ARAŞTIRMA MAKALESİ / Research Article

Glioblastoma Multiforma Tedavisinde Kanser Kök Hücrelerinin Temozolomide Karşı Oluşturdukları Direnç

Cancer Stem Cell Resistance Against Temozolomide in Glioblastoma Multiforma Treatment

Meryem Alagoz

Biruni Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü, Protokol Yolu No:45, 10. Yıl Cd., 34010 Zeytinburnu/İstanbul,

Yazışma Adresi / Correspondence:
Meryem Alagoz
Biruni Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü,
Protokol Yolu No:45, 10. Yıl Cd., 34010 Zeytinburnu/İstanbul
T: **+90 553 076 76 88** E-mail: **malagoz@biruni.edu.tr**

Geliş Tarihi / Received : **07.04.2018** Kabul Tarihi / Accepted : **16.05.2018**

Öz

Amaç Glioblastoma multiform (GBM), primer beyin tümörleri arasında en sık görülen agresif bir malign kanser türüdür. Bu hastalığın tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluk tümörün kendi doğasındaki karmaşıklık ve ilaç direncine sebep olan sayısız mekanizmaya dayanmaktadır. GBM 'de tedaviye karşı oluşan direnci heterojenik hücre populasyonu içindeki kanser hücrelerinden farklı olan hücrelerin gösterdiği öne sürülmüştür. Bu hücrelerin kök hücrelerine benzer simetrik/asimetrik çoğalma kabiliyetine sahip oldukları ve kök hücre belirteçleri taşıdıkları gösterilmiştir. Bu çalışmadaki hedefimiz GBM kök hücrelerinin ilaca karşı oluşturdukları direncin rolünü araştırarak GBM tedavisini daha etkili hale getirmektir. **Sakarya Tıp Dergisi, 2018, 8(2):379-387)**

Gereç ve Yöntem Glioblastoma hücre hatlarından kök hücre özellikleri taşıyan kanser hücreleri Neurosefir Kültür modeli kullanılarak elde edildi. Nöronal kök hücre belirteçleri olan CD133 ve Sox 1 protein ekspresyonları Western blot analizi ile bakıldı. GBM kanser kök ve farklılaşmış kanser hücrelerinin temozolomide karşı oluşturdukları sitotoksisite hücre canlılık testi ile araştırıldı.

Bulgular Bu çalışmada öncelikle GBM hücre hatlarından kanser kök hücreleri (KKH) Neurosefir Kültür modeli kullanılarak başarıyla izole edildi. Bu hücrelerin, nöronal kök hücre belirteçleri olan CD133 ve Sox 1 eksprese ettikleri gösterilerek karakterizasyonları yapıldı. Kanser kök hücrelerinin TMZ ile ölüm oranlarının farklılaşmış kanser hücrelerinden daha düşük olduğu tespit edildi.

Sonuç Bu çalışmada, KKH farklılaşmış kanser hücrelerine kıyasla TMZ'ye daha dirençli olduğunu gösterdik. Glioblastoma multiform'un tedavisinin daha etkili olarak yapılabilmesi, hastanın sağkalım süresinin uzatılması ve tümörün tamamen yok edilmesi için kanser kök hücrelerinin uygulanan tedaviye oluşturdukları direncin yok edilmesinin hedef alınması gerektiğini göstermektedir. .

Anahtar Kelimeler Glioblastoma multiform (GBM); Kanser kök hücreleri; Temozolomid; Kanser tedavisi; Kemoterapi

Abstract

Purpose Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive form of malignant brain tumour. Treatment of this disease become the greatest challenge due to the complexity of a tumour and numerous mechanisms involving drug resistance. TMZ- resistant cells have different characteristics from cancer cells in the heterogeneous cell population. Further analysis indicates some physiological and biological properties of stem cells such as markers and symmetrical/asymmetrical proliferative capacity. In this study, our aim is to make GBM therapy more effective by investigating the role of GBM stem cells in drug resistance. **(Sakarya Med J, 2018, 8(2):379-387).**

Materials and Methods Cancer cells with stem cell characteristics are generated from the glioblastoma cell lines using Neutrosphere Culture model. Expression of neuronal stem cell markers such as CD133 and Sox1 are examined by Western blot analysis. Temozolomide cytotoxicity of GBM cancer stem and differentiated cancer cells investigated by cell viability assay.

Results In this study, cancer stem cells are successfully isolated from GBM cell lines using Neurosphere Culture model. These cells are further characterized by looking at the expression of neural stem cell markers such as CD133 and Sox 1. The results demonstrated that after Temozolomide treatment Cancer stem cells (CSC) had lower viability compare to differentiated cancer cells.

Conclusion In this study, we demonstrate that CSC is more resistant to TMZ compare to differentiated cancer cells. The results of this study suggest that to improve patient outcome, CSC resistance needs to be targeted to achieve more effective treatment and improve patient outcome

KeyWords Glioblastoma multiform (GBM); Cancer stem cells; temozolomide; Cancer treatment; Chemotherapy

Giriş

Glioblastoma multiform (GBM), beyin tümörleri arasında en sık görülen bir merkezi sinir sistemi kanseri türüdür. Primer beyin tümörlerinin yaklaşık %20-30unu oluşturmakta olan GBM en hızlı seyirli ve ölümcül bir tümördür.[1,2] GBM'ın erken tanısının koyulması ve tedavinin hemen başlatılması hastanın sağkalım süresinin uzatılması için önem taşır. GBM tanısından hemen sonra cerrahi rezeksiyonu takiben eş zamanlı uygulanan adjuvant radyoterapi ve kemoterapi ile ortalama yaşam süresi en fazla 18-24 aya kadar uzatılabilmiştir.[3] Uygulanan kombine terapi sonrasında hastanın takibinde yapılan MRI taramasında tümörün aynı lokalizasyonda tekrarlandığı tespit edilmiştir.[4,5] Bu malign hastalığın tedavisinde karşılaşılan zorluk hem tümörün kendi doğasındaki karmaşıklıktan hem de ilaç direncine karşı sahip olduğu sayısız mekanizmaya dayanmaktadır.

Glioblastoma Multiforma'nın kemoterapi tedavisinde sıklıkla Temozolomid (TMZ) kullamılır.[6] Alkilleyici bir ajan olan TMZ, DNA'nın en kritik bölgesindeki guanin'in O6 pozisyonuna metil grubu ekleyerek hasar oluştururlar. Bu hasarlar kanser hücrelerinin G2/M hücre siklusunda durdurulmasını sağlayarak apoptosize yol açarlar.[7] Ancak, GBM hastalarının uygulanan bu TMZ kemoterapisine verdikleri yanıtlarda farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir.[8,9] Bununla birlikte, hastaların tedavi sürecinde Temozolomid'e direnç oluşturdukları ve hatta bazı hastalarının TMZ tedavisine yanıt vermediği görülmüştür. TMZ etkisiyle GBM hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının tamirini O6- metil guanin transferaz (MGMT) enzimi sağlamaktadır. Bu enzim, yapısında bulunan sistin grubu ve O6-guanin'ine bağlanmış olan metil grubu arasında kovalent bir bağı katalize ederek TMZ tarafından eklenen bu metil grubunu DNA'dan uzaklaştırır.[10] Bazı GBM hastalarının TMZ tedavisine yanıt vermediği görülmüştür. Bunun nedeni, GBM hücrelerinde O6- metil guanin transferaz (MGMT) enziminin fazla sentezlenmesi sonucu kanser hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının hızla tamir edilerek TMZ ile öldürülmemesidir. Çalışmalar, TMZ tedavisine yanıt vermeyen hastalarda MGMT enziminin fazla sentezlenmesi ile oluşan DNA hasarlarının hızlı bir şekilde tamir edilmesine sebep olarak kanser hücrelerinin ölümünü engelliklerini göstermişlerdir. Bu hastalarda GBM tedavisinin daha etkili olabilmesi için MGMT enzimini inhibe etmek hedeflenmiştir ve bu nedenden dolayı MGMT inhibitörleri geliştirilmektedir.[11-14]

Glioblastoma multiform da tümör hücreleri heterojenik yapıda olup kendilerini yenileyebilme özelliğine sahip olan hücrelere sahiptirler.[15,16] Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin CD133, Nestin, SOX-2 ve Olig2 gibi kök hücre belirteçlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir.[17-20] Dolayısıyla, bu hücreler kök hücre özelliğine sahip kanser hücreleri veya kanser kök hücreleri olarak tanımlanmışlardır. GBM hücre popülasyonu içinde bulunan kanser kök hücrelerinin yeniden tümörün oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte ilaca ve radyoterapiye karşı dirençli oldukları düşünülmektedir.

Glioblastoma multiforma hastaların TMZ ile tedavisinde sıklıkla karşılaşılan diğer bir sorun bazı hastaların TMZ nin sitotoksisitesine oluşturdukları dirençtir. Bu nedenle, TMZ direnç mekanizmasını tanımlamak ve potansiyel terapötik ajanları test etmek büyük önem taşımaktadır. Birçok GBM hücre hattının TMZ direnç kazandıkları tespit edilmiştir. Buna rağmen, gerçek ve adaptif TMZ dirençli GBM hücre popülasyonlarının özellikleri tam olarak karşılaştırılmamıştır.

GBM hastaların yaşam sürelerini uzatmak ve ilaca karşı verdikleri cevabı arttırmak için ilaç direncinin nedenlerini araştırmak önem arz etmektedir. Bu projede GBM'nin tekrar oluşmasına neden

olan ilaca karşı direnç araştırılmıştır. GBM kanseri hücre hatlarında temozolomide karşı oluşan sitotoksik dirence bu hücre hatlarından elde edilen kanser kök hücreleri ve farklılaşmış kanser hücrelerinde eşzamanlı olarak bakılmıştır. Hedefimiz GBM kök hücrelerinin TMZ'ye karşı oluşan ilaç direncindeki rolünü araştırarak GBM tedavisini daha etkili hale getirmektir.

Gereç ve Yöntemler

Bu çalışmada ATCC firmasından temin edilen hazır hücre hatları kullanıldığından etik kurul izni gerektirmemektedir. Bu çalışma deneysel araştırma yöntemler kullanılarak laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir. Çalışma Haziran 2017-Mart 2018 tarihleri arasında Biruni Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genom merkezinde yapılmıştır.

İstatistiksel analizler iki yönlü t-testi kullanılarak yapılmıştır. Veri noktalarının ortalama değerleri +/- SEM olarak tüm deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. İstatistik değerleri P değerinin 0,05'e eşit veya altında olduğu durumda anlamlı olarak kabul edildi. İstatistik anlamlılık değerleri şu şekilde gösterilmiştir: * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

GBM hüce hatlarından kanser kök hücrelerinin ve farklılaşmış hücrelerin eldesi

Glioblastoma hücre hatları olan U87 ve U118, ATCC firmasından temin edildi. Her bir hücre hattından kanser kök hücrelerinin popülasyonunu ayrıştırmak ve koruyabilmek için bu hücreler 1. pasajlarından itibaren % 1 B27 (Invitrogen),% 0.5 N2 (Invitrogen), 4ug / ml heparin, 20ng / ml bFG , 20ng/ml EGF (Sigma), ve 1% L-Glutamin takviyeli DMEM F12 ortamında (Gibco) üretildiler. Hücre hatlarından eş zamanlı farklılaşmış tümör popülasyonunu üretmek içinde % 10 FBS Sigma,% 1 L-glutamin ve % 1 sodyum piruvat ile takviye edilmiş MEM (Gibco) içinde kültür edildi. Tüm hücre kültürleri, % 5 C02 içeren 37 ° C'de inkübe edildi.

Western Blotlama

İmmünoblotlama için tüm hücre lizatları hazırlandı ve SDS tamponu içinde işleme alındı, ardından membranlar üzerine blotlandı ve önce birincil antikorlarla (tamamlayıcı materyal ve yöntemler) gece boyunca sonra ikinci antikorlarla 1-3 saat boyunca işaretlendi. Bağlanan antikorlar kemilüminesans (Thermo Scientific,USA) kullanılarak görüntülendi ve Image J programı kullanılarak belirtilen bantların ölçümü yapıldı.

Hücre canlılığı testi

Hücre canlılığını belirlemek için 96 kuyucuklu bir plakaya her kuyucuğa 2500 sayıda hücre düşecek şekilde ekim yapıldı ve bir gün boyunca bu hücreler büyümeye bırakıldı. Ardından hücreler farklı konsantrasyonlardaki temozolomid ile muamele edildi. Kontrol için ise hücreler temozolomid tedavisinin en yüksek konsantrasyon seyreltmesiyle aynı miktardaki DMSO ile muamele edildi. Hücre canlılığı dört gün sonra üreticinin talimatlarına göre CellTiter-Glo Testi (Promega) ile değerlendirildi. Bu deney canlı hücrelerdeki ATP seviyelerini ölçen işaretleyicilerin metabolik olarak aktif olduğu bir parlaklık testidir. Sinyaller bir plaka okuyucu tarafından kaydedilir.

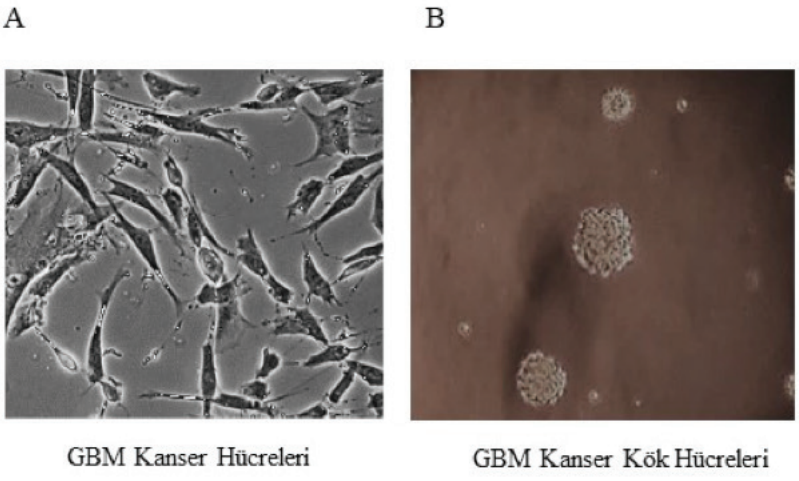
Sonuçlar

1. Glioblastoma hücre hatlarından kanser kök hücre izolasyonu

Teknik olarak zor olmasına rağmen hetorejenik tümör populasyonundan birçok yöntemle kanser kök hücrelerinin (KKH) izolasyonu yapılabilmektedir. Bu çalışmada ilk hedefimiz glioblastoma hücre

hatlarından kök hücre özellikleri taşıyan kanser hücreleri elde etmekti. Bu amaçla ilk olarak duyarlı ve özgül KKH izolasyonunu elde etmek için KKH modeli oluşturuldu. KKH modeli oluştururken serum içermeyen kök hücre kültürü (Neurosefir Kültür) sistemi kullanıldı. Bu metodla kök hücre özelliği taşıyan Glioblastoma kök hücreleri (GKHs) elde edildi.

Serum içeren kültür ortamı hücreleri farklılaşmaya yönlendirirken serum içermeyen ortamda büyütülen kök hücreler tek tabakalı olmaktan ziyade sferoid şeklinde büyümeye teşvik edilebilir. Glioblastoma hücre hatlarından olan U87 ve U118 hücreleri serum içeren kültür ortamında tek tabakalı olarak büyütüldüler (Şekil 1a).) Bu hücre hatları eş zamanlı olarak 3-5 pasaj nörosefir kültür ortamında (Epidermal ve Fibroblast Büyüme Faktörü (EGF,FGF) ve serum yerine B27) büyütüldü. Bu besi ortamında farklılaşmaları inhibe edilen hücreler yüzeye yapışmayarak hücre küreleri (sefir) halinde büyümeye başladı. (Şekil 1 b). Burada, serum içermeyen kültür ortamı olan nörosefir kültür ortamında hücrelerin farklılaşmasını durdurarak kök hücre populasyonunu arttırmayı amaçladık. Morfolojik analizde, U87 ve U118 glioblastoma hücre hatlarının serum içeren kültür ortamında tek tabakalı olarak farklılaşarak büyüdüğü (Şekil 1a) ve serum içermeyen nörosefir kültür ortamında ise süspansiyon ortamda sefir oluşturarak büyüdükleri gösterildi (Şekil 1b).



Şekil 1: Farklılaşmış glioblastoma hücreleri ve izole edilen kanser kök hücreleri
GBM hücre hatları serum içeren veya içermeyen nörosfer büyüme ortamında büyütülerek farklılaşmış ve kök hücreler elde edildi. A: Farklılaşmış GBM hücre hattı serum içeren kültür ortamında yapışık olarak büyütüldü. B: Glioblatoma kök hücreleri (GKH) serum içermeyen nörosfer besi ortamında büyütülerek izole edildi.

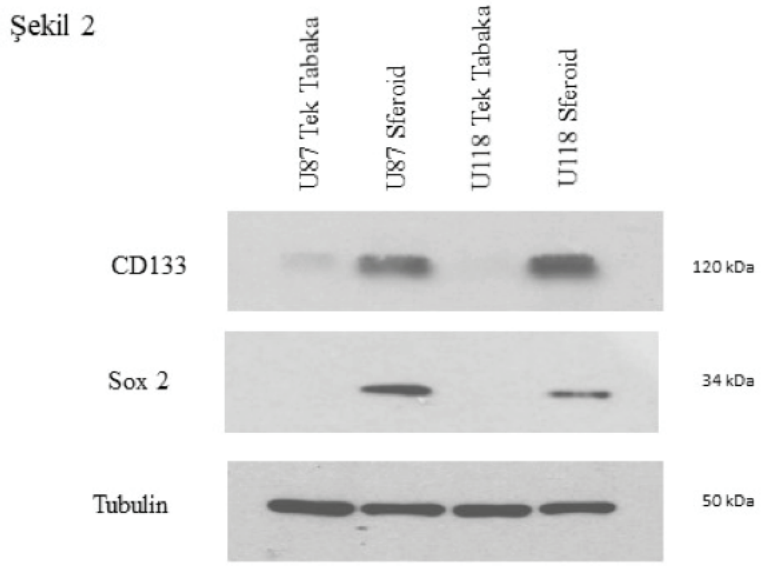
U87 ve U118 glioblastoma hücre hatları nörosefir kültür ortamında büyütülerek glioblastoma kök hücre (GKH) populasyonu arttırılmış ve bu elde edilen GKH ile farklılaşmış hücre populasyonlarının aynı sayıda pasaj sonucu elde edilmeleri sağlanmıştır. Bu şekilde elde edilen farklılaşmış ve kök hücreler daha sonraki analizlerde karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır.

2.Glioblastoma kanser kök hücrelerin karakterizasyonu

GBM hücre hatlarının nörosefir kültür ortamında sferoid olarak büyümeleri ve daha sonraki pasajlarda sferoid modelinden elde edilen bir hücrenin bölünerek sferoid oluşturabilmesi bu hücrelerin kök hücre özelliğinde olduğunun güçlü bir kanıtıdır. Kanser Kök Hücrelerinin ilaca direncini

araştırmadan önce bu hücrelerin moleküler karakterizasyonlarının yapılması ve bu hücrelerin kök hücre belirteçleri taşıyıp taşımadıklarına bakılması gerekmektedir. Kanser sferoid kök hücre modeli birçok çalışmada kullanılmış ve bu sistemin kök hücreleri zenginleştirdiği onaylanmıştır.[21] Bu çalışmada kanser kök hücreleri ve farklılaşmış hücre populasyonları karşılaştırmalı olarak araştırılacağı için sferoid model oluşturduğumuz tek tabakalı hücreler eş zamanlı olarak karakterize edildi.

Nöronal kök hücre belirteçleri olan CD133 ve Sox 1 protein ekspresyonları Western blot analizi kullanılarak araştırıldı. Bu belirteçlerin ekspresyonlarına U87 ve U118 hücre hatlarında sferoid ve tek tabakalı hücrelerde karşılaştırmalı olarak bakıldı. Her iki hücre hattı için U87 ve U118, sferoid hücreler kök hücre belirteçleri eksprese ederken tek tabakalı büyüyen farklılaşmaya uğramış hücrelerde çok düşük ve hemen hemen yok denilecek kadar az görülmüştür (Şekil 2). CD133 ekpresyonun U87 tek tabakalı hücrelerinde çok az olduğu ve U118 tek tabakalı hücrelerinde olmadığı tespit edilmiştir. CD133 ekpresyonun U87 ve U118 sferoid hücrelerinde tek tabakalı hücrelere oranla yüksek düzeyde olduğu western blot analizinde görülmüştür. Diğer bir nöronal kök hücre belirteci olan SOX2 nun U87 ve U118 sferoid hücrelerinde sadece ekpresyonları tespit edilmiştir. Her iki hücre hattında sferoid hücre modellerinde büyütülen hücrelerin kanser kök hücreler olduğu yukardaki belirteçlerin ekpresyonlarıyla kanıtlanmıştır.



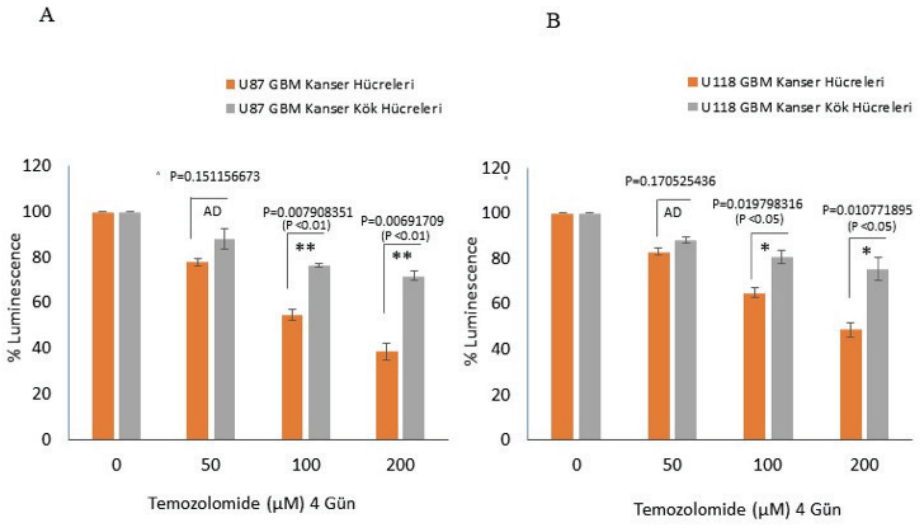
Şekil 2: Glioblastoma hücre hatlarından izole edilen kanser kök hücrelerin karakterizasyonu. Glioblastma hücre hatları olan U87 ve U118 den elde edilen kanser kök hücreleri ve farkllaşmış hücrelerde nöronal kök hücre belirteçleri olan CD133 ve Sox 1 protein ekspresyonlarına Western blot analizi ile bakıldı. Her kuyucuğa yüklenen protein miktarı Tubulin ile teyit edildi.

3.Glioblastoma kök hücrelerinin Temozolomide karşı oluşturdukları direnç.

Glioblastoma tedavisinde tümörün alınmasıyla birlikte uygulanan kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gösteren hücreler tümörün tekrarlanmasına sebep olmaktadır. GBM de bulunan heterojenik hücre populasyonu içindeki kanser kök hücrelerinin radyoterapi ve kemoterapiye karşı dirence sebep olduğu düşünülmektedir. Glioblastoma kemoterapisinde sıklıkla Temozolomide (TMZ) kullanılmaktadır6. TMZ kanser hücrelerini öldürme mekanizması DNA da oluşturdukları hasarlar sonu-

cu olmaktadır.[10] Bu çalışmada GBM hücre hatlarından elde edilen kanser kök ve farklılaşmış kanser hücrelerinde TMZ sitotoksisitesi hücre canlılık testi ile araştırıldı. Her iki kanser hücre hattında farklılaşmış ve kök hücrelerde karşılaştırmalı olarak eş zamanda bakıldı. GBM U87 hücre hattından izole edilen kanser kök hücrelerinin farklılaşmış kanser hücrelerine oranla en yüksek konsantrasyondaki temozolomid verildikten sonra canlılık oranlarının yaklaşık 2 katı olduğunu tespit ettik. Farklılaşmış kanser hücrelerinde artan TMZ dozuyla orantılı olarak hücre ölümü gerçekleşirken kanser kök hücrelerde düşük dozda görülen hücre ölümü çok az düzeyde farklılaşmıştır (Şekil 3A). Diğer bir GBM hücre hattı olan U118 da ise farklılaşmış ve kök hücre popülasyonlarında U87 hücrelerine oranla daha düşük hücre ölümü gözlenmiştir. Bu hücre hattında da TMZ ini kanser kök hücrelerini daha az öldürdüğünü tespit ettik (Şekil 3B).

Şekil 3



Şekil 3: Glioblastoma hücrelerinin Temozolimid ile uygulanan kemoterapiye karşı direnci. Glioblastoma kanser kök hücrelerin temozolide karşı dirençleri hücre canlılık testi ile araştırılmıştır. Hücreler üstüne 50uM, 100uM ve 200uM konsantırasyonlarındaki TMZ eklendikten 4 gün sonra temozolomidin sitotoksitesine canlılık testi ile bakılmıştır. Kontrol için hücreler sadece temozolomidin seyreltildiği DMSO ile muamele edildi. A: U87 hücre hattından elde edilen kanser kök ve farklılaşmış hücrelerin yukarıda belirtilen miktarda TMZ uygulamasının sonundaki hücre canlılığını göstermektedir. B: U118 kanser ve farklılaşmış hücrelerinin yukarıda belirtilen konsantırasyondaki TMZ ile muamelesinden sonraki elde edilen hücre canlılık düzeyleri. İstatistik değerleri P değerinin 0,05'e eşit veya altında olduğu durumda anlamlı olarak kabul edildi. İstatistik anlamlılık değerleri şu şekilde gösterilmiştir: * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001. Anlamli değil: AD.

Tartışma

Beyin tümörlerinin arasında en sık olarak erişkinlerde görülen Glioblastoma Multiform (GBM) en ölümcül tümörler arasında yer almaktadır. Yoğun araştırmalar yapılmasına rağmen GBM hastalarının sağkalım süreleri ancak 24 aya kadar uzatılmıştır.[22] GBM tedavisinde izlenen en etkin metod olan tümörün cerrahi rezeksiyonu ve bunu takiben uygulanan radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarından 6 ay sonra tümörün çıkarıldığı bölgede tekrar nüksettiği görülmüştür.[23,24] Bu hastaların yaşam sürelerinin uzatılması için yeni tedaviler geliştirilmesi önem taşımaktadır. GBM tedavisinde karşılaşılan güçlüklerden en önemlisi hastanın temozolomide karşı oluşturduğu direnç sonucu te-

daviye cevap vermemesidir. Birçok araştırma GBM tümörlerinden alınan biyopsilerinden elde edilen hücre hatlarının incelenmesi sonucunda bu hücrelerin heterojen yapıda olduklarını göstermiştir. GBM hastalarından elde edilen U118 ve U87 hücreleri tümör oluşturabilme kapasiteleri arasında farklar tespit edilmiştir.[25] Ayrıca heterojen yapıda olan bu hücrelerin kök hücre özelliği taşıyan kanser hücreleri içerdikleri tespit edilmiştir. Bu kanser kök hücreleri tümörün tekrar oluşmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle bu hücrelerin yapılan agresif kombine tedavi ile ölmemelerini sağlayan mekanizmalarının açığa çıkarılması GBM tedavisinde hedeflenecek önemli bir aşamadır. Bu hücreler asimetrik bölünme ile farklılaşmış kanser hücreleri üretirler ve aynı zamanda simetrik bölünme ile de kanser kök hücrelerini üretirler. Bu bölünme kanser kök hücre havuzundaki hücre popülasyonunun devamlılığını sağlamaktadırlar.[26] GBM in kesin tedavisi ancak bu hücrelerin tümünün öldürülmesiyle mümkün olabilir. Kanser kök hücrelerin farklılaşmış kanser hücrelerinde ayrıştırılmaları ve kanser kök hücre özelliklerini kaybetmeden hücre kültürü ortamında çoğaltılmaları önemlidir.

Bizim çalışmamızın sonuçları oluşan İlaç direncin sebeplerini ortaya çıkararak GBM tedavisinin daha etkili yapılmasına katkıda bulunmaktadır. Çalışmamızda GBM hücrelerinin nörosefir kültür ortamında büyütüldüğünde kök hücre özellikleri taşıyan kanser hücrelerin ayrıştırılabildiğini gösterdik (şekil 1). Bu araştırmada elde ettiğimiz sonuçlar kanser kök hücrelerinin izole edilmesindeki en önemli faktörün serum içermeyen kültür ortamı olduğununu göstermiştir. Serum hücrelerin farklılaşarak bölünmesini sağlamaktadır. Kültür ortamından serumu çıkararak U87 ve U118 glioblastoma hücrelerinin farklılaşmasını inhibe edip kök hücre populasyonunu arttırmayı başardık. İzole edilen GBM kök hücrelerinin TMZ sitotoksitesine duyarlılıklarını araştırmak ancak bu hücrelerin farklılaşmış kanser hücreleri ile karşılaştırılmalı olarak sitotoksiteye bakılması ile anlamlı olacağından iki hücre hattından da aynı sayıda pasaj yaparak eş zamanlı olarak farklılaşmış kanser hücreleri elde etmek önem taşımaktadır. Elde edilen Kanser Kök Hücrelerinin moleküler karakterizasyonlarının yapılması ve bu hücrelerin kök hücre belirteçleri taşıyıp taşımadıklarına bakılması gerekmektedir. Çalışmamızda U87 ve U118 Glioblastoma hücre hatlarından elde ettigimiz kanser kök hücrelerinin CD133 ve Sox 1 nöronal kök hücre belirteçlerini taşıdıklarını tespit ettik (şekil 2).

Araştırmalar radyoterapi ile TMZ'ın birlikte kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermiştir.[27] Bu çalışmalara dayanarak GBM hastalarının tedavisinde RT ile TMZ nin birlikte kullanımı yaygınlaşmıştır. Bir DNA onarım enzimi olan; O6-alkilguanin DNA alkiltransferaz (AGAT) olarak da bilinen O6-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT)'ın tümörün tedavi direnci ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir.[28,29] Bu enzim, alkilleyici ajanların hedeflerinden biri olan guanin'in O6 pozisyonundan alkil gruplarını uzaklaştırarak alkilleyici ilaçların etkisini azaltabilmektedir.[13-18] TMZ, DNA'nın en kritik bölgesinde bulunan guanin'in O6 pozisyonuna metil grubu ekler.[17,19,20] RT ile TMZ'in birlikte kullanılması; in vitro ve in vivo sinerji[21-23], TMZ doz yoğunluğunda iki katına kadar artış[24] ve MGMT'yi daha etkili bir şekilde tüketme potansiyeli[26] oluşturur. TMZ'in glioma hücrelerinde hücre siklusunda radyosensitif bir faz olan G2-M fazında durdurmaya neden olduğu gösterilmiştir.[27]

Glioblastoma multiforma hastalarının TMZ ile tedavisinde sıklıkla karşılaşılan bir sorun da bazı hastaların TMZ nin sitotoksisitene oluşturdukları dirençtir.[28] Bunun sebebi bazı hastalarda MGMT enziminin ekpresyonun fazla bulunması ve DNA tamir mekanizmalarının aşırı aktif olması sonucu TMZin oluşturduğu DNA hasarının onarılması olarak açıklanmaktadır. Kanser hücrelerinin bu mekanizmayla TMZ'ın sitotoksik etkisini ortadan kaldırdıkları düşünülmektedir.[28]

GBM tedavisinde sıklıkla karşılaşılan diğer bir sorunda da bu hastaların TMZ ye karşı direnç kazanmalarıdır.[29] Glioblastoma tedavisinde tümörün alınmasıyla birlikte uygulanan kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gösteren hücreler tümörün tekrarlanmasına sebep olmaktadır.[29] GBM hücrelerinin TMZ direnç kazandıklarının tespit edilmesine rağmen bu dirence neden olan mekanizmalar heterojenik hücre populasyonunda araştırılmamıştır. Ayrıca hastalardan elde edilen farklı kanser hücre türleri tümör oluşturma kapasitelerinde de farklılık göstermektedirler. U118 hücrelerinin oluşturduğu tümör U87 hücrelerinin oluşturduğu tümörlerden daha küçük olduğu gösterilmiştir.[25] Bu araştırmada U118 ve U87 hücre hatlarının seçilmesinin temel nedeni bu hücre hatlarının tümör oluşturma kapasitesindeki farklılıklarının ilaca karşı oluşturacakları direnç düzeylerine de etkisi olabileceğini düşündüğümüz içindir. Bu çalışmada GBM kanser kök hücrelerinin ve farklılaşmış kanser hücrelerinin TMZ sitotoksisitesine duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. Çalışmamız U118 ve U87 GBM hücre hatlarından elde edilen kanser kök hücrelerinin TMZ sitotoksisitesine farklılaşmış kanser hücrelerinden daha dirençli olduklarını göstermiştir (şekil 3). Bu sonuç GBM de bulunan heterojenik hücre populasyonu içindeki kanser kök hücrelerinin radyoterapi ve kemoterapiye karşı direncinin nedenini düşündürmektedir. Bununla birlikte bu hücrelerin TMZ sitotoksisitesine karşı gösterdikleri direnç sonucu, uygulanan yoğun tedavi rejiminden sonra GBM tümörünün tekrar nüksetmesinin nedeninin rezeksiyon yapılan bölgede kalmış olabilecek birkaç kanser kök hücresinin tekrar tümör oluşturabileceğini göstermektedir.

GBM'li hastaların yaşam sürelerini uzatmak için tedaviden sonra tümörün tekrarlanmaması gerekmektedir. Bunun sağlanması için tümör hücrelerinin TMZ ile etkili bir şekilde yokedilmesi ve ilaca karşı oluşan direncin ortadan kaldırılması önem arz etmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar GBM tedavinde uygulanacak kemoterapinin daha etkili olmasına ışık tutacaktır.

1. DeVita Jr J. Principles & Practice of Oncology 6th edition. InCancer Forum 2001 Nov (Vol. 25, No.3).
2. Kleihues P, Cavenee WK, editors. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. International Agency for Research on Cancer 2000 Jun. (Vol.2)
3. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. The lancet oncology. 2009 May 1;10(5):459-66.
4. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. Neurology. 1980 Sep 1;30(9):907.
5. Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, Herbort K, Gebarski SS, Martel MK, Radany EH, Lichter AS, Sandler HM. Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics. 1999 Jan 1;43(1):79-88.
6. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. Biochemistry. 1994 Aug 1;33(31):9045-51.
7. Silber JR, Bobola MS, Blank A, Chamberlain MC. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. 2012 Aug 1;1826(1):71-82.
8. Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., ... & Curschmann, J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. New England Journal of Medicine, 2005 March 352(10), 987-996.
9. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. New England Journal of Medicine. 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
10. Taioli E, Ragin C, Wang XH, Chen J, Langevin SM, Brown AR, Gollin SM, Garte S, Sobol RW. Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. BMC cancer. 2009 Dec;9(1):354.
11. Alonso MM, Gomez-Manzano C, Bekele BN, Yung WA, Fueyo J. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. Cancer research. 2007 Dec 15;67(24):11499-504.
12. Natsume A, Ishii D, Wakabayashi T, Tsuno T, Hatano H, Mizuno M, Yoshida J. IFN- down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. Cancer research. 2005 Sep 1;65(17):7573-9.
13. Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M. O6 methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. Journal of neurochemistry. 2006 Feb 1;96(3):766-76.
14. Van Nifterik KA, Van Den Berg J, Van Der Meide WF, Ameziane N, Wedekind LE, Steenbergen RD, Leenstra S, Lafleur MV, Slotman BJ, Stalpers LJ, Sminia P. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. British journal of cancer. 2010 Jun;103(1):29.
15. Piccirillo SG, Colman S, Potter NE, van Delft FW, Lillis S, Carnicer MJ, Kearney L, Watts C, Greaves M. Genetic and functional diversity of propagating cells in glioblastoma. Stem Cell Reports. 2015 Jan 13;4(1):7-15.
16. Sottoriva A, Spiteri I, Shibata D, Curtis C, Tavaré S. Single-molecule genomic data delineate patient-specific tumor profiles and cancer stem cell organization. Cancer research. 2013 Jan 1;73(1):41-9.
17. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer research. 2004 Oct 1;64(19):7011-21.
18. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature. 2004 Nov;432(7015):396.
19. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. Cell stem cell. 2009 May 8;4(5):440-52.
20. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature. 2006 Dec;444(7120):756.
21. Jensen SS, Meyer M, Petterson SA, Halle B, Rosager AM, Aaberg-Jessen C, Thomassen M, Burton M, Kruse TA, Kristensen BW. Establishment and characterization of a tumor stem cell-based glioblastoma invasion model. PloS one. 2016 Jul 25;11(7):e0159746.
22. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. New England Journal of Medicine. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
23. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. Neurology. 1980 Sep 1;30(9):907-.907.
24. Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, Herbort K, Gebarski SS, Martel MK, Radany EH, Lichter AS, Sandler HM. Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics. 1999 Jan 1;43(1):79-88.
25. Jaworski S, Sawosz E, Grodzik, Kutwin M, Wierzbicki W, a Włodyga K, Jasik A, ł Reichert M, Chwalibog A. Comparison of tumour morphology and structure from U87 and U118 glioma cells cultured on chicken embryo chorioallantoic membrane. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 2013 Dec 57, 593-598.
26. Bu P, Chen KY, Lipkin SM, Shen X. Asymmetric division: a marker for cancer stem cells?. Oncotarget. 2013 Jul;4(7):950.
27. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. New England Journal of Medicine. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
28. Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. DNA repair. 2007 Aug 1;6(8):1155-60.
29. Binabaj MM, Bahrami A, ShahidSales S, Joodi M, Joudi Mashhad M, Hassanian SM, Anvari K, Avan A. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta analysis of clinical trials. Journal of cellular physiology. 2018 Jan 1;233(1):378-86.