T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMADA TRİPTOFAN YOLAĞININ İNFLAMATUAR TÜMÖR MİKROÇEVRESİ VE AGRESİFLİĞE ETKİSİ

Dahil Can BUDAK
ORCID:0000-0001-9463-2962

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Translasyonel Onkoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
MAYIS 2025

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2022970042

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMADA TRİPTOFAN YOLAĞININ İNFLAMATUAR TÜMÖR MİKROÇEVRESİ VE AGRESİFLİĞE ETKİSİ

Dahil Can BUDAK
ORCID: 0000-0001-9463-2962

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Translasyonel Onkoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Doç.Dr.Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL
ORCID: 0000-0002-3201-4752

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından TYL-2024-3429 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
MAYIS 2025

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Glioblastomada Triptofan Yolağının İnflamatuar Tümör Mikroçevresi Ve Agresifliğe Etkisi'' başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Öğrencinin Adı Soyadı: Dahil Can BUDAK

Tarih:

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını tamamlarken, desteği ve katkılarıyla bu süreci müml tüm değerli insanlara teşekkür etmek istiyorum.

Öncelikle, bana rehberlik ettiği, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaştığı için ve sadece akademik anlamda değil, aynı zamanda bana verdiği moral ve cesaretle de bu süreç boyunca bana büyük katkılarda bulunup, her zaman sabırlı ve anlayışlı bir yaklaşım sergileyerek, bu araştırmayı daha güçlü bir hale getirmeme yardımcı olan, Sayesinde, bilimsel düşünme yetimi geliştirirken, akademik yolculuğumda birikimimi artırma fırsatım olmasına olanak sağladığı için değerli akademik danışmanım Doç. Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL'a

Kurumsal gelişime ve bilimsel üretkenliğe olan katkılarıyla, bölümümüzün güçlü ve saygın bir akademik yapıya kavuşmasında önemli rolü olan ve bölümümüze kazandırdığı vizyoner bakış açısı, akademik liderliği ve özverili çalışmaları için Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR'a,

Bana her konuda destek olup, moral veren, bu zorlu süreçte deneyimlerini esirgemeyen ve tez çalışmamda her zaman yardımcı olan, çok değerli Nurçin KAYACIK başta olmak üzere tüm ekip arkadaşlarıma,

Ayrıca; hayatımın her anında yanımda olan, eğitimim için çok büyük katkılar sağlayan, sabır göstererek beni daima destekleyen canım anneme ve kardeşlerime,

Son olarak, Babam, hayatım boyunca en büyük destekçim, ilham kaynağım ve sarsılmaz dayanağım oldu. Eğitim hayatımda attığım her adımda, gerek maddi gerek manevi olarak hep yanımdaydı. Ne yazık ki, bu satırları yazarken artık fiziksel olarak yanımda değil, fakat onun bana bıraktığı değerler, sevgisi ve desteği hep benimle. Onunla bu başarıyı paylaşamıyor olmak kalbimde büyük bir boşluk bıraksa da, bu çalışmayı onun anısına ithaf ediyorum. Her zaman gurur duyduğum ve bir ömür boyu minnettar olacağım canım babama sonsuz teşekkür ederim.

Dahil Can BUDAK

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ ..... **i**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ii**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
1.GİRİŞ **1**
1.1.Problemin Tanımı ve Önemi 1
1.2.Araştırmanın Amacı 1
1.3.Araştırmanın Hipotezleri 2
2.GENEL BİLGİLER **3**
2.1.Glioblastoma Multiform 3
2.2.Epidemiyoloji ve İnsidans 3
2.3.Glioblastoma Multiform Genetiği 3
2.4.İntra Tümör Heterojenliği 5
2.5.Gliomaların Sınıflandırılması 6
2.6.Mevcut Tedavi Yaklaşımları 8
2.7.Temozolomid 9
2.8.Glioblastomada TMZ Direnci ve Mekanizmaları 9
2.9.GBM'nin Agresifliği ve Tümör Mikroçevresi 10
2.10.GBM'de İmmün Sistem ve İnflamasyonun Rolü 12
2.11.Sitokinler 13
2.12.Triptofan Metabolizması ve Yolağı 15
2.12.1.Triptofanın Metabolik Yolları 15
2.12.2. Kinürenin Yolu ve Temel Enzimleri 15
2.12.3.Triptofan Metabolizmasının Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etkileri 16
2.12.4.İmmün Kaçış Mekanizmaları 18
2.13.Triptofan Yolağı ve Glioblastoma 19
2.13.1.IDO ve TDO'nun GBM'de Ekspresyonu ve Fonksiyonları 19
2.13.2.IDO/TDO'nun GBM'de Tümör İmmün Kaçışına Etkisi 20

2.13.3Triptofan Türevlerinin GBM Hücrelerinin Proliferasyonu ve İnvazyonuna Etkisi 20
2.13.4.Triptofan Yolağının GBM Agresifliği ile İlişkisi 21
2.13.5.Triptofan Metabolizmasının GBM'nin İmmünolojik Direnç Mekanizmalarındaki Rolü 21
2.14.Triptofan Yolağı Ve İnflamatuar Tümör Mikroçevresi 22
2.14.1.GBM'de İnflamasyonun Rolü 22
2.14.2.Triptofan Metabolitlerinin İnflamatuar TME Üzerindeki Etkileri 22
2.14.3.Mikrogliyal Aktivasyon ve Tümör Progresyonu 23
2.14.4Tümör ile Stromal Hücreler Arasındaki Etkileşimler 24
2.15.Triptofan Yolağını Hedefleyen Potansiyel Tedaviler 24
2.15.1. IDO ve TDO İnhibitörleri 24
2.15.2.Kombinasyon Tedavi Yaklaşımları 25
2.16.LM10- TDO İnhibitörü 26
2.17.Çalışmanın Bilimsel Önemi 26
2.18.Bu Çalışmanın Literatüre Katkısı ve Gelecek Perspektifler 27
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER 28
3.1.Araştırmanın Tipi 28
3.2.Araştırmanın Yeri ve Zamanı 28
3.3.Araştırmanın Örneklemi 28
3.4.Çalışma Materyali 28
3.5.Araştırmanın Değişkenleri 28
3.6.Veri Toplama Araçları 29
3.6.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar 29
3.6.2.Potansiyel İlaç Adaylarının Belirlenmesi ve İn Siliko Analiz 31
3.6.3.Hücre Kültürü 32
3.6.4.Temozolomid Çözeltisinin Hazırlanması 33
3.6.5.LM10 Çözeltisinin Hazırlanması 33
3.6.6.İlaç Sitotoksisite Deneyi ve IC50 Hesaplamaları 33
3.6.7.Hücre Göç Analizi (Wound Healing Assay) 33
3.6.8.Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Analizi 34

4.BULGULAR 37
4.1.İn Siliko Farmakokinetik Analiz Bulguları 37
4.2.Temozolomid ve LM10 Konsantrasyonların Belirlenmesi ve Canlılık Üzerine Etkileri 38
4.3.Temozolomid ve LM10'un Hücre Göçü Üzerine Etkisi 40
4.4.Temozolomid ve LM10'un IL-6, IL-8, IFN-β ve PDL-1 Gen 4 Ekspresyonları Üzerine Etkisi 43
4.4.1. IL-6 Gen Ekspresyonu 43
4.4.2. IL-8 Gen Ekspresyonu 44
4.4.3. IFN-β Gen Ekspresyonu 45
4.4.4. PD-L1 Gen Ekspresyonu 46
5.TARTIŞMA 48
6.SONUÇ VE ÖNERİLER 53
7.KAYNAKLAR 54
8.EKLER 72
EK 1: ETİK KURUL ONAYI 72
EK2: KATKI 74
EK 3: ÖZGEÇMİŞ 75

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Tez çalışmasının zamansal akışı……..…..28

Tablo 2. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar…… .29

Tablo 3. U87-MG hücrelerinin özellikleri…...……....32

Tablo 4. Primer dizileri……...……35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Glioblastomanın intratümör heterojenliği……....6
Şekil 2. Temozolomid yapısı ……...9
Şekil 3. Glioblastoma tümör mikroçevresi…… 11
Şekil 4. Kynurenine yolu ile triptofan metabolizması……... 19
Şekil 5. LM10 bileşiğine ait SwissADME BOILED-Egg grafiği……...37
Şekil 6. U87-MG hücrelerinde TMZ'nin hücre canlılığına etkisi……. 38
Şekil 7. U87-MG hücrelerinde LM10'un hücre canlılığına etkisi …….39
Şekil 8. U87-MG hücrelerinde canlılık analizlerine ait sonuçlar…….. 40
Şekil 9. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarına ait yara iyileşmesi deneylerinin görüntüleri……..…41
Şekil 10. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında 24. saate ait yara iyileşmesi analizlerinden elde edilen yara kapanma yüzdeleri …….…….41
Şekil 11. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında 48. saate ait yara iyileşmesi analizlerinden elde edilen yara kapanma yüzdeleri…….…..42
Şekil 12. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında IL-6 gen ekspresyon sonuçları…….…. 44
Şekil 13. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında IL-8 gen ekspresyon sonuçları…….…. 45
Şekil 14. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında IFN-Beta gen ekspresyon sonuçları …….46
Şekil 15. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında PDL-1 gen ekspresyon sonuçları…….. 47

SİMGELER VE KISALTMALAR

GBM: Glioblastoma Multiforme

TDO: Triptofan 2,3-dioksijenaz

IDO: İndoleamin 2,3-dioksijenaz

KBB: Kan beyin bariyeri

DNA: Deoksiribonükleik asit

IL-6: Interlökin-6

IL-8: Interlökin-8

IFN-β: Interferon-beta

PD-L1: Programlanmış ölüm ligand 1

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

FBS: Fetal sığır serumu

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

IC50: Maksimum inhibisyon konsantrasyon 50 (IC50)

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

%: Yüzde

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

mM: Milimolar

µM: Mikromolar

ºC: Santigrat Derece

GLİOBLASTOMADA TRİPTOFAN YOLAĞININ İNFLAMATUAR TÜMÖR MİKROÇEVRESİ VE AGRESİFLİĞE ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Dahil Can BUDAK

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM), merkezi sinir sisteminde en çok görülen ve oldukça agresif karakterli beyin tümörüdür. Yüksek proliferasyon kapasitesi, invaziv büyüme paterni ve mevcut tedavilere karşı direnç geliştirmesi nedeniyle prognozu kötüdür ve sağkalım süresi sınırlıdır. Triptofan metabolizmasının özellikle kinürenin yolu üzerinden ilerleyen kolunun GBM'nin progresyonunda, ve tümör immün mikroçevresinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Triptofanın büyük kısmı (%90'dan fazlası) kinürenin yoluyla metabolize edilir ve bu süreçte, tümör mikroçevresini etkileyen kinürenin türevleri oluşur. Bu metabolik yolda görev yapan TDO (Triptofan 2,3-dioksijenaz) enzimi, sürecin hızını belirleyen temel enzimlerden biridir. Kinürenin yolu pek çok solid tümörde tedavi hedefi olarak araştırılmış olsa da, GBM'ye özel olarak TDO inhibitörlerinin etkileri yeterince incelenmemiştir. Bu nedenle, bu çalışmada, triptofan metabolizmasında yer alan TDO'yu hedef alan deneysel bileşik LM10'un, GBM hücre hattı U87-MG üzerinde, TMZ ile kombinasyon şeklinde kullanılması sonucundaki biyolojik etkileri değerlendirilmiştir.

Bu doğrultuda, TDO inhibitörü LM10'un temozolomid ile kombine olarak uygulanmasının: GBM hücre canlılığı üzerindeki etkisi resazurin testi ile, hücre göçü yara iyileşmesi testi ile, ve immün mikroçevre ile ilişkili moleküler belirteçler olan IL-6, IL-8, IFN-β ve PD-L1 düzeyleri de gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edilmiştir.

Hücre canlılığı analizlerinde, TMZ + LM10 kombinasyonu uygulaması, tek başına TMZ uygulamasına kıyasla hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Hücre göçüne analizlerinde, 48. saat kombinasyon uygulaması, TMZ uygulamasına göre hücre göçünü istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır. Gen ekspresyon analizlerine göre, kombinasyon uygulaması, IL-8'in ekspresyonunu hem TMZ hem de LM10 tekli uygulamasına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. IL-6 düzeylerinde ise, kombinasyon uygulaması LM10 uygulamasına göre anlamlı azalma sağlamış, ancak TMZ uygulamasına kıyasla anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç olarak, GBM hücrelerinde TMZ ve LM10 kombinasyon uygulanmasının tek başına TMZ uygulamasına göre sitotoksisiteyi artırdığı, hücre göçünü azalttığı ve immün mikroçevre ile ilişkili sitokinlerden IL-8 ve IL6'ya yönelik azaltıcı etki gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Glioblastoma, temozolomid, triptofan 2,3-dioksijenaz, LM10, triptofan metabolizması, inflamatuvar mikroçevre

Tezin sayfa adedi: 77

Danışman: Doç.Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL

EFFECT OF TRYPTOPHAN PATHWAY ON INFLAMMATORY TUMOR MİCROENVİRONMENT AND AGGRESSİVENESS İN GLİOBLASTOMA

Master Thesis

Dahil Can BUDAK

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCINCE INSTITUTE

Department of Oncology

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and highly aggressive primary brain tumor of the central nervous system. Its poor prognosis is attributed to high proliferative capacity, invasive growth, and the development of resistance to standard therapies. Despite multimodal treatment approaches, including surgical resection, radiotherapy, and temozolomide (TMZ)-based chemotherapy, overall survival remains limited. Recent studies have shown that the kynurenine branch of tryptophan metabolism plays a significant role in GBM progression and in regulating the tumor immune microenvironment. More than 90% of tryptophan is metabolized via the kynurenine pathway, generating immunosuppressive metabolites. One of the key rate-limiting enzymes in this pathway is tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), which facilitates the conversion of tryptophan into kynurenine. While the kynurenine pathway has been explored as a therapeutic target in various solid tumors, the effects of TDO inhibitors in GBM remain under-investigated. In this study, we evaluated the biological effects of LM10, an experimental TDO inhibitor, in combination with TMZ, on the human GBM cell line U87-MG.

The effects of LM10 and TMZ, both alone and in combination, were assessed in terms of cell viability (resazurin assay), cell migration (wound healing assay), and the expression of immune microenvironment-related markers (IL-6, IL-8, IFN-β, and PD-L1) using quantitative real-time PCR.

The combination of TMZ and LM10 significantly reduced cell viability compared to TMZ alone. At 48 hours, the combination treatment also led to a statistically significant reduction in cell migration. Moreover, IL-8 expression was significantly suppressed by the combination compared to both monotherapies. While IL-6 levels were significantly lower in the combination group than in the LM10 group, no significant difference was observed compared to TMZ alone.

In conclusion, the TMZ + LM10 combination enhanced cytotoxicity, inhibited cell migration, and suppressed IL-8 and IL-6 expression, suggesting potential therapeutic benefit in GBM.

Keywords: Glioblastoma, tryptophan metabolism, inflammatory microenvironment, temozolomide, LM10

Page number: 77

Advisor: Assoc.Prof.Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL

1.GİRİŞ

1.1.Problemin Tanımı ve Önemi

Glioblastoma multiforme (GBM), merkezi sinir sisteminin en agresif ve yaygın görülen primer malign tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflamasına göre derece IV astrositom olarak tanımlanan bu tümör, hızlı büyüme, yüksek invazivlik, heterojenite ve tedaviye direnç gibi özellikleri nedeniyle hastaların yaşam süresi ve kalitesini ciddi şekilde olumsuz etkilemektedir. Cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve temozolomid (TMZ) temelli kemoterapiye dayanan multimodal tedavilere rağmen, GBM hastalarında ortalama sağkalım süresi 12–15 ay ile sınırlıdır. Bu durum, yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, triptofan metabolizmasının özellikle kinürenin yolu üzerinden ilerleyen kolunun, GBM'nin progresyonunda, immün kaçış mekanizmalarında ve inflamatuar mikroçevrenin düzenlenmesinde kritik rol oynadığını göstermektedir. Triptofan, %90'dan fazlası kinürenin yolu üzerinden metabolize edilen esansiyel bir amino asittir. Bu yol, triptofanı immün yanıtı baskılayıcı özelliklere sahip kinürenin türevlerine çevirir. Bu dönüşüm, başta T hücreleri olmak üzere immün hücrelerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu baskılayarak tümör hücrelerinin immün sistemden kaçmasına neden olur.

Kinürenin yolunun anahtar enzimleri olan IDO (İndoleamin 2,3-dioksijenaz) ve TDO (Triptofan 2,3-dioksijenaz), triptofanın kinürenine dönüşümünü başlatan hız sınırlayıcı basamakları katalizler. Bu süreç sadece triptofan tükenmesine neden olmakla kalmaz, aynı zamanda tümör mikroçevresinde anti-inflamatuar sitokinlerin (IL-10, TGF-β) artışına, pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-6, TNF-α) dengesiz üretimine ve T hücresi fonksiyonlarının inhibisyonuna yol açar. Bu durum, GBM'nin immün baskılayıcı ortamında tümör büyümesi ve invazyonu için elverişli bir zemin oluşturur. Ayrıca kinürenin türevleri, IFN-β gibi immün düzenleyici faktörlerin üretimini de etkileyerek tümörle ilişkili inflamasyonu şekillendirir.

Literatürde kinürenin yolunun meme, akciğer ve over kanserleri gibi çeşitli tümör tiplerinde terapötik hedef olarak araştırıldığı ve bazı IDO inhibitörlerinin klinik araştırmalarda test edildiği bilinmektedir. Ancak, GBM'ye özgü olarak TDO inhibitörleri ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Oysaki son bulgular, TDO'nun

özellikle gliomalarda aşırı ifade edildiğini ve bu enzimin kan-beyin bariyerini geçebilen inhibitörlerle hedeflenmesinin, GBM tedavisinde yeni bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

1.2.Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın temel amacı, glioblastoma (GBM) tedavisinde triptofan metabolizmasının önemli bir kolu olan kinürenin yolunu hedef alarak, TDO (triptofan 2,3-dioksijenaz) inhibitörü LM10 ile Temozolomid (TMZ)kombinasyonunun terapötik potansiyelini değerlendirmektir.

Bu doğrultuda, TDO inhibitörünün temozolomid ile birlikte uygulanmasının: GBM hücre canlılığı üzerindeki etkisi (kemoterapiye duyarlılığın artırılması), hücre migrasyonu ve invazyon kapasitesinin baskılanması, ve tümör mikroçevresinde immün yanıtla ilişkili moleküler belirteçler olan IL-6, IL-8, IFN-β ve PD-L1düzeylerinde meydana getirdiği değişiklikler ayrıntılı biçimde araştırılacaktır.

Bu çalışma ile triptofan metabolizmasının GBM hücrelerinde immün mikroçevreyi yeniden şekillendiren etkilerinin anlaşılması hedeflenmekte olup, elde edilecek verilerin TDO hedefli immüno-metabolik kombinasyon tedavileri için bilimsel bir temel oluşturması beklenmektedir.

1.3.Araştırmanın Hipotezleri

Kinürenin yolu üzerinden çalışan TDO enzimi, glioblastomada hem tümör hücrelerinin yaşamını desteklemekte hem de immünosupresif mikroçevrenin oluşmasına katkıda bulunmaktadır. TDO inhibitörü LM10'un temozolmid ile kombinasyonu, hem GBM hücrelerinin proliferatif ve migratif yeteneğini baskılayacak hem de tümör immün-mikroçevresiyle ilişkili moleküllerin (IL-6, IL-8, IFN-β, PD-L1) modülasyonunu sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Glioblastoma Multiform

GBM, astrositlerden meydana gelen dünya genelinde en agresif primer beyin tümörlerinden biridir. Bu tümör, tüm primer beyin tümörlerinin yaklaşık %15'ini ve malign beyin tümörlerinin %50'sini oluşturur (1). Yetişkinlerde en sık görülen ve genellikle 45-70 yaş arasındaki bireylerde daha yaygın olan malign beyin tümörüdür.

2.2 Epidemiyoloji ve İnsidans

GBM, primer beyin tümörlerinin yaklaşık %15-20'sini oluşturur ve yetişkinlerde en sık görülen kötü huylu beyin tümörüdür. GBM insidans oranı yaklaşık 3-4/100.000 kişi/yıl olarak rapor edilmektedir ve erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür (2). Bunun yanında raporlanan vaka oranının gelişmiş ülkelerde daha yüksek olduğu bilinmektedir; bu durumun çevresel ve genetik faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (3).

GBM, her yaşta görülebilse de, özellikle 45-70 yaş aralığında daha sık teşhis edilir. Erkeklerde kadınlara göre daha yüksek bir insidansa sahiptir (4). Ayrıca, iyonize radyasyona maruz kalma ve ailesel kanser öyküsü gibi risk faktörleri de GBM gelişiminde rol oynayabilir. Genetik olarak, IDH mutasyonları ve MGMT promotör metilasyonu gibi biyobelirteçler GBM prognozunu ve tedavi yanıtını etkileyebilir. Ancak, GBM gelişiminde çevresel faktörlerin sınırlı bir rol oynadığı ve bu tümörün büyük ölçüde sporadik genetik değişikliklerle ortaya çıktığı bilinmektedir (5). Bu durum, GBM' nin önlenmesi ve tedavisinde genetik araştırmaların önemini vurgulamaktadır.

2.3 Glioblastoma Multiform Genetiği

GBM, genetik olarak oldukça heterojen bir tümördür ve gelişiminde birden fazla moleküler yolak yer alır (5). GBM'nin genetik profili, hücresel proliferasyonu artıran, apoptozu inhibe eden ve invazyonu kolaylaştıran birçok genetik ve epigenetik değişikliği içerir. En yaygın görülen genetik değişikliklerden biri, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) genindeki amplifikasyon veya mutasyonlardır. EGFR değişiklikleri, hücre büyümesini ve hayatta kalmayı teşvik eden sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açar. Ayrıca, tümör baskılayıcı gen olan TP53 mutasyonları ve

PTEN kaybı, GBM patogenezinde önemli rol oynar (6).

TP53, hücre siklusunun kontrolü ve hücre ölümü mekanizmalarında görev alan tümör baskılayıcı bir gendir ve özellikle IDH mutasyonlu GBM alt tiplerinde sıklıkla mutasyona uğrar. TP53 mutasyonu, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına rağmen hücre döngüsünün devam etmesine ve tümör gelişiminin kolaylaşmasına neden olur. Öte yandan, EGFR geni, GBM' lerin yaklaşık %40-50'sinde amplifiye olur ve özellikle EGFRvIII gibi mutasyonlar, hücre proliferasyonu ve tümör invazyonunu artırır. EGFR mutasyonları çoğunlukla IDH mutasyonu olmayan (yabanıl tip-wild-type) GBM' lerde görülür ve agresif seyirle ilişkilidir. PTEN ise bir diğer tümör baskılayıcı gendir ve mutasyonları, PI3K/AKT/mTOR yolunun kontrolsüz aktivasyonuna yol açarak hücre hayatta kalma sinyallerini artırır. PTEN kaybı, genellikle EGFR amplifikasyonu ile birlikte görülür ve GBM hücrelerinin invaziv ve tedaviye dirençli fenotipler kazanmasına katkıda bulunur. Sonuç olarak tüm bunlar, hücresel kontrol mekanizmalarının devre dışı kalmasına ve anormal hücre büyümesine neden olur (7, 8).

Bir diğer kritik moleküler değişiklik ise IDH (izositrat dehidrogenaz) gen mutasyonlarının varlığıdır. Isositrat dehidrogenaz (IDH) gen mutasyonları, gliomların moleküler sınıflandırılmasında ve prognoz değerlendirmesinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle IDH1 ve IDH2 genlerinde görülen mutasyonlar, GBM'nin sekonder formunda daha yaygın olup, genellikle daha genç yaş grubunda ortaya çıkar ve daha iyi prognoz ile ilişkilidir (9). Primer GBM' lerde ise bu mutasyon nadirdir. IDH mutasyonu sonucu normalde alfa-ketoglutarat üreten enzim, bunun yerine onkometabolit olarak kabul edilen 2-hidroksiglutarat (2-HG) üretir (10). Bu birikim, DNA ve histon metilasyonlarını etkileyerek epigenetik yeniden programlamaya yol açar ve tümör hücrelerinin farklılaşmasını engelleyebilir. Bu mutasyon ayrıca glioma-CpG island methylator phenotype (G-CIMP) olarak bilinen geniş çaplı DNA metilasyon profiliyle ilişkilidir (11). IDH-mutant GBM'ler, genellikle TP53 ve ATRX mutasyonları ile birlikte görülürken, EGFR amplifikasyonu ve TERT promotör mutasyonları gibi değişiklikler çoğunlukla IDH yabanıl tip GBM'lere özgüdür. Bu nedenle, IDH mutasyonları sadece tanısal bir belirteç olmakla kalmaz, aynı zamanda hasta yönetiminde ve tedavi stratifikasyonunda da önemli bir prognostik faktördür (12,13,14).

TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) geni, telomerlerin korunmasında görevli olan telomeraz enzimini kodlar. GBM'de özellikle IDH wild-type alt tipte sık görülen TERT promotör mutasyonları, telomeraz aktivitesini artırarak hücrelerin sınırsız bölünebilme kapasitesine ulaşmasına katkı sağlar. Bu mutasyon, tümör hücrelerinin ölümsüzleşmesine neden olur ve kötü prognoz ile ilişkilidir. TERT mutasyonu, özellikle EGFR amplifikasyonu ile birlikte sık görülür (15).

ATRX geni, kromatin yeniden şekillenmesi ve telomer stabilitesinde görev alır. Bu genin kaybı, gliomlarda alternatif telomer uzatma mekanizmasının (ALT) aktifleşmesine neden olur. IDH-mutant ve TP53-mutant gliomlarda sıklıkla ATRX kaybı görülür ve bu durum genellikle TERT mutasyonu ile karşılıklı dışlayıcıdır (mutual exclusive). ATRX kaybı, gliomların tanı ve moleküler sınıflandırmasında önemli bir belirteçtir (16).

MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) geni, DNA'daki alkilleşmiş guanin kalıntılarını onararak genetik bütünlüğü koruyan bir DNA tamir enzimini kodlar. Bu genin özellikle promotör bölgesinin metilasyonu, GBM tedavisinde önemli bir biyobelirteçtir. MGMT promotör metilasyonu, gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olarak DNA onarım kapasitesini azaltır ve alkilleyici kemoterapötik ajanlara (özellikle TMZ) karşı hücrelerin duyarlılığını artırır. Bu nedenle, MGMT promotörü metile olan hastalar, kemoterapiden daha fazla fayda görür ve genellikle daha uzun sağkalım süresi ile ilişkilendirilir. Öte yandan, metillenmemiş (aktif) MGMT promotörü, ilaca dirençli tümör fenotiplerinin ortaya çıkmasına katkı sağlar. Bu nedenle MGMT metilasyon durumu, GBM hastalarında tedavi yanıtını öngörmede kullanılan önemli bir prediktif ve prognostik biyobelirteçtir (8).

GBM'nin genetik yapısındaki bu farklılıklar, tümörlerin tedaviye olan yanıtını ve prognozunu belirleyen önemli faktörlerdir ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde temel rol oynar.

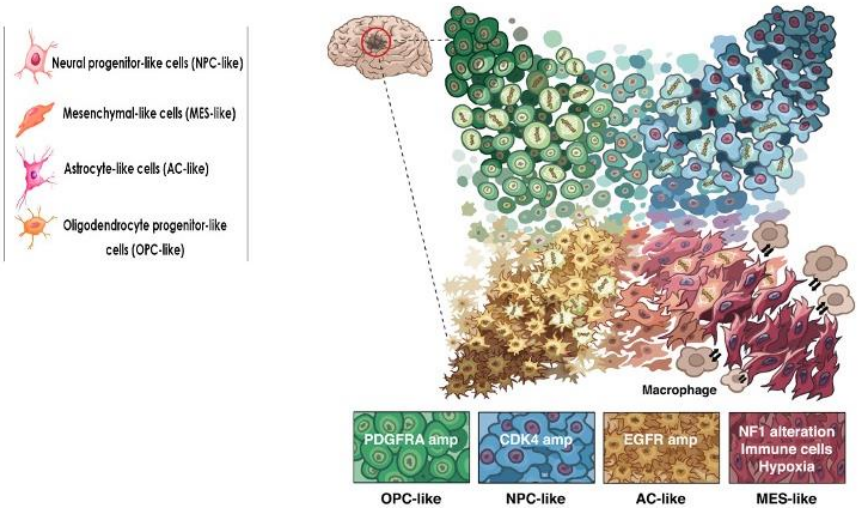
2.4 İntra Tümör Heterojenliği

İntra-tümör heterojenliği, bir tümörün içinde birden fazla genetik, epigenetik, transkriptomik ve mikroyapısal farklılığın bulunması anlamına gelir. Bu durum, tümörün farklı bölgelerinde veya tek bir hücre popülasyonunda dahi farklı biyolojik

özelliklerin bulunmasına yol açar (17). Glioblastomların, aileden ileri gelen kalıtsal temelinin üzerine eklenen genetik değişikliklerin etkisiyle nöral/glial progenitör hücrelerinin kanserleşmesi sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Sonradan edinilen genetik bozuklukların rastlantısal değil, belirli bir düzen içinde eklendiği ve her yeni genetik değişikliğin, kanser hücresi gruplarının farklı karakteristik özellikler kazanmasına yol açtığı gösterilmiştir (15).

Bu süreç, GBM kitlesini farklı alanlarda, farklı oranlarda görülen ve çeşitli genetik özelliklere sahip klonlardan oluşan bir malign hücre havuzuna dönüştürür. Farklı gruplar, kendilerine özgü gen ekspresyon özelliklerine sahiptir. Bu özellikler, tek hücre RNA dizileme teknolojisi aracılığı ile dört temel gruba ayrılmıştır. Bu gruplar; nöral progenitör hücre benzeri, oligodendrosit progenitor hücresi benzeri, astrosit benzeri ve mezenkimal hücrelerdir (Şekil 1) (19).

Bu gruplar, tümör mikroçevresindeki damarlanma, oksijenlenme, immün infiltrasyon gibi dinamik ve değişken çevresel faktörlere uyum sağlar (20). Bu adaptif yetenek, glioblastomun tedaviye dirençli yapısının temelini oluşturur.



Şekil 1. Glioblastomanın intratümör heterojenliği (19)

2.5 Gliomaların Sınıflandırılması

Düşük dereceli gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflamasına göre Derece I ve II olarak değerlendirilen, genellikle yavaş büyüme gösteren beyin tümörleridir (8). Bu tümörler, düşük hücresel atipi, sınırlı mitotik aktivite ve genellikle

iyi sınırlı yapılarıyla karakterizedir. Klinik olarak daha hafif semptomlara neden olsalar da, anatomik yerleşimlerine bağlı olarak nörolojik fonksiyonları etkileyebilirler. En sık görülen düşük dereceli gliomlar arasında pilositik astrositom ve diffüz astrositom yer alır (21). Tedavi seçenekleri arasında cerrahi rezeksiyon ön plandadır, ancak malign transformasyon riski nedeniyle dikkatli izlem gerektirirler.

Yüksek dereceli gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü-WHO sınıflamasında Derece III ve IV olarak tanımlanan, malign potansiyeli yüksek, hızlı proliferasyon ve invazyon yeteneği gösteren tümörlerdir (22). Bu grup, anaplastik astrositom (Derece III) ve GBM (Derece IV) gibi agresif tümörleri içerir. Hücresel atipi, yüksek mitotik aktivite, nekroz ve anjiyogenez gibi belirgin histopatolojik özellikler sergilerler (23). Klinik seyirleri hızlı progresyon, tedaviye direnç ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Tedavi yaklaşımları cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapinin kombinasyonundan oluşur; ancak bu yöntemlere rağmen, yüksek dereceli gliomalar sıklıkla tekrarlama eğilimindedir ve yaşam süresi genellikle sınırlıdır (24).

Bu ayrım, gliomaların biyolojik davranışlarını anlamak ve hasta için en uygun tedavi stratejisini belirlemek açısından kritik öneme sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü - WHO beyin tümörleri sınıflandırmasına göre GBM, IV. derece bir tümör olarak tanımlanır (25). Bu derece, GBM' nin hızlı proliferasyon, nekroz, mikrovasküler proliferasyon ve invazyon gibi özelliklerini yansıtarak en yüksek malignite seviyesini ifade eder. WHO 2021 sınıflandırması, GBM' i IDH mutasyon durumuna göre de ayırır: IDH-mutant GBM ve IDH-yabanı tipi GBM. IDH-mutant GBM' ler, genellikle daha iyi prognoza sahipken, IDH-yabanı tipi GBM' ler daha agresif bir seyir gösterir (23). Bu sınıflandırma, tanı ve tedavi planlamasında önemli bir rehberdir.

Buna ek olarak; Kanser Genom Atlası (Cancer Genome Atlas-TCGA) projesi kapsamında yapılan kapsamlı genomik analizler sonucunda, GBM dört moleküler alt tipe ayrılmıştır: Pronöral, klasik, mezenkimal ve nöral. Bu alt tipler, tümörün genetik profiline göre sınıflandırılmış ve her biri belirli genetik değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Pronöral alt tip, genellikle IDH1 mutasyonu ve PDGFRA amplifikasyonu ile karakterizedir ve daha iyi prognoz ile ilişkilendirilir. Klasik alt tip, sıklıkla EGFR amplifikasyonu gösterir ve genellikle TP53 yabanıl tip özelliği taşır (26). Mezenkimal alt tip ise NF1 kaybı ile ilişkilidir ve yüksek invazivlik ve kötü prognoz ile karakterizedir. Son olarak, nöral alt tip, nöronal belirteçlerin (NEFL,

GABRA1, SYT1 gibi) ekspresyonu ile tanımlansa da, bu alt tipin klinik anlamı sınırlı kabul edilmektedir. Bu moleküler sınıflama, GBM'nin heterojen doğasını anlamada ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemli bir temel oluşturmuştur (27).

2.6 Mevcut Tedavi Yaklaşımları

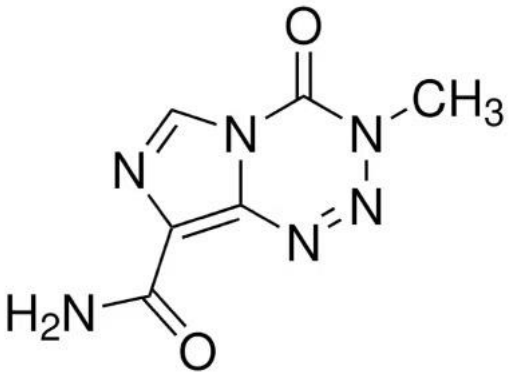
GBM' nin tedavi süreci, genellikle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapinin kombinasyonunu içeren multidisipliner bir yaklaşımı gerektirir. Ancak, tümörün mikroskobik invazyon gösterme eğilimi ve tedaviye olan dirençliliği nedeniyle, tam bir iyileşme sağlanması oldukça zordur. Bu nedenle, GBM tedavisinde yapılan çalışmalar, mevcut tedavi yöntemlerini iyileştirmek ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek üzerine yoğunlaşmaktadır.

Günümüzde GBM tedavisinin temel yaklaşımları cerrahi rezeksiyon, postoperatif radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonunu içerir (28). TMZ, bu hastalığın standart kemoterapi ajanı olarak kullanılmakta olup, tümör hücrelerinin DNA'sına zarar vererek hücresel ölümün indirilmesini amaçlar. Radyoterapi, tümörün bölgesine yönelik yüksek dozda uygulanan fraksiyonel ışın tedavisi ile mikroskobik hücreleri yok etmeyi hedefler. Bununla birlikte, GBM' nin genetik heterojenitesi ve tedaviye karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları, tedaviye yanıtı sınırlamakta ve hastalığın tekrarlama oranlarını artırmaktadır (29). Bu zorluklar, yeni tedavi stratejilerinin ve biyomarkerlerin keşfedilmesi ihtiyacını doğurmuştur. GBM tedavisinde karşılaşılan en önemli zorluklardan biri, KBB varlığıdır. KBB, merkezi sinir sistemini koruyan seçici geçirgen bir yapıdır ve bu özelliğiyle birçok terapötik ajanın tümör bölgesine ulaşmasını engeller (30). Kemoterapötik ilaçların ve diğer tedavi ajanlarının etkili bir şekilde tümör hücrelerine ulaşabilmesi için KBB'yi aşmaları gerekmektedir. Ancak, KBB'nin sıkı yapısı ve aktif taşıma mekanizmaları, ilaçların geçişini büyük ölçüde kısıtlar. Bu durum, özellikle TMZ gibi kemoterapötiklerin etkinliğini azaltabilir ve tedavi başarısını sınırlayabilir. Ayrıca, KBB'nin tümör bölgesinde bozulmuş olmasına rağmen, bu bozulma homojen değildir ve ilaç dağılımını tutarsız hale getirir. Bu zorluklar, ilaç taşıyıcı sistemlerin (nanopartiküller, lipozomlar) ve KBB'yi geçebilen yeni moleküllerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (31). Ayrıca, KBB'yi geçici olarak açan veya ilaçların hedefe

ulaşmasını kolaylaştıran yöntemler (örneğin, odaklanmış ultrason) üzerine yapılan çalışmalar, GBM tedavisinde umut vaat etmektedir (32). Bu yaklaşımlar, tedavi etkinliğini artırarak hastalığın prognozunu iyileştirme potansiyeline sahiptir.

2.7 Temozolomid

TMZ, özellikle GBM tedavisinde önemli bir yere sahiptir ve genellikle cerrahi rezeksiyon sonrası radyoterapi ile birlikte adjuvan tedavi olarak kullanılır. Ayrıca, GBM' nin tedaviye yanıt veren bir alt grubu olan ve tümör hücrelerinde MGMT (O6-metilguanina metiltransferaz) geninin metilasyonu bulunan hastalarda daha etkili olduğu gösterilmiştir (33,34). TMZ, tedaviye direnç geliştiren ve hızla ilerleyen GBM gibi tümörler için en yaygın kemoterapi ajanı olmasına rağmen, tedaviye duyarlılık ve etkinlik konusunda kişisel farklılıklar gösterebilir.



Şekil 2. Temozolomid yapısı

2.8 Glioblastomada TMZ Direnci ve Mekanizmaları

TMZ direncinin olası nedenlerinden biri, MDR1/ABCB1 gibi çoklu ilaç direnci proteinlerinin varlığıdır. Bu gen, çoklu ilaç direncine sahip P-glikoproteini kodlamaktadır (35). TMZ, DNA'daki adenin ve guanin kalıntılarına metil grupları ekleyen bir alkilleyici ajan olarak işlev görür. Bu süreç, G2/M hücre döngüsü duraklamasına yol açarak nihayetinde hücre ölümünü tetikler (36). Ancak TMZ'nin neden olduğu DNA metilasyon hasarı, direkt tamir (Direct repair), baz çıkarım tamiri (Base excision repair) veya yanlış eşleşme tamiri (Mismatch repair) gibi mekanizmalarla onarılabilir. GBM hücreleri ise genellikle TMZ'nin terapötik etkisini azaltan tamir yollarını tercih eder (37).

GBM'de kazanılmış TMZ direncini açıklamak için çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür ve bunlardan en iyi incelenmiş olanı, doğrudan tamir proteini MGMT'nin (O6-metilguanin-DNA metiltransferaz) aracılık ettiği mekanizmadır (38). MGMT, TMZ'nin etkisini, tedavi sonrası oluşan O6-metilguanin (O6-MeG) lezyonlarından metil gruplarını uzaklaştırarak engeller. Bu işlem sırasında guanin, O6-alkil grubunu MGMT'nin aktif bölgesindeki sistein kalıntısına (Cys145) aktarır ve MGMT kalıcı olarak inaktive olur. İnaktive olmuş MGMT daha sonra proteazom tarafından ubikitinlenir ve parçalanır (33).

TMZ'ye duyarlılık, MGMT ifadesi ile ters orantılıdır; daha yüksek MGMT düzeyleri daha fazla kemoterapi direnci ile ilişkilidir. MGMT ekspresyonunun düzenlenmesi, MGMT geninin ekson–intron sınırında yer alan ve 59 baz çiftlik bir cis-aktif artırıcı öğeyi içeren bir promotör/artırıcı (P/E) bölgesi ile ilişkilidir (40). Bu P/E bölgesi metilasyon geçirebilir ve bu da MGMT ifadesini susturabilir. Yeni tanı almış GBM hastalarının yaklaşık %45'inde MGMT promotör metilasyonu gözlemlenir ve bu durum TMZ tedavisine daha iyi yanıt ile ilişkilendirilir (41).

MGMT promotör bölgesi, p53, SP1, GRE, AP-1 ve NFkB gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer ve glukokortikoidler, siklik AMP, protein kinaz C aktivatörleri ve NFkB gibi faktörler tarafından düzenlenir. Tüm bu faktörler MGMT'yi yukarı yönde düzenleyebilir (42). Ancak TMZ yanıtı, yalnızca MGMT promotör metilasyonuna bağlı değildir. MGMT'nin yaban tipi kodlama dizisine sahip GBM hastalarında, MGMT protein sentezi ile promotör metilasyon durumu arasında tutarsızlıklar görülebilmektedir. İlginç bir şekilde, P/E bölgesinde DNA metilasyonu olan bazı hastalarda hala yüksek MGMT ekspresyon düzeyleri gözlemlenmiştir (43).

Tekrarlayan tümör örnekleri ve TMZ'ye dirençli ksenograft hatları üzerinde yapılan araştırmalar, MGMT ve Ki67 gen promotörleri arasında yer alan bir artırıcı bölgenin aktif hale geldiğini ortaya koymuştur (43). Bu durum, MGMT ekspresyonunu etkileyen ve TMZ direncine katkıda bulunan başka düzenleyici unsurların veya mekanizmaların da olabileceğini göstermektedir.

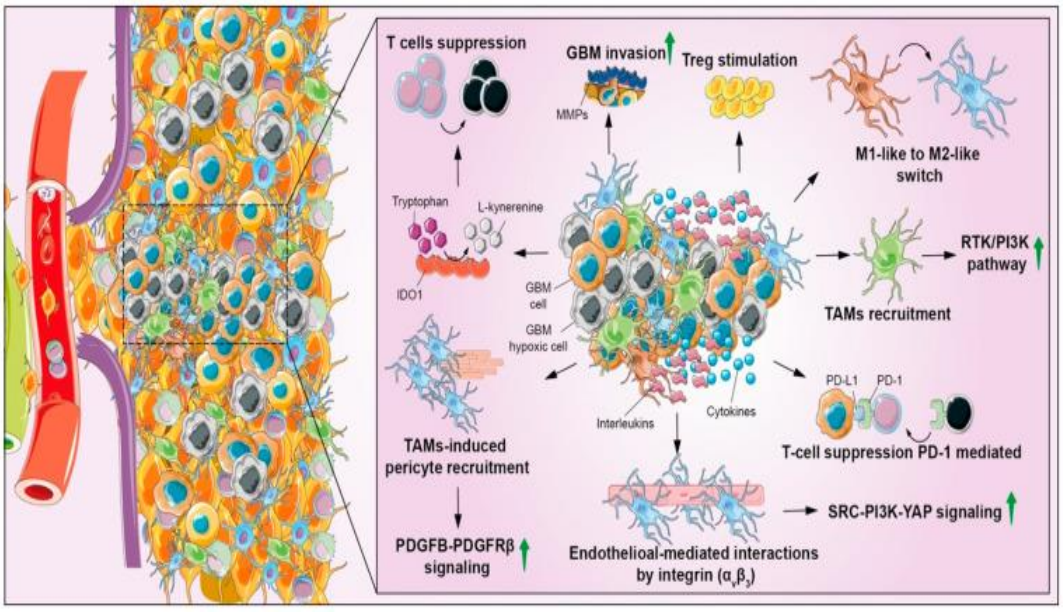
2.9 GBM'nin Agresifliği ve Tümör Mikroçevresi

GBM, yüksek derecede invaziv ve heterojen bir tümördür. Tümör hücreleri, beyin dokusuna hızla yayılır ve cerrahi sınırların ötesine uzanabilir. Bu invaziv özellik,

tümörün tamamen çıkarılmasını zorlaştırır ve nüks riskini artırır. Ayrıca, GBM hücreleri arasında genetik ve epigenetik heterojenlik bulunur. Bu heterojenlik, tedavi direncine ve tümör progresyonuna katkıda bulunur. Örneğin, tümör içindeki farklı alt popülasyonlar, kemoterapi ve radyoterapiye farklı yanıtlar verebilir (44).

TME, bir tümörü çevreleyen hücresel ve hücresel olmayan ortamdır ve tümörün büyümesinde, invazyonunda ve tedaviye yanıtında kritik bir rol oynar. GBM durumunda, TME özellikle karmaşık ve heterojendir ve tümör hücrelerinin çevresindeki stromal hücreler, immün hücreler, kan damarları ve hücre dışı matriks gibi bileşenlerden oluşur. GBM'de TME, tümörün büyümesi, invazyonu ve immün kaçış mekanizmalarında kritik bir rol oynar (Şekil 3) (45).

GBM mikroçevresinde en çok bulunan neoplastik olmayan hücre tiplerinden biri, tümörle ilişkili makrofajlar ve mikrogliadır. Bu bağışıklık hücreleri, tümör hücreleri tarafından salgılanan kemokinler tarafından tümör mikroçevresine alınır, böylece tümör mikroçevresindeki toplam hücre popülasyonunun %30-50'sini oluşturabilirler (46). Tümörle ilişkili makrofajlar ve mikroglia, tümör hücresi proliferasyonunu, anjiyojenezi ve istilayı destekleyen çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri salgılar. Ayrıca bağışıklık sistemini baskılayabilirler (47).



Şekil 3. Glioblastoma tümör mikroçevresi (48)

Endotel hücreleri ve perisitler de GBM mikroçevresinde bulunur ve tümör anjiyogenezinde kritik bir rol oynarlar. GBM hücreleri, tümöre oksijen ve besin sağlamak için yeni kan damarlarının büyümesini uyaran vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi pro-anjiyojenik faktörler salgılar (48). Endotel hücreleri ve perisitler, yapı ve işlev açısından anormal olabilen bu yeni kan damarlarının oluşmasına yardımcı olur ve ayrıca tümörün agresif büyümesine ve istilasına katkıda bulunur (49).

GBM mikroçevresindeki ekstraselüler matriks de değişmiştir ve anormal seviyelerde çeşitli proteinler ve proteoglikanlar içerir (50). Örneğin, normalde beyinde bulunmayan bir ekstraselüler matriks proteini olan tenascin-C, GBM' de sıklıkla aşırı eksprese edilir ve tümör hücresi göçünü ve istilasını teşvik edebilir (51).

GBM hücrelerinin metabolik profili, normal beyin hücrelerine kıyasla değiştirilir. GBM hücreleri, hızlı çoğalmalarını beslemek için büyük ölçüde glikoz ve glutamin metabolizmasına güvenir. Ayrıca değiştirilmiş lipit metabolizması sergilerler ve yağ asitlerini bir enerji kaynağı olarak kullanabilirler (52).

2.10 GBM'de İmmün Sistem ve İnflamasyonun Rolü

GBM, merkezi sinir sisteminin en agresif ve immünosupresif tümörlerinden biridir. GBM mikroçevresi, immün sistemin fonksiyonunu baskılayan ve tümörün büyümesini destekleyen karmaşık bir yapıya sahiptir (26). Bu mikroçevrede, hem doğuştan gelen hem de kazanılmış immün sistem hücreleri bulunur, ancak bu hücreler tümörle mücadele etmek yerine genellikle tümör progresyonunu destekler (53).

GBM'de immün sistemin baskılanması, tümör hücrelerinin immün kaçış mekanizmalarıyla ilişkilidir. Tümör hücreleri, immün kontrol noktalarını (checkpoints) manipüle ederek T hücrelerinin aktivasyonunu engeller. Özellikle, PD-1/PD-L1 ve CTLA-4 gibi immün kontrol noktaları, T hücrelerinin anerjisine ve apoptozuna yol açar (54). Ayrıca, GBM mikroçevresinde yüksek düzeyde immünosupresif sitokinler (TGF-β, IL-10) ve tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar) bulunur. TAM'lar, M2 fenotipine sahip olup, tümör büyümesini destekleyen faktörler salgılar (55).

İnflamasyon, GBM progresyonunda kritik bir rol oynar. GBM mikroçevresi, pro-inflamatuar (IL-6, TNF-α) ve anti-inflamatuar (IL-10, TGF-β) sitokinler arasında

bir dengesizlik içerir (56). Bu dengesizlik, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve yayılmasını kolaylaştırır. Ayrıca, mikrogliyal hücreler, GBM mikroçevresinde aktif hale gelir ve tümör büyümesini destekleyen sinyal molekülleri salgılar. Mikrogliyal aktivasyon, tümör invazyonunu ve anjiyogenezi artırır (57).

GBM'de immün sistem ve inflamasyon, tümörün agresif davranışını destekleyen karmaşık bir ağ oluşturur. Bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması, GBM tedavisinde yeni immünoterapi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

2.11 Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasında iletişim ve sinyal aktarımı sağlayan proteinlerdir. GBM tümörlerinde, tümör hücreleri ve çevredeki normal hücreler sitokinler üretirler ve bu sitokinler tümör büyümesi, yayılması ve bağışıklık sistemine karşı korunma üzerinde etkilidir (58,59). Tümör hücrelerinde sitokin üretimi farklı olabilir ve aynı zamanda sitokin reseptörleri de farklılık gösterebilir. Bu durum, tümör hücreleri arasında farklı sinyal yolları aktive olmasına ve hücrelerin farklı yanıtlar vermesine neden olur.

Sitokinler, kanserin teşhisinde, prognozunda ve tedavisinde çok önemli bir role sahiptir. Tümörlerle ilişkili sitokinlerin serbestleştirilmesi, bağışıklık sisteminin kötü huylu tümör hücrelerini tanımlayamamasından ve başarılı bir yanıt başlatamamasından sorumlu olabilir. GBM, benzersiz bir sitokin ekspresyon paterni sergiler ve sitokin ekspresyonundaki değişiklikler, glioma oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (60). Tümör hücrelerinin, normal beyin hücrelerinin, bağışıklık hücrelerinin ve kök hücrelerin bir arada bulunduğu GBM' nin karmaşık mikro ortamında, karmaşık bir sitokin ağı aracılığıyla birbirleriyle etkileşime girerler (61). Aşağıda belirtilen sitokinlerin GBM hücrelerindeki ifade(ekspresyon) farkları incelenecektir.

IL-6, bağışıklık sisteminde hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar roller oynayan bir sitokindir. Monositler, makrofajlar, fibroblastlar ve endotelyal hücreler gibi çeşitli hücreler tarafından üretilir. IL-6, akut faz yanıtını başlatarak karaciğerden C-reaktif protein gibi akut faz proteinlerinin salgılanmasını uyarır. Anjiyogenezin uyarılması yoluyla GBM' nin invazivliğini teşvik etmenin yanı sıra B hücrelerinin olgunlaşmasında yer alır (62). IL-6 ayrıca akut ve kronik inflamasyon, hücre proliferasyonu sırasında salgılanır ve apoptoz ve radyasyona karşı direnç sağlar.

IL-6, reaktif astrogliosis, patolojik inflamatuar yanıtları indükleme ve modüle etme ve nöro-koruma sağlama yeteneğine sahiptir. IL-6'nın çok yönlülüğü, çeşitli hücresel ve fizyolojik yollardaki önemini ve kanser ve iltihaplanma gibi hastalıklar üzerindeki etkisini vurgulamaktadır (63).

IL-8, CXC kemokin ailesine ait güçlü bir kemotaktik moleküldür ve özellikle nötrofillerin inflamasyon bölgelerine çekilmesinde rol oynar. Makrofajlar, monositler, endotelyal hücreler ve fibroblastlar tarafından salgılanır. IL-8, nötrofillerin aktivasyonunu ve degranülasyonunu artırarak enfeksiyon ve inflamasyon sırasında bağışıklık savunmasını güçlendirir. Aynı zamanda IL-8 GBM'de yaygın bir sitokindir ve endotel hücre apoptozunu inhibe ederek ve MMP üretimini indükleyerek anjiyogenezi destekler. Lökosit kemotaktik özellikleri, inflamasyon ve bulaşıcı hastalıklardaki rolü ile bilinir. IL-8, nötrofillerin, bazofillerin ve T lenfositlerin göçünü teşvik eden monositler ve makrofajlar tarafından salgılanır. Ekspresyonu, IL-1, TNF-a, IL-6 ve IFN-c gibi sitokinler tarafından indüklenebilir (64). IL-8, neo-vaskülarizasyon ile ilişkilidir ve gliomaların histopatolojik derecesi ile ilişkilidir. IL-8'in GBM'de anormal ifadesi, NF-jB'nin aktivasyonundan kaynaklanır ve araştırmalar, IL-8'in aşağı regülasyonunun GBM hücre istilasını azalttığını göstermiştir. Bu nedenle IL-8, GBM'de potansiyel bir terapötik hedef olabilir (65).

Sitokin (IFN-β), Tip I interferon ailesine ait bir sitokindir ve antiviral bağışıklık tepkilerinde önemli bir rol oynar. Epitel hücreleri, fibroblastlar ve diğer bazı hücreler tarafından viral enfeksiyonlara yanıt olarak üretilir. IFN-β, antiviral proteinlerin ekspresyonunu teşvik ederek hücreleri virüs replikasyonuna karşı korur. Doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktivitesini artırarak adaptif bağışıklık yanıtını destekler. Sitotoksik T lenfositlerin farklılaşmasını arttırır ve bunların antitümör etkilerini destekler. Çalışmalar, lipozomla sarılmış IFN-b'nin intratümöral enjeksiyonunun, CD8+ T hücrelerinin aracılık ettiği GL261 glioma hücrelerinin bir fare modelinde tümör hacmini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (66). Glioma rezeksiyonundan sonra hastalar için doğrudan cerrahi boşluğa enjekte edilen IFN-b'nin adenoviral vektör taşıyıcı mekanizmalarının dozaj toleransını test eden klinik deneyler, tedavi öncesi ve sonrası biyopsilerde artan tümör hücresi apoptozu ile umut verici ön sonuçlar göstermiştir. Bununla birlikte, bazı hastalarda sınırlı faydalar gözlendi ve sadece bir hastada tedaviye bağlı yan etki olarak kafa karışıklığı yaşandı. Bu bulgular, IFN-b'nin

glioma tedavisi için terapötik bir hedef olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (67,68).

2.12 Triptofan Metabolizması ve Yolağı

2.12.1.Triptofanın Metabolik Yolları

Triptofan, esansiyel bir amino asit olup, vücutta iki ana metabolik yolakta kullanılır: serotonin/melatonin yolu ve kinürenin yolu. Bu yollar, hem merkezi sinir sisteminde nörotransmitter sentezi hem de immün sistemin düzenlenmesi gibi kritik biyolojik süreçlerde önemli rol oynar (69).

Triptofan, serotonin sentezinin başlangıç molekülüdür. Bu yolak, özellikle merkezi sinir sisteminde ve gastrointestinal sistemde önemlidir. Serotonin sentezi, triptofanın triptofan hidroksilaz (TPH) enzimi tarafından 5-hidroksitriptofan (5-HTP)'a dönüştürülmesiyle başlar (70). Daha sonra, 5-HTP, aromatik L-amino asit dekarboksilaz enzimi ile merkezi sinir sisteminde nörütransmitter olarak görev yapan serotonine dönüştürülür (71). Serotonin, melatonin sentezi için de bir öncül moleküldür. Serotonin, arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) enzimi ile N-asetilserotonin'e dönüştürülür. Daha sonra, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi ile melatonin sentezlenir. Melatonin, özellikle epifiz bezinde üretilir ve sirkadiyen ritmin (uyku-uyanıklık döngüsü) düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (72). Ayrıca, melatonin antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir (73).

2.12.2. Kinürenin Yolu ve Temel Enzimleri

Kinurenin yolu olarak da bilinen triptofan yolu, triptofanı biyolojik olarak aktif moleküllere dönüştüren metabolik bir yoldur. GBM'nin büyümesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur ve bu yolu hedeflemek, bu agresif beyin tümörünü tedavi etmek için potansiyel bir strateji olarak ortaya çıkmıştır (74,75).

Triptofanın beyindeki kinürenin yolu aracılığıyla üretilen bozunma ürünleri hem nöromodülatör hem de enflamatuar etkilere sahiptir ve nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesiyle bağlantılıdır (76,77). Ek olarak, bu ürünlerin bağışıklık yanıtının modülasyonunda ve kanser gelişiminde rol oynadığı bulunmuştur (78). Çalışmalar, kinüreninlerin GBM modelleri üzerinde immünosüpresif bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir ve GBM' li hastalarda kinürenin/triptofan oranındaki bir artışın, kinurenin yolunun aktivasyonunun tümör oluşumu sırasında mevcut olduğunu ve tümörün

ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (79).

Triptofanın %90'dan fazlası kinürenin yolu üzerinden metabolize edilir. Bu yolak, hem periferik dokularda hem de merkezi sinir sisteminde önemli biyolojik etkilere sahiptir. Kinürenin yolu, triptofanın IDO veya TDO enzimleri tarafından N-formilkinürenin'e dönüştürülmesiyle başlar. N-formilkinürenin, daha sonra kinürenin'e dönüştürülür (80).

Kinürenin, kinürenin monooksijenaz enzimi ile oluşan reaksiyon sonucunda 3-hidroksikinürenin'e dönüştürülür. 3-hidroksikinürenin, kinürenaz enzimi ile 3-hidroksiantranilik asit ve kinürenik asit gibi metabolitlere ayrılır. Kinürenin, ayrıca kinürenaz enzimi ile antranilik asit'e de dönüştürülebilir. Bu metabolitler, immün sistem üzerinde önemli etkilere sahiptir (81,82). Özellikle, kinürenik asit ve 3-hidroksikinürenin, nörotoksik ve immünosupresif özellikleriyle bilinir (83). Kinürenin yolu, T hücrelerinin proliferasyonunu baskılar ve immün toleransı artırır (84). Bu nedenle, kinürenin yolu, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kronik inflamatuar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (85).

Triptofan metabolizmasındaki bu iki yolak arasında bir denge vardır. Serotonin yolu, özellikle merkezi sinir sisteminde nörotransmitter sentezi için önemliyken, kinürenin yolu, immün sistemin düzenlenmesinde ve inflamatuar yanıtlarda kritik bir rol oynar (86). Bu dengenin bozulması, çeşitli patolojik durumlara yol açabilir. Örneğin, kinürenin yolunun aşırı aktivasyonu, immünosupresyon ve nörotoksisite ile ilişkilidir. Bu nedenle, triptofan metabolizmasının düzenlenmesi, birçok hastalığın tedavisinde potansiyel bir hedef olarak görülmektedir (87).

2.12.3.Triptofan Metabolizmasının Bağışıklık Sistemi Üzerindeki **Etkileri**

Kinürenin yolu, triptofan metabolizmasının önemli bir kolu olup, özellikle immün sistem üzerinde güçlü baskılayıcı (immünosupresif) etkilere sahiptir. Bu yolak, tümör mikroçevresi, kronik inflamatuar hastalıklar ve otoimmün bozukluklar gibi patolojik durumlarda immün toleransı artırarak immün sistemin fonksiyonunu engeller (86).

Kinürenin yolunun ana enzimleri olan IDO ve TDO, triptofanı kinürenine dönüştürür. Bu süreç, tümör mikroçevresinde ve inflamatuar bölgelerde triptofanın

hızla tükenmesine neden olur. T hücreleri, proliferasyon ve aktivasyon için triptofana bağımlıdır. Triptofan tükenmesi, T hücrelerinin G1 fazında durmasına ve anerji (fonksiyonel inaktivasyon) durumuna geçmesine yol açar (87). Bu durum, T hücrelerinin antijenlere karşı yanıt verme yeteneğini ciddi şekilde azaltır. Kinürenin yolunun metabolitleri, özellikle kinürenik asit, 3-hidroksikinürenin ve kinürenin, T hücreleri üzerinde toksik ve baskılayıcı etkilere sahiptir (88). Kinürenik asit, N-metil-D-aspartat reseptörlerini antagonize ederek nöronal ve immün hücre fonksiyonlarını baskılar. 3-hidroksikinürenin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak T hücrelerinde oksidatif stres ve apoptozu tetikler. Kinürenin, T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin üretimini engelleyerek immün yanıtı baskılar. Bu metabolitler, T hücrelerinin fonksiyonel aktivitesini azaltır ve immün sistemin tümör hücrelerini tanıma ve yok etme yeteneğini zayıflatır (89).

Kinürenin yolu, regülatör T hücrelerinin (Treg) aktivasyonunu ve proliferasyonunu artırarak immünosupresif bir mikroçevre oluşturur. Treg hücreleri, immün yanıtı baskılayan ve immün toleransı sağlayan özel bir T hücre alt grubudur (90). Kinürenin metabolitleri, Treg hücrelerinin diferansiyasyonunu ve fonksiyonunu destekler. Bu durum, özellikle tümör mikroçevresinde, efektör T hücrelerinin (örneğin, CD8+ sitotoksik T hücreleri) aktivitesini engelleyerek tümörün immün sistemden kaçışını kolaylaştırır (91).

Kinürenin yolu, dendritik hücrelerin immün uyarıcı özelliklerini baskılar. Dendritik hücreler, antijen prezentasyonu ve immün T hücrelerinin aktivasyonunda önemli bir role sahiptir. IDO ve TDO aktivitesi, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve antijen sunumunu engelleyerek T hücrelerinin aktivasyonunu önler. Ayrıca, kinürenin metabolitleri, dendritik hücrelerin immünojenik özelliklerini azaltır ve immün toleransı destekleyen bir fenotip kazanmalarına neden olur (92).

Kinürenin yolu, immün kontrol noktalarının (checkpoints) ekspresyonunu artırarak T hücrelerinin fonksiyonunu baskılar. Özellikle, programlı ölçüm 1 (PD-1) ve sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (CTLA-4) gibi immün kontrol noktaları, T hücrelerinin aktivasyonunu ve efektör fonksiyonlarını engeller (93). Kinürenin metabolitleri, bu kontrol noktalarının ekspresyonunu artırarak T hücrelerinin anerjisine ve apoptozuna katkıda bulunur (94).

Kinürenin yolu, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin dengesini bozarak immün yanıtı baskılar. Özellikle, IL-10 ve TGF-β gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırır (95). Bu sitokinler, T hücrelerinin aktivasyonunu ve efektör fonksiyonlarını baskılar. Ayrıca, kinürenin metabolitleri, IL-6 ve TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini de modüle ederek immün yanıtın düzenlenmesini bozar (96).

2.12.4. İmmün Kaçış Mekanizmaları

Triptofan metabolizması, tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmalarında kritik bir rol oynar. Bu süreçte, IDO1 ve TDO enzimleri, triptofanı kinürenin yolunda metabolize ederek tümör mikroçevresinde immünosupresif bir ortam oluşturur. Triptofan tükenmesi, T hücrelerinin proliferasyonunu ve fonksiyonunu baskılayarak antijenlere karşı immün yanıtı zayıflatır. Aynı zamanda, kinürenin yolunun metabolitleri olan kinürenik asit ve 3-hidroksikinürenin gibi moleküller, T hücre apoptozunu tetikler ve düzenleyici T hücrelerinin (Treg) aktivasyonunu artırır (97). Bu durum, tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminin tanıma ve yok etme mekanizmalarından kaçışını kolaylaştırır.

Ek olarak, triptofan metabolizmasının aktivasyonu, myeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) gibi immünosupresif hücre popülasyonlarının birikimini teşvik eder. MDSC'ler, tümör mikroçevresinde T hücrelerinin işlevini baskılayarak ve immün toleransı artırarak tümör büyümesini destekler. Bu hücreler, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) gibi diğer immünosupresif hücrelerle etkileşime girerek immün yanıtı daha da zayıflatır. Bu mekanizmalar, tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırarak kanser progresyonunu hızlandırır (98).

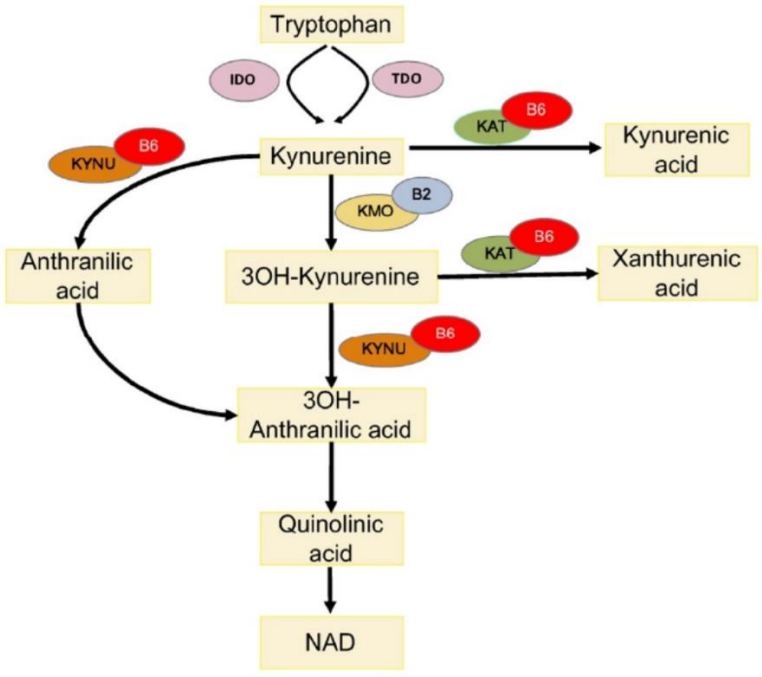
IDO1 ve TDO enzimlerinin inhibisyonu, tümör mikroçevresindeki immünosupresif ortamı tersine çevirebilir. Bu inhibisyon, triptofan tükenmesini önleyerek T hücrelerinin fonksiyonunu geri kazandırır ve kinürenin metabolitlerinin immünosupresif etkilerini azaltır. Ayrıca, MDSC ve Treg gibi baskılayıcı hücre popülasyonlarının aktivitesini sınırlayarak bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini artırır. Bu strateji, immünoterapilerin etkinliğini artırmak için umut verici bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Özellikle, IDO1 ve TDO inhibitörlerinin immün kontrol noktası inhibitörleriyle kombinasyonu, kanser tedavisinde yeni bir dönem başlatabilir.

Bu kombinasyon tedavileri, tümör mikroçevresindeki immünosupresyonu kırarak bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tanıma ve yok etme kapasitesini güçlendirebilir. Bu nedenle, triptofan metabolizmasının düzenlenmesi, kanser immünoterapilerinde önemli bir hedef haline gelmiştir.

2.13 Triptofan Yolağı ve Glioblastoma

2.13.1 IDO ve TDO'nun GBM'de Ekspresyonu ve Fonksiyonları

IDO1, IDO2 ve TDO, L-triptofanı L-kinürenine dönüştürerek kinürenin yolunu (KP) başlatan enzimlerdir (Şekil 4). Kinürenin, aril hidrokarbon reseptörünün (AhR) endojen bir ligandı gibi davranır ve gliomalarda tümör büyümesini desteklemek için AhR'yi aktive edebilir (99). IDO1 ve IDO2'nin bu mekanizmadaki rolü belirsiz olsa da, klinik örnekler, IDO1 ve/veya TDO'nun (IDO1/TDO) ekspresyonu ve aktivitesinin gliomaların patolojik dereceleri ile pozitif korelasyon gösterdiğini göstermiştir (100). IDO2'den ziyade IDO1/TDO ifadesi, Ki67 indeksi ve genel sağkalım ile pozitif olarak ilişkilidir (101).



Şekil 4. Kinürenin yolu ile triptofan metabolizması. IDO: indoleamin 2,3-dioksijenaz; TDO: triptofan 2,3-dioksijenaz; KAT: kinurenin aminotransferaz; KMO: kinurenin 3-monooksijenaz; KYNU: kinüreninaz; 3OH-kinurenin: 3-hidroksi kinürenin; 3OH-antranilik asit: 3-hidroksiantranilik asit (102).

Kinürenin yolunun beyin fonksiyonu, bağışıklık sistemi düzenlemesi ve kanser gelişimindeki önemli rolü nedeniyle, son araştırmalar, meme, akciğer ve yumurtalık kanserinin yanı sıra GBM için potansiyel bir terapötik strateji olarak IDO inhibitörlerinin kullanımını araştırmıştır (103,104,105,106). GBM' nin *in vitro* ve *in vivo* modellerinde ümit verici sonuçlar görülmüştür (107,108). Fakat GBM'de etkin olan IDO ile eş görev yapan TDO enzimi inhibitörleri üzerine yeterli araştırma yapılmamıştır. Kinureninlerin GBM üzerindeki potansiyel etkileri, triptofan metabolizmasının kanserdeki rolüne yeni bir bakış açısı sunmaktadır.

2.13.2. IDO/TDO'nun GBM'de Tümör İmmün Kaçışına Etkisi

GBM'de IDO1 ve TDO ekspresyonu, tümör mikroçevresinde immünosupresif bir ortam oluşturarak tümörün bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırır. Bu enzimler, triptofan tükenmesine ve kinürenin metabolitlerinin birikimine neden olarak T hücrelerinin fonksiyonunu baskılar (109). IDO1 ve TDO inhibitörleri, GBM tedavisinde umut vaat eden bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Özellikle immün kontrol noktası inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanıldığında, bu inhibitörlerin anti-tümör bağışıklık yanıtını güçlendirdiği gösterilmiştir (110). Ancak, bu tedavilerin etkinliği ve güvenilirliği üzerine daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.13.3. Triptofan Türevlerinin GBM Hücrelerinin Proliferasyonu ve İnvazyonuna Etkisi

Triptofan türevleri, özellikle kinürenin yolunun metabolitleri, GBM hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonu üzerinde önemli etkilere sahiptir. Kinürenin metabolitleri, tümör mikroçevresinde birikerek GBM hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını destekler. Özellikle kinürenik asit ve 3-hidroksikinürenin, tümör progresyonunu teşvik eden sinyal yollarını aktive eder (111).

Kinürenik asit, GBM hücrelerinin proliferasyonunu artırır ve hücre döngüsünü düzenleyen molekülleri etkileyerek tümör büyümesini hızlandırır. Aynı zamanda, kinürenik asit, anti-apoptotik sinyal yollarını aktive ederek hücre ölümünü engeller. 3-Hidroksikinürenin ise, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak DNA hasarına ve genetik instabiliteye neden olur. Bu durum, tümör hücrelerinin daha agresif

bir fenotip kazanmasına yol açar (112).

Ek olarak, bu metabolitler, GBM hücrelerinin invazyonunu artıran matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi enzimlerin ekspresyonunu yükseltir. Bu enzimler, ekstraselüler matriksin parçalanmasını sağlayarak tümör hücrelerinin çevre dokulara yayılmasını kolaylaştırır (113). Sonuç olarak, kinürenin metabolitleri, GBM'nin progresyonunda kritik bir rol oynar ve bu yolak, potansiyel bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir.

2.13.4. Triptofan Yolağının GBM Agresifliği ile İlişkisi

Triptofan yolağı, GBM gibi agresif tümörlerin progresyonunda kritik bir rol oynar. Triptofan, IDO1 ve TDO enzimleri tarafından kinürenin yolunda metabolize edilir ve bu süreçte kinürenik asit, 3-hidroksikinürenin gibi biyoaktif metabolitler açığa çıkar. Bu metabolitler, GBM'nin agresif davranışını destekleyerek tümör büyümesi, invazyon ve anjiyogenez süreçlerini hızlandırır (114).

Kinürenin metabolitleri, tümör hücrelerinin proliferasyonunu artırır ve apoptoza karşı direnç kazanmalarını sağlar. Özellikle 3-hidroksikinürenin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak DNA hasarına ve genetik instabiliteye neden olur. Bu durum, tümör hücrelerinin daha agresif bir fenotip kazanmasına yol açar. Kinürenik asit gibi metabolitler, anti-apoptotik sinyal yollarını aktive ederek hücre ölümünü engeller (115).

Anjiyogenez açısından, kinürenin metabolitleri, yeni damar oluşumunu teşvik eden VEGF gibi moleküllerin ekspresyonunu artırır. Bu süreç, tümörün beslenmesini ve büyümesini destekler (80). Ek olarak, bu metabolitler, tümör mikroçevresinde immünosupresif bir ortam oluşturarak bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini baskılar. Triptofan yolağı ve kinürenin metabolitleri, GBM'nin agresifliğini artıran önemli faktörlerdir ve bu yolak, terapötik müdahaleler için potansiyel bir hedef olarak değerlendirilmektedir (116).

2.13.5. Triptofan Metabolizmasının GBM'nin İmmünolojik Direnç Mekanizmalarındaki Rolü

Triptofan metabolizması, GBM gibi agresif tümörlerin immünolojik direnç mekanizmalarında kilit bir rol oynar. Triptofan, IDO1 ve TDO enzimleri tarafından

kinürenin yolunda metabolize edilir. Bu süreç, tümör mikroçevresinde immünosupresif bir ortam oluşturarak GBM'nin bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırır (117).

IDO1 ve TDO aktivitesi, triptofan tükenmesine ve kinürenin metabolitlerinin birikimine neden olur. Triptofan eksikliği, T hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu engelleyerek anerjiye (fonksiyonel inaktivasyon) yol açar. Aynı zamanda, kinürenin metabolitleri (örn., kinürenik asit, 3-hidroksikinürenin), T hücrelerinin apoptozunu indükler ve düzenleyici T hücrelerinin (Treg) aktivasyonunu artırarak immün toleransı destekler. Bu mekanizmalar, GBM'nin bağışıklık sistemine karşı direnç geliştirmesine katkıda bulunur.

2.14. Triptofan Yolağı ve İnflamatuar Tümör Mikroçevresi

2.14.1. GBM'de İnflamasyonun Rolü

GBM mikroçevresinde, inflamatuar süreçler tümör progresyonunda kritik bir rol oynar. GBM'de pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler arasında bir dengesizlik bulunur (118). Pro-inflamatuar sitokinler (örn., IL-6, TNF-α), tümör hücrelerinin büyümesini, hayatta kalmasını ve invazyonunu destekler. Özellikle IL-6, sinyal yolağı JAK/STAT'ı aktifleyerek tümör hücrelerinin proliferasyonunu artırır ve apoptoza karşı direnç kazanmalarını sağlar (119). TNF-α ise, tümör mikroçevresinde inflamatuar yanıtı şiddetlendirerek tümörün agresif davranışını teşvik eder (120). Diğer yandan, anti-inflamatuar sitokinler (örn., IL-10, TGF-β), immünosupresif bir mikroçevre oluşturarak bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini baskılar. IL-10, dendritik hücrelerin ve makrofajların fonksiyonunu engelleyerek antijen sunumunu azaltır (121). TGF-β ise, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) aktivasyonunu artırır ve efektör T hücrelerinin fonksiyonunu baskılar. Bu sitokin dengesizliği, GBM'nin bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırır ve tümör progresyonunu hızlandırır (122). Bu nedenle, GBM'de inflamatuar süreçlerin modülasyonu, tedavi stratejileri için önemli bir hedef haline gelmiştir (123).

2.14.2. Triptofan Metabolitlerinin İnflamatuar TME Üzerindeki Etkileri

Triptofan metabolitleri, özellikle kinürenin yolunun ürünleri olan kinürenik asit ve 3-hidroksikinürenin, GBM gibi tümörlerin mikroçevresinde (TME) hem pro-

inflamatuar hem de immünosupresif etkilere sahiptir (124). Bu metabolitler, tümör progresyonunu destekleyen karmaşık bir immünolojik ortam oluşturur. Kinürenik asit ve 3-hidroksikinürenin, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve yayılmasını kolaylaştırırken, bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini baskılar (125).

Kinürenin metabolitleri, pro-inflamatuar etkileriyle tümör mikroçevresinde kronik inflamasyonu tetikler (126). Örneğin, 3-hidroksikinürenin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak DNA hasarına ve genetik instabiliteye yol açar. Bu durum, tümör hücrelerinin daha agresif bir fenotip kazanmasını sağlar (127). Aynı zamanda, bu metabolitler, immünosupresif etkileriyle bağışıklık sistemini baskılar. Kinürenik asit, T hücrelerinin apoptozunu indüklerken, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) aktivasyonunu artırarak immün toleransı destekler (128).

Kinürenin metabolitleri, myeloid kökenli baskılayıcı hücreler ve tümörle ilişkili makrofajlar gibi immünosupresif hücrelerin birikimini teşvik eder. Bu hücreler, tümör mikroçevresinde immün baskılamayı daha da artırır (129). Kinürenin türevleri, GBM'nin immünolojik direncini güçlendirerek tümör progresyonunu hızlandırır ve bu yolak, terapötik müdahaleler için önemli bir hedef haline gelmiştir.

2.14.3. Mikrogliyal Aktivasyon ve Tümör Progresyonu

Mikrogliyal hücreler, merkezi sinir sisteminin (MSS) birincil immün hücreleri olarak GBM mikroçevresinde önemli bir rol oynar. GBM'de, tümör hücreleri tarafından salınan sinyaller (örn., kemokinler, sitokinler) mikrogliyal hücreleri aktif hale getirir (130). Aktive olan mikrogliya, tümör büyümesini ve invazyonunu destekleyen çeşitli faktörler salgılar. Örneğin, mikrogliyal hücreler, EGF, TGF-β ve matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi molekülleri üreterek tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve çevre dokulara yayılmasını kolaylaştırır (131).

Ayrıca, mikrogliya, tümör mikroçevresinde immünosupresif bir ortam oluşturur. IL-10 ve TGF-β gibi anti-inflamatuar sitokinler salgılayarak bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini baskılar (132). Bu durum, GBM'nin bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırır. Mikrogliyal aktivasyon, tümör kök hücrelerinin hayatta kalmasını ve kendini yenilemesini de destekleyerek tümörün nüks etmesine katkıda bulunur (133). Bu nedenle, mikrogliyal aktivasyonun modülasyonu, GBM tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

2.14.4. Tümör ile Stromal Hücreler Arasındaki Etkileşimler

Triptofan metabolitleri, GBM gibi tümörlerde tümör hücreleri ile stromal hücreler (örn., mikrogliya, astrositler, endotel hücreler) arasındaki etkileşimleri önemli ölçüde modüle eder (134). Kinürenin yolunun metabolitleri olan kinürenik asit ve 3-hidroksikinürenin, tümör mikroçevresinde immünosupresif ve pro-tümörijenik bir ortam oluşturur (135). Bu metabolitler, stromal hücrelerin tümör hücrelerini destekleyen faktörler salgılamasını teşvik eder. Örneğin, mikrogliyal hücreler, tümör büyümesini ve invazyonunu artıran büyüme faktörleri (EGF, TGF-β) ve matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) salgılar (136).

Ayrıca, triptofan metabolitleri, stromal hücrelerin immünosupresif özelliklerini artırır (137). Mikrogliya ve makrofajlar, IL-10 ve TGF-β gibi anti-inflamatuar sitokinler salgılayarak bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini baskılar. Bu etkileşimler, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını, proliferasyonunu ve metastazını kolaylaştırır (138). Triptofan metabolitleri, tümör-stromal hücre etkileşimlerini modüle ederek GBM progresyonunu destekler ve bu süreç, terapötik müdahaleler için önemli bir hedef oluşturur (138).

2.15. Triptofan Yolağını Hedefleyen Potansiyel Tedaviler

2.15.1 IDO ve TDO İnhibitörleri

IDO ve TDO inhibitörleri, GBM başta olmak üzere birçok kanser türünde umut vaat eden terapötik hedefler olarak öne çıkmaktadır. Bu enzimler, triptofan metabolizmasını kinürenin yoluna yönlendirerek tümör mikroçevresinde immünosupresif bir ortam oluşturur. IDO ve TDO inhibitörleri, bu süreci tersine çevirerek bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini artırmayı amaçlar (139).

GBM gibi agresif beyin tümörlerinde, IDO1 ve TDO ekspresyonu yüksektir ve bu enzimler, tümörün bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırır. Klinik çalışmalarda, IDO1 inhibitörleri (örn., epakadostat, navoximod) ve TDO inhibitörleri, anti-PD-1 ve anti-CTLA-4 gibi immün kontrol noktası inhibitörleri ile kombinasyon halinde test edilmektedir (140). Bu kombinasyonlar, tümör mikroçevresindeki immünosupresyonu azaltarak T hücrelerinin yeniden aktive olmasını sağlar. Ancak, GBM'nin karmaşık mikroçevresi ve KBB gibi engeller, tedavi etkinliğini sınırlayabilir

(141). Melanoma, akciğer kanseri ve mesane kanseri gibi katı tümörlerde, IDO1 inhibitörleri immünoterapi ile kombinasyon halinde umut verici sonuçlar göstermiştir (142). Örneğin, epakadostat ile anti-PD-1 tedavisinin kombinasyonu, melanoma hastalarında objektif yanıt oranlarını artırmıştır. Benzer şekilde, IDO inhibisyonu, tümör mikroçevresindeki regülatuar T hücrelerinin sayısını azaltarak efektör T hücrelerinin aktiflenmesini güçlendirir (143). Lenfoma ve lösemi gibi hematolojik kanserlerde de IDO ekspresyonu yüksektir. Preklinik çalışmalar, IDO inhibitörlerinin bu kanserlerde immün sistem aktivasyonunu artırabileceğini göstermiştir (144). Özellikle, T hücrelerinin tümöre karşı etkisini artırarak remisyon oranlarını yükseltebileceği düşünülmektedir (145).

Erken faz klinik çalışmalar, IDO/TDO inhibitörlerinin güvenilir olduğunu ve immün sistem aktivasyonunu artırabileceğini göstermiştir. Ancak, bazı çalışmalarda (örn., ECHO-301 faz III çalışması) beklenen terapötik etkinin tam olarak sağlanamadığı görülmüştür (146). Bu durum, tümör mikroçevresinin karmaşık yapısı ve diğer immünosupresif mekanizmaların varlığıyla ilişkilendirilmektedir (147). Bu nedenle, IDO/TDO inhibitörlerinin diğer immünoterapi yöntemleriyle (örn., dendritik hücre aşıları, sitokin terapileri) kombinasyonu üzerine odaklanan çalışmalar devam etmektedir (147).

IDO ve TDO inhibitörleri, GBM başta olmak üzere melanoma, akciğer kanseri ve hematolojik kanserler gibi birçok tümör türünde önemli bir potansiyele sahiptir. Bu inhibitörler, immünosupresif mikroçevreyi modüle ederek bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini artırabilir (148). Ancak, tedavi etkinliğini artırmak için kombinasyon terapileri ve daha geniş kapsamlı klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu yaklaşımlar, kanser tedavisinde yeni bir çığır açabilir.

2.15.2 Kombinasyon Tedavi Yaklaşımları

İmmün kontrol noktası inhibitörleri (anti-PD-1 ve anti-CTLA-4 gibi) ile kemoterapi (örn., temozolomid) kombinasyonu, GBM tedavisinde umut vaat eden bir stratejidir. Kemoterapi, tümör hücrelerinin ölümüne neden olarak antijen salınımını artırır ve bağışıklık sisteminin tümöre karşı daha etkili bir yanıt oluşturmasını sağlar. Anti-PD-1 gibi immünoterapiler ise, T hücrelerinin tümöre karşı aktivitesini artırarak bu etkiyi güçlendirir (150).

Radyoterapi, tümör hücrelerinin DNA hasarı yoluyla ölümünü tetiklerken, aynı zamanda immünojenik hücre ölümüne de neden olur. Bu süreç, tümöre özgü antijenlerin sunulmasını kolaylaştırarak immünoterapinin etkinliğini artırır. Özellikle anti-PD-1 ile radyoterapi kombinasyonu, GBM'de immün sistem aktivasyonunu güçlendirir (151).

IDO/TDO inhibitörleri, VEGF inhibitörleri (örn., bevacizumab) veya EGFR inhibitörleri gibi hedefe yönelik tedaviler, immünoterapi ile kombine edilerek tümör mikroçevresindeki immünosupresyonu azaltabilir. Bu kombinasyonlar, tümör büyümesini engellerken bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini artırır (152).
Kombinasyon tedavileri, GBM gibi zorlu tümörlerde tedavi başarısını artırmak için önemli bir stratejidir. Bu yaklaşımlar, tümör mikroçevresini modüle ederek immün sistemin tümöre karşı daha etkili bir yanıt oluşturmasını sağlar (153).

2.16 LM10- TDO İnhibitörü

LM10, TDO enzimini seçici olarak inhibe eden bir küçük molekül inhibitörüdür. TDO, triptofan metabolizmasında önemli bir enzimdir ve triptofanın kinürenin yoluna dönüştürülmesinde rol oynar. TDO'nun aşırı aktivitesi, tümör mikroçevresinde immünosupresyona yol açarak bağışıklık yanıtını baskılayabilir ve kanser gelişimine katkıda bulunabilir. LM10 bu aktivitenin durdurulmsı için TDO enzimini inhibe eder. LM10, özellikle TDO'yu hedefler ve insan TDO'su için IC_{50} değeri 0.62 μM, fare TDO'su için 2 μM olarak bildirilmiştir (154). Bu seçicilik, LM10'un IDO gibi diğer triptofan metabolizması enzimleri üzerinde anlamlı bir inhibisyon göstermemesiyle güçlenir. LM10' un en dikkat çekici özelliklerinden biri, TDO ekspresyonu yapan tümörlerde büyüme inhibisyonu göstermesidir. Özellikle, P815 mastositoma tümörlerinde yapılan çalışmalarda, LM10'un tümör büyümesini azaltmada etkili olduğu rapor edilmiştir (155). Bu etkiler, LM10'un bağışıklık sistemini modüle ederek tümör üzerindeki immünosupresif etkileri azalttığını göstermektedir.

2.17 Çalışmanın Bilimsel Önemi

GBM, tedavisi en zor ve agresif beyin tümörlerinden biridir. Mevcut tedavilere rağmen, GBM hastalarının sağ kalım oranları oldukça düşüktür. Bu çalışma, GBM' de triptofan metabolizmasının rolünü detaylı bir şekilde inceleyerek, tümör

mikroçevresindeki immünosupresif mekanizmaları aydınlatmayı hedeflemektedir. Triptofan metabolizması, özellikle IDO1 ve TDO enzimleri aracılığıyla, tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştıran kritik bir süreçtir. Bu çalışma, triptofan yolağının GBM progresyonundaki etkilerini ortaya koyarak, yeni immünoterapi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmayı amaçlamaktadır. Bu sayede, GBM tedavisinde etkinliği artıracak yenilikçi yaklaşımların önü açılabilir.

2.18 Bu Çalışmanın Literatüre Katkısı ve Gelecek Perspektifler

Triptofan yolağı, GBM tedavisinde umut vaat eden bir hedef olarak öne çıkmaktadır. IDO1 ve TDO enzimleri, triptofanı kinürenin yolunda metabolize ederek tümör mikroçevresinde immünosupresif bir ortam oluşturur. Bu süreç, triptofan tükenmesi ve kinürenin metabolitlerinin birikimiyle T hücrelerinin fonksiyonunu baskılar. IDO/TDO inhibisyonu, bu immünosupresif mekanizmaları tersine çevirerek bağışıklık sisteminin tümöre karşı etkisini artırabilir. Özellikle immün kontrol noktası inhibitörleri (anti-PD-1 ve anti-CTLA-4 gibi) ile kombinasyon halinde kullanıldığında, IDO/TDO inhibitörleri, tümör mikroçevresindeki immünosupresyonu azaltarak tedavi etkinliğini artırabilir. Bu yaklaşım, GBM gibi soğuk tümörlerin immünoterapiye yanıt vermesini sağlayabilir.

Bu çalışma, GBM'nin patofizyolojisini anlamaya ve tümör mikroçevresindeki immünosupresif mekanizmaları aydınlatmaya önemli bir katkı sağlayacaktır. Triptofan yolağının GBM'deki rolünün detaylı bir şekilde incelenmesi, yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine olanak tanıyacaktır. Ayrıca, bu çalışma, IDO/TDO inhibitörlerinin klinik etkinliğini artırmak için kombinasyon terapilerinin geliştirilmesine yönelik bir temel oluşturacaktır. Bu çalışma, kanser immünoterapisinde yeni bir çığır açarak, hastaların sağ kalım oranlarını artırmaya yönelik umut vaat eden bir adım olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu tez araştırması tanımlayıcı bir çalışma olarak planlanmış ve yürütülmüştür.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu teze ilişkin çalışmalar Mart 2024 – Mart 2025 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın zamansal akışı Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Tez çalışmasının zamansal akışı

Ay/Yıl	Yapılanlar
Ekim 2023	Etik kurul hazırlanması ve onayı
Kasım 2023	Tez önerisinin hazırlanması ve onayı
Mart 2024	Bap proje başvurusunun onaylanması
Nisan 2024 – Temmuz 2024	Malzeme alımları
Ağustos 2024 –Aralık 2025	Hücre Kültürü ve IC50 dozlarının bulunması
Aralık 2024 – Mart 2024	Yara iyileşmesi/migrasyon, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) analizleri
Mart-Mayıs 2025	Analiz-Tez yazımı

3.3 Araştırmanın Örneklemi

Bu tez çalışması ticari hücre hattı kullanılarak (U87-MG, Glioblastoma) ile *in-vitro* olarak gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamına insan ya da hayvan materyali dahil edilmemiştir.

3.4 Çalışma Materyali

Bu tez çalışması kapsamında ticari insan GBM hücre hattı olan U87-MG (American Type Culture Collection-ATCC, HTB-14) kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bu tez çalışması kapsamında hücre davranışlarını gösteren canlılık, yara iyileşmesi/migrasyon, sitokin ekspresyonları (IL-6/ IL-8/ IFN-Beta) ve PD-L1 ekspresyonu bağımlı değişken; LM-10 ve TMZ bağımsız değişkendir.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Tablo 2. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
U87-MG glioblastoma kanser hücre hattı	ATCC/ HTB-14	*In vitro* çalışmalar için hücre olarak kullanılmıştır.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (Yüksek glukoz (4.5 g/l), ve L-Glutamin içerikli)	Cegrogen Biotech/ GmbH- E0500-160	U87-MG hücrelerinin kültür edilmesinde kültür ortamı olarak kullanılmıştır.
Penisilin-Streptomisin (10,000U/ml)	Cegrogen Biotech GmbH/ P0100-790	U87-MG hücrelerinin kültür ortamına eklenen antibiyotik olarak kullanılmıştır.
Fetal sığır serum (FBS)	Cegrogen Biotech GmbH/ A0500-3030	U87-MG hücrelerinin kültür ortamına eklenmiştir.
LM10	MedChemExpress/ HY-33298	TDO2 inhibitörü olarak kullanılmıştır.
Temozolomid	Apollo Scientific/ 85622-93-1	FDA onaylı kemoterapötik ajan olarak kullanılmıştır.
Fosfat tamponlu salin-tuz çözeltisi (PBS)	Cegrogen Biotech GmbH/ H0500-550	Hücre kültürü aşamalarında kullanılmıştır.
Tripan mavisi	Sigma Aldrich/ T8154	Hücre kültür basamaklarında hücre sayımı için kullanılmıştır.
Dimetilsülfoksit (DMSO)	PanReac AppliChem/ A3672,0250	Kimyasalların çözgeni ve hücre kültüründe hücre dondurma çözeltisinde kullanılmıştır.
Resazurin	Cayman/ 14322	Hücre proliferasyon analiz reaktifi olarak kullanılmıştır.
HiPure Total RNA Kit	Magen/ R401102	RNA izolasyonunda kullanılmıştır.
VitaScript FirstStrand	Procomcure/	cDNA sentezinde kullanılmıştır.

cDNA Synthesis Kit,	PCCSKU1301	
FastStart Essential DNA Green Master	Roche/ 06402712001	Polimeraz zincir reaksiyonları için kullanılan kit.
Karbondioksit (CO_2) inkübatörü	ESCO/ CCL-170T-8	Hücrelerin optimal büyüme koşullarında (37°C, %5 CO_2) kültüre edilmesi için kullanılmıştır.
Sınıf II Biyogüvenlik kabini	ESCO/ AC2-4E8	Hücre kültürü işlemleri sırasında steril bir ortam sağlayarak kontaminasyonu önlemek için kullanılmıştır.
Ters (inverted) ışık mikroskobu	Zeiss/ Axio Vert.A1	Hücre kültürlerinin büyüme durumlarının izlenmesi, morfolojik analizlerinin yapılması ve ilaç tedavisi sonrası hücrelerin görüntüsel değerlendirilmesi için kullanılmıştır.
LightCycler® 480	Roche/ 05015278001	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri için kullanıldı.
Soğutucular	Vestel/ NF52101	Hücre kültürü malzemeleri, örnekler, reaktifler ve kimyasalların uygun sıcaklıkta (4°C ve -20°C) saklanması ve korunması için kullanılmıştır.
Otoklav	Nüve/ NC40	Kullanılan solüsyonlar, cam malzemeler ve diğer ekipmanların sterilizasyonu amacıyla kullanılmıştır.
Distile Su Cihazı	Stakpure/ 19200005	Tüm deney aşamalarında gerekli solüsyon ve kültür ortamlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.
pH metre	Thermo Scientific/	Solüsyonların, tamponların ve

	Orion Star A111	reaktiflerin pH değerlerinin doğru bir şekilde ayarlanması ve kontrol edilmesi için kullanılmıştır.
Santrifüj	Nüve/ NF-400	Hücrelerin kültürü ve tüm deney aşamalarında kullanılmıştır.

3.6.2. Potansiyel İlaç Adaylarının Belirlenmesi ve İn Siliko Analiz

Bu çalışmada GBM tedavisine yönelik TMZ ile birlikte potansiyel bir ajan olan LM10 birlikte değerlendirilmiştir. TMZ, alkilleyici yapısı sayesinde DNA hasarı oluşturarak hücre ölümünü indükleyen ve GBM tedavisinde halen klinikte standart olarak kullanılan bir kemoterapötiktir. TMZ'nin klinik etkinliği, 2005 yılında yayımlanan çok merkezli faz III klinik çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, TMZ'nin radyoterapi ile birlikte uygulanmasının GBM hastalarında genel sağkalımı anlamlı düzeyde artırdığı gösterilmiştir (156,157).

Ancak TMZ'nin uzun süreli kullanımına bağlı gelişen kemoterapi direnci ve sistemik yan etkiler, tedavi başarısını sınırlamaktadır. Bu nedenle, tedaviye duyarlılığı artıracak ve bağışıklık baskılanmasını ortadan kaldıracak yeni moleküllerin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda, çalışmada incelenen ikinci ajan olan LM10, son yıllarda özellikle triptofan metabolizması üzerinden etkili olan yeni nesil TDO2 inhibitörleri arasında dikkat çekmektedir. TDO2'nin tümör mikroçevresinde immün baskılanmayı artırarak progresyonuna etki ettiği öne sürülmektedir (156).

Bu çalışmada, LM10 ve literatürde yer alan diğer potansiyel bileşiklerin merkezi sinir sistemi tümörleri üzerindeki terapötik potansiyellerini değerlendirmek amacıyla *in siliko* farmakokinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlerde, SwissADME (http://www.swissadme.ch/) web tabanlı arayüzü kullanılmıştır. SwissADME, İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü'ne bağlı Moleküler Modelleme Grubu tarafından geliştirilmiş, geniş çaplı farmakokinetik ve farmakodinamik parametrelerin hesaplanmasına olanak sağlayan güvenilir bir araçtır. İlgili bileşiklerin kimyasal yapı bilgileri, PubChem veri tabanından Canonical SMILES formatında elde edilmiştir. Elde edilen SMILES verileri SwissADME platformuna yüklenmiş ve bileşiklerin ADME (Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon) profilleri, Lipinski

kurallarına uygunlukları, ilaç benzerliği özellikleri ve gastrointestinal emilim kapasiteleri detaylı olarak analiz edilmiştir. Ayrıca, LM10 bileşiğinin KBB' i geçme potansiyeli, SwissADME aracının öngörsel hesaplama araçlarından biri olan BOILED-Egg (Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method) analizi ile değerlendirilmiştir. Bu analiz, moleküllerin pasif difüzyon yoluyla merkezi sinir sistemine erişim kabiliyetlerini öngörmekte ve ilaç geliştirme sürecinde özellikle nöro-onkolojik hedefler için ön değerlendirme sağlamaktadır.

3.6.3. Hücre Kültürü

Bu çalışma *in vitro* olarak hücre kültüründe gerçekleştirilecek şekilde planlanmış olup, çalışma kapsamında ticari GBM hücre hattı U87-MG (ATCC, HTB-14) kullanılmıştır. Hücrenin özellikle Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. U87-MG hücrelerinin özellikleri

Hücre	**Hasta Bilgisi**	**Doku**	**Hastalık**	**Morfoloji**	**Mutasyon**
U87-MG	Yetişkin/ Erkek	Beyin	Glioblastoma Multiform	Epitelyal-astrosit	CDKN2A ve PTEN

U87-MG hücreleri, %10 fötal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-Glutamin takviyeli DMEM ortamında, 37 °C ve %5 CO_2 atmosferinde 25 cm^2'lik flasklarda kültüre alındı. İstenilen hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, ortam serolojik pipetle uzaklaştırılarak hücreler 2–3 ml steril PBS ile yıkanıp, yüzeyde kalan ortamın tripsin/EDTA inhibitör etkisini önlemek üzere temizlendikten sonra 1 ml %0,05'lik tripsin/EDTA çözeltisi eklendi ve 2–3 dakika boyunca inkübe edildi. İncelten hücre süspansiyonunun zarara uğramaması için üzerine 2 ml taze kültür ortamı ilave edilip 15 ml'lik konik tüpe aktarıldıktan sonra 1.200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrasında hücre pelleti tekrar uygun hacimde kültür ortamıyla süspanse edildikten sonra, hücre sayımı yapılarak 1×10^6 hücrelik alıkondu yeni bir 25 cm^2 flask'a ekildi. Kalan hücreler ise ileriki deneyler için %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) içeren FBS ile dondurularak −145 °C'de saklamaya hazır hale getirildi.

3.6.4. Temozolomid Çözeltisinin Hazırlanması

TMZ 20 mg/ml olacak şekilde 1 ml DMSO içerisinde çözüldü ve dondur-çöz işleminden kaçınmak için mikrosantrifüj tüpleri içerisine paylaştırılarak -20ºC'de depolandı.

3.6.5. LM10 Çözeltisinin Hazırlanması

LM10 4,65 mg/ml olacak şekilde 2 ml DMSO içerisinde çözüldü ve dondur-çöz işleminden kaçınmak için mikrosantrifüj tüpleri içerisine paylaştırılarak +4 ºC'de depolandı.

3.6.6. İlaç Sitotoksisite Deneyi ve IC50 Hesaplamaları

TMZ ve LM10 için maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değerleri bulundu. Bunun için resazurin ajanı kullanıldı. Hücreler kültür plakalarına (96 kuyucuklu) $5x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 100 µl kültür ortamı içinde ekildi. Hücrelerin kuyucuk zeminine tamamen yapışması için 24 saat beklendi ve yapışmanın mikroskopta kontrol edilmesi ardından hücreler 48 saat süresinde 300- 450- 600- 750- 900- 1050 µM konsantrasyonlarında TMZ ve 8,125- 16,25- 32,5- 62,5- 125 nM konsantrasyonlarında LM10 ile inkübe edildi. Uygulama sonrası hücreler üzerine kuyulardaki hücreler üzerine resazurin ajanı (10 µl) eklendi ve CO_2 etüvde 100 dakika 37°C'de inkübe edildi. Ardından, 560-590 nm dalga boyunlarında spektrofotometrik olrak ölçüm alınarak TMZ'nin IC50 değeri hesaplandı. Bununla birlikte LM10 için, istatistiksel olarak hücre canlılığını inhibe etmeyen maksimum doz saptandı. Tüm deneysel gruplar üç tekrar olacak şekilde planlanmış olup, tüm deneyler 3 kez tekrar edildi.

Deney grupları, negatif kontrol (tedavisiz), TMZ (IC50 konsantrasyon uygulaması), LM10 bileşiği (maksimum canlılığa etki etmeyen konsantrasyon uygulaması), TMZ ve LM10 kombinasyonu şeklinde planlandı. Tüm deneysel gruplar üç tekrar olacak şekilde planlanmış olup, tüm deneyler 3 kez tekrar edildi.

3.6.7. Hücre Göç Analizi

U87-MG, GBM hücrelerinin *in vitro* migrasyon yeteneklerini yara iyileşmesi (wound healing assay) analizi ile değerlendirildi. Deneysel uygulamalar, 6 kuyucuklu

kültür plaklarında gerçekleştirilmiş olup, her kuyucuğa 2×10^5 hücre ekilerek, U87-MG hücrelerinin kuyucuklara yayılma davranışı açısından %70 konfluensi düzeyine ulaşmaları beklendi. Ardından, hücre monolayerinin ortasına steril 200 µL hacminde bir pipet ucu kullanılarak düzgün bir çizik çizildi. Oluşturulan hücresiz alanlar, PBS ile yıkanarak hücre kalıntılarından arındırıldı.

Uygulamanın ardından, kültür ortamı yenilenerek hücreler dört deney grubuna ayrıldı: Negatif kontrol (tedavisiz), TMZ (IC50 konsantrasyon uygulaması), LM10 bileşiği (maksimum canlılığa etki etmeyen konsantrasyon uygulaması), TMZ ve LM10 kombinasyonu. Çizik sonrası hücrelerin migrasyon süreçleri sırasıyla 0, 24 ve 48. saatlerde ters-inverted mikroskop (ZEISS, Axio Vert. A1, Almanya) ile görüntülendi. Tüm deneysel gruplar üç tekrar olacak şekilde planlanmış olup, tüm deneyler 3 kez tekrar edildi.

Görüntü analizleri mikroskop yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Başlangıç ve izleyen saatlerdeki hücresiz alanlar ölçülerek hücre göçü yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

% Yara kapanması = [Yara açıklığı (t0) – Yara açıklığı (tx)*] / Yara açıklığı (t0) × 100 (*=0, 24, 48. saat)

3.6.8. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Analizi

Bu çalışmada, TMZ ve LM10 uygulamalarının U87-MG glioblastoma hücrelerinde IL-6, IL-8, IFN-β ve PD-L1 genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri, RT-PCR yöntemiyle araştırıldı. Deney grupları, negatif kontrol (tedavisiz), TMZ (IC50 konsantrasyon uygulaması), LM10 bileşiği (maksimum canlılığa etki etmeyen konsantrasyon uygulaması), TMZ ve LM10 kombinasyonu şeklinde planlandı. Tüm deneysel gruplar üç tekrar olacak şekilde planlanmış olup, tüm deneyler 3 kez tekrar edildi. RT-PCR analizi için işlemler aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1. Toplam RNA İzolasyonu: Toplam RNA izolasyonu, ticari kiti ile üretici firmanın protokolüne uyularak gerçekleştirildi. İlaçların uygulanması ardından hücreler PBS ile yıkandı. Ardından hücreler Tripsin/EDTA 5 dakika inkübe edilerek kuyucuk yüzeyinden uzaklaştırıldı. Hücrelerin kuyucuk yüzeyinden kalkması gözlemlendikten sonra hücrelerin üzerine kültür ortamı eklendi ve elde edilen hücre

süspansiyonu santrifüjlendi. Elde edilen hücre pelleti lizis tamponu ile işlendi. Hücre lizatı koleksiyon tüpüne aktarıldı ve ardışık yıkama adımlarının ardından total RNA, 100 µL RNaz'sız su kullanılrak elüe edildi. Elüsyonla elde edilen total RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu, spektrofotometrik ölçümle A_{260}/A_{280} oranının 1,9–2,1 aralığında olup olmadığına bakılarak kalite kontrolünden geçirildi.

2. cDNA Sentezi: cDNA sentezi saflaştırılan toplam RNA'dan, ticari cDNA sentez kiti kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Her reaksiyon için 10 µL RNA örneği, 4 µL nükleazsız (nuclease free) su, 4 µL reaksiyon tamponu (reaction buffer) ve 1 µL enzim karışımı (enzyme mix) ilave edilerek 42°C'de 1 saat , 80 °C'de 10 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA örnekleri, toplam hacim 200 µL olucak şekilde RNaz'sız su (RNase-free water) ile tamamlandı ve -20°C'de saklandı.

3. qRT-PCR Reaksiyon Koşulları ve Spesifiklik Doğrulaması: Gerçek zamanlı PCR analizleri, LightCycler® 480 (Roche, Almanya) cihazında, ticari pcr kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne uyularak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda, her biri 20 nükleotid uzunluğunda ve 50 nmol konsantrasyonda sentetik olarak sentezlenmiş primer çiftleri kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan genlere özgü primer dizileri (ileri-forward ve geri-reverse) ve ilgili bilgiler Tablo 4' de sunuldu. Primer stok çözeltileri 100 µM olacak şekilde hazırlandı ve uygun şekilde seyreltilerek reaksiyon karışımına eklendi. Reaksiyon hacmi, her örnek için 20 µL olacak şekilde tamamlandı. Reaksiyonların spontan başlamasını engellemek amacıyla tüm hazırlıklar soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı analizi için referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Kantitatif analizler, $2^{\wedge-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle yapıldı.

Tablo 4. Primer dizileri

Gen	**Yön**	**Sekans (5'–3')**
IL-6	İleri	AGAAGCTCTATCTCCCCTCC
IL-6	Geri	GTTCTGAAGAGGTGAGTGGC
IL-8	İleri	CAGTTTTGCCAAGGAGTGCT
IL-8	Geri	CAGCCCTCTTCAAAAACTTC
IFN-β	İleri	GCCTCAAGGACAGGATGAAC

IFN-β	Geri	CTATGGTCCAGGCACAGTGA
PDL-1	İleri	CGCATTTACTGTCACGGTTC
PDL-1	Geri	CTGAAGTGCAGCATTTCCCA
GAPDH	İleri	CCATCTTCCAGGAGCGAGAT
GAPDH	Geri	TCCTTCCACGATACCAAAGT

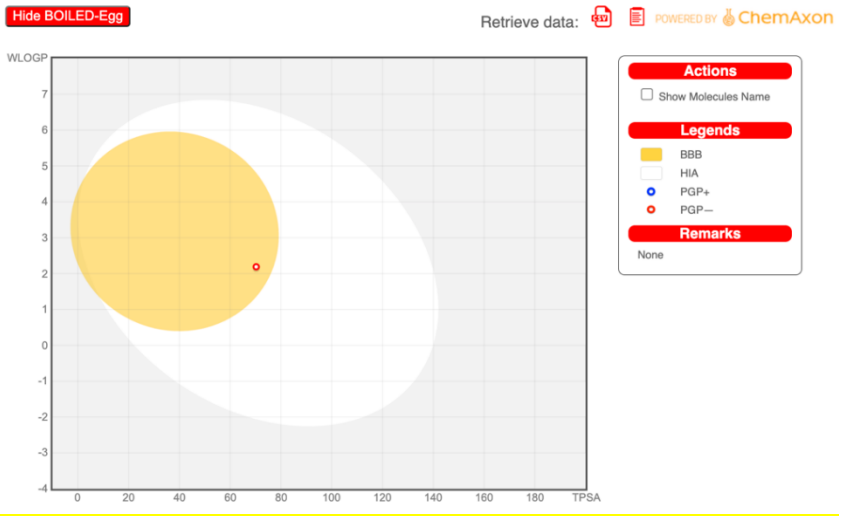
4. BULGULAR

4.1 *İn Siliko* Farmakokinetik Analiz Bulguları

Çalışma kapsamında, LM10 bileşiğinin merkezi sinir sistemi tümörleri üzerindeki potansiyel etkisini değerlendirmek amacıyla SwissADME arayüzü kullanılarak *in siliko* farmakokinetik analizler gerçekleştirildi. Bu analizler doğrultusunda, özellikle ilaç benzerliği kriterleri, gastrointestinal emilim kapasitesi ve KBB' i geçebilme potansiyeli değerlendirildi.

SwissADME platformunda gerçekleştirilen BOILED-Egg (Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method) analizine göre, LM10 bileşiği yüksek düzeyde gastrointestinal absorpsiyon potansiyeline sahip bir molekül olarak sınıflandırılmıştır. Aynı zamanda LM10'un, pasif difüzyon yoluyla KBB' i geçme yeteneğine sahip olduğu öngörüldü. Bu özellik, özellikle GBM gibi merkezi sinir sistemi kaynaklı malignitelerde, sistemik yolla uygulanan ajanların terapötik etkinliğini belirleyen başlıca farmakokinetik parametrelerden biri olarak değerlendirilmektedir.

BOILED-Egg analiz çıktısı, LM10'un merkezi sinir sistemi hedeflerine ulaşabilme potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. SwissADME analizinde sarı renkle gösterilen beyin penetrasyonu yüksek bileşikler bölgesinde konumlanan LM10, bu özelliğiyle CNS odaklı farmakolojik müdahalelerde umut vadeden bir aday olarak öne çıkmaktadır ve ilgili farmakokinetik tahmin grafiği Şekil 5'te sunulmaktadır.

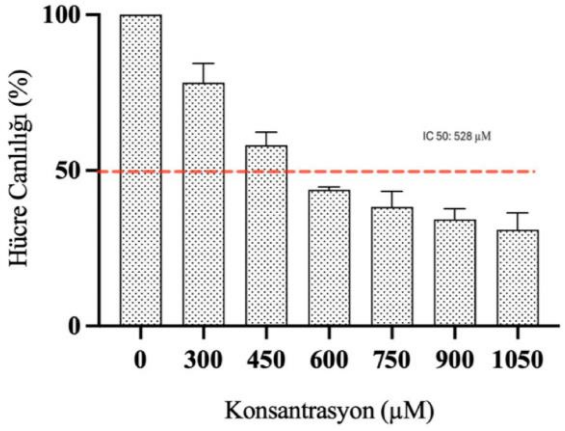


Şekil 5. LM10 bileşiğine ait SwissADME BOILED-Egg grafiği. LM10, beyin penetrasyonu yüksek bileşiklerin yer aldığı sarı bölgede konumlanmakta olup, CNS hedeflerine ulaşabilme potansiyeline sahiptir.

LM10, yüksek gastrointestinal emilime sahip moleküllerin yer aldığı beyaz alan ile birlikte, KBB'i geçebilen bileşiklerin temsil edildiği sarı bölgede konumlanmıştır. Bu durum, LM10'un merkezi sinir sistemi içerisindeki hedef yapılarla etkileşim kurabilecek farmakokinetik profile sahip olduğunu göstermektedir. LM10'un BOILED-Egg analizinde merkezi sinir sistemine penetre olabilen moleküller arasında sınıflandırılması, GBM gibi beyin tümörlerine yönelik potansiyel terapötik ajan olma ihtimalini güçlendirmiştir. Tüm bu bulgular doğrultusunda, LM10'un GBM tedavisinde potansiyel bir adjuvan ajan olabileceği öngörülmüş ve çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

4.2 Temozolomid ve LM10 Konsantrasyonların Belirlenmesi ve Canlılık Üzerine Etkileri

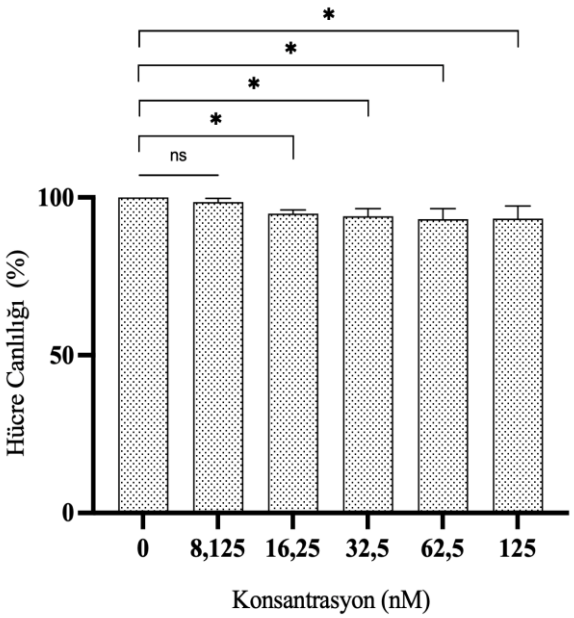
Bu çalışmada, TMZ ve LM10'un U87-MG glioblastoma hücresinde oluşturduğu sitotoksik etkiler, resazurin hücre canlılık testi ile değerlendirildi ve bar grafiği şeklinde sunuldu. Sayısal sonuçlara ortalama±standard sapma şeklinde verildi. Hücre canlılığı %100 referans kabul edilen kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edildi. TMZ uygulanan grupların hepsinde hücre canlılığı kontrol gruba göre anlamlı düzeyde azalmıştır (300 µM: %78,17 ± 6,22; 450 µM: %58,13 ± 4,15; 600 µM: %43,80 ± 0,90; 700 µM: %38,29 ± 5,03; 900 µM: %34,28 ± 3,43; 1050 µM: %30,96 ± 5,44; $p < 0.05$). Hesaplanan IC_{50} değeri yaklaşık 528 µM olarak saptandı (Şekil 6).



Şekil 6. U87-MG hücrelerinde temozolomidin hücre canlılığına etkisi

Analizler sonucunda, LM10'un istatistiksel olarak hücre canlılığını düşürmeyen en yüksek dozunun 8,125 nM (%98,53 ± 1,16) olduğu belirlendi (Şekil 7). LM10'un

diğer tüm gruplarında canlılık kontrole oranla anlamlı düzeyde azalmıştır (16,25 nM: %94,89 ± 1,11; 32,5 nM: %94,06 ± 2,35; 62,5 nM: %93,12 ± 3,35; 125 nM: %93,25 ± 4,01; $p < 0.05$). Canlılığı etkilemeyen konsantrasyon (8,125 nM), kombinasyon deneylerinde LM10'un toksik etkisinden bağımsız etkileşimlerin değerlendirilmesi amacıyla kullanıldı.

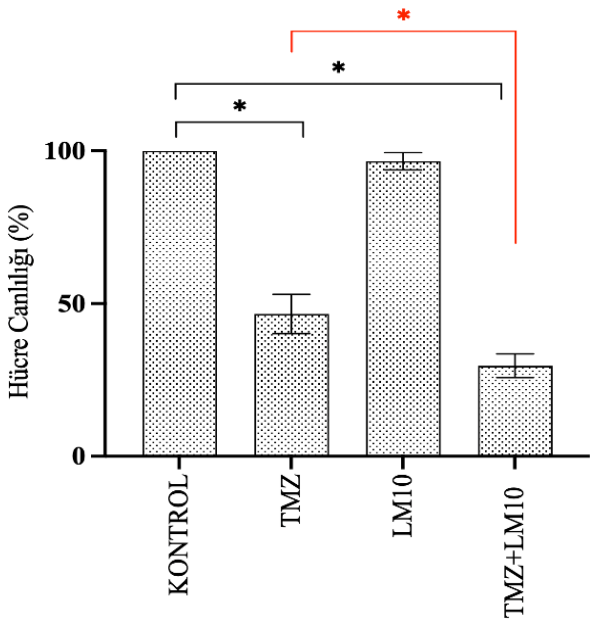


Şekil 7. U87-MG hücrelerinde LM10'un hücre canlılığına etkisi

Kombinasyon çalışmalarında dört deney grubu (Kontrol, TMZ, LM10, TMZ+LM10) için hücre canlılığı ortalamaları bar grafik olarak sunuldu. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilerek karşılaştırma yapıldı. TMZ uygulanan grupta hücre canlılığı kontrole göre anlamlı düzeyde azalmış (%46,64 ± 6,41, $p < 0.05$); LM10 grubunda ise kontrol ile anlamlı farklılık gözlenmemiştir (%96,63 ± 2,80; $p > 0.05$) (Şekil 8).

TMZ ve LM10'un birlikte uygulandığı kombinasyon grubunda, hücre canlılığı hem kontrol grubuna (%29,66 ± 3,84) hem de tek TMZ grubuna göre anlamlı oranda azalmıştır ($p < 0.05$).

Sonuç olarak, tüm bu veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, TMZ ve LM10 kombinasyon uygulamasının GBM hücrelerinde TMZ'nin tek başına kullanıldığı duruma göre sitotoksik etkiyi arttırabileceğini oluşturabileceğini göstermektedir.

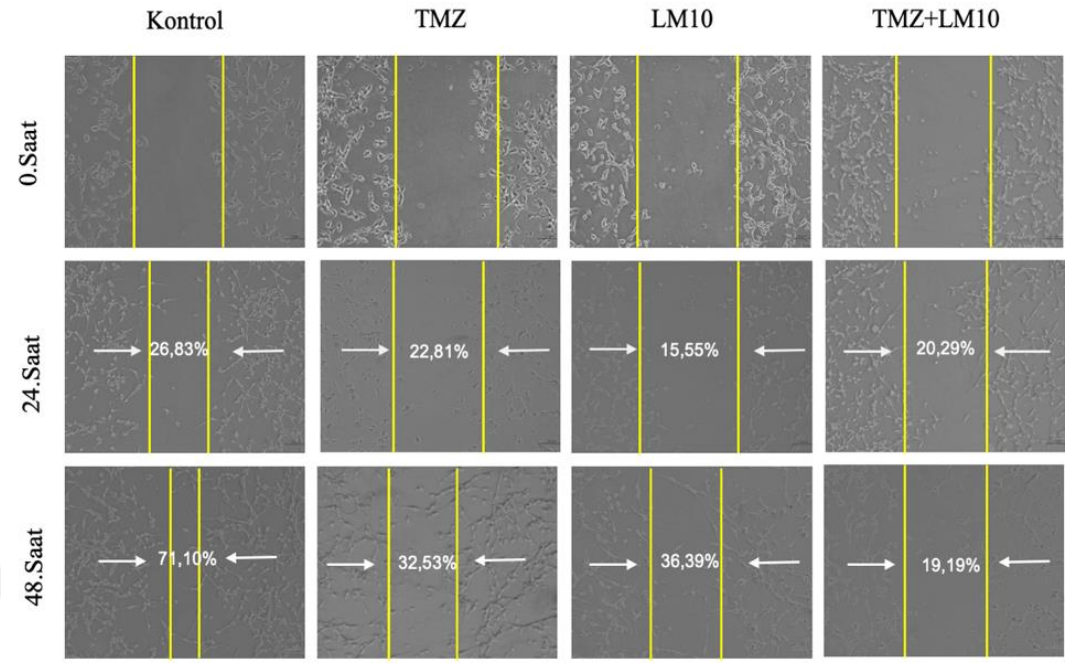


Şekil 8. U87-MG hücrelerinde canlılık analizlerine ait sonuçlar (Uygulanan TMZ konsantrasyonu: 528 µM, LM10 konsantrasyonu: 8,125 nM).

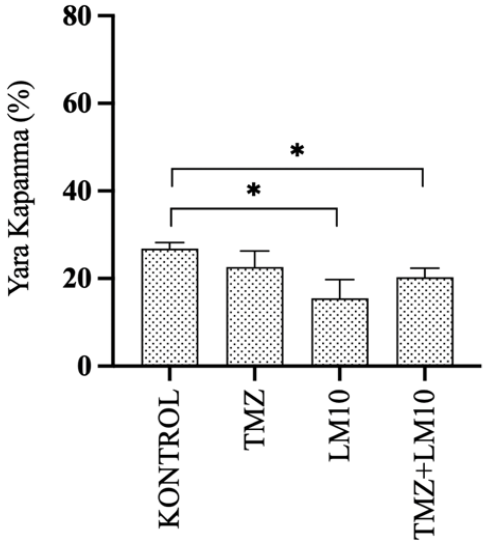
4.3 Temozolomid ve LM10'un Hücre Göçü Üzerine Etkisi

U87-MG hücre hattında hücre göçünü değerlendirmek amacıyla yapılan yara iyileşme (wound healing) deneyinde, hücreler çizik atıldıktan sonra 0., 24. ve 48. saatlerde görüntülenerek hücre göçüne bağlı yara kapanma oranları ölçüldü (Şekil 9).

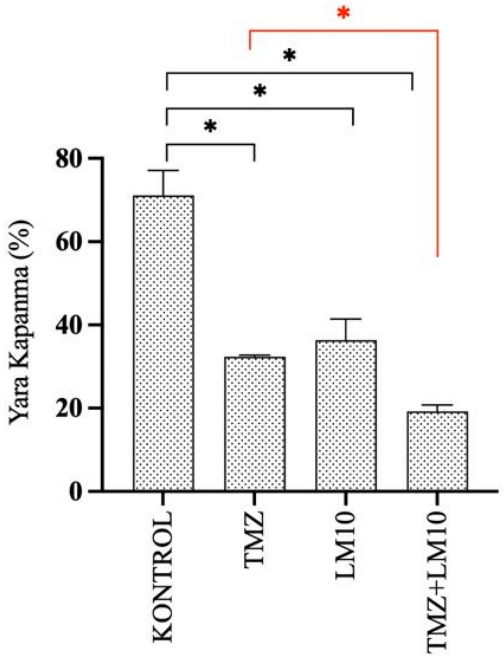
24. saat sonunda yara kapanma yüzey alanları; Kontrol Grubu: %26,75 ± 0,62, TMZ: %22,62 ± 1,86, LM10: %15,52 ± 2,12, TMZ + LM10: %20,32 ± 1,02 olarak ölçüldü (Şekil 10). 24 saatlik analizlerde, LM10 (8,125 nM) ve TMZ + LM10 kombinasyon uygulaması kontrole göre yara kapanma oranını anlamlı düzeyde azaltmıştır ($p < 0.05$). Ancak, tek başına uygulanan TMZ' nin (528 µM) yara kapanma üzerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Benzer şekilde, TMZ + LM10 kombinasyonu, yalnızca TMZ uygulamasıyla karşılaştırıldığında yara kapanma oranını azaltmada ek bir fayda sağlamamıştır ($p > 0.05$). Bu bulgular, TMZ'nin (528 µM) tek başına uygulandığı duruma kıyasla, TMZ ve LM10 kombinasyonunun hücre göçünü baskıladığını ortaya koymaktadır. Bu etkinin, kombinasyonun yalnızca LM10 bileşeninden kaynaklandığını düşündürmektedir.



Şekil 9. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarına ait yara iyileşmesi deneylerinin görüntüleri (Uygulanan TMZ konsantrasyonu: 528 µM, LM10 konsantrasyonu: 8,125 nM).



Şekil 10. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında 24. saate ait yara iyileşmesi analizlerinden elde edilen yara kapanma yüzdeleri (Uygulanan TMZ konsantrasyonu: 528 µM, LM10 konsantrasyonu: 8,125 nM).



Şekil 11. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında 48. saate ait yara iyileşmesi analizlerinden elde edilen yara kapanma yüzdeleri (Uygulanan TMZ konsantrasyonu: 528 µM, LM10 konsantrasyonu: 8,125 nM).

48. saat sonunda yara kapanma yüzey alanları ise: Kontrol: %71,13 ± 2,99, TMZ: %32,38 ± 0,19, LM10: %36,34 ± 2,55, TMZ + LM10: %19,26 ± 0,76 olarak ölçüldü (Şekil 11). 48. saatte yapılan istatistiksel değerlendirmelerde ise, TMZ (528 µM), LM10 (8,125 nM) ve TMZ+LM10 gruplarının kontrole kıyasla yara kapanma oranını anlamlı düzeyde azalttığı görüldü ($p < 0.05$). Ayrıca, TMZ+LM10 kombinasyon grubu ile tek başına TMZ uygulanan grubun karşılaştırması sonucu, kombinasyon uygulamasının TMZ'e göre yara kapanma oranını anlamlı düzeyde azalttığı görüldü ($p < 0.05$). Bu sonuçlar, kombinasyon tedavisinin hücre göçü-migrasyon inhibisyonu açısından tekli tedavilere göre daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Elde edilen veriler, LM10'un hücre göçünü baskıladığını ve bu etkinin TMZ+LM10 kombinasyon grubunda daha da belirginleştiğini göstermektedir. Bu durum, kombinasyon uygulamasının migrasyonun inhibisyonu açısından daha etkin olabileceğin göstermektedir.

4.4 Temozolomid ve LM10'un IL-6, IL-8, IFN-β ve PDL-1 Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

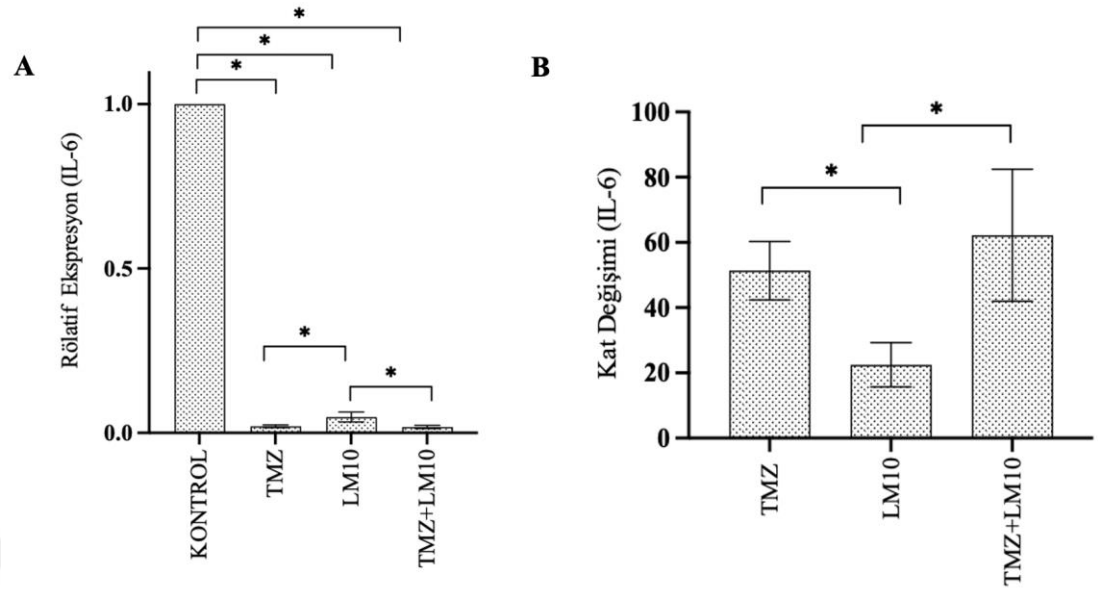
U87-MG glioblastoma hücrelerinde TMZ, LM10 ve kombinasyonlarının sitokin ve immün yanıt ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri, qRT-PCR yöntemiyle analiz edildi. Kontrol grubunda gen ekspresyonu 1 kabul edildi.

4.4.1. IL-6 Gen Ekspresyonu

IL-6 gen ekspresyonu, TMZ grubunda 0,02015 ± 0,002020, LM10 grubunda 0,04809 ± 0,007551, TMZ+LM10 kombinasyon grubunda ise 0,01761 ± 0,002417 olarak belirlendi. Üç tedavi grubunda da IL-6 düzeylerinin, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptandı ($p < 0,05$). TMZ+LM10 grubundaki IL-6 gen ekspresyonu, TMZ'nin tek başına kullanıldığı gruba göre anlamlı oranda değişim göstermemiştir ($p > 0,05$). Ancak bununla birlikte TMZ+LM10 grubundaki IL-6 gen ekspresyonu, LM10'un tek başına kullanıldığı gruba göre anlamlı oranda azalmıştır ($p < 0,05$).

Gen ekspresyon değerleri doğrultusundan, kontrole kıyasla gen ekspresyonuna ilişkin kat değişimlerindeki azalma (Fold change), TMZ grubunda 51,37 ± 8,967, LM10 grubunda 22,48 ± 6,784, TMZ+LM10 grubunda 62,19 ± 20,25 olarak belirlendi. TMZ+LM10 kombinasyon uygulaması TMZ'e göre IL-6 ekspresyonunu açısından anlamlı bir değişim göstermemiştir ($p > 0,05$). Bununla birlikte, TMZ+LM10 kombinasyon uygulaması ile tek başına yapılan LM10 uygulaması IL-6 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında kombinasyon uygulaması, LM10 uygulamasına göre IL-6 ekspresyonunu daha çok azalttığı ve bu azalmanın anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). LM10'un tek başına uygulandığı grup ile TMZ arasındaki karşılaştırmada da TMZ'nin LM10'a göre IL-6 ekspresyonunu daha çok azalttığı ve bu değişimin anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Bu sonuçlar, TMZ+LM10 kombinasyon uygulamasının tek başına TMZ uygulamasına göre IL-6 ekspresyon düzeyini azalttığını göstermekle birlikte bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Kombinasyon uygulamasının tek başına LM10 kullanımına göre IL-6 ekspresyonunu anlamlı olarak daha çok azalttığını göstermektedir. Bu bulgular TMZ hem LM10'un tek başına anti-inflamatuar etki gösterebildiğini, ancak kombinasyon tedavisinin tek başına TMZ kullanımına göre bu etkiyi daha fazla etkileyemediğini ortaya koymaktadır (Şekil 12).



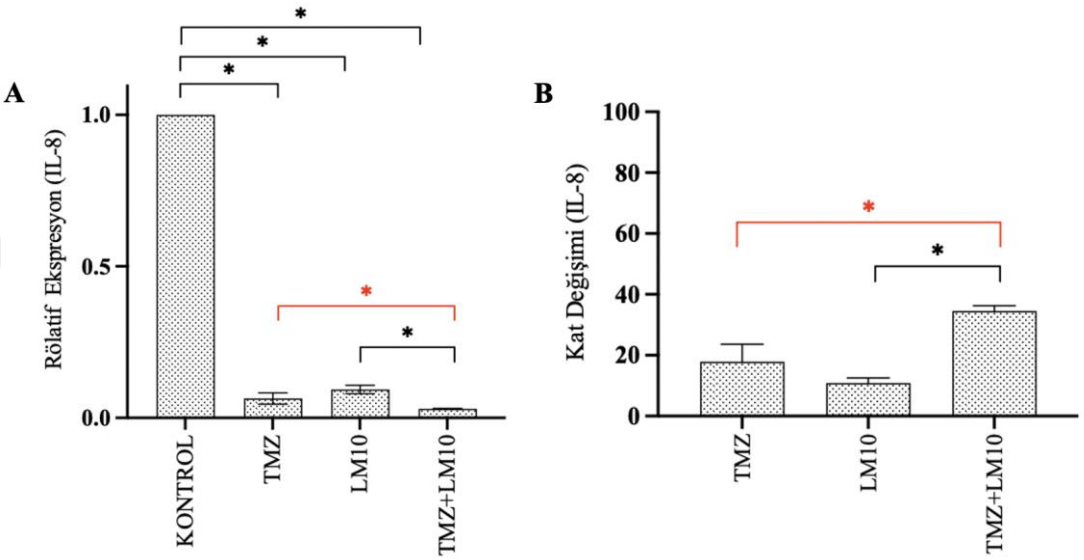
Şekil 12. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında IL-6 gen ekspresyon sonuçları. A) Rölatif ekspresyon değerleri. B) Ekspresyonun azalmasında kontrole göre kat değişim değerleri (Uygulanan TMZ konsantrasyonu: 528 µM, LM10 konsantrasyonu: 8,125 nM).

4.4.2. IL-8 Gen Ekspresyonu

IL-8 genine ait ekspresyon düzeyleri, kontrol grubunda 1.000 iken; TMZ grubunda 0,06423 ± 0,01864, LM10 grubunda 0,09390 ± 0,01409 ve TMZ+LM10 grubunda 0,02959 ± 0,001525 olarak ölçülmüştür. Tüm tedavi gruplarında kontrole kıyasla IL-8 düzeylerinde anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte TMZ+LM10'un kombine olarak uygulandığı gruptaki IL-8 ekspresyon düzeyi, TMZ'nin tek başına uygulandığı gruba göre anlamı düzeyde azalmıştır ($p < 0,05$). Ek olarak TMZ+LM10'un kombine olarak uygulandığı gruptaki IL-8 ekspresyon düzeyi, LM10'un tek başına uygulandığı gruba göre de anlamı düzeyde azalmıştır ($p < 0,05$). Bu durum, TMZ+LM10 kombinasyonunun, IL-8 açısından azalma etkisi oluşturacağını gösterdi. En düşük ekspresyon düzeyinin kombinasyon grubunda saptanmış olması, destekleyici bir baskılamanın varlığını göstermektedir (Şekil 13).

Gen ekspresyon değerleri doğrultusundan, gen ekspresyonuna ilişkin kat değişimlerindeki azalma (Fold change), TMZ grubunda 17,87 ± 5,789, LM10 grubunda 10,88 ± 1,679, TMZ+LM10 grubunda 34,54 ± 1,745 olarak belirlendi. Bu

kapsamda TMZ+LM10 kombinasyonunun, TMZ'nin ve LM10'un tek başına uygulandığı gruplar ile karşılaştırılması sonucu, kombinasyon uygulamasının IL-8 ekspresyonunu anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür ($p < 0,05$). TMZ uygulaması ile LM10 arasında ise IL-8 ekspresyonu açısından anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p > 0,05$).



Şekil 13. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında IL-8 gen ekspresyon sonuçları. A) Rölatif ekspresyon değerleri. B) Kat değişim değerleri (Uygulanan TMZ konsantrasyonu: 528 µM, LM10 konsantrasyonu: 8,125 nM).

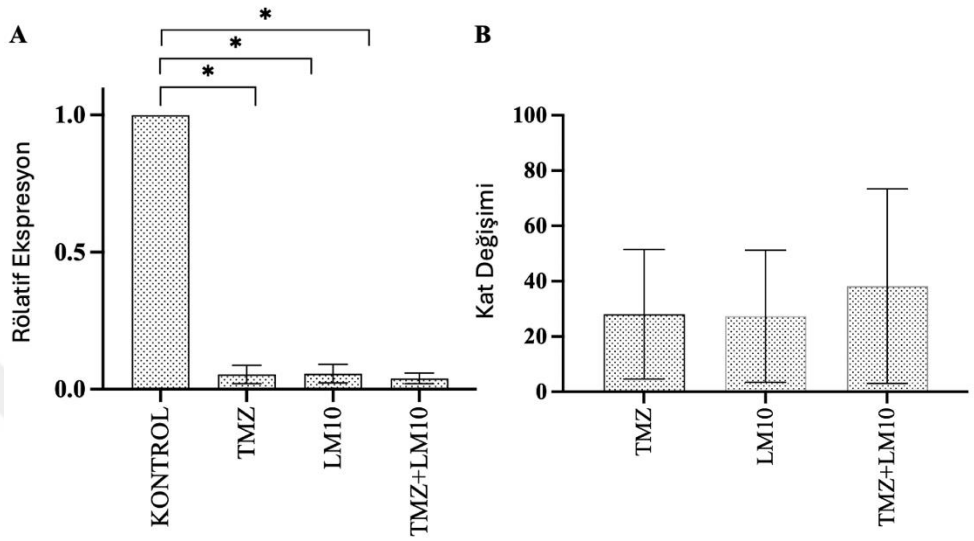
4.4.3. IFN-β Gen Ekspresyonu

IFN-β gen ekspresyonu kontrol grubunda 1.000 iken; TMZ grubunda 0,05440 ± 0,03343, LM10 grubunda 0,05712 ± 0,03392, TMZ+LM10 grubunda ise 0,03994 ± 0,01906 olarak belirlenmiştir (Şekil 14). Her üç tedavi grubunda da IFN-β düzeyleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görüldü ($p < 0,05$). Bununla birlikte TMZ+LM10 kombinasyonundaki değişim, TMZ'nin veya LM10'un tek başına uygulandığı gruptan farklı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Aynı şekilde TMZ ile LM10 grupları arasında da anlamlı değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Gen ekspresyon değerleri doğrultusundan, gen ekspresyonuna ilişkin kat değişimlerindeki azalma (Fold change), TMZ grubunda 28,02 ± 23,42, LM10 grubunda 27,34 ± 23,87, TMZ+LM10 grubunda 38,21 ± 35,16 olarak belirlendi (Şekil 14). Bu kapsamda kat değişimi açısından gruplar arasında herhangi bir anlamlı değişim

gözlenmedi (p > 0,05).

Sonuç olarak elde edilen veriler doğrultusunda TMZ+LM10 kombinasyonunun IFN-Beta sitokin ekspresyon düzeyinde, TMZ'nin veya LM10'un tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi (p > 0,05).

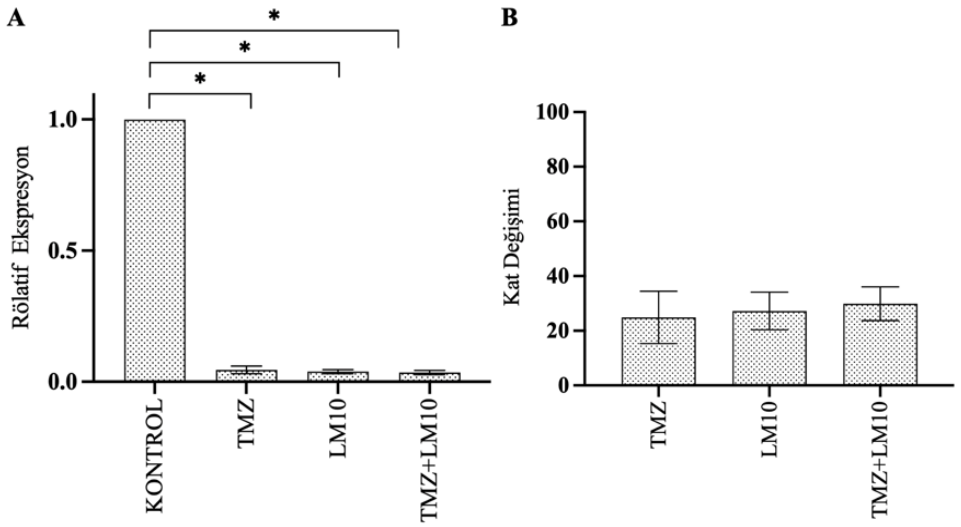


Şekil 14. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında IFN-Beta gen ekspresyon sonuçları. A) Rölatif ekspresyon değerleri. B) Kat değişim değerleri. (Uygulanan TMZ konsantrasyonu: 528 µM, LM10 konsantrasyonu: 8,125 nM).

4.4.4. PD-L1 Gen Ekspresyonu

PD-L1 gen ekspresyonu kontrol grubunda 1.000 iken; TMZ grubunda 0,04414 ± 0,01448, LM10 grubunda 0,03857 ± 0,008016, TMZ+LM10 kombinasyon grubunda ise 0,03543 ± 0,008557 olarak ölçülmüştür. Tüm tedavi gruplarında kontrole kıyasla PD-L1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (p < 0,05). Özellikle kombinasyon grubunda gözlenen belirgin düşüş, TMZ ve LM10'un birlikte kullanımının tümör hücrelerinin immün sistemi baskılayıcı kapasitesini azaltabileceğine işaret etmektedir, ancak TMZ+LM10 kombinasyonundaki azalma TMZ'nin veya LM10'un tek başına kullanıldığı gruba göre anlamlı bir fark göstermemiştir (Şekil 14).

Gen ekspresyon değerleri doğrultusunda, gen ekspresyonuna ilişkin kat değişimlerindeki azalma (Fold change), TMZ grubunda 24,88 ± 9,592, LM10 grubunda 27,25 ± 6,868, TMZ+LM10 grubunda 29,88 ± 6,162 olarak belirlendi. Buna göre kat değişimi açısından gruplar arasında anlamlı değişim gözlenmedi (p > 0,05).



Şekil 15. U87-MG hücrelerinde oluşturulan farklı deney gruplarında PDL-1 gen ekspresyon sonuçları. A) Rölatif ekspresyon değerleri. B) Kat değişim değerleri (Uygulanan TMZ konsantrasyonu: 528 μM, LM10 konsantrasyonu: 8,125 nM).

Sonuç olarak elde edilen bulgular TMZ+LM10 kombinasyonunun IL-8 gen ekspresyon düzeylerinde, TMZ'nin ve LM10'un tek başına uygulandığı gruplara göre anlamlı azalma oluşturduğunu göstermiştir. IL-6 açısından da TMZ+LM10 kombinasyon uygulamasının TMZ'nin tek başına uygulandığı gruba göre IL-6 ekspresyonunu anlamlı düzeyde olmasa da azalttığını, ancak LM10'un tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir. Bu sonuç, TMZ+LM10 kombinasyonunun IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin kanserde anti-apoptotik, proliferasyon, anjiyojenez ve metastaz açısından olan etkilerinin azaltılması açısından da önemlidir.

5. TARTIŞMA

GBM, merkezi sinir sisteminin primer beyin tümörleri arasında en sık rastlanan ve en yüksek agresifliğe sahip olanıdır. Yüksek çoğalma hızı, invaziv büyüme eğilimi ve sık nüks etmesiyle öne çıkan bu tümör tipi, hastalarda genellikle olumsuz bir prognoza işaret eder (19). Standart tedavi protokolü cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ve TMZ tedavisini içermektedir (159). TMZ, DNA metilasyon yoluyla hücre ölümünü indükleyen alkilleyici bir ajan olarak, GBM tedavisinde önemli bir yer tutsa da, uzun dönem kullanımında gelişen kemorezistans ve sistemik toksisite gibi dezavantajlar klinik başarıyı sınırlamaktadır (160).

Bu nedenle, TMZ'nin etkinliğini artıracak yeni ajanların araştırılması büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda, doğal kaynaklardan türetilen ya da biyosentez yoluyla elde edilen bileşikler, antitümör potansiyelleriyle dikkat çekmektedir (161). Bu kapsamda geliştirilen LM10 adlı molekülün, düşük toksisite profili ve biyolojik etkinliği açısından umut vadeden bir aday olduğu düşünülmektedir (153).

Bu çalışmada, U87-MG glioblastoma hücreleri üzerinde TMZ ve LM10'un tek başına ve kombinasyon halinde sitotoksik etkileri, hücre göçü üzerine etkileri ve bazı inflamatuar ve immün yanıtla ilişkili genlerin (IL-6, IL-8, IFN-β ve PD-L1) ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular hem TMZ'nin etkinliğinin artırılması hem de LM10'un terapötik potansiyelinin ortaya konması açısından önemli veriler sunmaktadır.

Çalışmanın ilk aşamasında gerçekleştirilen hücre canlılık analizi, TMZ'nin U87-MG hücreleri üzerinde konsantrasyon bağımlı bir sitotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Elde edilen IC_{50} değeri, TMZ'nin GBM hücreleri üzerindeki literatürde bildirilen etkileriyle uyumludur (161). Ancak yapılan birçok çalışmada TMZ'nin U87-MG hücre hattı üzerinde IC_{50} değerlerinin 7–900 µM aralığında değiştiği rapor edilmiştir (161, 162, 163). Elde edilen veriler, hücre hattının ilaca beklendiği gibi yanıt verdiğini doğrularken, TMZ'nin GBM hücrelerindeki farklı tepkilerinin GBM' nin heterojen yapısından kaynaklandığını göstermektedir.

Son yıllarda gerçekleştirilen çeşitli *in vitro* çalışmalar da TMZ'nin U87-MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini desteklemektedir. Örneğin, 2019 yılında yapılan bir çalışmada TMZ' nin 72 saatlik uygulama sonunda yaklaşık 280 µM IC_{50} değeri ile anlamlı bir hücre ölümüne yol açtığını bildirmiştir (165). Yapılan bir diğer

çalışmada TMZ tedavisinin otoklastik hücre ölümünü indüklediğini ve bu etkinin mTOR sinyal yolakları ile bağlantılı olabileceğini rapor etmiştir (166). Ayrıca TMZ'ye karşı duyarlılığın hücre içi glutatyon düzeyleriyle ilişkili olduğunu ve bu düzeylerin modülasyonunun kemoterapi etkinliğini artırabileceğini göstermiştir (167). Son olarak, kombinasyon tedavilerinin TMZ'nin IC_{50} değerini önemli ölçüde düşürdüğünü ve böylece tedavi etkinliğinin artırılabileceğini ortaya koymuştur (168).

Bu güncel bulgular, çalışmamızda elde edilen IC_{50} değerlerinin sadece metodolojik olarak değil, aynı zamanda güncel literatürle de tutarlı olduğunu ve TMZ'nin U87-MG hücreleri üzerindeki konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkisini güçlü biçimde desteklediğini göstermektedir. Dikkat çekici bir diğer bulgu ise LM10'un tek başına uygulandığında düşük toksisite göstermesidir. Hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe neden olmaması, bu molekülün terapötik penceresinin geniş olabileceğine işaret etmektedir. Bu durum, LM10'un özellikle kombinasyon tedavilerinde yardımcı ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, LM10'un toksik etki göstermeksizin TMZ ile kullanıldığında hücre canlılığını daha çok düşürdüğü gözlemlenmiştir; bu durum, LM10'un, TMZ'nin canlılık üzerindeki etkisini güçlendirdiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, TMZ ve LM10' un birlikte uygulanmasının, her iki ajanın tek başına kullanımına kıyasla U87-MG glioblastoma hücrelerinin canlılığında daha belirgin bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgu, LM10 ile kombinasyon tedavisinin TMZ'nin antitümör etkinliğini artırabileceğini düşündürmektedir. Kombinasyonun daha yüksek sitotoksik etki göstermesi, LM10'un TMZ ile uygulandığında hücre metabolizması veya proliferasyonu üzerinde tamamlayıcı veya destekleyici mekanizmalarla etkileşime girebileceğini ortaya koymaktadır.

Gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizlerinden elde edilen sonuçlar, TMZ ve LM10 uygulamalarının U87-MG hücre hattında inflamatuar yanıt ve bağışıklık regülasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyonunu anlamlı şekilde etkilediğini göstermiştir. Bu çalışmada özellikle IL-6, IL-8, IFN-β ve PD-L1 genleri üzerinde durulmuştur.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, GBM hücrelerinde inflamatuar sitokinlerin ve immün yanıt düzenleyicilerinin önemli roller oynadığını ortaya koymuştur. Örneğin,

IL-6'nın GBM hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edildiği ve tümör mikroçevresinde immünosupresif myeloid hücrelerin PD-L1 ekspresyonunu artırarak tümör büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir. Benzer şekilde, IL-8'in tümör mikroçevresinde pro-anjiyojenik ve pro-invaziv etkilere sahip olduğu, bu nedenle GBM progresyonunda önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir. (169). IFN-β'nin ise GBM tedavisinde TMZ ile kombinasyon halinde kullanıldığında, O6-metil-guanin-DNA metiltransferaz enzimini aşağı yönde regüle ederek glioma hücrelerini kemo-radyasyon tedavisine karşı daha hassas hale getirdiği rapor edilmiştir (170). PD-L1'in, GBM hücrelerinde immün kaçış mekanizmalarında kritik bir rol oynadığı ve TMZ tedavisinin PD-L1 ekspresyonunu etkileyebileceği gösterilmiştir. Örneğin GBM kök hücrelerinden türetilen PD-L1 içeren eksozomların, AMPK/ULK1 yolunu aktive ederek koruyucu otofajiyi tetiklediği ve TMZ'ye karşı direnci artırdığı bulunmuştur (171). Diğer yandan, GBM hücrelerinin IFN-γ ile uyarıldığında, ekstraselüler veziküller aracılığıyla PD-L1 ekspresyonunu artırarak T hücre aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum, GBM hücrelerinin immün kaçış mekanizmalarını destekleyen bir diğer yolak olarak değerlendirilmektedir (172). Çalışmamızda elde edilen veriler, TMZ ve LM10 kombinasyonunun GBM hücrelerinde sitotoksik etkiyi artırabileceğini ve inflamatuar yanıt ile immün regülasyonla ilişkili gen ekspresyonlarını modüle edebileceğini göstermektedir. Bu bulgular, GBM tedavisinde kombinasyon terapilerinin potansiyelini ve immün yanıtın hedeflenmesinin önemini vurgulamaktadır. IL-6 ve IL-8, GBM gibi yüksek dereceli malin beyin tümörlerinde proinflamatuar yanıtı destekleyen ve tümör progresyonunu kolaylaştıran temel sitokinler arasında yer almaktadır. Bu sitokinlerin aşırı ekspresyonu, tümör mikroçevresinde immün baskılanmayı, anjiyogenezi ve invaziv tümör fenotipini destekleyerek klinik prognozu olumsuz yönde etkilemektedir (173). IL-6, özellikle JAK/STAT3 sinyal yolunu aktive ederek glioma hücrelerinde proliferasyon, invazyon ve migrasyon süreçlerini tetiklerken; IL-8 ise tümör kaynaklı anjiyogenezi artırarak vasküler yapı oluşumunu kolaylaştırmakta ve tümör ilerleyişine katkıda bulunmaktadır (174).

2021 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, GBM hastalarının serum IL-6 ve IL-8 düzeylerinin sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında yaklaşık 1.5–2 kat daha yüksek olduğu ve bu artışın tümör progresyonu ve kötü prognozla anlamlı biçimde ilişkili

olduğu bildirilmiştir (175). Benzer şekilde, 2024 tarihli bir araştırma, IL-6 düzeylerinin düşük dereceli glioma olgularında dahi kötü prognozla bağlantılı olduğunu ve bu sitokinin bağışıklık mikroçevresi üzerindeki belirleyici rolünü ortaya koymuştur (176). Literatürde, IL-6'nın yalnızca tümör hücrelerini değil, aynı zamanda immün hücreleri de etkileyerek immün baskılayıcı mikroçevre oluşumuna katkı sağladığı belirtilmektedir (177). Örneğin, IL-6'nın periferik miyeloid hücrelerde PD-L1 ekspresyonunu indüklediği ve bu durumun $CD8^+$ T hücre aracılı antitümör yanıtı baskılayarak tümör büyümesini kolaylaştırdığı ortaya konmuştur (178).

Bu çalışma kapsamında hem TMZ hem de LM10 uygulamaları, IL-6 ve IL-8 gen ekspresyon düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu bulgu, her iki ajanın da GBM mikroçevresinde inflamasyonla ilişkili sinyal yollarını hedef alarak proinflamatuar ortamı baskılayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle kombinasyon tedavi grubunda gözlemlenen daha belirgin gen baskılanması, TMZ ve LM10'un birlikte daha etkin olduğunu destekler niteliktedir.

Bu bulgular, önceki araştırmalarla da paralellik göstermektedir. IL-6 ekspresyonu yüksek GBM olgularında STAT3 aktivasyonunun da arttığını ve bu aksın tümör agresifliğiyle korele olduğunu bildirmiştir (179). IL-8'in GBM dokularında CXCR2 üzerinden neoanjiyogenezi uyararak tümör büyümesini teşvik ettiğini ve bu sitokinin farmakolojik hedeflenmesinin terapötik fayda sağlayabileceğini belirtmiştir (180). IL-6/STAT3 tolağının TMZ direnci ile ilişkili olduğunu ve bu yolun inhibisyonunun TMZ etkinliğini artırabileceğini ortaya koymuştur (181). Ayrıca, IL-8'in GBM hücrelerinde CXCR1/2 reseptörleri üzerinden invazyonu ve kemorezistansı artırdığını göstermiştir (182). IL-6 ve IL-8'in eşzamanlı baskılanmasının yumurtalık kanseri hücrelerinin büyümesini anlamlı düzeyde azalttığını raporlamıştır (183). IFN-β ekspresyonunda ise tedavi gruplarında artış gözlenmiştir. IFN-β, bilinen anti-tümöral ve immünmodülatör etkileri sayesinde GBM gibi immün baskılanmış tümörlerde önemli bir terapötik ajan olarak değerlendirilmektedir. TMZ ve LM10'un IFN-β ekspresyonunu artırması, tümör mikroçevresinde immün sistemin yeniden aktive edilmesi bakımından umut verici bir bulgu niteliğindedir. Literatürde, IFN-β'nın GBM kök hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve aynı zamanda immün yanıt ile hücre döngüsüyle ilişkili sinyal yollarını modüle ettiği gösterilmiştir (185).

Bununla birlikte, IFN-β'nın GBM hücrelerinde IFITM, ISG15 ve MX1 gibi interferonla ilişkili genleri indüklediği ve bu genlerin yüksek düzeyde ekspresyonunun daha iyi klinik sonuçlarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (186).

Öte yandan, PD-L1 immün kaçış mekanizmalarının merkezinde yer alan bir moleküldür. Yüksek PD-L1 ekspresyonu, GBM gibi yüksek dereceli tümörlerde bağışıklık sisteminin işlevsiz hale gelmesine yol açarak hastalığın ilerlemesine katkıda bulunur. Çalışmamızda, TMZ ve LM10'un tekli uygulamalarında PD-L1 ekspresyonunda bir miktar azalma gözlemlenirken, kombinasyon grubunda bu baskılanmanın daha belirgin hale geldiği saptanmıştır. Bu durum, her iki ajanın birlikte kullanımının, GBM hücrelerinin immün sistemi baskılayıcı kapasitesini azaltabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, yüksek PD-L1 ekspresyonunun, GBM hastalarında kötü sağkalım ile ilişkili olduğu meta-analizlerle de desteklenmiştir (187). Ek olarak, PD-L1 ekspresyonunun yalnızca prognozu değil, aynı zamanda immünoterapilere verilen yanıtı da etkilediği ve bu molekülün, tedavi planlamasında potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (172). PD-L1 ekspresyon profili, GBM alt tiplerine göre farklılık göstermekte ve özellikle mesenkimal alt tiplerde daha yüksek düzeyde gözlemlenmektedir. Bu bağlamda, PD-L1 ekspresyonunun hem prognostik hem de prediktif bir rol oynayabileceği, yeni nesil tedavi stratejilerinin belirlenmesinde dikkate alınması gereken bir unsur olduğu vurgulanmaktadır (172). Son olarak, PD-L1'in baskılanmasının, tümör mikroçevresindeki regülatör T hücrelerinin azalmasına ve sitotoksik T hücrelerin fonksiyonunun artmasına neden olarak immün dengenin tümör aleyhine çevrilmesini sağladığı rapor edilmiştir (172).

Genel olarak değerlendirildiğinde, elde edilen bu gen ekspresyon profili, TMZ ve LM10'un GBM tedavisinde yalnızca sitotoksik değil, aynı zamanda immünregülatör etkiler de gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu etkiler, GBM gibi bağışıklık açısından zorlayıcı tümörlerde, kombinasyon tedavilerinin çok yönlü faydalarını desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen bulgular ile, temozolomid (TMZ) ile TDO inhibitörü LM10 kombinasyonun uygulamasının glioblastoma multiforme (GBM) hücreleri üzerindeki sitotoksik ve antimigratif etkilerinin yanı sıra, immün mikroçevreyi modüle eden sitokinlerin gen ekspresyonları üzerindeki anlamlı etkilerini gösterilerek, LM10'un TMZ ile terapötik açıdan anlamlı etkiler oluşturabileceği ortaya konulmuştur.

Kombinasyon tedavisi, TMZ ve LM10'un tek başına uygulamalarına kıyasla hücre canlılığını daha etkili bir şekilde azaltmış, bu da TMZ'ye karşı hücresel duyarlılığı artırdığını göstermiştir. Ayrıca hücre göçü üzerinde de benzer şekilde belirgin bir azalma sağlanmış, böylece tümör hücrelerinin migratif kapasitesi anlamlı ölçüde azaltılmıştır. İmmün mikroçevredeki inflamatuar yanıt göstergeleri açısından değerlendirildiğinde, pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-8'in ekspresyonu, kombinasyon grubunda hem TMZ hem de LM10 tekli tedavi gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla baskılanmıştır. IL-6 düzeylerinde ise, kombinasyon tedavisi LM10 grubuna göre anlamlı azalma sağlamış, ancak TMZ grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte, IFN-β ve PD-L1 ekspresyonunda kombinasyon tedavisi ile tekli uygulamalar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Gen ekspresyon analizleri sonuçlarına göre, pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-8'in ekspresyonu, kombinasyon grubunda hem TMZ hem de LM10 tekli tedavi gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla baskılanmıştır. IL-6 düzeylerinde ise, kombinasyon tedavisi LM10 grubuna göre anlamlı azalma sağlamış, ancak TMZ grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Genel olarak, elde edilen veriler LM10'un TMZ ile kullanımının GBM hücrelerinde canlılığı ve migrasyonu azaltarak tedavi etkinliğini artırdığını, immün mikroçevredeki inflamatuar belirteçleri baskılayarak tümörün agresif özelliklerini sınırlayabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar LM10'un TMZ ile terapötik potansiyel taşıdığını ve TMZ'nin sınırlı etkinliğinin LM10 ile kombinasyon halinde daha etkin hale getirilerek daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilebileceğini göstermektedir.

Bununla birlikte, elde edilen sonuçların yorumlanmasında dikkate alınması gereken bazı sınırlılıklar mevcuttur. Çalışmanın *in vitro* düzeyde gerçekleştirilmiş

olması, bulguların klinik karşılığının değerlendirilebilmesi için *in vivo* modellerde doğrulama yapılmasını gerekli kılmaktadır. Ayrıca LM10'un hedeflediği enzime (TDO) karşı inhibitör etkinliğinin biyokimyasal düzeyde net olarak ortaya konulabilmesi için enzim aktivitesi çalışmalarına ihtiyaç vardır. Bu doğrultuda, gelecekte yapılacak çalışmalarda bu sınırlılıkların giderilmesine yönelik daha kapsamlı ve çok boyutlu deneysel tasarımların oluşturulması önerilmektedir. Bunun yanısıra, T hücreleri ile ko-kültür modelleri kullanılarak sitokin temelli mikroçevre etkisinin etkisi daha ayrıntılı biçimde incelenmelidir. Bu tür ileri analizler, tedavi etkinliğinin daha geniş şekilde analiz edilmesine olanak sağlayarak, elde edilen preklinik verilerin klinik uygulamalara aktarılabilirliğini artıracaktır.

7.KAYNAKLAR

1- Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. J Pathol. 2014; 232(2): 165-77.

2- Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clin J Oncol Nurs. 2016; 20: 8.

3- Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. JAMA. 2013; 310(17): 1842-50.

4- Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D ve ark. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. Cancers (Basel). 2022; 14(10): 2412.

5- DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, Yasmin H, Klein L, Singh SK ve ark. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. Front Immunol. 2020; 11: 1402.

6- Yang L, Li A, Lei Q, Zhang Y. Tumor-intrinsic signaling pathways: key roles in the regulation of the immunosuppressive tumor microenvironment. J Hematol Oncol. 2019; 12(1): 125.

7- Shah S, Nag A, Sachithanandam SV, Lucke-Wold B. Predictive and Prognostic Significance of Molecular Biomarkers in Glioblastoma. Biomedicines. 2024; 12(12): 2664.

8- Clayton D, Schifflers E. Models for temporal variation in cancer rates. II: Age-period-cohort models. Stat Med. 1987; 6(4): 469-81.

9- Shah S, Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA ve ark. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med. 2009 Feb 19;360(8):765-73.

10- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers E ve ark. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature. 2009; 462(7274): 739–744.

11- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP ve ark. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. Cancer Cell. 2010; 17(5): 510–522.

12- Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA ve ark. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. Cell. 2016; 164(3): 550–563.

13- Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E ve ark. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. Nature. 2012; 483(7390): 479–483.

14- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P ve ark. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science. 2008; 321(5897): 1807–1812.

15- Lee Y, Park CK, Park SH. Prognostic Impact of TERT Promoter Mutations in Adult-Type Diffuse Gliomas Based on WHO2021 Criteria. Cancers (Basel). 2024; 16(11): 2032.

16- Liu J, Zhang X, Yan X, Sun M, Fan Y, Huang Y. Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. Oncol Lett. 2019; 17(1): 95–102.

17- Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H ve ark. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. Science. 2014; 344(6190): 1396–1401.

18- Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ ve ark. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. Cancer Cell. 2011; 20(6): 810-817.

19- Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ ve ark. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. Cell. 2019; 178(4): 835-849.e21.

20- Ozawa T, Riester M, Cheng YK, Huse JT, Squatrito M, Helmy K ve ark. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. Cancer Cell. 2014; 26(2): 288–300.

21- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee ve ark. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. Acta Neuropathol. 2016; 131(6): 803-820.

22- Tariq R, Hussain N, Bajwa MH, Aziz HF, Shamim MS, Enam SA. Multicentric low-grade glioma: A systematic review of a rare neuro-oncological disease. Clin Neurol Neurosurg. 2025; 251: 108821.

23- Cancer Genome Atlas Research Network; Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR ve ark. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. N Engl J Med. 2015; 372(26): 2481–2498.

24- Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. Neuropathol Appl Neurobiol. 2018; 44(2): 139-150.

25- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB ve ark. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma. N Engl J Med. 2005; 352(10): 987-996.

26- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D ve ark. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. Neuro Oncol. 2021; 23(8): 1231-1251.

27- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD ve ark. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell. 2010; 17(1): 98-110.

28- Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A ve ark. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. Lancet Oncol. 2014; 15(9): e395-403.

29- Sarkaria JN, Hu LS, Parney IF, Pafundi DH, Brinkmann DH, Laack NN ve ark. Is the blood–brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. Neuro Oncol. 2018; 20(2): 184-191.

30- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006; 7(1): 41-53.

31- Hersh AM, Alomari S, Tyler BM. Crossing the Blood-Brain Barrier: Advances in Nanoparticle Technology for Drug Delivery in Neuro-Oncology. Int J Mol Sci. 2022; 23(8): 4153.

32- Liu HL, Hua MY, Chen PY, Chu PC, Pan CH, Yang HW ve ark. Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment. Radiology. 2010; 255(2): 415-25.

33- Almeida Lima K, Osawa IYA, Ramalho MCC, de Souza I, Guedes CB, Souza Filho CHD ve ark. Temozolomide Resistance in Glioblastoma by NRF2: Protecting the Evil. Biomedicines. 2023; 11(4): 1081.

34- Wick W, Platten M, Weller M. Wick W, Platten M, Weller M. New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. Neuro Oncol. 2009;11(1):69-79.
35- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer. 2002 Jan;2(1):48-58.
36- Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. Cancer Res. 2001;61(5):1957-1963.
37- Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. J Clin Oncol. 2007; 25(26): 4127-36.
38- Frosina G. DNA repair and resistance of gliomas to chemotherapy and radiotherapy. Mol Cancer Res. 2009; 7(7): 989-999.
39- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M ve ark. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 2005; 352(10): 997-1003.
40- Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair (Amst). 2007; 6(8): 1079-1099.
41- Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y ve ark. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. Brain Pathol. 2001;11(2):159-168.
42- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V ve ark. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N Engl J Med. 2000;343(19):1350-1354.
43- Chen X, Zhang M, Gan H, Wang H, Lee JH, Fang D ve ark. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. Nat Commun. 2018; 9(1): 2949.
44- Lauko A, Lo A, Ahluwalia MS, Lathia JD. Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors. Semin Cancer Biol. 2022; 82: 162-175.

45- Pires-Afonso Y, Niclou SP, Michelucci A. Revealing and Harnessing Tumour-Associated Microglia/Macrophage Heterogeneity in Glioblastoma. Int J Mol Sci. 2020; 21(3): 689.
46- Tao JC, Yu D, Shao W, Zhou DR, Wang Y, Hou SQ ve ark. Interactions between microglia and glioma in tumor microenvironment. Front Oncol. 2023; 13: 1236268.
47- Zhang X, Zhao L, Zhang H, Zhang Y, Ju H, Wang X ve ark. The immunosuppressive microenvironment and immunotherapy in human glioblastoma. Front Immunol. 2022; 13: 1003651.
48- Torrisi F, Alberghina C, D'Aprile S, Pavone AM, Longhitano L, Giallongo S ve ark. The Hallmarks of Glioblastoma: Heterogeneity, Intercellular Crosstalk and Molecular Signature of Invasiveness and Progression. Biomedicines. 2022; 10(4): 806.
49- Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK ve ark. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. Cell. 2013; 153(1): 139-152.
50- Xia S, Lal B, Tung B, Wang S, Goodwin CR, Laterra J. Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. Neuro Oncol. 2016; 18(4): 507-517.
51- Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, Orend G. Advances in tenascin-C biology. Cell Mol Life Sci. 2011; 68(19): 3175-3199.
52- Cortes Ballen AI, Amosu M, Ravinder S, Chan J, Derin E, Slika H ve ark. Metabolic Reprogramming in Glioblastoma Multiforme: A Review of Pathways and Therapeutic Targets. Cells. 2024; 13(18): 1574.
53- Njonkou R, Jackson CM, Woodworth GF, Hersh DS. Pediatric glioblastoma: mechanisms of immune evasion and potential therapeutic opportunities. Cancer Immunol Immunother. 2022; 71(8): 1813-1822.
54- Huang S, Song Z, Zhang T, He X, Huang K, Zhang Q, Shen J, Pan J. Identification of Immune Cell Infiltration and Immune-Related Genes in the Tumor Microenvironment of Glioblastomas. Front Immunol. 2020; 11: 585034.
55- Saavedra-López E, Roig-Martínez M, Cribaro GP, Casanova PV, Gallego JM, Pérez-Vallés A ve ark. Phagocytic glioblastoma-associated microglia and

macrophages populate invading pseudopalisades. Brain Commun. 2019; 2(1): fcz043.

56- Șovrea AS, Boșca B, Melincovici CS, Constantin AM, Crintea A, Mărginean M ve ark. Multiple Faces of the Glioblastoma Microenvironment. Int J Mol Sci. 2022; 23(2): 595.

57- Rolón-Reyes K, Kucheryavykh YV, Cubano LA, Inyushin M, Skatchkov SN, Eaton MJ ve ark. Microglia Activate Migration of Glioma Cells through a Pyk2 Intracellular Pathway. PLoS One. 2015; 10(6): e0131059.

58- Amin T, Hossain A, Jerin N, Mahmud I, Rahman MA, Rafiqul Islam SM ve ark. Immunoediting Dynamics in Glioblastoma: Implications for Immunotherapy Approaches. Cancer Control. 2024; 31: 10732748241290067.

59- Sarantopoulos A, Ene C, Aquilanti E. Therapeutic approaches to modulate the immune microenvironment in gliomas. NPJ Precis Oncol. 2024; 8(1): 241.

60- Yeung YT, Bryce NS, Adams S, Braidy N, Konayagi M, McDonald KL ve ark. p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells. J Neurooncol. 2012; 109(1): 35-44.

61- Lin H, Liu C, Hu A, Zhang D, Yang H, Mao Y. Understanding the immunosuppressive microenvironment of glioma: mechanistic insights and clinical perspectives. J Hematol Oncol. 2024; 17(1): 31.

62- Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Andus T, Geiger T ve ark. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. FEBS Lett. 1989; 242(2): 237-239.

63- Hirano T. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. Int Immunol. 2021; 33(3): 127-148.

64- Cambier S, Gouwy M, Proost P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. Cell Mol Immunol. 2023; 20(3): 217-251.

65- Guo Q, Jin Y, Chen X, Ye X, Shen X, Lin M ve ark. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. Signal Transduct Target Ther. 2024; 9(1): 53.

66- Yoshida J, Mizuno M, Yagi K, Hayashi Y, Hayakawa T. Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon-beta gene transfer against intracerebral glioma in mouse. Gene Ther. 1999; 6(9): 1626-33.

67- Chiocca EA, Smith KM, McKinney B, Palmer CA, Rosenfeld S, Lillehei K ve ark. hIFN-beta gene therapy for glioma. Mol Ther. 2008; 16(3): 618-26.

68- GuhaSarkar D, Neiswender J, Su Q, Gao G, Sena-Esteves M. Intracranial AAV-IFN-β gene therapy eliminates invasive xenograft glioblastoma and improves survival in orthotopic syngeneic murine model. Mol Oncol. 2017; 11(2): 180-193.

69- Badawy AA. Tryptophan Metabolism: A Versatile Area Providing Multiple Targets for Pharmacological Intervention. Egypt J Basic Clin Pharmacol. 2019; 9: 10.

70- Moffett JR, Arun P, Puthillathu N, Vengilote R, Ives JA, Badawy AA ve ark. Quinolinate as a Marker for Kynurenine Metabolite Formation and the Unresolved Question of NAD^+ Synthesis During Inflammation and Infection. Front Immunol. 2020; 11: 31.

71- Fernstrom JD. Effects and side effects associated with the non-nutritional use of tryptophan by humans. J Nutr. 2012; 142(12): 2236S-2244S.

72- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., & Cardinali, D. P. Melatonin. Int J Biochem Cell Biol. 2006; 38(3): 313–316.

73- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC ve ark. Melatonin-a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. Ann N Y Acad Sci. 1994; 738: 419-420.

74- Badawy AA. Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. Biosci Rep. 2015; 35(5): e00261.

75- Young SN. How to increase serotonin in the human brain without drugs. J Psychiatry Neurosci. 2007; 32(6): 394-9.

76- Jenkins TA, Nguyen JC, Polglaze KE, Bertrand PP. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. Nutrients. 2016; 8(1): 56.

77- Hardeland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. Nutr Metab (Lond). 2005; 2: 22.
78- Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. Physiology (Bethesda). 2014; 29(5): 325-333.
79- Zhai L, Spranger S, Binder DC, Gritsina G, Lauing KL, Giles FJ ve ark. Molecular Pathways: Targeting IDO1 and Other Tryptophan Dioxygenases for Cancer Immunotherapy. Clin Cancer Res. 2015; 21(24): 5427-33.
80- Badawy AA. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. Int J Tryptophan Res. 2017; 10: 1178646917691938.
81- Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. Nat Rev Drug Discov. 2013; 12(1): 64-82.
82- Lim CK, Bilgin A, Lovejoy DB, Tan V, Bustamante S, Taylor BV ve ark. Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. Sci Rep. 2017; 7(1): 41473.
83- Guillemin GJ, Brew BJ. Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. Redox Rep. 2022; 7(4): 199–206.
84- Orabona C, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulatory function: tryptophan starvation and beyond. Methods Mol Biol. 2011; 677: 269-80.
85- Huang YS, Ogbechi J, Clanchy FI, Williams RO, Stone TW. IDO and Kynurenine Metabolites in Peripheral and CNS Disorders. Front Immunol. 2020; 11: 388.
86- Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. Trends Immunol. 2013; 34(3): 137-43.
87- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D ve ark. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. Immunity. 2005; 22(5): 633-42.
88- Seo SK, Kwon B. Immune regulation through tryptophan metabolism. Exp Mol Med. 2023; 55(7): 1371-1379.
89- Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. Nat Rev Immunol. 2007; 7(10): 817-23.

90- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R ve ark. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nat Immunol. 2003; 4(12): 1206-12.
91- Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. J Reprod Immunol. 2004; 61(2): 67-77.
92- Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. J Exp Med. 2002; 196(4): 459-68.
93- Rad Pour S, Morikawa H, Kiani NA, Yang M, Azimi A, Shafi G ve ark. Exhaustion of CD4+ T-cells mediated by the Kynurenine Pathway in Melanoma. Sci Rep. 2019; 9(1): 12150.
94- - Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT ve ark. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. Sci Transl Med. 2013; 5(200): 200ra116.
95- Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. Nat Rev Immunol. 2007; 7(10): 817-23.
96- Wang Y, Liu H, McKenzie G, Witting PK, Stasch JP, Hahn M ve ark. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. Nat Med. 2010; 16(3): 279-285.
97- Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. Nat Rev Drug Discov. 2019; 18(5): 379-401.
98- Holmgaard RB, Zamarin D, Li Y, Gasmi B, Munn DH, Allison JP ve ark. Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. Cell Rep. 2015; 13(2): 412-24.
99- Zhong C, Peng L, Tao B, Yin S, Lyu L, Ding H ve ark. TDO2 and tryptophan metabolites promote kynurenine/AhR signals to facilitate glioma progression and immunosuppression. Am J Cancer Res. 2022; 12(6): 2558-2575.

100- Mellor A. Indoleamine 2,3-dioxygenase and its role in regulating T-cell immunity. Mellor A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 338(1): 20-24.

101- Du L, Xing Z, Tao B, Li T, Yang D, Li W ve ark. Both IDO1 and TDO contribute to the malignancy of gliomas via the Kyn-AhR-AQP4 signaling pathway. Signal Transduct Target Ther. 2020; 5(1): 10.

102- Mascolo E, Vernì F. Vitamin B6 and Diabetes: Relationship and Molecular Mechanisms. Int J Mol Sci. 2020; 21(10): 3669.

103- Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Sautès-Fridman C, Tartour E, Kennedy EP ve ark. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. Oncoimmunology. 2014; 3(10): e957994.

104- Gouasmi R, Ferraro-Peyret C, Nancey S, Coste I, Renno T, Chaveroux C ve ark. The Kynurenine Pathway and Cancer: Why Keep It Simple When You Can Make It Complicated. Cancers (Basel). 2022; 14(11): 2793

105- Opitz CA, Litzenburger UM, Opitz U, Sahm F, Ochs K, Lutz C, Wick W, Platten M. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. PLoS One. 2011; 6(5): e19823.

106- Abd El-Fattah EE. IDO/kynurenine pathway in cancer: possible therapeutic approaches. J Transl Med. 2022; 20(1): 347.

107- Barachini S, Morelli M, Santonocito OS, Mazzanti CM. Preclinical glioma models in neuro-oncology: enhancing translational research. Curr Opin Oncol. 2023; 35(6): 536-542.

108- Ladomersky E, Zhai L, Lenzen A, Lauing KL, Qian J, Scholtens DM ve ark. IDO1 Inhibition Synergizes with Radiation and PD-1 Blockade to Durably Increase Survival Against Advanced Glioblastoma. Clin Cancer Res. 2018; 24(11): 2559-2573.

109- Hosseinalizadeh H, Mahmoodpour M, Samadani AA, Roudkenar MH. The immunosuppressive role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in glioblastoma: mechanism of action and immunotherapeutic strategies. Med Oncol. 2022; 39(9): 130.

110- Ghouzlani A, Kandoussi S, Tall M, Reddy KP, Rafii S, Badou A. Immune Checkpoint Inhibitors in Human Glioma Microenvironment. Front Immunol. 2021; 12: 679425.

111- León-Letelier RA, Dou R, Vykoukal J, Sater AHA, Ostrin E, Hanash S, Fahrmann JF. The kynurenine pathway presents multi-faceted metabolic vulnerabilities in cancer. Front Oncol. 2023; 13: 1256769.

112- Deneka-Hannemann S, Jarosz B, Zgrajka W, Stoma F, Trojanowski T, Turski WA, Rzeski W. Kynurenic acid inhibits proliferation and migration of human glioblastoma T98G cells. Pharmacol Rep. 2014; 66(1): 130-6.

113- Pérez de la Cruz G, Pérez de la Cruz V, Navarro Cossio J, Vázquez Cervantes GI, Salazar A, Orozco Morales M ve ark. Kynureninase Promotes Immunosuppression and Predicts Survival in Glioma Patients: In Silico Data Analyses of the Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) and of the Cancer Genome Atlas (TCGA). Pharmaceuticals (Basel). 2023; 16(3): 369.

114- Panitz V, Končarević S, Sadik A, Friedel D, Bausbacher T, Trump S ve ark. Tryptophan metabolism is inversely regulated in the tumor and blood of patients with glioblastoma. Theranostics. 2021; 11(19): 9217-9233.

115- Basson C, Serem JC, Hlophe YN, Bipath P. The tryptophan-kynurenine pathway in immunomodulation and cancer metastasis. Cancer Med. 2023; 12(18): 18691-18701.

116- Cecchi M, Anceschi C, Silvano A, Coniglio ML, Chinnici A, Magnelli L ve ark. Unveiling the Role of Tryptophan 2,3-Dioxygenase in the Angiogenic Process. Pharmaceuticals (Basel). 2024; 17(5): 558.

117- Xu Y, Zhang H, Sun Q, Geng R, Yuan F, Liu B ve ark. Immunomodulatory Effects of Tryptophan Metabolism in the Glioma Tumor Microenvironment. Front Immunol. 2021; 12: 730289.

118- Jarmuzek P, Defort P, Kot M, Wawrzyniak-Gramacka E, Morawin B, Zembron-Lacny A. Cytokine Profile in Development of Glioblastoma in Relation to Healthy Individuals. Int J Mol Sci. 2023; 24(22): 16206.

119- Jones C, Karajannis MA, Jones DTW, Kieran MW, Monje M, Baker SJ ve ark. Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. Neuro Oncol. 2017; 19(2): 153-161.

120- Kore RA, Abraham EC. Inflammatory cytokines, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, upregulated in glioblastoma multiforme, raise the levels of CRYAB in exosomes secreted by U373 glioma cells. Biochem Biophys Res Commun. 2014; 453(3): 326-31.

121- Mittal SK, Cho KJ, Ishido S, Roche PA. Interleukin 10 (IL-10)-mediated Immunosuppression: MARCH-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. J Biol Chem. 2015; 290(45): 27158-27167.

122- Zhao J, Chen AX, Gartrell RD, Silverman AM, Aparicio L, Chu T ve ark. Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. Nat Med. 2019; 25(3): 462-469.

123- Hambardzumyan D, Bergers G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. Trends Cancer. 2015; 1(4): 252-265.

124- Xu Y, Zhang H, Sun Q, Geng R, Yuan F, Liu B ve ark. Immunomodulatory Effects of Tryptophan Metabolism in the Glioma Tumor Microenvironment. Front Immunol. 2021; 12: 730289.

125- Peyraud F, Guegan JP, Bodet D, Cousin S, Bessede A, Italiano A. Targeting Tryptophan Catabolism in Cancer Immunotherapy Era: Challenges and Perspectives. Front Immunol. 2022; 13: 807271.

126- Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S ve ark. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature. 2011; 478(7368): 197-203.

127- Han Q, Cai T, Tagle DA, Li J. Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. Cell Mol Life Sci. 2010;67(3):353-68.

128- Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. J Clin Invest. 2007; 117(5): 1147-1154.

129- Wainwright DA, Balyasnikova IV, Chang AL, Ahmed AU, Moon KS, Auffinger B ve ark. IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival. Clin Cancer Res. 2012; 18(22): 6110-21.

130- Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M ve ark. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma

invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. Oncogene. 2008; 27(7): 918-930.

131- Wang G, Zhong K, Wang Z, Zhang Z, Tang X, Tong A ve ark. Tumor-associated microglia and macrophages in glioblastoma: From basic insights to therapeutic opportunities. Front Immunol. 2022; 13: 964898.

132- Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, Kaminska B. Characteristics of the alternative phenotype of microglia/ macrophages and its modulation in experimental gliomas. PLoS One. 2011; 6(8): e23902.

133- Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. Nat Neurosci. 2016; 19(1): 20-27.

134- Zhai L, Ladomersky E, Lenzen A, Nguyen B, Patel R, Lauing KL, Wu M, Wainwright DA. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. Cell Mol Immunol. 2018; 15(5): 447-457.

135- Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. Nat Neurosci. 2016; 19(1): 20-27.

136- Takenaka MC, Gabriely G, Rothhammer V, Mascanfroni ID, Wheeler MA, Chao CC ve ark. Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. Nat Neurosci. 2019 May;22(5):729-740. doi: 10.1038/s41593-019-0370-y. Epub 2019 Apr 8. Erratum in: Nat Neurosci. 2019; 22(9): 1533.

137- Geribaldi-Doldán N, Fernández-Ponce C, Quiroz RN, Sánchez-Gomar I, Escorcia LG, Velásquez EP ve ark. The Role of Microglia in Glioblastoma. Front Oncol. 2021; 10: 603495.

138- Prendergast GC, Malachowski WP, DuHadaway JB, Muller AJ. Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. Cancer Res. 2017; 77(24): 6795-6811.

139- Long GV, Dummer R, Hamid O, Gajewski TF, Caglevic C, Dalle S ve ark. Epacadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO-301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study. Lancet Oncol. 2019; 20(8): 1083-1097.

140- Zhai L, Lauing KL, Chang AL, Dey M, Qian J, Cheng Y ve ark. The role of IDO in brain tumor immunotherapy. J Neurooncol. 2015; 123(3): 395-403.

141- Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. Clin Cancer Res. 2015; 21(4): 687-92.

142- Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. Trends Immunol. 2016; 37(3): 193-207.

143- Heng B, Bilgin AA, Lovejoy DB, Tan VX, Milioli HH, Gluch L ve ark. Differential kynurenine pathway metabolism in highly metastatic aggressive breast cancer subtypes: beyond IDO1-induced immunosuppression. Breast Cancer Res. 2020; 22(1): 113.

144- Platten M, Wick W, Van den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. Cancer Res. 2012; 72(21): 5435-5440.

145- Liu M, Wang X, Wang L, Ma X, Gong Z, Zhang S ve ark. Targeting the IDO1 pathway in cancer: from bench to bedside. J Hematol Oncol. 2018; 11(1): 100.

146- Wainwright DA, Balyasnikova IV, Chang AL, Ahmed AU, Moon KS, Auffinger B ve ark. IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival. Clin Cancer Res. 2012; 18(22): 6110-6121.

147- Holmgaard RB, Zamarin D, Munn DH, Wolchok JD, Allison JP. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. J Exp Med. 2013; 210(7): 1389-402.

148- Tie Y, Tang F, Wei YQ, Wei XW. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. J Hematol Oncol. 2022; 15(1): 61.

149- Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. Nat Rev Clin Oncol. 2018; 15(7): 422-442.

150- D'Souza NM, Fang P, Logan J, Yang J, Jiang W, Li J. Combining Radiation Therapy with Immune Checkpoint Blockade for Central Nervous System Malignancies. Front Oncol. 2016; 6: 212.

151- Ladomersky E, Zhai L, Lenzen A, Lauing KL, Qian J, Scholtens DM ve ark. IDO1 Inhibition Synergizes with Radiation and PD-1 Blockade to Durably Increase Survival Against Advanced Glioblastoma. Clin Cancer Res. 2018; 24(11): 2559-2573.

152- Zhang X, Zhao L, Zhang H, Zhang Y, Ju H, Wang X ve ark. The immunosuppressive microenvironment and immunotherapy in human glioblastoma. Front Immunol. 2022; 13: 1003651.

153- Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, Colau D, Dolusic E, Frédérick R ve ark. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(7): 2497-502.

154- Opitz CA, Somarribas Patterson LF, Mohapatra SR, Dewi DL, Sadik A ve ark. The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer. Br J Cancer. 2020; 122(1): 30-44.

155- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ ve ark. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005; 352(10): 987-96.

156- Dolusić E, Larrieu P, Moineaux L, Stroobant V, Pilotte L, Colau D ve ark. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors. 3-(2-(pyridyl)ethenyl)indoles as potential anticancer immunomodulators. J Med Chem. 2011; 54(15): 5320-5334.

157- Komotar RJ, Otten ML, Moise G, Connolly ES Jr. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma-a critical review. Clin Med Oncol. 2008; 2: 421-2.

158- Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E ve ark. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. Lancet Oncol. 2017; 18(6): e315-e329.

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

160- Da Ros M, De Gregorio V, Iorio AL, Giunti L, Guidi M, de Martino M ve ark. Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. Int J Mol Sci. 2018; 19(10): 2879.

161- Yoshida M, Hayakawa I, Hayashi N, Agatsuma T, Oda Y, Tanzawa F ve ark. Synthesis and biological evaluation of benzothiazole derivatives as potent antitumor agents. Bioorg Med Chem Lett. 2005; 15(14): 3328-32.

162- Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. Genes Dis. 2016; 3(3): 198-210.

163- Günther W, Pawlak E, Damasceno R, Arnold H, Terzis AJ. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. Br J Cancer. 2003; 88(3): 463-469.

164- Lo Dico A, Salvatore D, Martelli C, Ronchi D, Diceglie C, Lucignani G ve ark. Intracellular Redox-Balance Involvement in Temozolomide Resistance-Related Molecular Mechanisms in Glioblastoma. Cells. 2019; 8(11): 1315.

165- Aasland D, Götzinger L, Hauck L, Berte N, Meyer J, Effenberger M ve ark. Temozolomide Induces Senescence and Repression of DNA Repair Pathways in Glioblastoma Cells via Activation of ATR-CHK1, p21, and NF-κB. Cancer Res. 2019; 79(1): 99-113.

166- Jiang C, Shen F, Du J, Fang X, Li X, Su J ve ark. Upregulation of CASC2 sensitized glioma to temozolomide cytotoxicity through autophagy inhibition by sponging miR-193a-5p and regulating mTOR expression. Biomed Pharmacother. 2018; 97: 844-850.

167- Zhu Z, Du S, Du Y, Ren J, Ying G, Yan Z. Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis. J Neurochem. 2018; 144(1): 93-104.

168- Zhao J, Chen AX, Gartrell RD, Silverman AM, Aparicio L, Chu T ve ark. Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. Nat Med. 2019; 25(3): 462-469.

169- McCoy MG, Nyanyo D, Hung CK, Goerger JP, R Zipfel W, Williams RM ve ark. Endothelial cells promote 3D invasion of GBM by IL-8-dependent induction of cancer stem cell properties. Sci Rep. 2019; 9(1): 9069.

170- Ochiai Y, Sumi K, Sano E, Yoshimura S, Yamamuro S, Ogino A ve ark. Antitumor effects of ribavirin in combination with TMZ and IFN-β in malignant glioma cells. Oncol Lett. 2020; 20(5): 178.

171- Zheng Y, Liu L, Wang Y, Xiao S, Mai R, Zhu Z ve ark. Glioblastoma stem cell (GSC)-derived PD-L1-containing exosomes activates AMPK/ULK1 pathway mediated autophagy to increase temozolomide-resistance in glioblastoma. Cell Biosci. 2021; 11(1): 63.

172- Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A ve ark. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. Neuro Oncol. 2015; 17(8): 1064-75.

173- Chen J, Song Y, Miao F, Chen G, Zhu Y, Wu N, Pang L, Chen Z, Chen X. PDL1-positive exosomes suppress antitumor immunity by inducing tumor-specific $CD8^{+}$T cell exhaustion during metastasis. Cancer Sci. 2021; 112(9): 3437-3454.

174- Feng Y, Wang J, Tan D, Cheng P, Wu A. Relationship between circulating inflammatory factors and glioma risk and prognosis: A meta-analysis. Cancer Med. 2019; 8(17): 7454–7468.

175- Jarmuzek P, Defort P, Kot M, Wawrzyniak-Gramacka E, Morawin B, Zembron-Lacny A. Cytokine Profile in Development of Glioblastoma in Relation to Healthy Individuals. Int J Mol Sci. 2023; 24(2): 1234.

176- Yang SD, Chen MZ, Yang DF, Hu SB, Zheng DD. IL-6 significantly correlated with the prognosis in low-grade glioma and the mediating effect of immune microenvironment. Medicine (Baltimore). 2024; 103(19): e38091.

177- Lamano JB, Lamano JB, Li YD, DiDomenico JD, Choy W, Veliceasa D ve ark. Glioblastoma-Derived IL6 Induces Immunosuppressive Peripheral Myeloid Cell PD-L1 and Promotes Tumor Growth. Clin Cancer Res. 2019; 25(12): 3643-3657.

178- Ott M, Kassab C, Marisetty A, Hashimoto Y, Wei J, Zamler D ve ark. Radiation with STAT3 Blockade Triggers Dendritic Cell-T cell Interactions in the Glioma Microenvironment and Therapeutic Efficacy. Clin Cancer Res. 2020; 26(18): 4983-4994.

179- Huseni MA, Wang L, Klementowicz JE, Yuen K, Breart B, Orr C ve ark. CD8+ T cell-intrinsic IL-6 signaling promotes resistance to anti-PD-L1 immunotherapy. Cell Rep Med. 2023: 4(1); 100878.

180- Hasan T, Caragher SP, Shireman JM, Park CH, Atashi F, Baisiwala S ve ark. Interleukin-8/CXCR2 signaling regulates therapy-induced plasticity and enhances tumorigenicity in glioblastoma. Cell Death Dis. 2019; 10: 292.

181- West AJ, Tsui V, Stylli SS, Nguyen HPT, Morokoff AP, Kaye AH ve ark. The role of interleukin-6-STAT3 signalling in glioblastoma. Oncol Lett. 2018; 16(4): 4095–4104.

182- Sharma I, Singh A, Siraj F, Saxena S. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. J Biomed Sci. 2018; 25(1): 62.

183- Zhang R, Roque DM, Reader J, Lin J. Combined inhibition of IL-6 and IL-8 pathways suppresses ovarian cancer cell viability and migration and tumor growth. Inter J Oncol. 2022; 60(5): 50.

184- Garrison JI, Berens ME, Shapiro JR, Treasurywala S, Floyd-Smith G. Interferon-beta inhibits proliferation and progression through S phase of the cell cycle in five glioma cell lines. J Neurooncol. 1996; 30(3): 213–223.

185- Lohmann B, Le Rhun E, Silginer M, Epskamp M, Weller M. Interferon-β sensitizes human glioblastoma cells to the cyclin-dependent kinase inhibitor, TG02. Oncol Lett. 2020; 19(4): 2649–2656.

186- Lang R, Li H, Luo X, Liu C, Zhang Y, Guo S ve ark. Expression and mechanisms of interferon-stimulated genes in viral infection of the central nervous system (CNS) and neurological diseases. Front Immunol. 2022; 13: 1008072.

187- Nduom EK, Wei J, Yaghi NK, Huang N, Kong LY, Gabrusiewicz K ve ark. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. Neuro Oncol. 2016; 18(2): 195–205.

188- Chen RQ, Liu F, Qiu XY, Chen XQ. The Prognostic and Therapeutic Value of PD-L1 in Glioma. Front Pharmacol. 2018; 9: 01503

8. EKLER

EK 1: ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Doç.Dr. Gizem Çalıbaş Koçal
Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**goaek@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	8355-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Glioblastomada Triptofan Yolağının İnflamatuar Tümör Mikroçevresi ve Agresifliğe Etkisi**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr. Gizem Çalıbaş Koçal Onkoloji Enstitüsü	
	TEZ SAHİBİNİ ADI SOYADI	Dahil Can BUDAK	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2023/33-19**	**Tarih:18.10.2023**
	Doç.Dr. Gizem Çalıbaş Koçal'ın sorumlusu olduğu **"Glioblastomada Triptofan Yolağının İnflamatuar Tümör Mikroçevresi ve Agresifliğe Etkisi"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	

EK2: KATKI

TC

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

(Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi)

Konu: Yürürlüğe Giren Proje Öneriniz

Tarih
25.03.2024

Sayın : Doç.Dr. GİZEM ÇALIBAŞI KOÇAL

Aşağıda bilgileri özetlenen proje onerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır.

Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

Prof.Dr. ZEYNEP ARIKAN
Harcama Yetkilisi

Proje Başlığı: Glioblastomada Triptofan Yolağının İnflamatuar Tümör Mikroçevresi ve Agresifliğe Etkisi

Proje No: TYL-2024-3429

Proje Türü: Yüksek Lisans

Süresi: 12 ay

Başlama Tarihi: 25.03.2024

Onaylanan Bütçesi: 51.999,60 TL

Proje Yürütücüsü: Doç.Dr. GİZEM ÇALIBAŞI KOÇAL

Araştırmacı(lar): ÖĞRENCİ DAHİL CAN BUDAK

EK 3: ÖZGEÇMİŞ



DAHİL CAN BUDAK

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

09 Eylül 2022 - Şu Anda (2 yıl 8 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TRANSLASYONEL ONKOLOJİ (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.91 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

DAHİL CAN BUDAK, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı, Destek Sona Erdi, 2018 - 2.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0