2 M)'nin 26,428 g (NH_4) bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanması, ksantin oksidaz çözeltisi (167 U/L)'nin 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş $(NH_4)2SO_4$ çözeltisinde çözülerek 1 mL'ye tamamlanması ve bakır klorür çözeltisi (0,8 mM)'nin 13,64 mg $CuCl_2.2H_2O$'nun bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

2,85 mL SOD reaktifi örnek ve kör tüplerine aktarıldı. Örnek tüpüne 100 µL süpernatant ve her iki tüpe 50 µL ksantin oksidaz eklenerek tüplere 20 dakika 25 °C'de inkübasyon uygulandıktan sonra tüplere 100 µL $CuCl_2$ çözeltisi eklendi. Son olarak da kör tüpüne 100 µL süpernatant eklenerek karıştırıldı. Kör tüpünün ve örnek tüplerinin 560 nm'de absorbans değerleri ayrı ayrı ölçüldü. SOD aktivitesi elde edildi ve spesifik aktivite U/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.8.3. Katalaz Aktivitesi

H_2O_2 substratının katalaz ile enzimatik olarak yıkılmasının (Formül 8) 240 nm de izlenmesi prensibine dayanan katalaz aktivitesi ölçümü Aebi yöntemine göre yapılmıştır [307].

$$H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2 \quad (8)$$

Analiz için gerekli reaktifler olan potasyum dihidrojen fosfat çözeltisinin (A) 0,681 g KH_2PO'nin bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanması, disodyum hidrojen fosfat çözeltisinin (B) 2,77 g $Na_2HPO_4.12H_2O$'nun bidistile suda çözülerek 155 mL'ye tamamlanması, fosfat tamponu (50 mM pH 7,0)'nun A/B'nin 1/1,55 oranında karıştırılarak pH 7'ye ayarlanması ve hidrojen peroksid çözeltisinin (30 mM) 34 µL % 30'luk H_2O_2'nin fosfat tamponu ile10 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Kuvarzt spektrofotometre küvetleri içine 10 µL 10.000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine de 1990 µL fosfat tamponu eklendi Örnek küvetine 1 mL 30 mM H_2O_2 eklenip hemen karıştırıldı. Örneğin absorbans değerindeki azalma kör tüpe karşı 240 nm'de 1 dakika süresince gözlemlendi. Spesifik aktivite ünite/mg protein cinsinden elde edildi.

3.8.4. Malondialdehit Ölçümü

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyeleri tiyobarbitürik asit reaksiyonu ile belirlenmiştir. Yöntemin prensibi, barbitürik asidin lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA ile etkileşimi sonrası ortaya çıkan pembe rengin ölçülmesine dayanmaktadır

Ölçüm için 532 nm dalga boyunda bir Carry 50 spektrofotometre (Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) kullanıldı. 1,1,3,3-tetraetoksi propan ile renkli reaksiyon birincil standart (Sigma-Aldrich Chemical Co, MO, USA) olarak alındı. MDA düzeylerinin belirlenmesi Yagi yöntemi ile miligram protein (nmol/mg protein) başına bir nanomol olarak gerçekleştirildi [308].

Stok tetrametoksipropan çözeltisinin 0,92 gr tetrametoksipropanın 1 mL'de çözülmesi, günlük tetrametoksipropan çözeltisinin 10 mL'lik stok çözeltisini 100 mL'ye dH_2O ile tamamlanması (Çalışma sırasında günlük çözelti1/10 oranında seyreltilmiştir), Sodyum dodesil sülfat çözeltisinin 8,1 gr Sodyum dodesil sülfatın 100 mL'ye dH_2O ile birlikte tamamlanarak çözülmesi, asetik asit çözeltisinin 20 mL asetik asidin dH_2O ile 100 mL'ye tamamlanarak pH'sinin 3,5'e ayarlanması, tiobarbitürik asit çözeltisinin 0,8 gr tiobarbitürik asitin 100 mL'ye dH_2O ile tamamlanıp ısıtılarak çözülmesi ve n-bütanol-piridin çözeltisi (15:1)'nin 1mL stok piridinin 15 mL n-bütanol ile karıştırılması ile hazırlanmıştır.

Analiz için tüpler 30 dakika süresince 95 ^{0}C'de inkübe edildi. Musluk suyunda soğutularak dH_2O (500 µL) ve n-bütanol-piridin karışımı (2,5 mL) eklenerek tüplerin kapakları kapatıldı Karışımlar beyaz renk alıncaya kadar vortekslendi. 4000 rpm'de 15 dakika süresince santrifüjlenerek elde edilen süpernatant fazın 1 mL'si 532 nm'de spektrofotometrik yöntem kullanılarak kör tüpe karşı ölçüldü.

Tablo 3.3. Malondialdehit (MDA) Ölçüm Protokolü

	Kör	**Standart**	**Örnek**
Standart(1/10dilüe)(µL)	-	50	-
Örnek(µL)	-	-	50
Sodyum dodesil sülfat çöz.(µL)	100	100	100
Asetik Asit çözeltisi (µL)	750	750	750
Tiobarbitürik asit çöz. (µL)	750	750	750
dH_2O (µL)	400	350	350

3.9. Gen Ekspresyonu Deneyleri

Deneyler için çalışma öncesinde kullanılacak olan primerler Tablo 3.4'deki gibi dizayn edilmiştir.

Tablo 3.4. Gen ekspresyon deneyleri için dizayn edilen primerler

Gen	**Erişim numarası, ürün boyutu**	**Prime diziler**
TRPC6	NM 004621 625 pb for TRPC6 - 277 pb for TRPC6γ	for: GAACTTAGCAATGAACTGGCAGT rev: CATATCATGCCTATTACCCAGGA
hβ-actin	NM 001101 210 pb	for: CAGAGCAAGAGAGGCATCCT rev: ACGTACATGGCTGGGGTG
NF-κB	NM_002503	for: CGACACCTACCTCGCTCAG rev: GTCGGAATCGGGGTACAAGG

3.9.1. RNA İzolasyonu

Analiz için manuel RNA izolasyon yöntemi kullanıldı. 2-3 mL DKFZ-EP1NS hücresi için 4 katı kadar dH_2O eklendi ve tüp alt üst edildi. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atıldı. Üzerine 500 µL trizol eklendi. Uzun uzun ve yavaş yavaş pipetaj yapıldı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 20 µL kloroform eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyon yapıldı. 12000 g'de +4 ^oC'de 25 dakika santrifüj edildi ve faz ayrımına bakıldı.

RNA içeren berrak faz dikkatlice ependorfa alındı. Her 1 mL trizole 500 µL izopropil alkol eklendi ve tüp yavaşça alt üst edildi. Ardından oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyon yapıldı ve 12000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant atıldı, pelletlerin üzerine 1000 µL % 75'lik etanol eklendi (37,5 µL alkol, 12,5 µL dH_2O). 7500 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Ortamdaki alkolün uzaklaştırılması ile birlikte 30 µL, 50 µL veya 75 µL RNase-free dH_2O ile pellet çözdürüldü (Kullanılacak olan RNase-free dH_2O miktarına pelletlerin büyüklüğüne göre karar verildi).

3.9.2. cDNA Sentezi

Sentez için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Donmuş halde muhafaza edilen kit çözüldükten sonra, kitin bileşenleri karıştırıldı ve kısa bir süre santrifüjlendi. Tablo 3.5'de verilen reaktifler buz üzerinde bekletilen steril nükleaz-free bir tüpe sırayla eklendi ve 65^oC'de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra buz üzerinde soğutuldu, ters çevrildi ve tüp tekrar buza yerleştirildi.

Tablo 3.5. Steril nükleaz-free tüpe eklenen reaktifler

Kalıp RNA	**Toplam RNA**	**0,1 ng-5µg**
Primer	Random Hexamer primer	1 µL
Nukleaz-free dH_2O		12 µL'ye kadar
Toplam hacim		12 µL

Tablo 3.6'da yer alan reaktifler sırasıyla tüpe eklendi. Nazikçe karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj yapıldı. 25°C'de 10 dakika, ardından 37°C'de 120 dakika, 85°C'de 5 dakika, 4°C'de 5 dakika inkübasyon yapılarak sonlandırıldı (tüm basamaklar 1'er döngü).

Tablo 3.6. Soğutulan karışıma eklenen bileşenler

5x Reaksiyon tamponu	4 µL
Ribolock RNase İnhibitör (U/ µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
Toplam Hacim	20 µL

Ters transkripsiyon reaksiyon ürünü doğrudan PCR uygulamalarında kullanılmak üzere -70°C'de muhafaza edildi.

3.9.3. Gerçek zamanlı PCR

QuantStudio™3 Real Time PCR sistemi (Applied Biosystems) ile üç kopya halinde tüm genler için bir qPCR analizi yapıldı. NF-κB ve TRPC6 kullanılarak değerlendirildi. Bir termal profil ve ardından erime eğrisi analiz aşamaları 10 dakika boyunca 95 °C' de, 40 döngü 95 °C' de 15 saniye ve 57°C' de 30 saniye boyunca gerçekleştirildi. Karşılaştırmalı ΔCT yöntemi ve housekeeping geni olarak hβ-actin, gen ekspresyonlarının normalizasyonunda kullanıldı.

3.10. İstatistiksel Analiz

Veri analizi için demo IBM SPSS-sürüm 22.0 (IBM., Armonk, NewYork, ABD) programı kullanılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov Testi ile belirlenmiştir. Gerçek zamanlı PCR ve sitotoksisite sonuçları dışındaki tüm veriler normal dağılıma uygun ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA), normal dağılıma uygun değil ise Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel önemliliğin sınırı $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

3.10.2. Gerçek Zamanlı PCR İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analiz içinde demo IBM SPSS (IBM., Armonk, NewYork, ABD) sürüm 22.0 kullanıldı. Analiz ile doz gruplarındaki değişimlerin kontrol grubuna göre gen ekspresyonlarındaki azalmalar değerlendirildi. Elde edilen değerlerin normallik kontrolü Kolmogorov-Smirnov Testi ile belirlendi. Normal dağılıma uygun çıkan verilerin delta delta Ct verilerine dayanarak FC (kat değişiklikleri) Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi [309] ile analiz edildi. 3 tekrarlı olarak yapılan analizlerden sonra hesaplanan genlerin delta Ct'leri için NF-κB ve TRPC6 ekspresyonlarının kontrol ve tedavi grupları arasında karşılaştırılması Student-t testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 Tüm Hücre Yama Kenetleme Yöntemi ile TRP Kanal Akımlarının Kayıtlanması

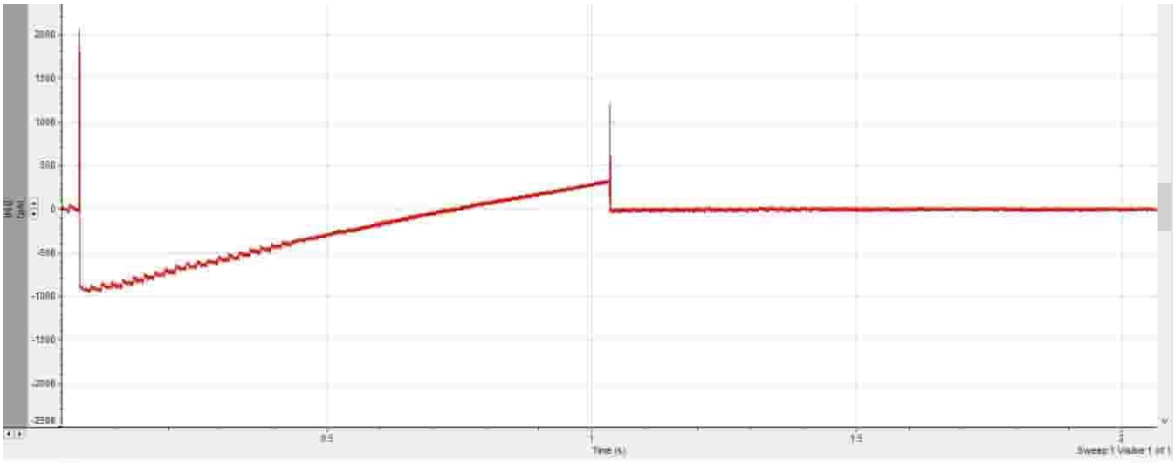
Tüm hücre yama kenetleme deneylerinde belirlenen kenetleme protokolü uygulanarak membran akımları kaydedildi. AB su ekstresinin doza bağımlı olarak TRP kanallarına blokaj bir etki uygulayıp uygulamadığını değerlendirmek amacıyla her grup için maksimum akım verileri kaydedildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Tüm gruplarda 72 saatlik ekstre uygulamasının ardından her bir hücreden 6 defa kayıt alındı. Maksimum akım değerleri HKG'de ortalama 919,77 ± 46,59 pA, MNTK konsantrasyon değerinde (0,115 mg/mL) ekstre uygulanan DDG'de ortalama 588,06 ± 35,80 pA, IC50 konsantrasyon değerinde (0,241 mg/mL) ekstre uygulanan ODG'de ortalama 426,11 ± 13,27 pA ve yüksek doz konsantrasyonu olarak belirlenen MNTK değerinin 4 katı konsantrasyon değerinde (0,46 mg/mL) ekstre uygulanan YDG'de ortalama 94,64 ± 8,45 pA olarak bulundu. Tüm grupların karşılaştırılması Şekil 4.5'de özetlenmiştir. Grupların ortalama akım değerlerine karşı çizilen akım-voltaj grafiklerinin fit edilmesi sonucu elde edilen eğrilerinden (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) elde edilen iletkenlik değerleri ise HKG'de ortalama 6,44 ± 0,46 nS, MNTK konsantrasyon değerinde (0,115 mg/mL) ekstre uygulanan DDG'de ortalama 4,28 ± 0,33 nS, IC_{50} konsantrasyon değerinde (0,241 mg/mL) ekstre uygulanan ODG'de ortalama 3,14 ± 0,10 nS ve yüksek doz konsantrasyonu olarak belirlenen MNTK değerinin 4 katı konsantrasyon değerinde (0,46 mg/mL) ekstre uygulanan YDG'de ortalama 0,73 ± 0,05 nS olarak bulundu (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Kontrol ve doz gruplarının maksimum akım ve iletkenlik değerleri (ort+ss)

	Maksimum Akım (pA)	**İletkenlik (nS)**
HKG	919,77 ± 46,59	6,44 ± 0,46
DDG	588,06 ± 35,80 [a]	4,28 ± 0,33 [a]
ODG	426,11 ± 13,27 [a,b]	3,14 ± 0,10 [a,b]
YDG	94,64 ± 8,45 [a,b,c]	0,73 ± 0,053 [a,b,c]

[a]: HKG ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$), [b]: DDG ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$),
[c]: ODG ile karşılaştırıldığında($p<0,05$),

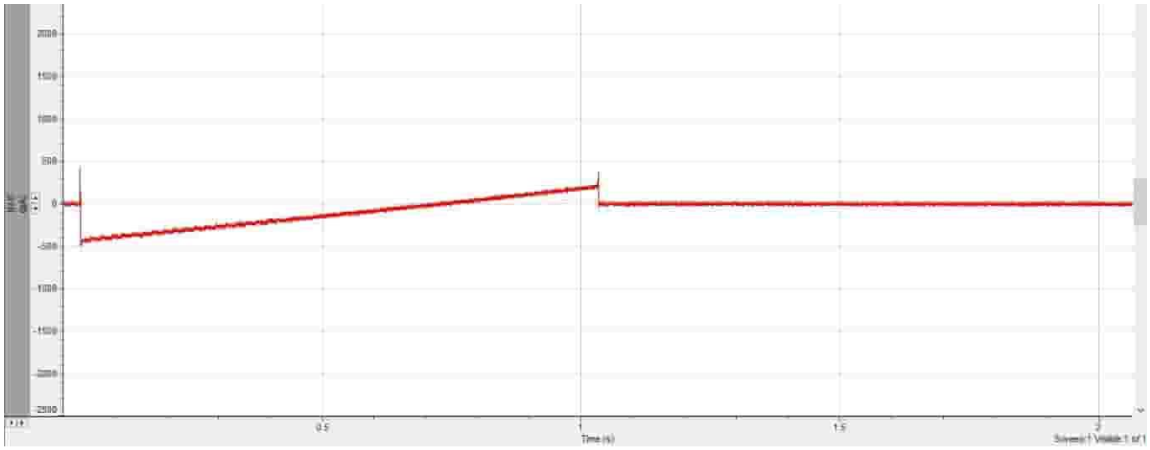
Tablo 4.1'de verildiği üzere elde edilen maksimum akım ve iletkenlik değerleri hem kontrole karşı hem de gruplar arası incelendiğinde tüm doz gruplarının hem akım hem de iletkenlik değerlerinin kontrole karşı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($p < 0,01$). Ayrıca tüm doz grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$). Buna göre doz artışı ile gruplardaki maksimum akım ve iletkenlik değerlerindeki azalma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi.



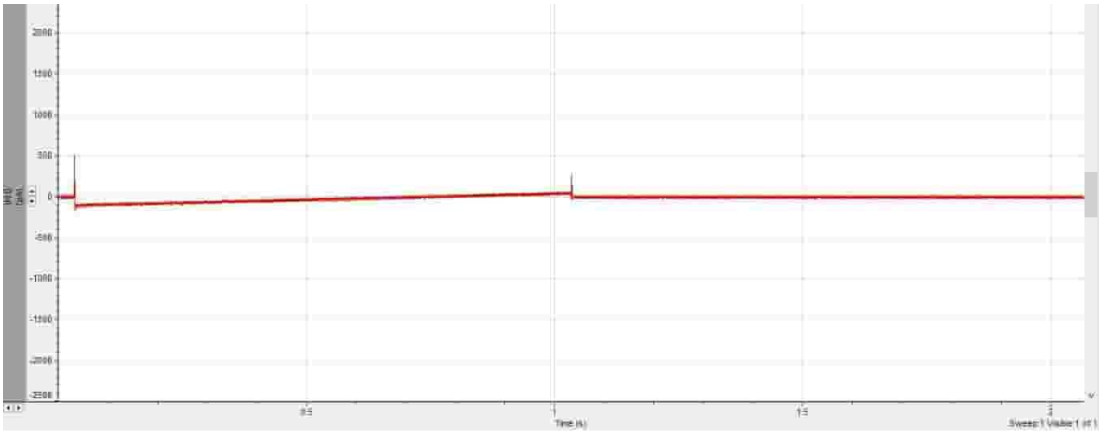
Şekil 4.1. Kontrol grubu için tüm hücre yama kenetleme TRP kanal akımı kaydı ortalaması



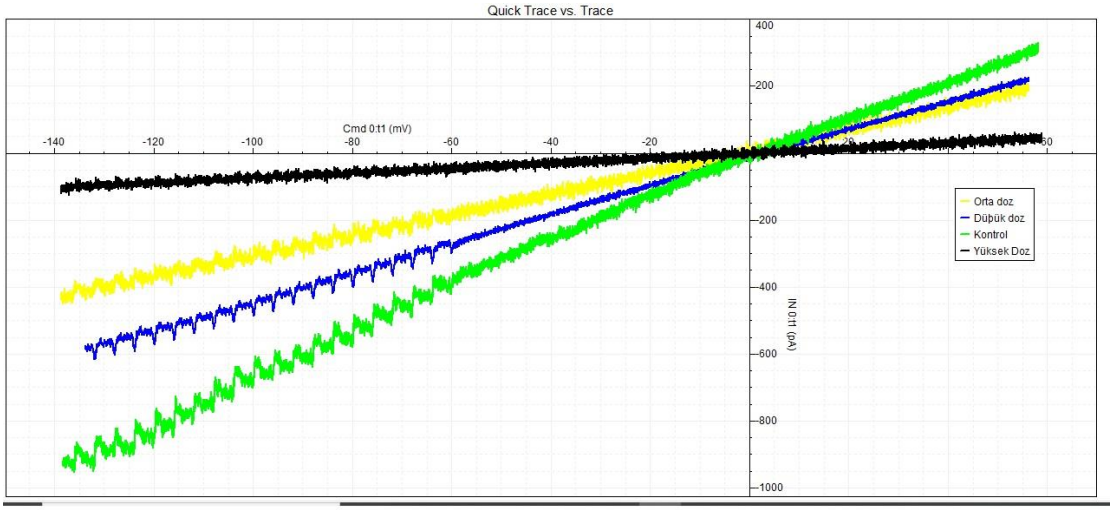
Şekil 4.2. Düşük doz grubu için tüm hücre yama kenetleme TRP kanal akımı kaydı ortalaması



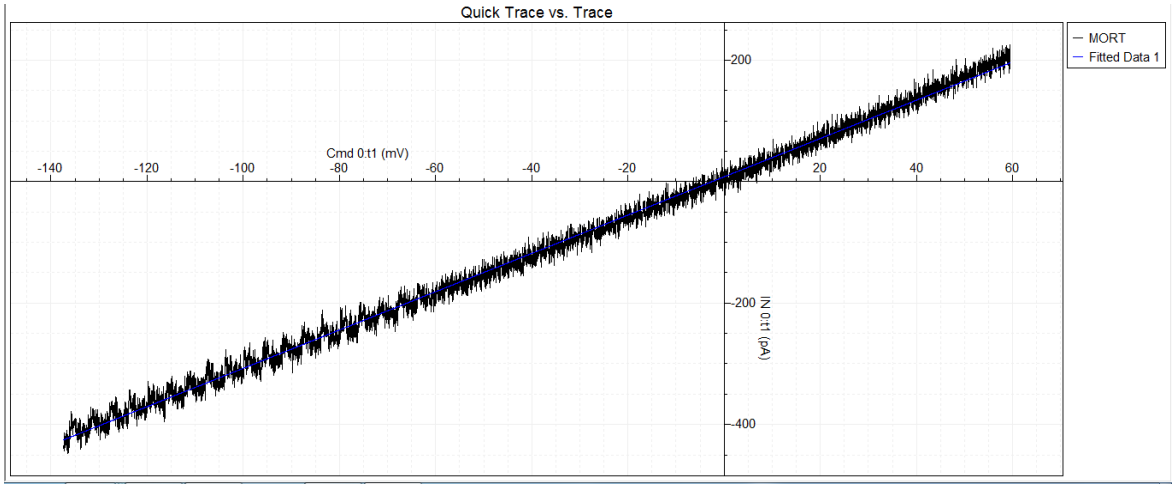
Şekil 4.3. Orta doz grubu için tüm hücre yama kenetleme TRP kanal akımı kaydı ortalaması



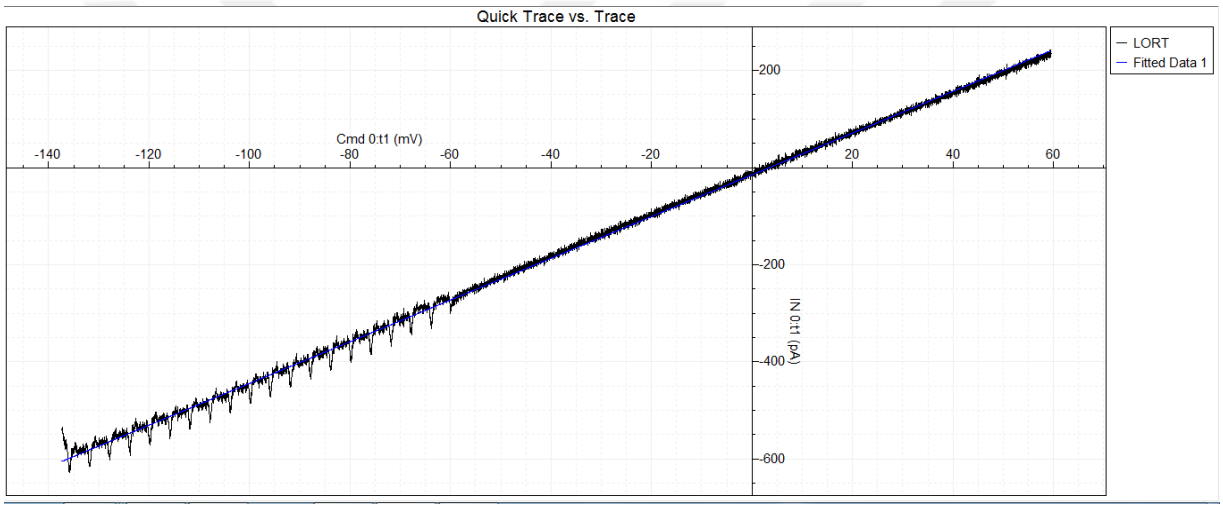
Şekil 4.4. Yüksek doz grubu için tüm hücre yama kenetleme TRP kanal akımı kaydı ortalaması



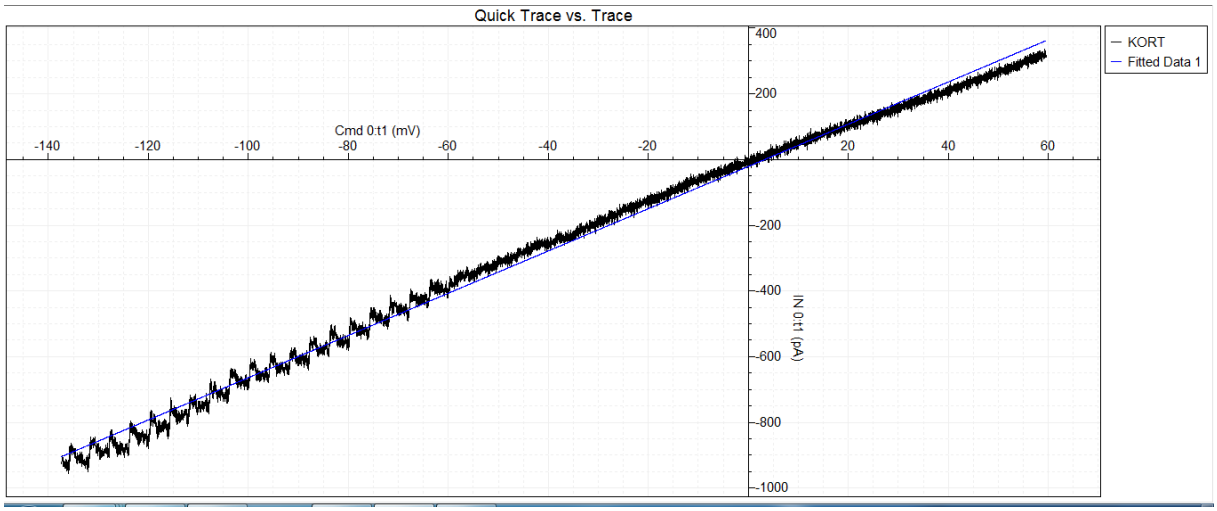
Şekil 4.5. Doz grubuna göre tüm hücre yama kenetleme ile elde edilen maksimum akım kayıtlarının karşılaştırılması



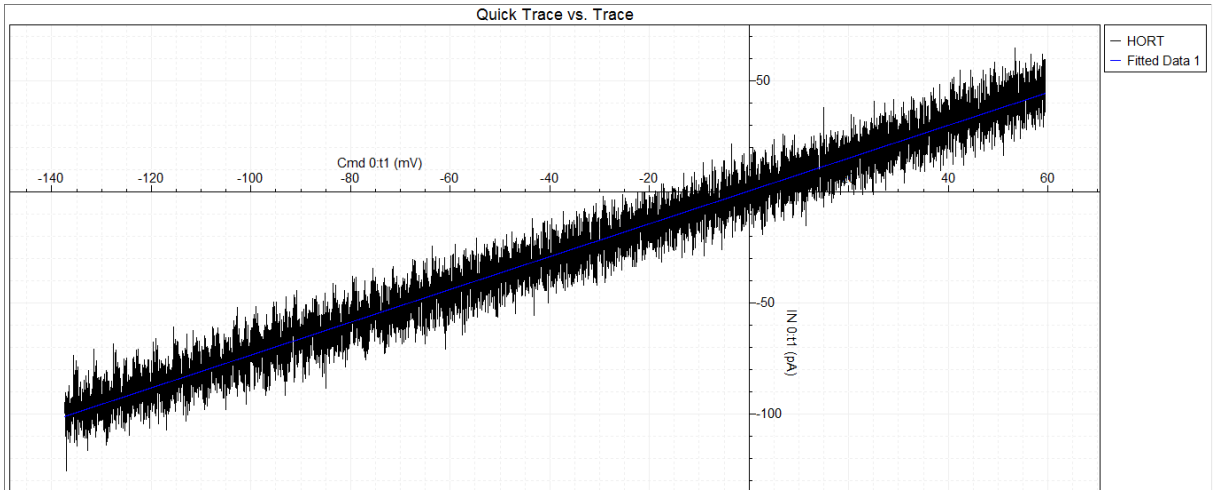
Şekil 4.6. Doğru denklemine fit edilmiş kontrol grubu akım-voltaj eğrisi



Şekil 4.7. Doğru denklemine fit edilmiş düşük doz grubu akım-voltaj eğrisi



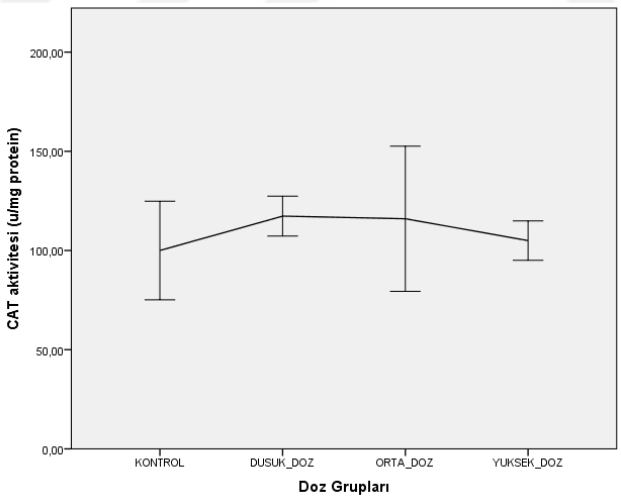
Şekil 4.8. Doğru denklemine fit edilmiş orta doz grubu akım-voltaj eğrisi



Şekil 4.9. Doğru denklemine fit edilmiş yüksek doz grubu akım-voltaj eğrisi

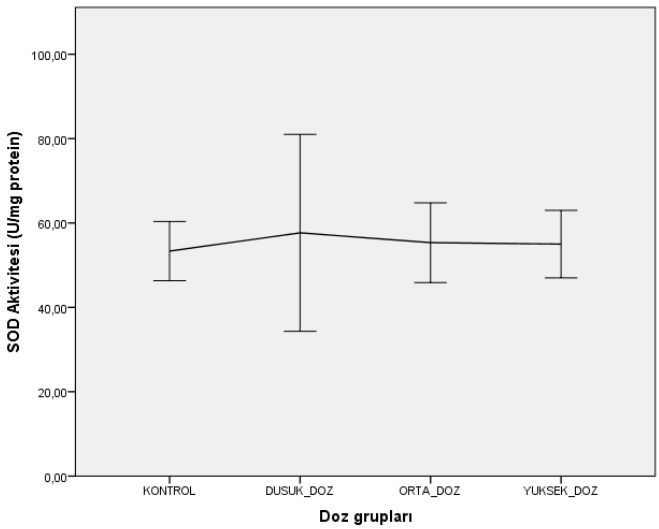
4.3. Oksidatif stresin değerlendirilmesi

DKFZ-EP1NS hücrelerinde ortalama CAT düzeyi (U/mg protein); HKG'de 100 ± 10 U/mg protein, DDG'de 117,3 ± 4 U/mg protein, ODG'de 116 ± 14,7 U/mg protein ve YDG'de 105 ± 4 U/mg protein olarak bulundu (Şekil 4.10). HKG'ye göre analiz yapıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).



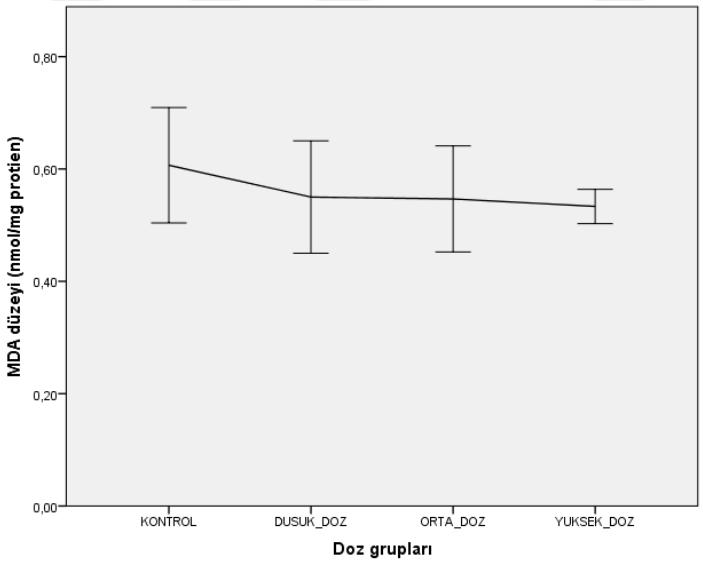
Şekil 4.10. Ortalama CAT aktivitesinin doza bağımlı değişimi

DKFZ-EP1NS hücrelerinde ortalama SOD düzeyi (U/mg protein); HKG'de 53,3 ± 3,5 U/mg protein, DDG'de 57,66 ± 11,6 U/mg protein, ODG'de 55,3 ± 4,7 U/mg protein ve YDG'de 55 ± 4 U/mg protein olarak bulundu (Şekil 4.11). HKG'ye göre analiz yapıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).



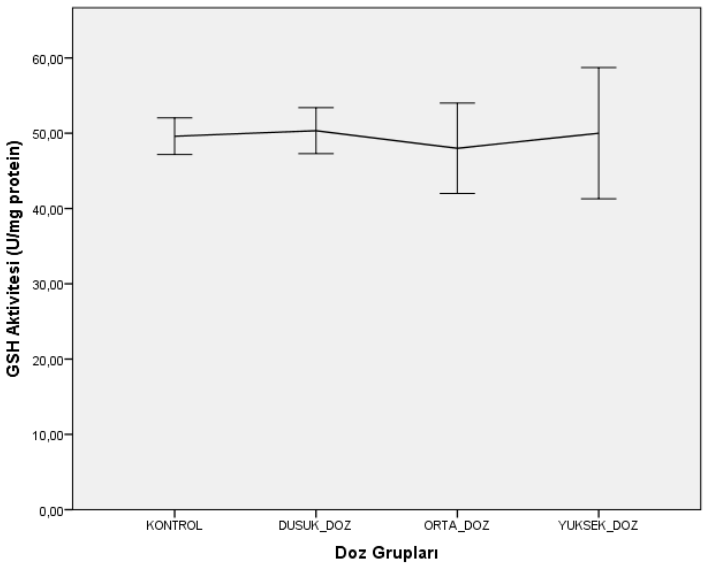
Şekil 4.11. Ortalama SOD aktivitesinin doza bağlı değişimi

DKFZ-EP1NS hücrelerinde ortalama MDA düzeyi (nmol/mg protein); HKG'de 0,66 ± 0,05 nmol/mg protein, DDG'de 0,55 ± 0,05 nmol/mg protein, ODG'de 0,54 ± 0,05 nmol/mg protein ve YDG'de 0,53 ± 0,1 nmol/mg protein olarak bulundu (Şekil 4.12). HKG'ye göre analiz yapıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.12. Ortalama MDA aktivitesinin doza bağlı değişimi

DKFZ-EP1NS hücrelerinde ortalama GSH düzeyi (nmol/mg protein); HKG'de 49,6 ± 1,21 nmol/mg protein, DDG'de 50,3 ± 1,52 nmol/mg protein, ODG'de 48 ± 3 nmol/mg protein ve YDG'de 50 ± 4,35 nmol/mg protein olarak bulundu (Şekil 4.13). HKG'ye göre analiz yapıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.13. Ortalama GSH aktivitesinin doza bağlı değişimi

4.4. Gen Ekspresyonu Analizi

Gen ekspresyonu analizinde HKG, 0.115 mg/mL ekstre uygulanan DDG, 0.241 mg/mL ekstre uygulanan ODG ve 0,46 mg/mL ekstre uygulanan YDG olmak üzere dört grup kullanılarak DKFZ-EP1NS hücre hattı üzerine AB su ekstresinin TRPC6 kanalının ve NF-κB'nın gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. Yapılan istatistik değerlendirme sonucunda hem NF-κB hem de TRPC6 gen ekspresyonlarının tüm gruplarda HKG'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($p<0,01$). Analiz sonuçlarına göre NF-κB ekspresyonunda HKG'ye göre DDG'de (0.115 mg/mL) yaklaşık 5.6 kat, ODG'de (0,241 mg/mL) yaklaşık 23.7 kat ve YDG'de yaklaşık 8,3 kat düşüş belirlenmiştir. Benzer şekilde TRPC6 ekspresyonunun HKG'ye göre DDG'de (0.115 mg/mL) yaklaşık 8,4 kat, ODG'de (0,241 mg/mL) yaklaşık 9,8 kat ve YDG'de (0,46 mg/mL) yaklaşık 10,9 kat azalma tespit edilmiştir. Bu değerlere ait veriler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Gen ekspresyon deneyi sonuçları

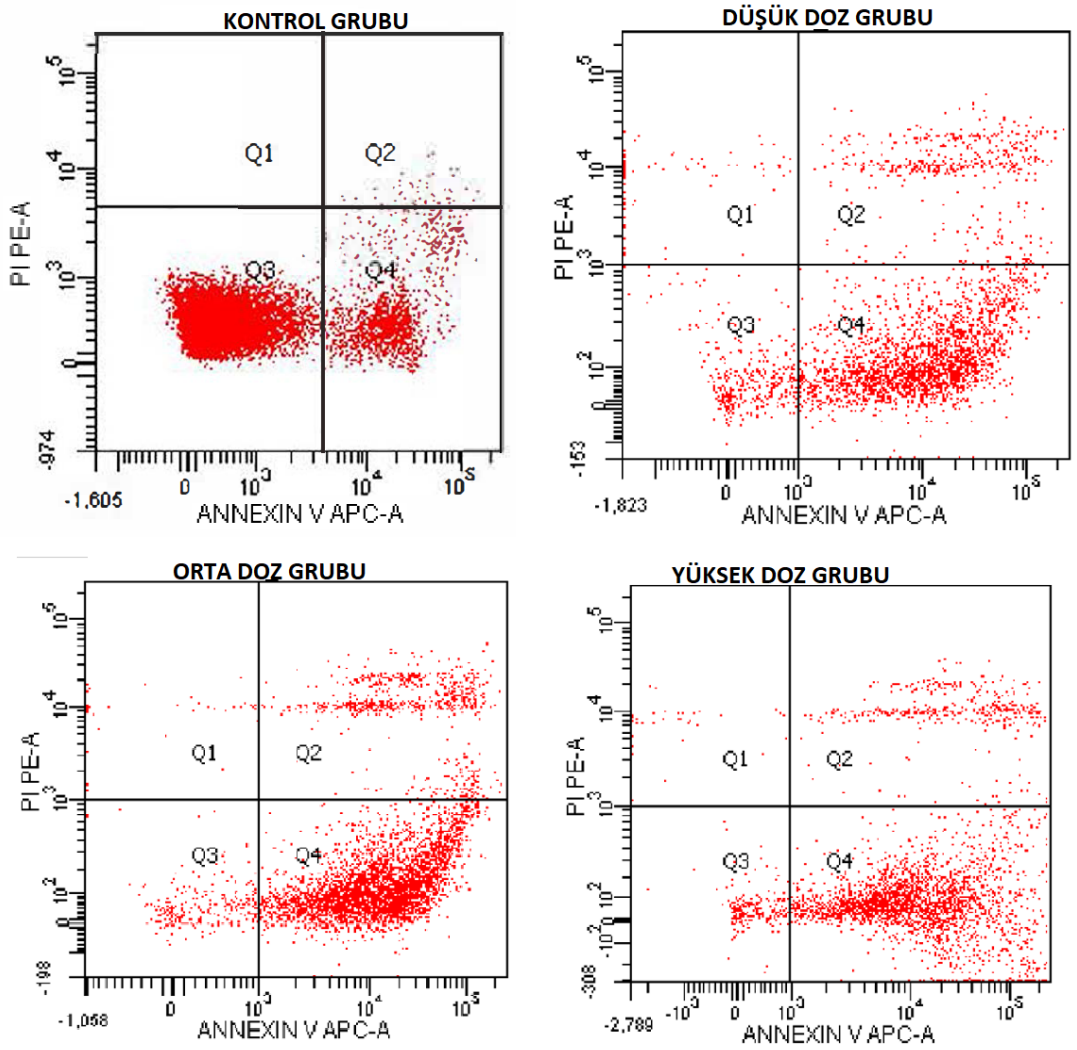
	HKG-DDG	**HKG-ODG**	**HKG-YDG**
NFKB	-5,622556475[a]	-23,7313765 [a]	-8,373229537 [a]
TRPC6	-8,395173345 [a]	-9,81014593 [a]	-10,94260258 [a]

[a]: HKG ile karşılaştırıldığında ($p<0,01$)

4.5. Akım Sitometrisi

4.5.1. Akım Sitometrisi İle Apoptoz Analizi

T75 flasklarda konfluent olduğu belirlenen DKFZ-EP1NS HKG sadece vasat ortamında, belirlenen doz gruplarına göre 0,115 mg/mL (DDG), 0,241 mg/mL (ODG) ve 0,482 mg/mL (YDG) dozlarında AB su ekstresine 72 saat maruz bırakılarak hazırlandı. Elde edilen süspansiyonların Annexin V kiti ile boyaması yapıldı ve akım sitometrisinde canlı hücreler okutularak apoptotik aktivite değerlendirildi. Sunulan diyagramlarda veriler nekrotik hücre (Q1), geç apoptoz (Q2), Canlı hücre (Q3) ve erken apoptoz (Q4) sonuçlarını temsil etmektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. AB su ekstresinin DKFZ-EP1NS hücre hattı üzerinde kontrol ve doz gruplarına göre apoptotik etkisi

Tablo 4.3'de doz gruplarına göre AB ekstresine 72 saat maruz bırakılmış DKFZ-EP1NS hücre hattında uygulanan akım sitometrisi analizi ile yapılan apoptoz testi sonucu Annexin V (+) ve PI (-) boyanan erken apoptotik, Annexin V (-) ve PI (-) boyanan canlı hücrelerin, Annexin V (+) ve PI (+) boyanan geç apoptotik hücrelerin ve Annexin V (-) ve PI (+) boyanan nekrotik hücrelerin doz gruplarına göre dağılımı verilmektedir (ortalama ± standart sapma).

Tablo 4.3. Kontrol ve doz gruplarına göre nekrotik, geç apoptotik, canlı hücre ve erken apoptotik ortalama yüzde oranları ve standart sapma değerleri (ort+ss)

	Nekrotik	**Geç Apoptotik**	**Canlı Hücre**	**Erken Apoptotik**
HKG	0	0,57 ± 0,30	85,63 ± 1,18	14,17 ± 0,58
DDG	2,38 ± 0,34 [a]	14,97 ± 1,40[a]	10,50 ± 1,32[a]	80,70 ± 1,47[a]
ODG	0,8 ± 0,10 [a,b]	13,37 ± 0,68[a]	5,33 ± 0,61[a,b]	81,80 ± 1,31[a]
YDG	1,43 ± 0,30 [a,b,c]	13,03 ± 1,00[a]	7,07 ± 0,40[a,b]	72,03 ± 0,95[a,b,c]

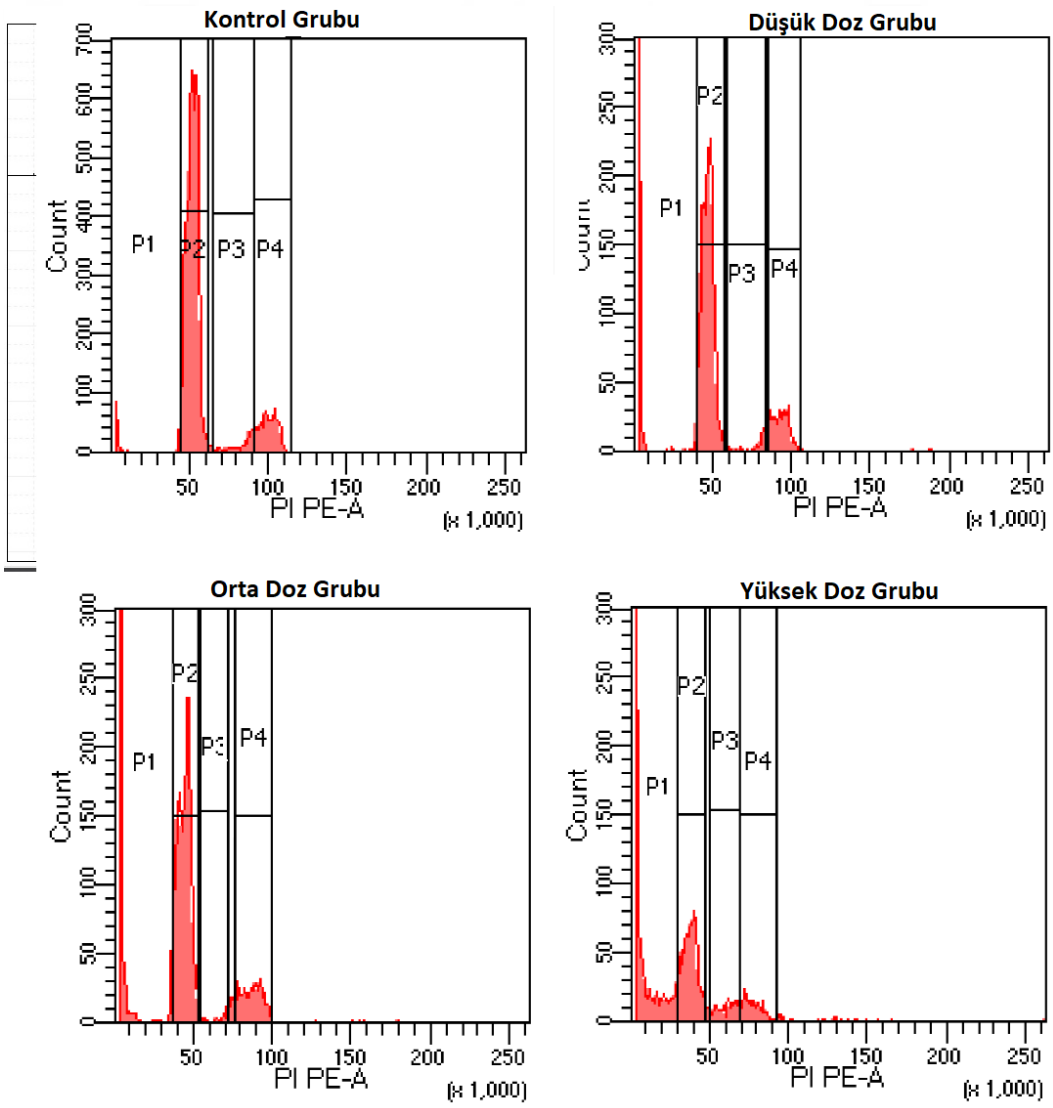
[a]: HKG ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$), [b]: DDG ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$),
[c]: ODG ile karşılaştırıldığında($p<0,05$).

DKFZ-EP1NS hücre hattı üzerine uygulanan AB su ekstresi hücrelerin erken apoptoza girmesine neden olmuştur. Doza bağlı olarak erken apoptoza giren hücre oranında HKG'ye göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). HGK'ye göre gerçekleşen artış DDG ile ODG arasında da sayısal olarak gözlemlenmesine rağmen bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). ODG'den daha yüksek konsantrasyonda AB su ekstresine maruz kalan YDG grubunda ise HKG'ye göre anlamlı bir artış bulunması ile birlikte DDG ve ODG'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). DKFZ-EP1NS hücre hattı üzerine uygulanan AB su ekstresi canlı hücrelerin sayısında azalmaya neden olmuştur. Doza bağlı olarak canlı hücre oranında HKG'ye göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). HGK'ye göre gerçekleşen azalma DDG ile ODG ve YDG arasında da doz artışı ile ters orantılı olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,05$). Ancak ODG ile YDG grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Doza bağlı olarak geç apoptotik hücre oranında HKG'ye göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlenmiştir ($p<0,05$). Doz grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Tüm doz gruplarında HKG'ye göre nekrotik hücre sayısında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Doza bağlı olarak nekrotik hücre oranında HKG'ye göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir

(p<0,05). Doz grupları arasında ise; ODG'de hem DDG'ye hem de YDG'ye göre anlamlı bir azalma gözlemlenirken, YDG'de DDG'ye göre bir azalma ve ODY'ye göre anlamlı bir artış bulunmuştur (p<0,05).

4.5.2. Akım Sitometrisi İle Hücre Döngüsü Analizi

DKFZ-EP1NS hücre hattının 72 saatlik AB su ekstresine maruziyeti sonucunda oluşabilecek anormal DNA'ya sahip hücre hatlarını tespit etmek ve hücre döngüsünün faz dağılımını belirlemek amacı ile hücre döngüsü analizi yapıldı. Analiz için Becton Dickinson Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Almanya) akım sitometri cihazında hücre sayımı yapılarak FACSDiva (version 6.1.3, BD Biosciences) programı kullanıldı. Analiz sonucunda Şekil 4.15'de verilen faz dağılımı elde edildi.



Şekil 4.15. DKFZ-EP1NS hücre hattına AB su ekstresi uygulandıktan 72 saat sonra yapılan akım sitometrisi ile hücre döngüsü analizi faz dağılımları.
(PI: Propidyum iyodür, PE: Fitoeritrin. P1: G_0-faz, P2: G_1-fazı, P3: S-faz, P4: G_2-fazına karşılık gelmektedir.)

DKFZ-EP1NS hücre hattına AB su ekstresi uygulandıktan 72 saat sonra faz dağılımına göre hücrelerin oranları Tablo 4.4'de yüzde ortalama ± standart sapma olarak özetlenmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol ve doz gruplarına göre G_0, G_1, S ve G_2Hücre Döngüsü Fazlarındaki ortalama hücre oranları ve standart sapma değerleri (ort+ss)

	G_0	**G_1**	**S**	**G_2**
HKG	8,40 ± 2,66	73,63 ± 2,37	5,60 ±0,87	12,33 ± 1,27
DDG	23,73 ± 2,83 [a]	56,96 ± 1,70 [a]	6,5 ± 0,50	12,63 ± 0,55
ODG	40,50 ± 0,87 [a,b]	45,63 ± 0,55 [a,b]	2,43 ± 0,57 [a,b]	11,30 ± 0,26
YDG	52,70 ±1,21 [a,b,c]	29,30 ± 0,26 [a,b,c]	8,43 ± 0,37 [a,b,c]	9,13 ± 0,15 [a,b,c]

[a]: HKG ile karşılaştırıldığında (p<0,05), [b]: DDG ile karşılaştırıldığında (p<0,05),
[c]: ODG ile karşılaştırıldığında(p<0,05).

DKFZ-EP1NS hücrelerine AB su ekstresi uygulandıktan 72 saat sonra:

Doza bağlı olarak G_0-fazındaki hücre oranında HKG'ye göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0,05). Bu artış DDG'de % 23,73 ± 2,83, ODG'de % 40,50 ± 0,87 ve YDG'de % 52,70 ±1,21 olarak belirlenmiştir. Ayrıca doz grupları arasında da G_0-fazında bulunan hücre oranında doz artışı ile doğru orantılı anlamlı bir artma tespit edilmiştir (p<0,05).

Doza bağlı olarak G_1-fazındaki hücre oranında HKG'ye göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p<0,05). Bu azalma DDG'de % 56,96 ± 1,70, ODG'de % 45,63 ± 0,55 ve YDG'de 29,30 ± 0,26 olarak belirlenmiştir Ayrıca doz grupları arasında da G_1-fazında bulunan hücre oranında doz artışı ile ters orantılı anlamlı bir azalma belirlenmiştir (p<0,05).

Doza bağlı olarak S-fazındaki hücre oranında HKG'ye göre DDG hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir (p<0,05). HKG ile DDG arasında doza bağlı sayısal bir fark bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05). Buna göre ODG'de % 2,43 ± 0,57 azalma ve YDG'de % 8,43 ± 0,37 artma belirlenmiştir. Tüm doz grupları arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). DDG grubuna göre ODG'de azalma, YDG'de ise artış anlamlı olarak bulunmuştur (p<0,05). ODG'ye göre YDG'de doz bağımlı anlamlı bir artış tespit edilmiştir (P<0,05).

Doza bağlı olarak G_2-fazındaki hücre oranında HKG'ye göre sadece YDG'de % 9,13 ± 0,15 olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı bir fark (azalma) gözlenmiştir (p<0,05). HKG ile DDG

arasında sayısal bir artma ve ODG arasında sayısal bir azalma bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Doz grupları arasında ise DDG ile ODG arasında anlamlı bir fark gözlemlenmezken ($p>0,05$), YDG ile arasında ve ODG ile YDG arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma ile geleneksel tedavi yöntemlerinde hem ülkemizde hem de dünyanın pek çok bölgesinde yaygın bir şekilde kullanılan *Achillea biebersteinii* Afan.'nın DKFZ-EP1NS (C11orf95-RELA) ependimal tümör hücreleri üzerine etkileri sitotoksik, elektrobiyofiziksel, biyokimyasal ve moleküler olarak incelenmiştir. Ekstrenin DKFZ-EP1NS hücrelerinde sitotoksik etki göstermesi, TRP kanal akımını bloke etmesi, TRPC6 ve NF-κB ekspresyonlarını azaltması sonuçları ile ependimoma tedavisinde küratif bir ilaç olarak kullanılabileceğine dair ipuçları tespit edilmiştir.

Gliomaların tedavisi, yalızca belirli lokalizasyonları değil, aynı zamanda glioma hücrelerinin yüksek oranda proliferatif, yüksek oranda invaziv, yüksek derecede anjiyojenik ve yüksek oranda metabolik anormallikler dahil olmak üzere birçok habis özelliğe sahip olması nedeniyle dikkate değer klinik zorluklar çıkarır [2-4]. Tüm bu özellikler gliomaları nüks oranı ve ilaç rezistansı oldukça yüksek tümörler yapar [5]. Glioma için yeni ve etkili moleküler ilaç hedefleri bulmak hem temel hem de klinik araştırmalar için acil ve kritik bir görevdir. *İn-vitro* kanser modellemeleri, yeni kemoterapötik araştırmalarda, kemoterapötik ilaçların denenmesinde ve bitki ekstrelerinin anti-kanser özelliklerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu bağlamda teşhis edilmiş olan belirli kanser türlerinden izolasyonu sonrası karakterize edilip ticari kanser hücre hattı şeklinde temin edilerek kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan DKFZ-EP1NS hücre hattı glioma kökenlidir ve C11orf95-RELA tanısı alınmış hastalardan izole edilerek türetilmiştir [303].

Bu çalışmada kullanılan AB ise Karaman ilinin yüksek rakımlı bölgelerinden toplanmış ve ultrasonik yöntemlerle bitkinin TÜK'nin su ekstresi elde edilmiştir. Ekstrenin uygulama dozunu belirlemek için sitotoksisite analizlerinden biri olan MTT yönteminden faydalanılmıştır. MTT analizi ile bitkinin IC_{50} değeri 0,241 mg/mL olarak belirlenmiş ve AB su ekstresinin DKFZ-EP1NS hücreleri için belli doz üzerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir. IC_{50} değeri hücre canlılığının yarıya düştüğü değerdir. Yapılan literatür taramalarında AB su ekstresinin IC_{50} değerinin belirtildiği bir çalışmaya rastlanmamış olup farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstrelerin glioma hücresi olmayan hücre hatlarında tespit edilen IC_{50} değerleri mevcuttur. Bu çalışmalarda metanol ekstresi için insan deri fibroblast hücrelerinde 512 µg/mL, MCF7 hücrelerinde <250 µg/mL, DMSO ekstresi için insan gastrik adenokarsinoma hücrelerinde 32,773 µg/mL, MCF7 hücrelerinde 47,468 µg/mL, insan kolorektal karsinoma hücrelerinde 41,103 µg/mL, insan akciğer karsinoma hücrelerinde 57,024 µg/mL, insan melanoma hücrelerinde 36,178 µg/mL, insan karaciğer hepatoma hücrelerinde 41,806 µg/mL, etanol ekstresi için insan gastrik adenokarsinoma hücrelerinde 30,062 µg/mL, insan fetal deri

fibroblast hücrelerinde 183,650 µg/mL, hekzan ekstresi için kolerektal karsinoma hücrelerinde 473,5 µg/mL ve kloroform ekstresi için kolorektal karsinoma hücrelerinde 211,2 µg/mL IC_{50} değerleri rapor edilmiştir.[16, 300, 310-312]. Bu çalışmalara göre AB'nin farklı kanser hücreleri için belirlenen IC_{50} değerleri 30,062 µg/mL ile 512 µg/mL değerleri arasında değişmektedir. Bizim DKFZ-EP1NS ependimoma hücreleri için hesapladığımız 241 µg/mL IC_{50} değeri de bu aralıkta yer almaktadır.

Çalışmamızda MTT analizi AB ekstresinin hücre proliferasyonunu azalttığını göstermiştir. Hücre proliferasyonunda rol oynayan en önemli faktörlerden biri hücre içi kalsiyumudur. Çeşitli fizyolojik rollerine ek olarak, Ca^{+2} sinyalleşmesi, çeşitli patolojik durumlarda olduğu gibi kanserlerde de rol oynar. Kanserin ilerlemesi için kritik olan çeşitli hücresel süreçler, proliferasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastaz dahil Ca^{+2} sinyaline bağımlıdır [120]. Hücre içi Ca^{+2}'nın düzenlenmesi hem ekstraselüler alandan Ca^{+2} girişini hem de ER veya mitokondri içindeki hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımını içerir. Kalsiyum kanalları sadece Ca^{+2}'nın konsantrasyon gradyanı altında kolay difüzyonuna izin vermekle kalmaz, aynı zamanda ER'den Ca^{+2}'nın ER Ca^{+2} kanalları aracılığıyla hücre sitozolüne akışını sağlar. Ca^{+2}'nın hücre içine akışında yer alan plazma membran kanalları arasında VGCC ve TRP iyon kanalları bulunur. Hücre proliferasyonundaki azalmanın mekanizmasını açıklayabilmek için bu çalışmada elektrobiyofiziksel yöntemlerden tüm hücre modunda yama kenetleme tekniği kullanılarak DKFZ-EP1NS hücrelerinde TRP kanal akımları kayıtlanmış ve bu akımların doza bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. TRP kanalları, hücre büyümesi, proliferasyon, farklılaşma, migrasyon ve apoptoz gibi çeşitli hücresel fonksiyonları kontrol ettikleri bir dizi dokuda eksprese edilir [313]. TRP kanalları hem kimyasal hem de fiziksel uyaranların yanı sıra hücre mikroçevresindeki değişiklikler yoluyla aktive edilir [313]. Yapılan çalışmalar TRP kanallarının glioma ilerlemesindeki önemli rollerini göstermiştir. Bu çalışmaların birinde GBM multiform hücre (D54MG) hücrelerinde, hücrelerin SKF96365 (seçici olmayan bir TRPC kanal blokeri) ile tedavisi, hücre proliferasyonun ve sitokinezin inhibisyonuna yol açmıştır [314]. Başka bir çalışmada, shRNA aracılı TRPC1'in baskılanması veya D54MG glioma hücrelerinde SKF96365 ile tedavisi, hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve hücre bölünme sürecinin tamamlanmadan kesilmesi ile sonuçlanmıştır [315]. Bu çalışma ayrıca bir flank tümör modelinde TRPC1'in shRNA baskılanmasının tümör boyutunu azalttığını göstermiştir [315]. Bizim çalışmamızda da AB bir TRP kanal blokeri gibi işlev görmüştür. TRP kanal akımları düşük doz grubunda kontrolün kontrole göre .%36 orta doz grubunda %53.6 ve yüksek doz grubunda %89,7 oranında azalmıştır. Benzer şekilde kanalların iletkenliği düşük doz grubunda kontrole göre % 33.5, orta doz grubunda %51.24 ve yüksek doz grubunda % 88.5 oranında azalmıştır. Kanal iletkenliğindeki azalma AB'nin TRP kanal iletkenliğini azaltarak etki gösterdiğine işaret etmektedir. Kanal akımındaki azalmayı etkileyen bir başka faktör kanal proteininin

ekspresyonundaki azalmadır. Bunu test etmek için çalışmamızda AB'nin TRP kanal ailesinden TRPC6'nın ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada kanal protein ekspresyonu için oldukça kalabalık olan TRP kanal ailesinden TRP6'ının seçilme nedeni TRPC6'nın mesajcı RNA (mRNA)'sının ve protein seviyelerinin, normal beyin dokularına kıyasla insan glioma dokularında spesifik olarak arttığının gösterilmiş olmasıdır [125]. DKFZ-EP1NS hücrelerinde mRNA ekspresyonu AB uygulanan gruplara göre oldukça yüksektir. Çalışmamız sonucunda da TRPC6 ekspresyonu DDG grubunda kontrol grubuna göre 8.4 kat, ODG'de 9,8 kat ve YDG'de 10,9 kat azalmıştır. Ding ve arkadaşları glioma malignite dereceleri ile ilgili yaptıkları araştırmada, U251MG, U87MG ve T98G glioma hücrelerinde yüksek seviyelerde TRPC6 kanal ekspresyonunun bulunduğunu, ekspresyondaki gerçekleştirilen inhibisyonun hücre büyümesini baskılayan PDGF tarafından uyarılan Ca^{+2} akışında bir azalmaya neden olduğunu ve G_2/M fazında hücre döngüsü tutuklanmasına neden olduğunu bildirmişlerdir [125]. Chigurupati ve arkadaşlarının normal dokular ile GBM numuneleri arasında TRPC6'nın ekspresyonunu karşılaştırdıkları çalışmada, klinik olarak TRPC6 ekspresyonunun GBM numunelerine göre yüksek olduğu ve TRPC6'nın GBM tedavisinde umut vadedici terapötik bir hedef olabileceğini rapor etmişlerdir [160]. Alptekin ve arkadaşlarının GBM hastalarında TRP kanal genlerinin ekspresyon düzeylerini araştırmak ve TRP gen ekspresyonları ile hastaların sağkalımı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, farklı TRP kanalları ile birlikte TRPC6 gen ekspresyonunun GBM hastalarında anlamlı derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir [316]. Çalışmamızda glioma hücre proliferasyonunda önemli rolü olduğu gösterilen TRPC6 kanal ekspresyonunun AB uygulanması ile azalması AB'nin DKFZ-EP1NS hücrelerinde hücre proliferasyonunu azaltarak tümör büyümesini engelleyebileceğini düşündürmüştür.

Çok yönlü doğası nedeniyle NF-κB, anti-apoptotik genlerin, hayatta kalma faktörlerinin, pro-anjiyojenik ve pro-motilite (migrasyon ve invazyon dahil) moleküllerinin ekspresyonunu arttırmada önemli roller oynayan farklı onkojenik yollar arasında önemli bir rol oynar ve DNA hasar yanıtının düzenlenmesi yoluyla radyo ve kemorezistans mekanizmalarına aracılık edebilir. NF-κB'nın yukarı regülasyonu, tümör ilerlemesinde ve tedavi direncinde, sıklıkla onkogenezisin ileri evreleri ile ilişkilendirilmiştir [317]. Bu çalışmada AB'nin DKFZ-EP1NS hücrelerinde NF-κB'nın ekspresyonu üzerine etkisi de incelenmiştir. Ependimal tümörlerden DKFZ-EP1NS (C11orf95-RELA) RELA füzyonuyla tanımlanır. Kanonik NF-κB sinyalinin ana efektörünü içeren bu kimerik gen, vakaların % 70'inden fazlasında bulunur ve agresif bir fenotip ve kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir. Bugüne kadar yedi farklı ZFTA-RELA füzyon transkripti rapor edilmiştir ve bunların tümü, NF-κB'nin anormal aktivasyonu ile ilgilidir. ZFTA'nın hala karakterize edilmemiş olmasına rağmen, RELA'nın hücre trafiği ve diğer transkripsiyon düzenleyicileri ile etkileşimini bozduğu öne sürülmektedir [317]. Parker ve

arkadaşları yaptıkları çalışmada ST EPN'lerin üçte ikisinden fazlasının kanonik NF-κB sinyalinin ana efektörü olan RELA ile C11orf95 geni arasında onkojenik füzyonlar içerdiğini göstermişlerdir [51]. Griesinger ve arkadaşlarının PF-A EPN'lerde IL-6 aşırı ekspresyonunun altında yatan potansiyel epigenetik düzensizliği tanımlamak için yaptıkları çalışmada bir transkripsiyonel baskılayıcısı ve aynı zamanda da NF-κB sinyali düzenleyici protein olan LDOC1'in susturulmasının NF-κB hedef genlerindeki artışla ilişkili olan RELA'nın gen transkripsiyonunda önemli bir artışla sonuçlandığını rapor etmişlerdir [318]. Ozawa ve arkadaşları RELA tarafından düzenlenen hedef genleri keşfetmek için Kromatin İmmünopresipitasyon Dizilimi deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak ise aktif NF-κB'nın bloke edilmesinin RELA füzyon EPN tedavisi için uygun bir seçenek olacağını belirtmişlerdir [319]. Aubin ve arkadaşlarının, NF-κB hedef genleri için zenginleştirilmiş mezenkimal benzeri bir gen ekspresyon imzası ile karakterize edilen bir hücre popülasyonunun (tümör kaynaklı reaktif glia) varlığını tanımlamak için yaptıkları çalışmada EPN'nin mezenkimal gen ekspresyon imzası kötü prognoz ile (tümör hücresi proliferasyonu ve migrasyonu) ilişkilendirilmiştir [320]. Ayrıca hem Parker ve arkadaşları hem de Figarella-Branger ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarla anormal NF-κB aktivitesini RELA füzyon geni tarafından yönlendirilen ST EPN'nin ayırt edici özelliği olarak tanımışlardır [51, 54]. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularımız NF-κB ekspresyonunda HKG'ye göre DDG'de yaklaşık 5.6 kat, ODG'de yaklaşık 23.7 kat ve YDG'de yaklaşık 8,3 kat azalma olduğunu göstermiştir. Bu sonuç AB uygulamasının NF-κB'yi bloke ederek EPN tedavisinde olumlu rolü olabileceğini düşündürmüştür.

Apoptoz programlanmış hücre ölümü mekanizması olarak tanımlanır. Apoptotik aktivitenin artması bazı kanser türlerinin gelişimi ve ilerlemesinin engellenmesinde önemli rol oynar. Bu çalışmada AB'nin farklı dozlarının DKFZ-EP1NS hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi belirlenmiş ve AB su ekstresinin DKFZ-EP1NS hücre hattında doza bağlı olarak apoptotik aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. AB uygulaması çok düşük oranlarda (DDG-% 2,38 ± 0,34, ODG-% 0,8 ± 0,10 ve YDG- % 1,43 ± 0,30) nekrotik hücre oluşumuna neden olmuştur. Düşük oranda geç apoptoz ve yüksek oranda erken apoptozu indüklemiştir. 72 saatlik AB su ekstresi maruziyeti sonucunda DDG'de hücrelerin % 80,70 ± 1,47'sinin erken apoptozda ve % 14,97 ± 1,40'ının geç apoptozda olduğu belirlenmiştir. ODG'de hücrelerin % 81,80 ± 1,31'inin erken apoptozda ve % 13,37 ± 0,68'inin geç apoptozda, YDG'de ise hücrelerin % 72,03 ± 0,95'inin erken apoptozda ve % 13,03 ± 1,00'inin de geç apoptozda olduğu sonucuna ulaşılmıştır. AB'nin kanser hücreleri üzerine apoptotik aktivitesinin incelendiği çok sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır. Meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerinde yapılan çalışmada AB ile sentezlenen Ag-nanopartikülleri *in-vitro* olarak hücrelere farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Sonuç olarak hücre canlılığında bir azalmaya ve nükleik asitte parçalanmaya yol açmıştır. Ayrıca spesifik hücre döngüsü ve programlanmış hücre ölümü genlerini baskılayarak MCF-7 hücre

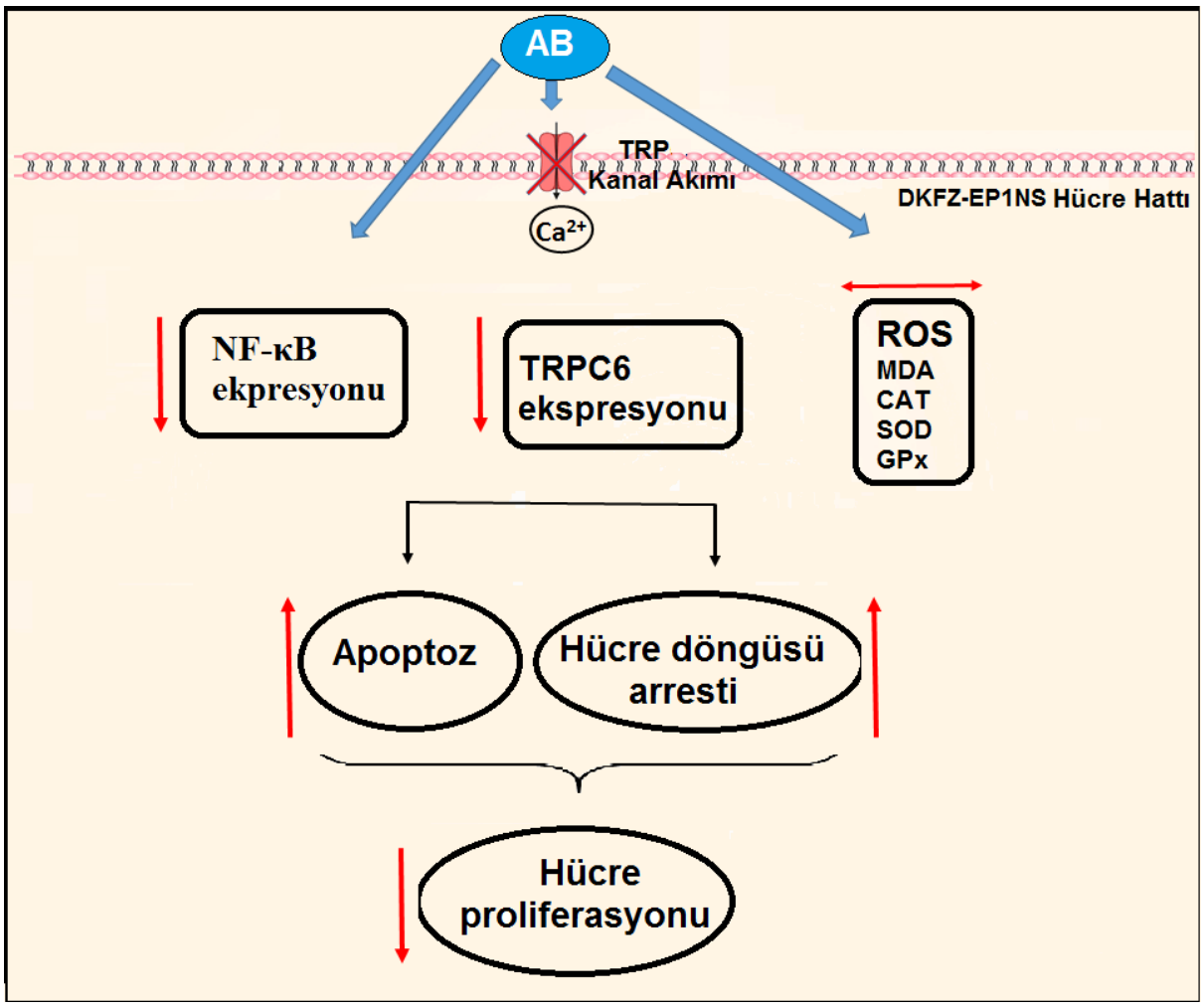
hattında proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir [18]. Bitki içeriğinde bulunan polifenolik bileşikler ile de yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. İçeriklerden luteolin ile yapılan çalışmalarda meme kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri oral kanser, böbrek kanseri hücrelerinde apoptozun indüklenmesine yol açtığı bildirilmiştir [248]. AB fenolik içeriklerinden olan kuersetin ile yapılan çalışmalarda ise meme kanseri hücrelerinde apoptozu artırdığı belirtilmiştir [254]. Ayrıca kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği, pankreas kanseri hücrelerinde apoptozu desteklediği, akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediği, gastrik kanser hücrelerinde beyin kanseri hücrelerinde nekrotik hücre ölümüne neden olduğu ve baş-boyun kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği rapor edilmiştir [254]. Çok fazla çalışmaya konu olmuş olan AB fenolik içeriklerinden kafeik asit ile yapılan çalışmalarda karaciğer hücrelerinde TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand olan TRAIL sinyalinin indüklendiği ve kaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla hücreyi apoptoza götürdüğü, rahim ağzı kanseri hücrelerinde mitokondriyal apoptotik yolla hücre ölümüne neden olduğu, kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu desteklediği ve akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu uyararak hücre bölünmesini bloke ettiği sonuçları bildirilmiştir [254]. Ferulik asit ile yapılan çalışmalarda meme kanseri, servikal kanser, kolon kanseri, karaciğer kanseri, akciğer kanseri, pankreas kanseri ve osteosarkoma hücrelerinde apoptozu indüklediği belirtilmiştir [321]. Kaempferol ile yapılan çalışmalarda meme kanseri ve kolanjio karsinomu hücrelerinde apoptoz yolağını indüklediği, fibrokarsinom hücrelerinde NF-κB'yi engelleyerek otofajik hücreyi uyardığı, baş-boyun kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği, karaciğer hücrelerinde hücreyi apoptoza yönlendirdiği, sinir sistemi kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığı, yumurtalık kanseri hücrelerinde apoptotik proteinlerin düzenlenmesini sağladığı ve apoptozu tetiklediği, pankreas kanseri hücrelerinde apoptozu desteklediği ve cilt kanser hücrelerinde apoptozu uyardığı rapor edilmiştir [273]. Myricetin ile yapılan çalışmalarda yumurtalık kanseri, insan plasental karsinomu, kolon kanseri, glioma, karaciğer kanseri ve troid kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği bildirilmiştir [274]. Rutin ile yapılan çalışmalarda ise rahim ağzı kanseri hücrelerinde kaspaz-3'ün aktivasyonunu indükleyerek apoptozu tetiklediği belirtilmiştir [275]. Literatürde yer alan çalışmalarda da rapor edildiği üzere AB su ekstresinin diğer kanser hücreleri ve glioma çeşitlerinde belirtildiği gibi çalışmamız sonucunda da DKFZ-EP1NS hücre hattında da apoptozu indüklediği belirlenmiştir.

Apoptozun indüklenmesi hücrelerin DNA içeriğinin, hücre siklusunun fazları (G, S ve M fazları) ile ilişkili olması sebebiyle hücre siklusunda oluşabilecek tutuklanma ile bağlantılı olabilir. Literatürde AB ekstrelerinin kanser hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkilerinin çalışıldığı bir araştırma bulunmasa da fenolik bileşenlerinin çeşitli kanser hücre tiplerinde hücre döngüsü üzerine etkilerinin araştırıldığı birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda fenoliklerin çeşitli kanser hücrelerinde çalışmalara göre farklı fazlarda olsa da hücre döngüsü

tutuklanmasına sebep olduğu rapor edilmiştir [247, 254, 273, 275, 278, 321]. Ayrıca AB fenolik içeriklerinin ya da bu içeriklere sahip farklı bitkilerin EPN'lerde olmasa da çeşitli gliomaların hücre döngüsü üzerine etkilerini kapsayan araştırmalar mevcuttur. Glioma hücrelerinde kafeik asit ve ferulik asit içeren *Leonurus sibiricus* ekstresi kullanılarak yapılan çalışmada ekstre tedavisinin S- ve G_2/M-fazı hücre döngüsü durmasına [262], *Menyanthes trifoliata* L. bitkisi ekstresi kullanılan başka bir çalışmada ise ekstrenin G_2/M-fazı hücre döngüsü durmasına [270] neden olduğu rapor edilmiştir. Rutin kullanılarak insan glioma hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada ise rutinin hücre döngüsü G_2-fazı tutuklanmasına yol açtığı sonucuna ulaşılmıştır [279]. Bu sebeple bu çalışmada 72 saat AB su ekstresine maruz kalan DKFZ-EP1NS hücre hatlarında hücre siklusu dağılımı ve hücresel proliferasyon aktivitesini açıklayabilmek için hücrenin siklusun hangi fazında ne miktarda bulunduğu bilgisini veren akım sitometri analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda HKG'de hücrelerin % 73,63'ü G_1-fazında iken, AB su ekstresi uygulanmış olan doz gruplarında DDG'de hücrelerin % 56,96'sı G_1-fazında, ODG'de hücrelerin % 40,50'sinin G_0 ve % 45,63 ise G_1-fazında, YDG'de ise hücrelerin % 52,70 G_0-fazında olduğu tespit edilmiştir. Literatürdeki farklı çalışmalarda da belirtildiği üzere AB fenolik içerikleri hücre siklusunun farklı fazlarında hücre tutuklanmasına yol açmıştır. Bu çalışmada da AB su ekstresinin G_1-fazında hücre döngüsü tutuklanmasına neden olarak apoptozu indüklediği ve bunun da kanser hücrelerinin proliferasyonunun azalmasına yol açtığı düşünülmüştür.

Farklı karakteristik özellikleri gün geçtikçe ortaya çıkan EPN'lerde antioksidan mekanizmalarında da literatürde ilginç raporlar yer almaktadır. Tümör dereceleri ile antioksidan enzim seviyelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada EPN'lerde antioksidan enzimlerin tümör derecesi ile ters orantılı olarak değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada artan antioksidan seviyesinin oligodendroglial ve diffüz astrositik beyin tümörlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilirken, EPN'lerde daha iyi bir prognoz ile ilişkilendirilmiştir [322]. Bir antioksidan enzim nötrleştirici süperoksit anyonu olan SOD, çoğu kanser türünde ve gliomalarda kötü sağkalımla ilişkilendirilmiştir. EPN'lerde ise SOD klinik veya biyolojik parametrelerle herhangi bir ilişki göstermemiştir [322]. Kato ve arkadaşlarının içerisinde EPN'lerin de bulunduğu 158 insan primer beyin tümörü serisinde indüklenebilir NO sentaz ekspresyonunun biyolojik önemini belirlemek için SOD analizi yaptıkları çalışmada EPN'lerde pozitif reaksiyon görülmediği rapor edilmiştir [323]. Bu çalışmada da yapılan biyokimyasal analizler sonucunda AB ekstresine doza bağımlı olarak maruz bırakılan DKFZ-EP1NS hücrelerinde MDA seviyeleri ile SOD, CAT ve GSH aktiviteleri analizleri yapılmıştır. Gruplar arasında sayısal olarak farklılıklar olsa da analizler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Literatürde farklı glial tümör hücrelerinde yapılan biyokimyasal analizlerde yukarıda da belirtildiği üzere birbiri ile çelişen sonuçlara rastlanmaktadır [294, 324]. Ayrıca EPN üzerine yapılan araştırmalarda antioksidan aktiviteler ile EPN arasında bir ilişki olmadığı belirtilmektedir. Elde

edilen sonuçlarda anlamlı fark bulunmaması üzerine analizlerin tekrar yapılmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. EPN'ler diğer kanser türleri ile hatta diğer glioma türleri ile ortak karakteristikler gösterse de henüz mekanizmaları hakkında bilinenler ve üzerine yapılan araştırmalar sınırlıdır. Ancak sonuçlarımız literatürde yer alan diğer kanser türlerindeki antioksidan analizleri ile çelişse de EPN'ler konusunda yapılmış olan sınırlı sayıdaki çalışma ile uyumludur. Çalışmamızın sonuçları malondialdehit seviyeleri ile oksidatif stres belirteci olan katalaz, süperoksitdismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri ile EPN'ler arasında bir ilişki olmadığını rapor eden çalışmaları desteklemektedir.



Şekil 5.1. AB su ekstresinin DKFZ-EP1NS hücreleri üzerine etkileri

Ependimoma tedavileri konusunda çalışmalar devam ediyor olsa da sınırlı sayıdadır. Ayrıca hastalığın henüz küratif sayılabilecek bir tedavisi de mevcut değildir. Bu açıdan kanser tedavisinde vazgeçilmez bir kaynak olarak yerini korumaya devam eden bitkisel kaynaklı bileşikler değerlendirilmektedir. Onaylanmış kanser ilaçlarının neredeyse % 75'i bitkisel kaynaklı ajanlardan fikir alınarak geliştirilmiştir [12]. Tüm kanser evrelerinde tedaviye katkı

sağlamaları, non-toksik ve çok hedefli olmaları, ayrıca çoğu kanser tedavisinde kullanılan pek çok ilaç ile sinerjik etki göstermeleri bitkisel terapötikleri oldukça önemli bir konuma taşımaktadır [13]. Bu çalışmada geleneksel tedavi yöntemlerinde yaygın olarak kullanılan AB bitkisinin su ekstresinin EPN hücre hattında (DKFZ-EP1NS (C11orf95-RELA)) anti-kanser etkileri incelenmiştir. Bu amaçla MTT analizi, tüm hücre yama kenetleme analizi ve gerçek zamanlı PCR ile gen ekspresyon analizi kullanılarak, AB su ekstresinin belli dozlarda DKFZ-EP1NS hücreleri için sitotoksik olduğu, hücre döngüsünü G_1-fazında tutuklanmaya uğrattığı, apoptotik aktiviteyi indüklediği, TRPC6 ve NF-κB gen ekspresyonlarını azalttığı ve TRP kanal akımlarını dolayısıyla kanal iletkenliğini doza bağlı olarak bloke ettiği gözlemlenmiştir. AB etkisi ile NF-κB inhibisyonu sonucunda NF-κB dimerlerinin çekirdeğe yer değiştiremediği, AB su ekstresinin TRP kanallarını bloke etmesi ve özellikle TRPC6 kanal ekspresyonunu inhibe etmesinin, yalnızca hücre içi Ca^{+2} akışını bastırmakla kalmadığı, dolayısıyla proliferasyonu ve apoptoza direnç gibi hücresel süreçler üzerine tümörjenik etkilerini gösteremediği, bu sonuçlar neticesinde de hücreleri G1 fazında tutuklanmaya uğrattığını düşündürmektedir (Şekil 5.1). Bu sonuçlara dayanarak *Achillea biebersteinii* su ekstresinin ependimoma için küratif bir fitoterapötik ajan adayı olarak değerlendirilebileceği söylenebilir. Bitki su ekstresi üzerine yapılan içerik çalışmalarında birbirine yakın oranlarda aynı fenolikler rapor edilmiş olsa da, bitkinin genel içeriği lokalizasyona göre farklılık gösterdiği için ilerleyen çalışmalarda bitkiye içerik analizi yapılması, farklı bölgelerden toplanan AB bitkilerinin etkilerinin karşılaştırılması, bitki içeriğindeki bileşenlerin hangisi/hangilerinin biyo-markörler kullanılarak EPN'ler için anti-kanser özellik gösterdiği, doz gruplarının belirlenmesinde bu çalışma sonuçları göz önüne alınarak daha dar aralıklarla grupların belirlenmesi ve farklı bitkiler, ilaçlar ya da kemo/radyoterapi ile AB sulu ekstresinin sinerjik etkisinin analiz edilmesi, ayrıca hayvan deneyleri ile ekstrenin sistematik etkierinin değerlendirilmesi bitkinin farmakolojik bir ajan olarak kullanılması için gerekli kanıtları destekleyecektir. Bitkinin kullanılacak olan dozunun sağlıklı hücrelere etkilerinin de değerlendirilmesi için sağlıklı glial hücre hattının kullanıldığı analizler de eklenmelidir. Ayrıca biyofiziksel olarak da Hiperforin ya da DAG gibi TRPC6 kanal inhibitör/aktivatörleri kullanılarak TRPC6 kanal akımlarının analiz edilmesi bitkinin hem TRPC6 kaynaklı kanser basamaklarında hem de TRPC6 kaynaklı kanalopatilerde hedefe yönelik terapötik olarak kullanılmasına dair kuvvetli kanıtlar sunacaktır.

KAYNAKLAR

[1]. Hejmadi, M., Intraduction to cancer biology. 1th ed.; Momna Hejmadi & Ventus Publishing ApS. 2009; p 6-13.

[2]. Bush, N. A., Chang, S. M. ve Berger, M. S. (2017). Current and future strategies for treatment of glioma. Neurosurgical review, 40(1), 1–14.

[3]. Ferguson S. D. (2011). Malignant gliomas: diagnosis and treatment. Disease-a-month : DM, 57(10), 558–569.

[4]. Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E. ve Kruchko, C. (2012). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. Neuro-oncology, 14 Suppl 5(Suppl 5), v1–v49.

[5]. Yiallouros, M. High-Grade Glioma (HGG)–Brief Information. Kinderkresinfo. https://www.gpoh.de/kinderkrebsinfo/content/diseases/brain_tumours/pohpatinfohg120070625/pohhm_gliomepatinfokurz120141217/index_eng.html (7 Kasım 2022)

[6]. Cordier, N., Delingette, H. ve Ayache, N. (2016). A Patch-Based Approach for the Segmentation of Pathologies: Application to Glioma Labelling. IEEE transactions on medical imaging, 35(4), 1066–1076.

[7]. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K. ve diğerleri. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta neuropathologica, 131(6), 803–820.

[8]. Khatua, S., Ramaswamy, V. ve Bouffet, E. (2017). Current therapy and the evolving molecular landscape of paediatric ependymoma. European journal of cancer (Oxford, England : 1990), 70, 34–41.

[9]. Cuddapah, V. A. ve Sontheimer, H. (2011). Ion channels and transporters [corrected] in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. American journal of physiology. Cell physiology, 301(3), C541–C549.

[10]. Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T. ve Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of ethnopharmacology, 96(1-2), 145–150.

[11]. Mandal, V., Mohan, Y. ve Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction - an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy Reviews, 1(1).

[12]. Newman, D. J. ve Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of natural products, 75(3), 311–335.

[13]. Wani, Z. A., Guru, S. K., Rao, A. V., Sharma, S., Mahajan, G., Behl, A. ve diğerleri. (2016). A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 87, 1–11.

[14]. Çolak, S., Çolak, S., DAĞLI, F., Çömlekcioğlu, N., Kocabaş, Y. Z. ve Aygan, A. (2020). Achillea aleppica subsp. Aleppica'nın Farklı Organlarından Elde Edilen Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitesi Ve Bazı Fitokimyasal Özellikleri. Gıda, 45(5), 929-941.

[15]. Bariş, Ö., Güllüce, M., Şahin, F., Özer, H., Kiliç, H., Özkan, H. ve diğerleri. (2006). Biological activities of the essential oil and methanol extract of Achillea biebersteinii Afan.(Asteraceae). Turkish Journal of Biology, 30(2), 65-73.

[16]. Ghavami G., Sardari S. ve Shokrgozar, M. A. (2010) Anticancerous potentials of Achillea species against selected cell lines. J Med Plants Res 4(22):2411–2417

[17]. Saeidnia, S., Gohari, A., Mokhber-Dezfuli, N. ve Kiuchi, F. (2011). A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus Achillea. Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, 19(3), 173–186.

[18]. Baharara, J., Namvar, F., Ramezani, T., Mousavi, M. ve Mohamad, R. (2015). Silver nanoparticles biosynthesized using Achillea biebersteinii flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of BAX and Bcl-2 gene expression. Molecules (Basel, Switzerland), 20(2), 2693–2706.

[19]. Gaweł-Bęben, K., Strzępek-Gomółka, M., Czop, M., Sakipova, Z., Głowniak, K. ve Kukula-Koch, W. (2020). Achillea millefolium L. and Achillea biebersteinii Afan. Hydroglycolic Extracts-Bioactive Ingredients for Cosmetic Use. Molecules (Basel, Switzerland), 25(15), 3368.

[20]. World Health Organization. "Cancer". https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer (6.11.2022)

[21]. Türkiye İstatistik Kurumu. "Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2019". https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2016-24572 (6.11.2022)

[22]. Sherr C. J (1996). Cancer cell cycles. Science (New York, N.Y.), 274(5293), 1672–1677.

[23]. Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144(5), 646–674.

[24]. Prevarskaya, N., Skryma, R., ve Shuba, Y. (2018). Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?. Physiological reviews, 98(2), 559–621.

[25]. Singh, A. ve Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. Oncogene, 29(34), 4741–4751.

[26]. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. ve Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(6), 394–424.

[27]. National Brain Tumor Society. "Brain Tumor Facts". https://braintumor.org/brain-tumors/about-brain-tumors/brain-tumor-facts/#:~:text=Today%2C%20an%20estimated%20700%2C000%20people,patient%20and%20their%20loved%20ones (6.11.2022)

[28]. T.C.Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı. "2017 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri". https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2017-turkiye-kanser-i-statistikleri.html (6.11.2022)

[29]. Kucukyildiz H. C. (2020). Trends on Central Nervous System Cancers in Turkey. Turkish neurosurgery, 30(4), 527–531.

[30]. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D. ve diğerleri. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro-oncology, 23(8), 1231–1251.

[31]. Osborn, A. G., Louis, D. N., Poussaint, T. Y., Linscott, L. L. ve Salzman, K. L. (2022). The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. AJNR. American journal of neuroradiology, 43(7), 928–937.

[32]. Trapp, B. D. ve Herrup, K. (2011). Neurons and Neuroglia. Younmas Neurological Surgery. 6th ed.,(ss 106-122). Philadelphia, Elsevier Saunders.

[33]. Mulcahy, E. Q. X., Colón, R. R. ve Abounader, R. (2020). HGF/MET Signaling in Malignant Brain Tumors. International journal of molecular sciences, 21(20), 7546.

[34]. De Lorenzi, D. ve Mandara, M. T. (2016). The Central Nervous System. Canine and Feline Cytology, 369–407.

[35]. Alfaro-Cervello, C., Soriano-Navarro, M., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A. ve Garcia-Verdugo, J. M. (2012). Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. The Journal of comparative neurology, 520(15), 3528–3552.

[36]. Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M. ve Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 25(1), 10–18.

[37]. Hugnot, J. P. ve Franzen, R. (2011). The spinal cord ependymal region: a stem cell niche in the caudal central nervous system. Frontiers in bioscience (Landmark edition), 16(3), 1044–1059.

[38]. Göritz, C. ve Frisén, J. (2012). Neural stem cells and neurogenesis in the adult. Cell stem cell, 10(6), 657–659.

[39]. Sabelström, H., Stenudd, M. ve Frisén, J. (2014). Neural stem cells in the adult spinal cord. Experimental neurology, 260, 44–49.

[40]. Grégoire, C. A., Goldenstein, B. L., Floriddia, E. M., Barnabé-Heider, F. ve Fernandes, K. J. (2015). Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury. Glia, 63(8), 1469–1482.

[41]. North, H. A., Pan, L., McGuire, T. L., Brooker, S. ve Kessler, J. A. (2015). β1-Integrin alters ependymal stem cell BMP receptor localization and attenuates astrogliosis after spinal cord injury. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 35(9), 3725–3733.

[42]. Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Burda, J. E., Bernstein, A. M., Brumm, A. J. ve diğerleri. (2017). Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. Scientific reports, 7, 41122.

[43]. Servidei, T., Lucchetti, D., Navarra, P., Sgambato, A., Riccardi, R. ve Ruggiero, A. (2021). Cell-of-Origin and Genetic, Epigenetic, and Microenvironmental Factors Contribute to the Intra-Tumoral Heterogeneity of Pediatric Intracranial Ependymoma. Cancers, 13(23), 6100.

[44]. Taylor, M. D., Poppleton, H., Fuller, C., Su, X., Liu, Y., Jensen, P. ve diğerleri. (2005). Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. Cancer cell, 8(4), 323–335.

[45]. Kriegstein, A. ve Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annual review of neuroscience, 32, 149–184.

[46]. Johnson, R. A., Wright, K. D., Poppleton, H., Mohankumar, K. M., Finkelstein, D., Pounds, S. B. ve diğerleri. (2010). Cross-species genomics matches driver mutations and cell compartments to model ependymoma. Nature, 466(7306), 632–636.

[47]. Pajtler, K. W., Witt, H., Sill, M., Jones, D. T., Hovestadt, V., Kratochwil, F. ve diğerleri. (2015). Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. Cancer cell, 27(5), 728–743.

[48]. Mack, S. C., Pajtler, K. W., Chavez, L., Okonechnikov, K., Bertrand, K. C., Wang, X. ve diğerleri. (2018). Therapeutic targeting of ependymoma as informed by oncogenic enhancer profiling. Nature, 553(7686), 101–105.

[49]. Ellison, D. W., McLendon, R., Wiestler, O. D. ve Kros, J. M. (2016). Ependymoma. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W.K. (Ed.) WHO classification of tumours of the central nervous system, 4th, (ss 106–112). International Agency for Research on Cancer, Lyon.

[50]. Zamecnik, J., Snuderl, M., Eckschlager, T., Chanova, M., Hladikova, M., Tichy, M. ve Kodet, R. (2003). Pediatric intracranial ependymomas: prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 16(10), 980–991.

[51]. Parker, M., Mohankumar, K. M., Punchihewa, C., Weinlich, R., Dalton, J. D., Li, Y. ve diğerleri. (2014). C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-κB signalling in ependymoma. Nature, 506(7489), 451–455.

[52]. Cachia, D., Wani, K., Penas-Prado, M., Olar, A., McCutcheon, I. E., Benjamin, R. S. ve diğerleri. (2015). C11orf95-RELA fusion present in a primary supratentorial ependymoma and recurrent sarcoma. Brain tumor pathology, 32(2), 105–111.

[53]. Pietsch, T., Wohlers, I., Goschzik, T., Dreschmann, V., Denkhaus, D., Dörner, E. ve diğerleri. (2014). Supratentorial ependymomas of childhood carry C11orf95-RELA fusions leading to pathological activation of the NF-κB signaling pathway. Acta neuropathologica, 127(4), 609–611.

[54]. Figarella-Branger, D., Lechapt-Zalcman, E., Tabouret, E., Jünger, S., de Paula, A. M., Bouvier, C. ve diğerleri (2016). Supratentorial clear cell ependymomas with branching capillaries demonstrate characteristic clinicopathological features and pathological activation of nuclear factor-kappaB signaling. Neuro-oncology, 18(7), 919–927.

[55]. Wani, K., Vera-Bolanos, E., Armstrong, T., Pfister, S., Jones, D., Witt, H. ve diğerleri. (2014). P04.01: Rela Fusıon Defines Clınıcopathologıc Subsets Of Supratentorıal Ependymoma: A Study From The Collaboratıve Ependymoma Research Network. Neuro-Oncology, 16(Suppl 2), ii36.

[56]. Pajtler, K. W., Mack, S. C., Ramaswamy, V., Smith, C. A., Witt, H., Smith, A. ve diğerleri. (2017). The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. Acta neuropathologica, 133(1), 5–12.

[57]. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A. ve diğerleri. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta neuropathologica, 114(2), 97–109.

[58]. Godfraind C. (2009). Classification and controversies in pathology of ependymomas. Child's nervous system: ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery, 25(10), 1185–1193.

[59]. Mack, S. C. ve Taylor, M. D. (2009). The genetic and epigenetic basis of ependymoma. Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery, 25(10), 1195–1201.

[60]. Wu, J., Armstrong, T. S. ve Gilbert, M. R. (2016). Biology and management of ependymomas. Neuro-oncology, 18(7), 902–913.

[61]. Lucchesi, K. M., Grant, R., Kahle, K. T., Marks, A. M. ve DiLuna, M. L. (2016). Primary spinal myxopapillary ependymoma in the pediatric population: a study from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database. Journal of neuro-oncology, 130(1), 133–140.

[62]. Nguyen, H. S., Doan, N., Gelsomino, M. ve Shabani, S. (2017). Intracranial Subependymoma: A SEER Analysis 2004-2013. World neurosurgery, 101, 599–605.

[63]. Varma, A., Giraldi, D., Mills, S., Brodbelt, A. R. ve Jenkinson, M. D. (2018). Surgical management and long-term outcome of intracranial subependymoma. Acta neurochirurgica, 160(9), 1793–1799.

[64]. Huynh, T. R., Lu, C., Drazin, D. ve Lekovic, G. (2018). Myxopapillary ependymoma with anaplastic features: A case report with review of the literature. Surgical neurology international, 9, 191.

[65]. Lee, J. C., Sharifai, N., Dahiya, S., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Rosenblum, M. K. ve diğerleri. (2019). Clinicopathologic features of anaplastic myxopapillary ependymomas. Brain pathology (Zurich, Switzerland), 29(1), 75–84.

[66]. Gupta, K. ve Salunke, P. (2017). Understanding Ependymoma Oncogenesis: an Update on Recent Molecular Advances and Current Perspectives. Molecular neurobiology, 54(1), 15–21.

[67]. Witt, H., Mack, S. C., Ryzhova, M., Bender, S., Sill, M., Isserlin, R. ve diğerleri. (2011). Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma. Cancer cell, 20(2), 143–157.

[68]. Pajtler, K. W., Wen, J., Sill, M., Lin, T., Orisme, W., Tang, B. ve diğerleri. (2018). Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas. Acta neuropathologica, 136(2), 211–226.

[69]. Cavalli, F., Hübner, J. M., Sharma, T., Luu, B., Sill, M., Zapotocky, M. ve diğerleri. (2018). Heterogeneity within the PF-EPN-B ependymoma subgroup. Acta neuropathologica, 136(2), 227–237.

[70]. Fukuoka, K., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukushima, S., Yamashita, S., Narushima, D. ve diğerleri. (2018). Significance of molecular classification of ependymomas: C11orf95-RELA fusion-negative supratentorial ependymomas are a heterogeneous group of tumors. Acta neuropathologica communications, 6(1), 134.

[71]. Hayden, M. S. ve Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell, 132(3), 344–362.

[72]. Perkins N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. Nature reviews. Molecular cell biology, 8(1), 49–62.

[73]. Malgulwar, P. B., Nambirajan, A., Pathak, P., Faruq, M., Rajeshwari, M., Singh, M. ve diğerleri. (2018). C11orf95-RELA fusions and upregulated NF-KB signalling characterise a subset of aggressive supratentorial ependymomas that express L1CAM and nestin. Journal of neuro-oncology, 138(1), 29–39.

[74]. Ozawa, T., Arora, S., Szulzewsky, F., Juric-Sekhar, G., Miyajima, Y., Bolouri, H. ve diğerleri. (2018). A De Novo Mouse Model of C11orf95-RELA Fusion-Driven Ependymoma Identifies Driver Functions in Addition to NF-κB. Cell reports, 23(13), 3787–3797.

[75]. Cheung M. R. (2014). Surveying and optimizing the predictors for ependymoma specific survival using SEER data. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 15(2), 867–870.

[76]. Liu, A. P., Shing, M. M., Yuen, H. L., Li, C. H., Ling, S. C., Luk, C. W. ve diğerleri. (2014). Timing of adjuvant radiotherapy and treatment outcome in childhood ependymoma. Pediatric blood & cancer, 61(4), 606–611.

[77]. Bouffet, E., Perilongo, G., Canete, A. ve Massimino, M. (1998). Intracranial ependymomas in children: a critical review of prognostic factors and a plea for cooperation. Medical and pediatric oncology, 30(6), 319–331.

[78]. Garvin, J. H., Jr, Selch, M. T., Holmes, E., Berger, M. S., Finlay, J. L., Flannery, A. ve diğerleri (2012). Phase II study of pre-irradiation chemotherapy for childhood intracranial ependymoma. Children's Cancer Group protocol 9942: a report from the Children's Oncology Group. Pediatric blood & cancer, 59(7), 1183–1189.

[79]. Duffner, P. K., Krischer, J. P., Sanford, R. A., Horowitz, M. E., Burger, P. C., Cohen, M. E. ve diğerleri (1998). Prognostic factors in infants and very young children with intracranial ependymomas. Pediatric neurosurgery, 28(4), 215–222.

[80]. Cooper P. R. (1989). Outcome after operative treatment of intramedullary spinal cord tumors in adults: intermediate and long-term results in 51 patients. Neurosurgery, 25(6), 855–859.

[81]. Ferrante, L., Mastronardi, L., Celli, P., Lunardi, P., Acqui, M. ve Fortuna, A. (1992). Intramedullary spinal cord ependymomas--a study of 45 cases with long-term follow-up. Acta neurochirurgica, 119(1-4), 74–79.

[82]. Gilbert, M. R., Ruda, R. ve Soffietti, R. (2010). Ependymomas in adults. Current neurology and neuroscience reports, 10(3), 240–247.

[83]. Atkinson, J. M., Shelat, A. A., Carcaboso, A. M., Kranenburg, T. A., Arnold, L. A., Boulos, N. ve diğerleri. (2011). An integrated in vitro and in vivo high-throughput screen identifies treatment leads for ependymoma. Cancer cell, 20(3), 384–399.

[84]. Merchant, T. E., Li, C., Xiong, X., Kun, L. E., Boop, F. A. ve Sanford, R. A. (2009). Conformal radiotherapy after surgery for paediatric ependymoma: a prospective study. The Lancet. Oncology, 10(3), 258–266.

[85]. Wright, K. D. ve Gajjar, A. (2012). Current treatment options for pediatric and adult patients with ependymoma. Current treatment options in oncology, 13(4), 465–477.

[86]. Wright, K. D. ve Gajjar, A. (2009). New chemotherapy strategies and biological agents in the treatment of childhood ependymoma. Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery, 25(10), 1275–1282.

[87]. Conklin, H. M., Li, C., Xiong, X., Ogg, R. J. ve Merchant, T. E. (2008). Predicting change in academic abilities after conformal radiation therapy for localized ependymoma. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 26(24), 3965–3970.

[88]. Grundy, R. G., Wilne, S. A., Weston, C. L., Robinson, K., Lashford, L. S., Ironside, J. ve diğerleri. (2007). Primary postoperative chemotherapy without radiotherapy for intracranial ependymoma in children: the UKCCSG/SIOP prospective study. The Lancet. Oncology, 8(8), 696–705.

[89]. Purdy, E., Johnston, D. L., Bartels, U., Fryer, C., Carret, A. S., Crooks, B. ve diğerleri. (2014). Ependymoma in children under the age of 3 years: a report from the Canadian Pediatric Brain Tumour Consortium. Journal of neuro-oncology, 117(2), 359–364.

[90]. Ramaswamy, V., Hielscher, T., Mack, S. C., Lassaletta, A., Lin, T., Pajtler, K. W. ve diğerleri. (2016). Therapeutic Impact of Cytoreductive Surgery and Irradiation of Posterior Fossa Ependymoma in the Molecular Era: A Retrospective Multicohort Analysis. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 34(21), 2468–2477.

[91]. Godfraind, C., Kaczmarska, J. M., Kocak, M., Dalton, J., Wright, K. D., Sanford, R. A. ve diğerleri. (2012). Distinct disease-risk groups in pediatric supratentorial and posterior fossa ependymomas. Acta neuropathologica, 124(2), 247–257.

[92]. Massimino, M., Solero, C. L., Garrè, M. L., Biassoni, V., Cama, A., Genitori, L. ve diğerleri. (2011). Second-look surgery for ependymoma: the Italian experience. Journal of neurosurgery. Pediatrics, 8(3), 246–250.

[93]. Zacharoulis, S., Ashley, S., Moreno, L., Gentet, J. C., Massimino, M. ve Frappaz, D. (2010). Treatment and outcome of children with relapsed ependymoma: a multi-institutional retrospective analysis. Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery, 26(7), 905–911.

[94]. Mack, S. C., Witt, H., Piro, R. M., Gu, L., Zuyderduyn, S., Stütz, A. M. ve diğerleri. (2014). Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. Nature, 506(7489), 445–450.

[95]. Grill, J., Le Deley, M. C., Gambarelli, D., Raquin, M. A., Couanet, D., Pierre-Kahn, A. ve diğerleri. (2001). Postoperative chemotherapy without irradiation for ependymoma in children under 5 years of age: a multicenter trial of the French Society of Pediatric Oncology. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 19(5), 1288–1296.

[96]. Venkatramani, R., Ji, L., Lasky, J., Haley, K., Judkins, A., Zhou, S. ve diğerleri. (2013). Outcome of infants and young children with newly diagnosed ependymoma treated on the "Head Start" III prospective clinical trial. Journal of neuro-oncology, 113(2), 285–291.

[97]. Lester, A. ve McDonald, K. L. (2020). Intracranial ependymomas: molecular insights and translation to treatment. Brain pathology (Zurich, Switzerland), 30(1), 3–12.

[98]. Merchant, T. E., Pollack, I. F. ve Loeffler, J. S. (2010). Brain tumors across the age spectrum: biology, therapy, and late effects. Seminars in radiation oncology, 20(1), 58–66.

[99]. Zacharoulis, S. ve Moreno, L. (2009). Ependymoma: an update. Journal of child neurology, 24(11), 1431–1438.

[100]. Sowar, K., Straessle, J., Donson, A. M., Handler, M. ve Foreman, N. K. (2006). Predicting which children are at risk for ependymoma relapse. Journal of neuro-oncology, 78(1), 41–46.

[101]. Kilday, J. P., Rahman, R., Dyer, S., Ridley, L., Lowe, J., Coyle, B. ve Grundy, R. (2009). Pediatric ependymoma: biological perspectives. Molecular cancer research: MCR, 7(6), 765–786.

[102]. Marinoff, A. E., Ma, C., Guo, D., Snuderl, M., Wright, K. D., Manley, P. ve diğerleri. (2017). Rethinking childhood ependymoma: a retrospective, multi-center analysis reveals poor long-term overall survival. Journal of neuro-oncology, 135(1), 201–211.

[103]. Pollack, I. F., Jakacki, R. I., Butterfield, L. H. ve Okada, H. (2013). Ependymomas: development of immunotherapeutic strategies. Expert review of neurotherapeutics, 13(10), 1089–1098.

[104]. Brasier A. R. (2010). The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. Cardiovascular research, 86(2), 211–218.

[105]. Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G. ve Gélinas, C. (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. Oncogene, 25(51), 6800–6816.

[106]. McFarland, B. C., Hong, S. W., Rajbhandari, R., Twitty, G. B., Jr, Gray, G. K., Yu, H. ve diğerleri. (2013). NF-κB-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma. PloS one, 8(11), e78728.

[107] Concetti, J. ve Wilson, C. L. (2018). NFKB1 and Cancer: Friend or Foe?. Cells, 7(9), 133.

[108]. Ghosh, G., Wang, V. Y., Huang, D. B. ve Fusco, A. (2012). NF-κB regulation: lessons from structures. Immunological reviews, 246(1), 36–58.

[109]. Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. ve Baldwin, A. S., Jr (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. Molecular and cellular biology, 19(8), 5785–5799.

[110]. Kiefel, H., Bondong, S., Pfeifer, M., Schirmer, U., Erbe-Hoffmann, N., Schäfer, H. ve diğerleri. (2012). EMT-associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signalling and NF-κB activation. Carcinogenesis, 33(10), 1919–1929.

[111]. Kiefel, H., Pfeifer, M., Bondong, S., Hazin, J. ve Altevogt, P. (2011). Linking L1CAM-mediated signaling to NF-κB activation. Trends in molecular medicine, 17(4), 178–187.

[112]. Pozniak, P. D., White, M. K. ve Khalili, K. (2014). TNF-α/NF-κB signaling in the CNS: possible connection to EPHB2. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 9(2), 133–141..

[113]. Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S. ve Aggarwal, B. B. (2010). Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. Biochimica et biophysica acta, 1799(10-12), 775–787.

[114]. Manuvakhova, M. S., Johnson, G. G., White, M. C., Ananthan, S., Sosa, M., Maddox, C. ve diğerleri. (2011). Identification of novel small molecule activators of nuclear factor-κB with neuroprotective action via high-throughput screening. Journal of neuroscience research, 89(1), 58–72.

[115]. Wong R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of experimental & clinical cancer research: CR, 30(1), 87.

[116]. Berridge, M. J., Bootman, M. D. Ve Lipp, P. (1998). Calcium--a life and death signal. Nature, 395(6703), 645–648.

[117]. Verkhratsky, A. (2007). Calcium and Cell Death. Sub-cellular biochemistry, 45, 465-480.

[118]. El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N. ve Capiod, T. (2008). Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. Hepatology (Baltimore, Md.), 47(6), 2068–2077.

[119]. Roderick, H. L. ve Cook, S. J. (2008). Ca2+ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca2+ for cancer cell proliferation and survival. Nature reviews. Cancer, 8(5), 361–375.

[120]. Monteith, G. R., Prevarskaya, N. ve Roberts-Thomson, S. J. (2017). The calcium-cancer signalling nexus. Nature reviews. Cancer, 17(6), 367–380.

[121]. Monteith, G. R., Davis, F. M. ve Roberts-Thomson, S. J. (2012). Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. The Journal of biological chemistry, 287(38), 31666–31673.

[122]. Parkash, J. ve Asotra, K. (2010). Calcium wave signaling in cancer cells. Life sciences, 87(19-22), 587–595.

[123]. Maklad, A., Sharma, A. ve Azimi, I. (2019). Calcium Signaling in Brain Cancers: Roles and Therapeutic Targeting. Cancers, 11(2), 145.

[124]. Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M. ve Palmer, C. (2009). Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy. Cancer cell international, 9, 23.

[125]. Ding, X., He, Z., Zhou, K., Cheng, J., Yao, H., Lu, D. ve diğerleri. (2010). Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma. Journal of the National Cancer Institute, 102(14), 1052–1068.

[126]. Valerie, N. C., Dziegielewska, B., Hosing, A. S., Augustin, E., Gray, L. S., Brautigan, D. L. ve diğerleri. (2013). Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. Biochemical pharmacology, 85(7), 888–897.

[127]. Wen, H., Gwathmey, J. K. ve Xie, L. H. (2020). Role of Transient Receptor Potential Canonical Channels in Heart Physiology and Pathophysiology. Frontiers in cardiovascular medicine, 7, 24.

[128]. Sun, Z. C., Ma, S. B., Chu, W. G., Jia, D. ve Luo, C. (2020). Canonical Transient Receptor Potential (TRPC) Channels in Nociception and Pathological Pain. Neural plasticity, 2020, 3764193.

[129]. Venkatachalam, K., Zheng, F. ve Gill, D. L. (2003). Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. The Journal of biological chemistry, 278(31), 29031–29040.

[130]. Schaefer, M., Plant, T. D., Obukhov, A. G., Hofmann, T., Gudermann, T. ve Schultz, G. (2000). Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. The Journal of biological chemistry, 275(23), 17517–17526.

[131]. Mizoguchi, Y., Kato, T. A., Seki, Y., Ohgidani, M., Sagata, N., Horikawa, H. ve diğerleri. (2014). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces sustained intracellular Ca2+ elevation through the up-regulation of surface transient receptor potential 3 (TRPC3) channels in rodent microglia. The Journal of biological chemistry, 289(26), 18549–18555.

[132]. Bello, L., Giussani, C., Carrabba, G., Pluderi, M., Costa, F. ve Bikfalvi, A. (2004). Angiogenesis and invasion in gliomas. Cancer treatment and research, 117, 263–284.

[133]. Kros, J. M., Mustafa, D. M., Dekker, L. J., Sillevis Smitt, P. A., Luider, T. M. ve Zheng, P. P. (2015). Circulating glioma biomarkers. Neuro-oncology, 17(3), 343–360.

[134]. Krock, B. L., Skuli, N. ve Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. Genes & cancer, 2(12), 1117–1133.

[135]. Merritt, J. E., Armstrong, W. P., Benham, C. D., Hallam, T. J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A. ve diğerleri. (1990). SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. The Biochemical journal, 271(2), 515–522.

[136]. Miller, M., Shi, J., Zhu, Y., Kustov, M., Tian, J. B., Stevens, A. ve diğerleir. (2011). Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. The Journal of biological chemistry, 286(38), 33436–33446.

[137]. Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Kalwa, H., Storch, U. ve Gudermann, T. (2005). Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 371(4), 257–265.

[138]. Dietrich, A., Mederos Y Schnitzler, M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U. ve diğerleri. (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice. Molecular and cellular biology, 25(16), 6980–6989.

[139]. Tu, P., Kunert-Keil, C., Lucke, S., Brinkmeier, H. ve Bouron, A. (2009). Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. Journal of neurochemistry, 108(1), 126–138

[140]. Venkatachalam, K., van Rossum, D. B., Patterson, R. L., Ma, H. T. ve Gill, D. L. (2002). The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. Nature cell biology, 4(11), E263–E272.

[141]. Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Hoffmann, M., Müller, C., Stolz, S. ve diğerleri. (2004). Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. Biochemical and biophysical research communications, 322(4), 1352–1358.

[142]. Spassova, M. A., Soboloff, J., He, L. P., Hewavitharana, T., Xu, W., Venkatachalam, K. ve diğerleri. (2004). Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: variations and enigma. Biochimica et biophysica acta, 1742(1-3), 9–20.

[143]. Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S. ve diğerleri. (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. Circulation research, 88(3), 325–332.

[144]. Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A. ve Yuan, J. X. (2003). PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. American journal of physiology. Cell physiology, 284(2), C316–C330.

[145]. Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G. ve Plant, T. D. (2002). TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. American journal of physiology. Cell physiology, 282(2), C347–C359.

[146]. Albert, A. P. ve Large, W. A. (2003). Synergism between inositol phosphates and diacylglycerol on native TRPC6-like channels in rabbit portal vein myocytes. The Journal of physiology, 552(Pt 3), 789–795.

[147]. Montell C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. Science's STKE: signal transduction knowledge environment, 2005(272), re3.

[148]. Estacion, M., Li, S., Sinkins, W. G., Gosling, M., Bahra, P., Poll, C. ve diğerleri. (2004). Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. The Journal of biological chemistry, 279(21), 22047–22056.

[149]. Garcia, R. L. ve Schilling, W. P. (1997). Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. Biochemical and biophysical research communications, 239(1), 279–283.

[150]. Riccio, A., Medhurst, A. D., Mattei, C., Kelsell, R. E., Calver, A. R., Randall, A. D. ve diğerleri. (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. Brain research. Molecular brain research, 109(1-2), 95–104.

[151]. Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T. ve Brayden, J. E. (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. Circulation research, 90(3), 248–250.

[152]. Tseng, P. H., Lin, H. P., Hu, H., Wang, C., Zhu, M. X. ve Chen, C. S. (2004). The canonical transient receptor potential 6 channel as a putative phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-sensitive calcium entry system. Biochemistry, 43(37), 11701–11708.

[153]. Tesfai, Y., Brereton, H. M. ve Barritt, G. J. (2001). A diacylglycerol-activated Ca2+ channel in PC12 cells (an adrenal chromaffin cell line) correlates with expression of the TRP-6 (transient receptor potential) protein. The Biochemical journal, 358(Pt 3), 717–726.

[154]. Corteling, R. L., Li, S., Giddings, J., Westwick, J., Poll, C. ve Hall, I. P. (2004). Expression of transient receptor potential C6 and related transient receptor potential family members in human airway smooth muscle and lung tissue. American journal of respiratory cell and molecular biology, 30(2), 145–154.

[155]. Bandyopadhyay, B. C., Swaim, W. D., Liu, X., Redman, R. S., Patterson, R. L. ve Ambudkar, I. S. (2005). Apical localization of a functional TRPC3/TRPC6-Ca2+-signaling complex in polarized epithelial cells. Role in apical Ca2+ influx. The Journal of biological chemistry, 280(13), 12908–12916.

[156]. Hassock, S. R., Zhu, M. X., Trost, C., Flockerzi, V. ve Authi, K. S. (2002). Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. Blood, 100(8), 2801–2811.

[157]. Chu, X., Tong, Q., Cheung, J. Y., Wozney, J., Conrad, K., Mazack, V. ve diğerleri. (2004). Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. The Journal of biological chemistry, 279(11), 10514–10522.

[158]. Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. ve Clapham, D. E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. Neuron, 29(3), 645–655.

[159]. Goel, M., Sinkins, W. G. ve Schilling, W. P. (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. The Journal of biological chemistry, 277(50), 48303–48310.

[160]. Chigurupati, S., Venkataraman, R., Barrera, D., Naganathan, A., Madan, M., Paul, L. ve diğerleri. (2010). Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. Cancer research, 70(1), 418–427.

[161]. Kini, V., Chavez, A. ve Mehta, D. (2010). A new role for PTEN in regulating transient receptor potential canonical channel 6-mediated Ca2+ entry, endothelial permeability, and angiogenesis. The Journal of biological chemistry, 285(43), 33082–33091.

[162]. Hamdollah Zadeh, M. A., Glass, C. A., Magnussen, A., Hancox, J. C. ve Bates, D. O. (2008). VEGF-mediated elevated intracellular calcium and angiogenesis in human microvascular endothelial cells in vitro are inhibited by dominant negative TRPC6. Microcirculation (New York, N.Y. : 1994), 15(7), 605–614.

[163]. Ge, R., Tai, Y., Sun, Y., Zhou, K., Yang, S., Cheng, T. ve diğerleri. (2009). Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. Cancer letters, 283(1), 43–51.

[164]. Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L. ve Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(17), 6392–6397.

[165]. Canales, J., Morales, D., Blanco, C., Rivas, J., Díaz, N., Angelopoulos, I. ve diğerleri. (2019). A TR(i)P to Cell Migration: New Roles of TRP Channels in Mechanotransduction and Cancer. Frontiers in physiology, 10, 757.

[166]. Mareel, M. ve Leroy, A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. Physiological reviews, 83(2), 337–376.

[167]. Koppenol, W. H., Bounds, P. L. ve Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nature reviews. Cancer, 11(5), 325–337.

[168]. Jones, N. P. ve Schulze, A. (2012). Targeting cancer metabolism--aiming at a tumour's sweet-spot. Drug discovery today, 17(5-6), 232–241.

[169]. Cairns, R. A., Harris, I. S. ve Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. Nature reviews. Cancer, 11(2), 85–95.

[170]. Li, S., Wang, J., Wei, Y., Liu, Y., Ding, X., Dong, B. ve diğerleri. (2015). Crucial role of TRPC6 in maintaining the stability of HIF-1α in glioma cells under hypoxia. Journal of cell science, 128(17), 3317–3329.

[171]. Chan, D. A., Sutphin, P. D., Nguyen, P., Turcotte, S., Lai, E. W., Banh, A. ve diğerleri. (2011). Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. Science translational medicine, 3(94), 94ra70.

[172]. Li, S. ve Ding, X. (2017). TRPC Channels and Glioma. Advances in experimental medicine and biology, 976, 157–165.

[173]. Azimi I. (2018). The interplay between HIF-1 and calcium signalling in cancer. The international journal of biochemistry & cell biology, 97, 73–77.

[174]. Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. Journal of Clinical and Experimental Investigations, 6(3), 331-336.

[175]. Tekeli, H. ve Bildik, A. (2012). Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarinda glutatyon (GSH) ve glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesi üzerine n-asetil sisteinin etkisi. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(2), 83-87.

[176]. Lushchak V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. Journal of amino acids, 2012, 736837.

[177]. Waris, G. ve Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. Journal of carcinogenesis, 5, 14.

[178]. Cheeseman, K. H. ve Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. British medical bulletin, 49(3), 481–493.

[179]. Nohl, H., Kozlov, A. V., Gille, L. ve Staniek, K. (2003). Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. Biochemical Society transactions, 31(Pt 6), 1308–1311.

[180]. Brand M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. Experimental gerontology, 45(7-8), 466–472.

[181]. Schafer, F. Q. ve Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free radical biology & medicine, 30(11), 1191–1212.

[182]. Schieber, M. ve Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current biology: CB, 24(10), R453–R462.

[183]. Storey K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas, 29(12), 1715–1733.

[184]. Kirtonia, A., Sethi, G. ve Garg, M. (2020). The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 77(22), 4459–4483.

[185]. Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K. ve diğerleri. (2019). Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. Biomolecules, 9(11), 735.

[186]. Halliwell B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. The Biochemical journal, 401(1), 1–11.

[187]. Harmanci, D. (2019). Antioxidant Supplementation during Glioma Therapy: Friend or Foe?. Omerhodzic (Ed.) Glioma-Contemporary Diagnostic and Therapeutic Approaches. (ss. 231-243). IntechOpen.

[188]. Shulaev, V. ve Oliver, D. J. (2006). Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. Plant physiology, 141(2), 367–372.

[189]. Roque, A. T., Gambeloni, R. Z., Felitti, S., Ribeiro, M. L. ve Santos, J. C. (2015). Inflammation-induced oxidative stress in breast cancer patients. Medical oncology (Northwood, London, England), 32(12), 263.

[190]. Esterbauer, H., Eckl, P. ve Ortner, A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. Mutation research, 238(3), 223–233.

[191]. Esterbauer, H., Schaur, R. J. ve Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free radical biology & medicine, 11(1), 81–128.

[192]. Chaudhary, A. K., Nokubo, M., Reddy, G. R., Yeola, S. N., Morrow, J. D., Blair, I. A. ve diğerleri. (1994). Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. Science (New York, N.Y.), 265(5178), 1580–1582.

[193]. Seraj, A. K., Shankhar, M., Raju, K. D., Punam, J., Anju, P. ve Rajat, K. A. (2015). Antioxidants and lipid peroxidation status in women with breast cancer. IIUM Medical Journal Malaysia, 14(1).

[194]. Tsikas, D., Suchy, M. T., Niemann, J., Tossios, P., Schneider, Y., Rothmann, S. ve diğerleri. (2012). Glutathione promotes prostaglandin H synthase (cyclooxygenase)-dependent formation of malondialdehyde and 15(S)-8-iso-prostaglandin F2α. FEBS letters, 586(20), 3723–3730.

[195]. Li, Y., Zhao, T., Li, J., Xia, M., Li, Y., Wang, X. ve diğerleri. (2022). Oxidative Stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the Pathogenesis and Treatment of Aging-related Diseases. Journal of immunology research, 2022, 2233906.

[196]. Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E. ve Marnett, L. J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. The Journal of biological chemistry, 278(33), 31426–31433.

[197]. Feng, Z., Hu, W., Marnett, L. J. ve Tang, M. S. (2006). Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing

and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. Mutation research, 601(1-2), 125–136.

[198]. Yarıktaş, M., Döner, F., Doğru, H., Aynalı, G., Yönden, Z. ve Delibaş, N. (2003). Baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 10(4).

[199]. Il'yasova, D., Scarbrough, P. ve Spasojevic, I. (2012). Urinary biomarkers of oxidative status. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 413(19-20), 1446–1453.

[200]. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A. ve Ab Wahab, M. S. (2013). Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013, 931251.

[201]. Bansal, A. ve Simon, M. C. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. The Journal of cell biology, 217(7), 2291–2298.

[202]. Hayes, J. D., Flanagan, J. U. ve Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. Annual review of pharmacology and toxicology, 45, 51–88.

[203]. Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R. ve Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. The Journal of nutrition, 134(3), 489–492.

[204]. Lu S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. Molecular aspects of medicine, 30(1-2), 42–59.

[205]. Balendiran, G. K., Dabur, R. ve Fraser, D. (2004). The role of glutathione in cancer. Cell biochemistry and function, 22(6), 343–352.

[206]. Dharmajaya, R. ve Sari, D. K. (2022). Malondialdehyde value as radical oxidative marker and endogenous antioxidant value analysis in brain tumor. Annals of medicine and surgery (2012), 77, 103231.

[207]. Zhu, Z., Kimura, M., Itokawa, Y., Nakatsu, S., Oda, Y. ve Kikuchi, H. (1995). Effect of selenium on malignant tumor cells of brain. Biological trace element research, 49(1), 1–7.

[208]. Rooprai, H. K., Kyriazis, I., Nuttall, R. K., Edwards, D. R., Zicha, D., Aubyn, D. ve diğerleri. (2007). Inhibition of invasion and induction of apoptosis by selenium in human malignant brain tumour cells in vitro. International journal of oncology, 30(5), 1263–1271.

[209]. Vartak, S., Robbins, M. E. ve Spector, A. A. (1997). Polyunsaturated fatty acids increase the sensitivity of 36B10 rat astrocytoma cells to radiation-induced cell kill. Lipids, 32(3), 283–292.

[210]. Arora-Kuruganti, P., Lucchesi, P. A. ve Wurster, R. D. (1999). Proliferation of cultured human astrocytoma cells in response to an oxidant and antioxidant. Journal of neuro-oncology, 44(3), 213–221.

[211]. Rooprai, H. K., Kandanearatchi, A., Maidment, S. L., Christidou, M., Trillo-Pazos, G., Dexter, D. T. ve diğerleri. (2001). Evaluation of the effects of swainsonine, captopril, tangeretin and nobiletin on the biological behaviour of brain tumour cells in vitro. Neuropathology and applied neurobiology, 27(1), 29–39.

[212]. Lou, M., Zhang, L. N., Ji, P. G., Feng, F. Q., Liu, J. H., Yang, C. ve diğerleri. (2016). Quercetin nanoparticles induced autophagy and apoptosis through AKT/ERK/Caspase-3 signaling pathway in human neuroglioma cells: In vitro and in vivo. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 84, 1–9.

[213]. Pozsgai, E., Bellyei, S., Cseh, A., Boronkai, A., Racz, B., Szabo, A. ve diğerleri. (2013). Quercetin increases the efficacy of glioblastoma treatment compared to standard chemoradiotherapy by the suppression of PI-3-kinase-Akt pathway. Nutrition and cancer, 65(7), 1059–1066.

[214]. Wang, C. J. ve Lin, J. K. (1989). (Abstract) Inhibitory effects of carotenoids and retinoids on the in vitro growth of rat C-6 glioma cells. Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences, 13(3), 176–183.

[215]. Sabarinathan, D., Mahalakshmi, P. ve Vanisree, A. J. (2011). Naringenin, a flavanone inhibits the proliferation of cerebrally implanted C6 glioma cells in rats. Chemico-biological interactions, 189(1-2), 26–36.

[216]. Balos, M. ve Akan, H. (2007). Zeytinbahçe - Akarçay (Birecik, Şanlıurfa) Arasında Kalan Bölgenin Etnobotanik Özellikleri. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, 2 (29) , 155-171.

[217]. Croteau, R., Kutchan, T.M. ve Lewis, N.G. (200). Natural products (secondary metabolites). Biochemistry and Molecular Biology of Plant. American Society of Plant Physiologists, ss. 1250–1318

[218]. Dewick, P. M. (2002). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, ss. 7-35

[219]. Shewach, D. S. ve Kuchta, R. D. (2009). Introduction to cancer chemotherapeutics. Chemical reviews, 109(7), 2859–2861.

[220]. Williamson E. M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology, 8(5), 401–409.

[221]. Baharvand-Ahmadi, B., Bahmani, M., Tajeddini, P., Rafieian-Kopaei, M. ve Naghdi, N. (2016). An ethnobotanical study of medicinal plants administered for the treatment of hypertension. Journal of renal injury prevention, 5(3), 123–128.

[222]. Ford, C. T., Richardson, S., McArdle, F., Lotito, S. B., Crozier, A., McArdle, A. ve Jackson, M. J. (2016). Identification of (poly)phenol treatments that modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human lymphocytes. The British journal of nutrition, 115(10), 1699–1710.

[223]. Srivastava, P. ve Yadav, R. S. (2016). Efficacy of Natural Compounds in Neurodegenerative Disorders. Advances in neurobiology, 12, 107–123.

[224]. Lombardi, V. R., Carrera, I. ve Cacabelos, R. (2017). In Vitro Screening for Cytotoxic Activity of Herbal Extracts. Evidence-based complementary and alternative medicine: Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2675631.

[225]. Graham, J. G., Quinn, M. L., Fabricant, D. S. ve Farnsworth, N. R. (2000). Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. Journal of ethnopharmacology, 73(3), 347–377.

[226]. Taneja, S. C. ve Qazi, G. N. (2007). Bioactive Molecues in Medicinal Plants: A perspective in their therapeutic action. Drug discovery and development, 1, 1-50.

[227]. Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. ve Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. Journal of ethnopharmacology, 75(2-3), 95–115.

[228]. Türkiye Bitkileri Veri Servisi. "Taxon Page". http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=5016 (04.07.2021)

[229]. Turkmenoglu, F. P., Agar, O. T., Akaydin, G., Hayran, M. ve Demirci, B. (2015). Characterization of Volatile Compounds of Eleven Achillea Species from Turkey and Biological Activities of Essential Oil and Methanol Extract of A. hamzaoglui Arabacı & Budak. Molecules (Basel, Switzerland), 20(6), 11432–11458.

[230]. Trifunovic, S., Aljancˇic, I., Vajs, V., Macura, S. ve Milosavljevic, S. (2005). Sesquiterpene lactones and flavonoids of Achillea depressa. Biochem Syst Ecol, 33, 317.

[231]. Valant-Vetschera, K. M. ve Wollenweber, E. (1996). Comparative analysis of leaf exudate flavonoids in Achillea subsect. Filipendulinae. Biochemical systematics and ecology, 24(5), 435-446.

[232]. Valant-Vetschera, K. M. ve Wollenweber, E. (2001). Exudate flavonoid aglycones in the alpine species of Achillea sect. Ptarmica: Chemosystematics of A. moschata and related species (Compositae-Anthemideae). Biochemical systematics and ecology, 29(2), 149–159.

[233]. Hormozi, M. ve Baharvand, P. (2019). Achillea biebersteinni Afan may inhibit scar formation: In vitro study. Molecular genetics & genomic medicine, 7(5), e640.

[234]. Yener, I., Yilmaz, M. A., Olmez, O. T., Akdeniz, M., Tekin, F., Hasimi, N. ve diğerleri. (2020). A Detailed Biological and Chemical Investigation of Sixteen Achillea Species' Essential Oils via Chemometric Approach. Chemistry & biodiversity, 17(3), e1900484.

[235]. Azizi, M., Chizzola, R., Ghani, A. ve Oroojalian, F. (2010). Composition at different development stages of the essential oil of four Achillea species grown in Iran. Natural product communications, 5(2), 283–290.

[236]. Polatoğlu, K., Karakoç, Ö. C. ve Gören, N. (2013). Phytotoxic, DPPH scavenging, insecticidal activities and essential oil composition of Achillea vermicularis, A. teretifolia and proposed chemotypes of A. biebersteinii (Asteraceae). Industrial crops and products, 51, 35-45.

[237]. Toncer, O., Basbag, S., Karaman, S., Diraz, E., ve Basbag, M. (2010). Chemical composition of the essential oils of some Achillea species growing wild in Turkey. Int. J. Agric. Biol, 12(4), 527-530.

[238]. Abd-Alla, H. I., Shalaby, N. M., Hamed, M. A., El-Rigal, N. S., Al-Ghamdi, S. N. ve Bouajila, J. (2016). Phytochemical composition, protective and therapeutic effect on gastric ulcer and α-amylase inhibitory activity of Achillea biebersteinii Afan. Archives of pharmacal research, 39(1), 10–20.

[239]. Rahimmalek, M., Tabatabaei, B. E. S., Etemadi, N., Goli, S. A. H., Arzani, A. ve Zeinali, H. (2009). Essential oil variation among and within six Achillea species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. Industrial Crops and Products, 29(2-3), 348-355.

[240]. Tabanca, N., Demirci, B., Gürbüz, I., Demirci, F., Becnel, J. J., Wedge, D. E. ve Başer, K. H. (2011). Essential oil composition of five collections of Achillea biebersteinii from central Turkey and their antifungal and insecticidal activity. Natural product communications, 6(5), 701–706.

[241]. Mirahmadi, S. F., Sefidkon, F., Hassandokht, M. R. ve Hassani, M. E. (2012). Essential oil content and composition of Achillea biebersteinii Afan. in different plant parts and phenological stages. Journal of Essential Oil Research, 24(1), 25-29.

[242]. Doğan, D. ve Meydan, İ. (2021). Antioxidant Effect of Achillea biebersteinii in Different Extracts and Extinguhishing Activity on DPPH. Journal of Agriculture, 4(1), 1-9.

[243]. Toplan, G. G., Taşkın, T., İşcan, G., Göger, F., Kürkçüoğlu, M., Civaş, A. ve diğerleri. (2022). Comparative Studies on Essential Oil and Phenolic Content with In Vitro Antioxidant, Anticholinesterase, Antimicrobial Activities of Achillea biebersteinii Afan. and A. millefolium subsp. millefolium Afan. L. Growing in Eastern Turkey. Molecules, 27(6), 1956.

[244]. Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z. ve Coflkun, M. (2004). Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some Asteraceae species. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 1(3), 203-216.

[245]. Hammad, M., Albu, C., Matar, S. A., Litescu, S., Al Jaber, H. I., Abualraghib, A. S. ve diğerleri. (2013). Biological activities of the hydro-alchoholic and aqueous extracts of Achillea biebersteinii Afan. (Asteraceae) grown in Jordan. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 7, 1686-1694.

[246]. Sabanoglu, S., Gökbulut, A. ve Altun, M. L. (2019). Characterization of phenolic compounds, total phenolic content and antioxidant activity of three Achillea species. Journal of Research in Pharmacy, 23(3).

[247]. Alam, M., Ahmed, S., Elasbali, A. M., Adnan, M., Alam, S., Hassan, M. I. ve diğerleri. (2022). Therapeutic Implications of Caffeic Acid in Cancer and Neurological Diseases. Frontiers in oncology, 12, 860508.

[248]. Huang, R., Dong, R., Wang, N., Lan, B., Zhao, H. ve Gao, Y. (2021). Exploring the Antiglioma Mechanisms of Luteolin Based on Network Pharmacology and Experimental Verification. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2021, 7765658.

[249]. Wu, C., Xu, Q., Chen, X. ve Liu, J. (2019). Delivery luteolin with folacin-modified nanoparticle for glioma therapy. International journal of nanomedicine, 14, 7515–7531.

[250]. Imran, M., Rauf, A., Abu-Izneid, T., Nadeem, M., Shariati, M. A., Khan, I. A. ve diğerleri. (2019). Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 112, 108612.

[251]. Chen, C. Y., Kao, C. L. ve Liu, C. M. (2018). The Cancer Prevention, Anti-Inflammatory and Anti-Oxidation of Bioactive Phytochemicals Targeting the TLR4 Signaling Pathway. International journal of molecular sciences, 19(9), 2729.

[252]. You, Y., Wang, R., Shao, N., Zhi, F. ve Yang, Y. (2019). Luteolin suppresses tumor proliferation through inducing apoptosis and autophagy via MAPK activation in glioma. OncoTargets and therapy, 12, 2383–2396.

[253]. Kou, J. J., Shi, J. Z., He, Y. Y., Hao, J. J., Zhang, H. Y., Luo, D. M. ve diğerleri. (2022). Luteolin alleviates cognitive impairment in Alzheimer's disease mouse model via inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent neuroinflammation. Acta pharmacologica Sinica, 43(4), 840–849.

[254]. Rauf, A., Imran, M., Khan, I. A., Ur-Rehman, M., Gilani, S. A., Mehmood, Z. ve diğerleri. (2018). Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. Phytotherapy research: PTR, 32(11), 2109–2130.

[255]. Hashemzaei, M., Delarami Far, A., Yari, A., Heravi, R. E., Tabrizian, K. ve diğerleri. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. Oncology reports, 38(2), 819–828.

[256]. Jang, E., Kim, I. Y., Kim, H., Lee, D. M., Seo, D. Y., Lee, J. A. ve diğerleri. (2020). Quercetin and chloroquine synergistically kill glioma cells by inducing organelle stress and disrupting Ca2+ homeostasis. Biochemical pharmacology, 178, 114098.

[257]. Chen, B., Li, X., Wu, L., Zhou, D., Song, Y., Zhang, L. ve diğerleri. (2022). Quercetin Suppresses Human Glioblastoma Migration and Invasion via GSK3β/β-catenin/ZEB1 Signaling Pathway. Frontiers in pharmacology, 13, 963614.

[258]. Siegelin, M. D., Reuss, D. E., Habel, A., Rami, A. ve von Deimling, A. (2009). Quercetin promotes degradation of survivin and thereby enhances death-receptor-mediated apoptosis in glioma cells. Neuro-oncology, 11(2), 122–131.

[259]. Kim, E. J., Choi, C. H., Park, J. Y., Kang, S. K. ve Kim, Y. K. (2008). Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells. Neurochemical research, 33(6), 971–979.

[260]. Wang, H., Yuan, Z., Chen, Z., Yao, F., Hu, Z. ve Wu, B. (2014). [Effect of quercetin on glioma cell U87 apoptosis and feedback regulation of MDM2-p53]. Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University, 34(5), 686–689.

[261]. Pan, H. C., Jiang, Q., Yu, Y., Mei, J. P., Cui, Y. K. ve Zhao, W. J. (2015). Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. Neurochemistry international, 80, 60–71.

[262]. Sitarek, P., Skała, E., Toma, M., Wielanek, M., Szemraj, J., Nieborowska-Skorska, M. ve diğerleri. (2016). A preliminary study of apoptosis induction in glioma cells via alteration of the BAX/Bcl-2-p53 axis by transformed and non-transformed root extracts of Leonurus sibiricus L. Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 37(7), 8753–8764.

[263]. Skała, E., Sitarek, P., Toma, M., Szemraj, J., Radek, M., Nieborowska-Skorska, M. ve diğerleri. (2016). Inhibition of human glioma cell proliferation by altered BAX/Bcl-2-p53 expression and apoptosis induction by Rhaponticum carthamoides extracts from transformed and normal roots. The Journal of pharmacy and pharmacology, 68(11), 1454–1464.

[264]. Mykhailenko, O., Petrikaitė, V., Korinek, M., El-Shazly, M., Chen, B. H., Yen, C. H. ve diğerleri. (2021). Bio-guided bioactive profiling and HPLC-DAD fingerprinting of Ukrainian saffron (Crocus sativus stigmas): moving from correlation toward causation. BMC complementary medicine and therapies, 21(1), 203.

[265]. Sitarek, P., Kowalczyk, T., Santangelo, S., Białas, A. J., Toma, M., Wieczfinska, J. ve diğerleri. (2018). The Extract of Leonurus sibiricus Transgenic Roots with AtPAP1 Transcriptional Factor Induces Apoptosis via DNA Damage and Down Regulation of Selected Epigenetic Factors in Human Cancer Cells. Neurochemical research, 43(7), 1363–1370.

[266]. Swiatek-Machado, K., Mieczkowski, J., Ellert-Miklaszewska, A., Swierk, P., Fokt, I., Szymanski, S. ve diğerleri. (2012). Novel small molecular inhibitors disrupt the JAK/STAT3 and FAK signaling pathways and exhibit a potent antitumor activity in glioma cells. Cancer biology & therapy, 13(8), 657–670.

[267]. Khan, M. S. S., Asif, M., Basheer, M. K. A., Kang, C. W., Al-Suede, F. S., Ein, O. C. ve diğerleri. (2017). Treatment of novel IL17A inhibitor in glioblastoma implementing 3rd generation co-culture cell line and patient-derived tumor model. European journal of pharmacology, 803, 24–38.

[268]. Naumowicz, M., Kusaczuk, M., Zając, M., Gál, M. ve Kotyńska, J. (2020). Monitoring of the Surface Charge Density Changes of Human Glioblastoma Cell Membranes upon Cinnamic and Ferulic Acids Treatment. International journal of molecular sciences, 21(18), 6972.

[26]. Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A. ve Rotsztejn, H. (2018). Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. Skin pharmacology and physiology, 31(6), 332–336.

[270]. Kowalczyk, T., Sitarek, P., Skała, E., Toma, M., Wielanek, M., Pytel, D. ve diğerleri. (2019). Induction of apoptosis by in vitro and in vivo plant extracts derived from Menyanthes trifoliata L. in human cancer cells. Cytotechnology, 71(1), 165–180.

[271]. Grasso, R., Dell'Albani, P., Carbone, C., Spatuzza, M., Bonfanti, R., Sposito, G. ve diğerleri. (2020). Synergic pro-apoptotic effects of Ferulic Acid and nanostructured lipid carrier in glioblastoma cells assessed through molecular and Delayed Luminescence studies. Scientific reports, 10(1), 4680.

[272]. Sohn, S. H., Ko, E., Jeon, S. B., Lee, B. J., Kim, S. H., Dong, M. S. ve diğerleri. (2009). The genome-wide expression profile of Scrophularia ningpoensis-treated thapsigargin-stimulated U-87MG cells. Neurotoxicology, 30(3), 368–376.

[273]. Amjad, E., Sokouti, B. ve Asnaashari, S. (2022). A systematic review of anti-cancer roles and mechanisms of kaempferol as a natural compound. Cancer cell international, 22(1), 260.

[274]. Song, X., Tan, L., Wang, M., Ren, C., Guo, C., Yang, B. ve diğerleri. (2021). Myricetin: A review of the most recent research. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 134, 111017.

[275]. Huo, M., Xia, A., Cheng, W., Zhou, M., Wang, J., Shi, T. ve diğerleri. (2022). Rutin Promotes Pancreatic Cancer Cell Apoptosis by Upregulating miRNA-877-3p Expression. Molecules (Basel, Switzerland), 27(7), 2293.

[276]. Yan, X., Hao, Y., Chen, S., Jia, G., Guo, Y., Zhang, G. ve diğerleri. (2019). Rutin induces apoptosis via P53 up-regulation in human glioma CHME cells. Translational cancer research, 8(5), 2005–2013.

[277]. Zhang, P., Sun, S., Li, N., Ho, A. S. W., Kiang, K. M. Y., Zhang, X. ve diğerleri. (2017). Rutin increases the cytotoxicity of temozolomide in glioblastoma via autophagy inhibition. Journal of neuro-oncology, 132(3), 393–400.

[278]. Khan, F., Pandey, P., Upadhyay, T. K., Jafri, A., Jha, N. K., Mishra, R. ve diğerleri. (2020). (Abstract) Anti-Cancerous Effect of Rutin Against HPV-C33A Cervical Cancer Cells via G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptotic Induction. Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets, 20(3), 409–418.

[279]. Santos, B. L., Silva, A. R., Pitanga, B. P., Sousa, C. S., Grangeiro, M. S., Fragomeni, B. O. ve diğerleri. (2011). Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. Food chemistry, 127(2), 404–411.

[280]. Akkol, E. K., Koca, U., Pesin, I. ve Yilmazer, D. (2011). Evaluation of the Wound Healing Potential of Achillea biebersteinii Afan. (Asteraceae) by In Vivo Excision and Incision Models. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2011, 474026.

[281]. Tajik, H., Jalali, F., S., S., Sobhani, A., Shahbazi, Y. ve Zadeh, M., S. (2008). In vitro Assessment of Antimicrobial Efficacy of Alcoholic Extract of Achillea Millefolium in Comparison with Penicillin Derivatives. Journal of Animal and Veterinary Advances, 7, 508-511.

[282]. Erbay, M. Ş., Sezin, A. ve Melikoğlu, G. (2017). Plants used as painkiller in folk medicine in turkey-i stomachache. Marmara Pharmaceutical Journal, 21(4), 741-755.

[283]. Altundag, E. ve Ozturk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. Procedia-Social and Behavioral Sciences, 19, 756-777.

[284]. Ghorbani A. (2005). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran (Part 1): general results. Journal of ethnopharmacology, 102(1), 58–68.

[285]. Tuzlacı, E. ve Erol, M. K. (1999). Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta). Fitoterapia, 70(6), 593-610.

[286]. Sezik, E., Yeşİlada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T. ve diğerleri. (1997). Traditional medicine in Turkey viii. folk medicine in east Anatolia; Erzurum, Erzíncan, Ağri, Kars, Iğdir provinces. Economic botany, 51(3), 195-211.

[287]. Tetik, F., Civelek, S. ve Cakilcioglu, U. (2013). Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). Journal of ethnopharmacology, 146(1), 331–346.

[288]. Polat, R., Cakilcioglu, U. ve Satıl, F. (2013). Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl-Turkey). Journal of ethnopharmacology, 148(3), 951–963.

[289]. Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T. ve diğerleri. (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. Journal of ethnopharmacology, 46(3), 133–152.

[290]. Sezik, E., Yesilada, E., Shadidoyatov, H., Kulivey, Z., Nigmatullaev, A. M., Aripov, H. N. ve diğerleri. (2004). Folk medicine in Uzbekistan. I. Toshkent, Djizzax, and Samarqand provinces. Journal of ethnopharmacology, 92(2-3), 197–207.

[291]. Demirel, M. A., Suntar, I., Ilhan, M., Keles, H. ve Kupeli Akkol, E. (2014). Experimental endometriosis remission in rats treated with Achillea biebersteinii Afan.: histopathological evaluation and determination of cytokine levels. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology, 175, 172–177.

[292]. Karaalp, C., Yurtman, A. N. ve Karabay Yavasoglu, N. U. (2009). Evaluation of antimicrobial properties of Achillea L. flower head extracts. Pharmaceutical biology, 47(1), 86-91.

[293]. Mercan Doğan, N., Cansaran, A., Acar, G. ve Öztekin, M. (2010). Antimicrobial activity of extracts of some plants from Amasya (Turkey). Advances n Bioresearch, 1, 86-90.

[294]. Mohamed, A. E., Mohamed, N. S., Hamed, A. R. ve Hegazy, M. F. (2016). Anti-inflammatory activity of highly oxygenated terpenoids from Achillea biebersteinii Afan. Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences, 71(11-12), 429–432.

[295]. Bashi, D. S., Fazly Bazzaz, B. S., Sahebkar, A., Karimkhani, M. M. ve Ahmadi, A. (2012). Investigation of optimal extraction, antioxidant, and antimicrobial activities of Achillea biebersteinii and A. wilhelmsii. Pharmaceutical biology, 50(9), 1168–1176.

[296]. Mazandarani, M., Osia, N. ve Ghafourian, M. (2015). Antioxidant activity and ethno pharmacological survey of Achillea biebersteinii Afan. in the treatment of dysmenorrhoea in traditional medicine of Golestan province, Iran. International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences, 3(2), 107-110.

[297]. Mirahmadi, S. F. ve Norouzi, R. (2017). Chemical composition, phenolic content, free radical scavenging and antifungal activities of Achillea biebersteinii. Food bioscience, 18, 53-59.

[298]. Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. ve El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food chemistry, 104(4), 1372-1378.

[299]. Kizil, M., Kizil, G., Yavuz, M. ve Çeken, B. (2010). Protective activity of ethanol extract of three Achillea species against lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage in vitro. Acta alimentaria, 39(4), 457-470.

[300]. Varasteh-Kojourian, M., Abrishamchi, P., Matin, M. M., Asili, J., Ejtehadi, H. ve Khosravitabar, F. (2017). Antioxidant, cytotoxic and DNA protective properties of Achillea eriophora DC. and Achillea biebersteinii Afan. extracts: A comparative study. Avicenna journal of phytomedicine, 7(2), 157–168.

[301]. Zengin, G., Aktumsek, A., Ceylan, R., Uysal, S., Mocan, A., Guler, G. O. ve diğerleri. (2017). Shedding light on the biological and chemical fingerprints of three Achillea species (A. biebersteinii, A. millefolium and A. teretifolia). Food & function, 8(3), 1152–1165.

[302]. Doğan, H. H., Türkçetin, Y. ve Duman, R. (2020). "Kültüre Alınmış Pleurotus ostreatus' un İnsan Respiratuvar Sinsityal Virüsü (HRSV)'ne Karşı İn Vitro Antiviral Etkisinin Değerlendirilmesi", Mantar Dergisi, 11(2), 172-180.

[303]. Yu, L., Baxter, P. A., Voicu, H., Gurusiddappa, S., Zhao, Y., Adesina, A. ve diğerleri. (2010). A clinically relevant orthotopic xenograft model of ependymoma that maintains the genomic signature of the primary tumor and preserves cancer stem cells in vivo. Neuro-oncology, 12(6), 580–594.

[304]. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. ve Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. Journal of immunological methods, 184(1), 39–51.

[305]. Jiang, H. N., Zeng, B., Zhang, Y., Daskoulidou, N., Fan, H., Qu, J. M. ve diğerleri. (2013). Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer. PloS one, 8(6), e67637.

[306]. Song, M., Chen, D. ve Yu, S. P. (2014). The TRPC channel blocker SKF 96365 inhibits glioblastoma cell growth by enhancing reverse mode of the Na(+) /Ca(2+) exchanger and increasing intracellular Ca(2+). British journal of pharmacology, 171(14), 3432–3447.

[307]. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Packer (Ed.). Methods in enzymology Vol. 105 (ss. 121–126). Axademic Press.

[308]. Ohkawa, H., Ohishi, N. ve Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry, 95(2), 351–358.

[309]. Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, Calif.), 25(4), 402–408.

[310]. Erdogan, M. K., Ağca, C. A. ve Aşkın, H. (2020). Achillea biebersteinii extracts suppress angiogenesis and enhance sensitivity to 5-fluorouracil of human colon cancer cells via the PTEN/AKT/mTOR pathway in vitro. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 10(11), 505.

[311]. Al-Sokari, S. S., Ali, N. A., Monzote, L. ve Al-Fatimi, M. A. (2015). Evaluation of Antileishmanial Activity of Albaha Medicinal Plants against Leishmania amazonensis. BioMed research international, 2015, 938747.

[312]. Mothana, R. A., Kriegisch, S., Harms, M., Wende, K. ve Lindequist, U. (2011). Assessment of selected Yemeni medicinal plants for their in vitro antimicrobial, anticancer, and antioxidant activities. Pharmaceutical biology, 49(2), 200–210.

[313]. Chen, J., Luan, Y., Yu, R., Zhang, Z., Zhang, J. ve Wang, W. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. Bioscience trends, 8(1), 1–10.

[314]. Bomben, V. C. ve Sontheimer, H. W. (2008). Inhibition of transient receptor potential canonical channels impairs cytokinesis in human malignant gliomas. Cell proliferation, 41(1), 98–121.

[315]. Bomben, V. C. ve Sontheimer, H. (2010). Disruption of transient receptor potential canonical channel 1 causes incomplete cytokinesis and slows the growth of human malignant gliomas. Glia, 58(10), 1145–1156.

[316]. Alptekin, M., Eroglu, S., Tutar, E., Sencan, S., Geyik, M. A., Ulasli, M. ve diğeleri .(2015). Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 36(12), 9209–9213

[317]. Medeiros, M., Candido, M. F., Valera, E. T. ve Brassesco, M. S. (2021). The multifaceted NF-kB: are there still prospects of its inhibition for clinical intervention in pediatric central nervous system tumors?. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 78(17-18), 6161–6200.

[318]. Griesinger, A. M., Witt, D. A., Grob, S. T., Georgio Westover, S. R., Donson, A. M., Sanford, B. ve diğerleri. (2017). NF-κB upregulation through epigenetic silencing of LDOC1 drives tumor biology and specific immunophenotype in Group A ependymoma. Neuro-oncology, 19(10), 1350–1360.

[319]. Ozawa, T., Kaneko, S., Szulzewsky, F., Qiao, Z., Takadera, M., Narita, Y. ve diğerleri. (2021). C11orf95-RELA fusion drives aberrant gene expression through the unique epigenetic regulation for ependymoma formation. Acta neuropathologica communications, 9(1), 36.

[320]. Aubin, R. G., Troisi, E. C., Montelongo, J., Alghalith, A. N., Nasrallah, M. P., Santi, M. ve diğerleri. (2022). Pro-inflammatory cytokines mediate the epithelial-to-mesenchymal-like transition of pediatric posterior fossa ependymoma. Nature communications, 13(1), 3936

[321]. Gupta, A., Singh, A. K., Loka, M., Pandey, A. K. ve Bishayee, A. (2021). Ferulic acid-mediated modulation of apoptotic signaling pathways in cancer. Advances in protein chemistry and structural biology, 125, 215–257.

[322]. Järvelä, S., Nordfors, K., Jansson, M., Haapasalo, J., Helén, P., Paljärvi, L. ve diğerleri. (2008). Decreased expression of antioxidant enzymes is associated with aggressive features in ependymomas. Journal of neuro-oncology, 90(3), 283–291.

[323]. Kato, S., Esumi, H., Hirano, A., Kato, M., Asayama, K. ve Ohama, E. (2003). Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human brain

tumors: relationships of iNOS to superoxide dismutase (SOD) proteins (SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen (MIB-1) and p53 protein. Acta neuropathologica, 105(4), 333–340.

[324]. Yilmaz, N., Dulger, H., Kiymaz, N., Yilmaz, C., Bayram, I., Ragip, B. ve Oğer, M. (2006). Lipid peroxidation in patients with brain tumor. The International journal of neuroscience, 116(8), 937–943.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Erkan ÖZBAY

Doğum Tarihi : [redacted]

E-mail [redacted]

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Ortaöğretim Fen ve Matematik Billimleri Eğitimi Bölümü/Fizik Öğretmenliği Programı (5 Yıllık)	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Biyofizik	Mersin Üniversitesi	2017
Doktora	Biyofizik	Mersin Üniversitesi	2023

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Yıl
Öğretim Görevlisi	Karamanoğlu Mehmetbey Ünivesitesi	2018

YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

Makaleler

1. Karagöz, S., ve Özbay, E. (2021). Koronavirüs-19 Hastalığının Makro ve Moleküler Olarak İncelenmesi: Derleme. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Dergisi, 3(2), 110-166.

2. Özbay, E., Türkseven, Ç. H., Karagöz, S., ve Büyükakıllı, B. (2021). Determination of Half Maximal Effective Concentration (EC50) Values on Skeletal Muscle Mechanic Activityof Arum dioscoridis, a Species Belonging to Arum Genus, One of the Plants of Karaman Province Region (Phase 0 – Preclinical Studies). Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Dergisi, 3(2), 86-109.

3. Özdemir, E., Çömelekoğlu, Ü., Değirmenci, E., Bayrak, G., Yıldırım, M., Ergenoğlu, T., Coşkun, Y. B., Korunur, E. B., Yalın, S., Koyuncu, D. D., ve Özbay, E. (2021). The effect of 4.5\u2009G (LTE Advanced-Pro network) mobile phone radiation on the optic nerve. Cutaneous and Ocular Toxicology, 1-27.

4. Mishchenko, Y., Kaya, M., Özbay, E., ve Yanar, H. (2019). Developing a Three- to Six-State EEG-Based Brain–Computer Interface for a Virtual Robotic Manipulator Control. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 66(4), 977-987.

5. Özbay, E., Çömelekoğlu, Ü., Vayısoğlu, Y., Albayrak, Ö., Bozdoğan Arpacı, R., Demirbağ, B., Deniz, D. A. ve Talas, D. Ü. (2019). Cochlear electrophysiology and histopathology of rats exposed to intratympanic silica nanoparticles. Journal of research in pharmacy (online), 23(6), 1115-1122.

6. Kaya, M., Binli, M. K., Ozbay, E., Yanar, H., ve Mishchenko, Y. (2018). A large electroencephalographic motor imagery dataset for electroencephalographic brain computer interfaces. Scientific data, 5, 180211.

7. Çömelekoğlu, Ü., Aktaş, S., Demirbağ, B., Karagül, M. İ., Yalın, S., Yıldırım, M., Korunur, E. B., Söğüt, F., ve Özbay, E. (2018). Effect of low-level 1800 MHz radiofrequency radiation on the rat sciatic nerve and the protective role of paricalcitol. BIOELECTROMAGNETICS, 39, 631-643.

Bildiriler

1. Yalın, A. E., Çömelekoğlu, Ü., Özbay, E., Yıldırım, M., Berköz, M., ve Yalın, S. (2018). Effects of antihyperglycemic agents on QT interval value of diabetic rats. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-12), 333-333.

2. Yıldırım, M., Özbay, E., Çömelekoğlu, Ü., Berköz, M., Yalın, S., ve Yalın, A. E. (2018). The effectiveness of exenatide, sitagliptinand insulin in treatment of diabetic neuropathy: A comparative experimental study in rats. 7th International Congeress on Molecular Biology and Biotechnology, 276-276.

3. Özdemir, E., Çömelekoğlu, Ü., Ergenoğlu, T., Koyuncu, D. D., Değirmenci, ve E., Özbay, E. (2018). 4,5G kablosuz teknoloji kullanan cep telefonlarının görme sistemine etkileri. Uluslararası Erdemli Sempozyumu. 15-15.

4. Özbay, E., Çömelekoğlu, Ü., Vayısoğlu, Y., Bozdoğan Arpacı, R., Albayrak, Ö., ve Talas, D. Ü. (2017). SiO2 Nanoparçacığının İşitme Sistemi Üzerine Etkileri. Uluslararası Sağlık ve Çevre Kongresi (USCEK) 2017, 179-179.

5. Mishchenko, Y, Kaya, M., Yanar, H., ve Özbay, E.N (2016). Characterization of the key properties of electroencephalographic signal for noninvasive brain machine/computer interface applications. Society for Neuroscience Annual Meeting 2016.

6. Özbay, E., Mishchenko, Y., Kaya, M., ve Yanar, H. (2016). Control of a virtual robotic hand manipulator usinga non-invasive EEG-based brain machine. 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress, 989-990.

7. Çamlıca, Y., Çömelekoğlu, Ü., ve Özbay, E. (2016). Electrical activity changes induced by thiacloprid insecticide in heart of rats. IMSEC, 1(1), 2569-2569.

8. Karagül, M. İ., Özbay, E., Söğüt, F., Yıldırım, M., Aktaş, S., Akar, A., Yalın, S., ve Çömelekoğlu, Ü. (2016). The effects of paricalcitol on rat peripheral nerve following exposure to 1800 MHz electromagnetic fields. IMSEC, 1(1), 2818-2818.

Kitap Bölümleri

1. Hamzaoğlu, V., ve Özbay, E. Görsel ve İşitsel Nöroprostetikler. Biçeroğlu, H., Tönge, M., Seçkin, M., Adıgüzel, E., Gürvit, H., Hancı, M. (Ed.), Fonksiyonun cerrahi anatomisi (ss. 2081-2091), US Akademi, İzmir.