

**YENİ SENTEZLENEN BENZAMİT TÜREVİ MOLEKÜLÜN TOKSİK
ETKİLERİNİN HAYVAN MODELİNDE ARAŞTIRILMASI VE MULTİPL
MİYELOMLU FARELERE UYGULANMASI**

**INVESTIGATION OF THE TOXIC EFFECTS OF A NEW SYNTHESIZED
BENZAMIDE DERIVATIVE MOLECULE IN ANIMAL MODEL AND ITS
APPLICATION TO MICE WITH MULTIPLE MYELOMA**

EYLÜL TURASAN

Prof. Dr. GÜLDENİZ SELMANOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

YENİ SENTEZLENEN BENZAMİT TÜREVİ MOLEKÜLÜN TOKSİK ETKİLERİNİN HAYVAN MODELİNDE ARAŞTIRILMASI VE MULTİPL MİYELOMLU FARELERE UYGULANMASI

EYLÜL TURASAN

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Eş Danışman: Prof.Dr. Meral BEKSAÇ

MART 2021, 108 sayfa

Multipl Miyelom (MM) hastalığı yeni terapötik ajanların geliştirilmesiyle hastalarının sağkalımında iyileşmelere rağmen, kür şansı çok az olan bir hastalık olarak bilinmektedir ve bu nedenle hastalığı kontrol altına alabilecek yeni ilaçlar aranmaya devam edilmektedir. Son yıllarda, farklı anti miyelom mekanizmalara sahip; monoklonal antikorlar, proteazom inhibitörleri, immün modülatör ilaçlar ve histon deasetilaz inhibitörleri gibi yeni ajanlar geliştirilmekle birlikte bu ilaçların onay süreçleri birkaç yıl araştırma ve büyük yatırım gerektirmektedir. Yeni potansiyel ilaç arayışları neticesinde, Ankara Üniversitesi Farmasötik Kimya bölümünde sentezlenen benzamit yapısındaki özgün bir molekül olan N-(2- Hidroksi-4 Nitrofenil)-4 Etilbenzamit (XT5) 'in daha önce grubumuz tarafından anti-miyelom ve ilaç direncini geri çevirebildiği yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında hem sağlıklı sıçanlarda ve miyelom modeli oluşturulan farelerde XT5'in *in vivo* toksisitesini belirlemek araştırılmıştır. Bu amaçla, önce sıçanlara 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında XT5 uygulaması

yapılmıştır. Olası toksik etkileri belirleyebilmek üzere, sıçan dokularında histopatolojik analizler yapılmış ve kanda yapılan testlerle ALT (Alanin Aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), total protein, üre, albümin ve GGT (glutamil transferaz) düzeyleri olmak üzere biyokimyasal analizler, ek olarak kanda hematolojik analizler yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre bir hafta ve sekiz hafta süreyle her gün 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarda XT5 uygulaması sonucunda sıçanlarda histopatolojik hasarı gösteren herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Sıçanların kanında yapılan biyokimyasal ve hematolojik analizler sonucunda; XT5 uygulama grupları ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gösterilmiştir.

XT5 molekülünün sıçanlarda DNA hasarının belirlenebilmesi için, sıçan lenfositlerinde komet yöntemi uygulanmıştır. 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg düzeylerine kadar sıçanlarda genomik toksisite oluşturmadığı belirlenmiştir. Multipl miyelom oluşturulan NSG farelerde, XT5 etkinliğinin belirlenebilmesi amacıyla farelerde tümör oluşumunu takiben XT5 uygulamaları başlatılmıştır. Sıçanlarda aralıklı olarak biyoluminesans görüntüleme yapılarak tümör büyüklükleri takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre XT5 molekülünün in vivo ve histopatolojik düzeyde ciddi bir toksisite oluşturmadığı gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgularla XT5 molekülünün fare miyelom modelinde farklı uygulamalarının önü açılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Multipl Miyelom, Ksenograft Model, XT5, Toksisite, İlaç Etkinliği

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE TOXIC EFFECTS OF A NEW SYNTHESIZED BENZAMIDE DERIVATIVE MOLECULE IN ANIMAL MODEL AND ITS APPLICATION TO MICE WITH MULTIPLE MYELOMA

EYLÜL TURASAN

Doctor of Philosophy, Department of BIOLOGY

Supervisor: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Co- Supervisor: Prof. Dr. Meral BEKSAÇ

March 2021, 108 pages

Multiple Myeloma (MM) disease continues to be an incurable disease despite improvements in the survival of its patients with the development of new therapeutic agents, and so the search for new drugs that can control the disease continues. In recent years, it has different action mechanisms against MM; New agents such as monoclonal antibodies, proteasome inhibitors, immune modulatory drugs and histone deacetylase inhibitors are being developed, but the approval process of these drugs requires several years of research and large investment. Therefore, as a result of the ongoing search for new potential drugs, results were obtained that N- (2-Hydroxy-4 Nitrophenyl) -4 Ethylbenzamide (XT5), a unique molecule in the structure of benzamide synthesized in the Department of Pharmaceutical Chemistry of Ankara University, can reverse anti-myeloma and drug resistance. has been.

In this thesis study, an animal myeloma model was created and studies were conducted to determine the effectiveness and toxicity of the molecule in

question, XT5, with an in vivo study. For this purpose, 5 mg / kg, 10 mg / kg and 50 mg / kg doses of XT5 were administered to rats. In order to determine possible toxic effects, histopathological analyzes were made in rat tissues and ALT, AST, Total protein, Urea, Albumin and GGT levels were measured with blood tests, and hematological analyzes were performed in the blood. According to the results of this analysis, no evidence of histopathological damage was found in rats after administration of 5 mg/kg, 10 mg/kg and 50 mg/kg doses of XT5 for one week and eight weeks. As a result of the biochemical and hematological analyzes performed on the blood of rats; It has been shown that there is no significant difference between the XT5 administration groups and the control groups.

In order to determine the possible DNA damage caused by the XT5 molecule in rats, the comet method was applied in the blood of rats. According to the results, it was determined that this molecule did not cause genomic toxicity in rats up to 5 mg / kg, 10mg / kg and 50mg / kg levels. In order to determine XT5 activity in NSG mice with multiple myeloma, XT5 applications were performed following tumor formation in mice. Dexamethasone and bortezomib, which are currently used for the treatment of multiple myeloma, were used as the control group. Tumor sizes were monitored by performing bioluminescence imaging intermittently in rats. According to the results, it has been shown that the XT5 molecule does not cause serious toxicity at the dose at which it exerts anti-myeloma effect in vivo. With the support of our findings, different applications of the XT5 molecule in the mouse myeloma model have been opened.

Keywords: Multiple Myeloma, Xenograft Model, XT5, Toxicity, Drug Efficacy

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.2. Multipl Miyelom	4
2.2.1. Etiyoloji	4
2.2.2. Tedavisi	7
2.3. MM tedavisinde kullanılan ilaçlar	8
2.3.1. Proteazom inhibitörleri.....	9
2.3.1.1. Bortezomib.....	9
2.3.1.2. Karfilzomib	10
2.3.1.3. İxazomib	10
2.3.2. İmmünomodülatörler (IMiD'ler)	10
2.3.2.1. Talidomid	11
2.3.2.2. Lenalidomid	11
2.3.2.2. Pomalidomid	11
2.3.3. Monoklonal antikorlar	12
2.3.3.1. Daratumumab	12
2.3.3.2. Elotuzumab	12
2.3.2.3. Isatuximab	12
2.3.4. Diğer İlaçlar	12
2.3.4.1. Deksametazon	13
2.3.5. Histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri	13
2.4. MM için kombine terapötik rejimler.....	14
2.5. Yeni ilaçların tasarımı ve geliştirilmesi	15

2.6. Benzoksazol ve Benzamid Türevleri	16
2.6.1. N-(2-hidroksi-4 nitrofenil)-4 etil benzamit (XT5).....	17
2.7. Deneysel Hayvan Modelleri	20
2.7.1. NSG (NOD/SCID IL-2R γ [null]) fareler.....	22
2.7.2. Fare Miyelom modelleri	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1 GEREÇ	29
3.1.1. Kimyasal maddeler	29
3.1.2. Deney Hayvanlarının Temini	29
3.1.3. Laboratuvar Koşulları	30
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Sıçan gruplarında XT5 uygulamaları	30
3.2.1.1. Sıçanların gruplandırılması ve XT5 uygulanması	30
3.2.1.2. Biyokimyasal analizler.....	31
3.2.1.3. Hematolojik analizler.....	32
3.2.1.4. Histopatolojik analizler	32
3.2.1.5. Komet testi.....	32
3.2.2. MM Model oluşturma	34
3.2.2.1. Hücre kültürü	34
3.2.2.2. NSG farede MM model oluşturma	34
3.2.2.3. Biyoluminesans görüntüleme	35
3.2.2.4. MM Model ilaç uygulama grupları	35
3.2.2.5. Histopatolojik incelemeler	36
3.2.3. İstatistiksel analizler.....	36
4.SONUÇLAR.....	38
4.1 Sıçanlarda Toksikite Testleri Sonuçları.....	38
4.1.1. Vücut Ağırlıkları Ölçümü.....	38
4.1.1. Biyokimyasal ve Hematolojik analiz sonuçları	39
4.1.2. Histopatolojik İncelemeler.....	45
4.1.3. Komet testi sonuçları	50
4.2. NSG farede MM model oluşumu ve XT5 etkinliği.....	54
4.2.1. Farede MM1.S hücre enjeksiyonunu takiben biyoluminesans görüntüleme ile tümör takibi	54
4.2.2. Farelerin vücut ağırlıkları	57

TARTIŞMA VE SONUÇ	62
7.KAYNAKLAR	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	MM'de kemik iliği yapısı	6
Şekil 4.1.	1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının ALT analiz sonuçları	41
Şekil 4.2.	1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının AST analiz sonuçları	41
Şekil 4.5.	1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının albümin analiz sonuçları	43
Şekil 4.6.	1 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının GGT analiz sonuçları	44
Şekil 4.7.	Kontrol grubu (a), 5mg/kg XT5 grubu (b) karaciğerin genel histolojik görünümü (X400), H&E	46
Şekil 4.8.	Kontrol grubu (a), 5 mg/kg XT5 grubu (b) böbreğin genel histolojik görünümü(X400), H&E.....	47
Şekil 4.9.	Kontrol grubu (a), 5 mg/kg XT5 grubu (b) kalp kasının genel histolojik görünümü(X400), H&E	47
Şekil 4.10.	Kontrol grubu (a), 10mg/kg XT5 grubu (b) pankreasın genel histolojik görünümü(X400), H&E	48
Şekil 4.11.	Kontrol grubu (a), XT5 grubu (b) beyin talamus bölgesinin genel histolojik görünümü(X200), H&E	48
Şekil 4.12.	Kontrol grubu ve 10 mg/kg XT5 grubu akciğerin genel histolojik görünümü (X100), H&E.....	49
Şekil 4.13.	8 hafta 10 mg/kg ve 50mg/kg XT5 grubuna ait böbreğin genel histolojik görünümü (x100), H&E.....	49
Şekil 4.14.	8 hafta 10 mg/kg ve 50mg/kg XT5 grubuna ait kalbin genel histolojik görünümü (x100), H&E.....	50
Şekil 4.15.	Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların periferik kan lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk yoğunluğu verileri	52
Şekil 4.16.	Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların periferik kan lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk momenti verileri	53

Şekil 4.26. Tüm gruplarda günlere göre tümör büyüklüklerinin karşılaştırılması	56
Şekil 4.27. Kontrol grubunda sol humerus-radius/ulna birleşiminde kemik iliğinde yer alan neoplazik hücrelerin genel görünümü(a), a'da kare ile büyütülen alan(b), mitotik aktivite gösteren neoplazik hücreler (ok başları) , HxE.	58
Şekil 4.28. Kontrol grubunda sağ femur kemik iliğinde yer alan neoplazik hücrelerin genel görünümü(a), a'da kare ile büyütülen alan(b), mitotik aktivite gösteren neoplazik hücreler (ok başları), HxE.	58
Şekil 4.29. Kontrol grubunda sağ skapula, çevre kas dokuya invaze olmuş neoplazik hücreler (oklar), HxE.	59
Şekil 4.30. Kontrol grubunda servikal vertebra, kemik iliğinde yer alan neoplazik hücrelerin genel görünümü(a), a'da kare ile büyütülen alan(b), neoplazik hücreler (ok), kemikte osteolitik değişiklik (ok başı), HxE.	59
Şekil 4.31. Kontrol grubunda böbrek, tubülüs ve glomeruluslar arasında neoplazik hücreler (ok) (a), Böbrek çevresi yağ dokuda damar çevresindeki neoplazik hücre grubu(b) (ok başı), HxE.	60
Şekil 4.32. Kontrol grubunda pankreas asinuslar arasındaki neoplazik hücrelerdeki mitoz (ok başları), HxE.	60
Şekil 4.33. Mide lamina propriyada bezler arasındaki neoplazik hücrelerin genel görünümü(a), a'da kare ile büyütülen alan (b), HxE.	61
Şekil 4.34. Karaciğer sinuzoidlerde neoplazik hücrelerin görünümü (oklar), HxE.	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.	8 haftalık uygulama süresi boyunca yağ kontrol ve XT5 uygulama gruplarının başlangıç ve bitiş ağırlıkları.....	38
Çizelge 4.2.	1 haftalık süre sonunda sıçanların biyokimyasal test sonuçları.....	40
Çizelge 4.3.	8 haftalık süre sonunda sıçanların biyokimyasal test sonuçları.....	40
Çizelge 4.3	1 haftalık süre sonunda sıçanların biyokimyasal test sonuçları.....	44
Çizelge 4.4	8 haftalık süre sonunda sıçanların biyokimyasal test sonuçları.....	45
Şekil 4.19.	Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların periferel kan lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu verileri	51

1. GİRİŞ

Multipl miyelom (MM), malign plazma hücrelerinin kemik iliği (Kİ)'nde çoğalması ile karakterize neoplastik bir plazma hücre hastalığıdır. Uzun yıllar en ölümcül hematolojik kanserler arasında ikinci sırada yer alması nedeniyle, üzerinde en çok araştırma yapılan hastalıklardan biridir. Kök hücre naklini takiben talidomib ve bortezomib adlı yeni moleküller tedavide önemli ilerlemelere yol açmış, takiben karfilzomib ve pomadilomid gibi ikinci kuşak yeni terapötikler kullanıma girmiştir. Tüm bu gelişmelere rağmen MM'de henüz tam şifa sağlanamamaktadır [1]. MM'de güncel sorun, ilk tanı aşamasında %80 ilaçlara duyarlı olan hastalığın her nükste giderek daha dirençli hale gelmesidir [2]. Özellikle günümüzde yeni geliştirilecek kanser ilaçlarının, etkin, hedefe özgü, mevcut ilaçlardan farklı etki mekanizmasına sahip ve daha az yan etkiye sahip olması, araştırmaların odağını oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında yeni geliştirilen özgün bir benzamid türevi olan N-(2-hidroksi-4 nitrofenil)-4 etil benzamit (XT5) molekülünün olası toksik etkileri ve etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda XT5'in *in vitro* anti-MM etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [2]. İlaç tasarımı ve geliştirme alanında yürütülen docking çalışmaları ile [3] yüzlerce molekül arasından özellikle MM hücrelerinde bulunan bir reseptör olan PAR1'e bağlanma potansiyeli olan moleküller seçilmiştir. Bu moleküller arasından, *in vitro* MM hücre hatlarında en yüksek sitotoksositeye sahip olarak öne çıkan molekül N-(2-hidroksi-4 nitrofenil)-4 etil benzamit (XT5) molekülü olmuştur. DNA'ya bağlanabilme özelliğinde, benzamit türevi bileşik olması yönünden diğer moleküllerden ve piyasadaki MM tedavisinde kullanılan proteozom inhibitörleri (IP) ile immünmodülatör ilaçlardan (IMiD) farklılık göstermektedir. Gerçekleştirilen ön çalışmalar sonucunda, insan MM hücre serilerinde yüksek düzeyde anti-MM etkinliğe sahip olmasının yanında, normal insan fibroblast hücrelerine karşı toksik etki göstermediği belirlenen XT5 molekülü, bu özellikleriyle MM tedavisi için güçlü bir potansiyel ilaç adayıdır.

Tez kapsamında XT5'in olası toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla sıçanlara farklı dozlarda XT5 uygulaması yapılmış ve süre sonunda sıçanların kan ve

dokularında incelemeler yapılmıştır. XT5'in etkinliğinin belirlenebilmesi amacıyla immünyetmezlikli bir fare türü olan NSG farelerde miyelom modeli oluşturulmuştur. Farede oluşan tümörün gelişimi ve XT5'in etkisi biyolüminesans görüntüleme yöntemi ile takip edilmiştir.

Çalışmadan elde edilen verilerin; yeni geliştirilen bu molekülün, özgün bir ilaç molekülü adayı olabilmesi için bundan sonra yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, birtakım anormal yapıdaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalması ve vücutta yayılması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. 2018'de dünyada 18,1 milyon civarı olduğu tahmin edilen yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanser ölümüyle dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Dünya sağlık örgütü (WHO), 2040 yılına kadar her yıl 29,5 milyon yeni kanser vakası ve 16,5 milyon kansere bağlı ölüm olacağını tahmin etmektedir [1,2].

Normal koşullarda vücut, hücrelerin çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlamak için birkaç entegre kontrol mekanizmasına sahiptir. Normal hücreler yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) uğrarlar. Vücudun normal kontrol mekanizması çalışmayı bıraktığında, kanser hücreleri olarak kabul edilen anormal hücreler bölünmeye ve/veya hasar görmüş yeni hücreler oluşturmaya devam eder. Kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesiyle oluşan ekstra hücreler, tümör adı verilen bir doku kütlesi oluşturabilmektedir. Kanserin, vücudun hemen hemen her dokusunda gelişebilmekle birlikte ve 100'den fazla kanser türü olduğu bilinmektedir [3].

100'den fazla kanser türü olmasına ve her kanser türünün kendine özgü özellikleri olmasına rağmen, tüm kanser türlerinin birkaç ortak özelliği vardır. Tüm kanser hücreleri, toplu olarak kötü huylu büyümeye yol açan birkaç özelliği paylaşır. Bu ayırt edici özellikler; büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme inhibe edici sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçınma (programlanmış hücre ölümü), sınırsız replikatif potansiyel, indüklenmiş anjiyogenez doku istilası ve metastaz olarak kabul edilmektedir. Kanserin en önemli özelliklerinden biri normal bir dokudan hasarlı, eski veya istenmeyen hücreleri temizlemek için aktive edilen düzenli ve organize bir hücre ölümü olan apoptozun gerçekleşmemesidir. Kanser hücreleri, apoptozdan kaçmak için farklı mekanizmalar edinmiştir, bu nedenle apoptotik yollarda görülen bütün farklılıklar, kanser tedavisi için bir hedef sağlamaktadırlar [4].

2.2. Multipl Miyelom

Kemik iliğinde bulunan malign monoklonal B-lenfositlerin çoğalması ile başlayan MM tedavi edilemeyen bir hematolojik kanser türüdür. MM, kemik iliğinde bulunan kötü huylu plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalması özelliğiyle bilinmekte ve hastalığın ileri aşamalarında kemik lezyonlarına neden olabilmektedir [5].

MM'nin 2019 yılında sadece Avrupa'da tahmin edilen 32.110 tanı insidansı ve 12.960 ölümlle birlikte ikinci en yaygın hematolojik malignite olduğu bilinmektedir . 1990 yılında ortalama % 30 olan MM'li hastaların sağkalım yüzdesi, 2010'da % 52,2'ye yükselerek son otuz yılda önemli ölçüde iyileşmiştir. 1990'lı yıllarda tedavi amacıyla uygulaması yaygınlaşan otolog kök hücre naklinin ve melfalan ilacının ortaya çıkmasının bu iyi gelişmeler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu gelişmelerin ardından immünomodülatör ilaçların (IMiD'ler) ve proteazom inhibitörlerinin (PI'ler) etkinliğinin öne çıkması da tedavi konusunda daha ileri gelişmelere yol açmıştır [6].

Günümüze dek ve halen günümüzde de , ikinci nesil yeni ajanlar, monoklonal antikorlar ve çoklu ilaç kombinasyonları sayesinde MM hastalarının hayatta kalma oranları artmaya devam etse de, daha az toksik yan etkileri olan ve etkili tedavilerle, hastalığın erken evrelerinde tedaviye ulaşmak için yeni ajanlarla ilgili araştırmalar devam etmektedir.

2.2.1. Etiyoloji

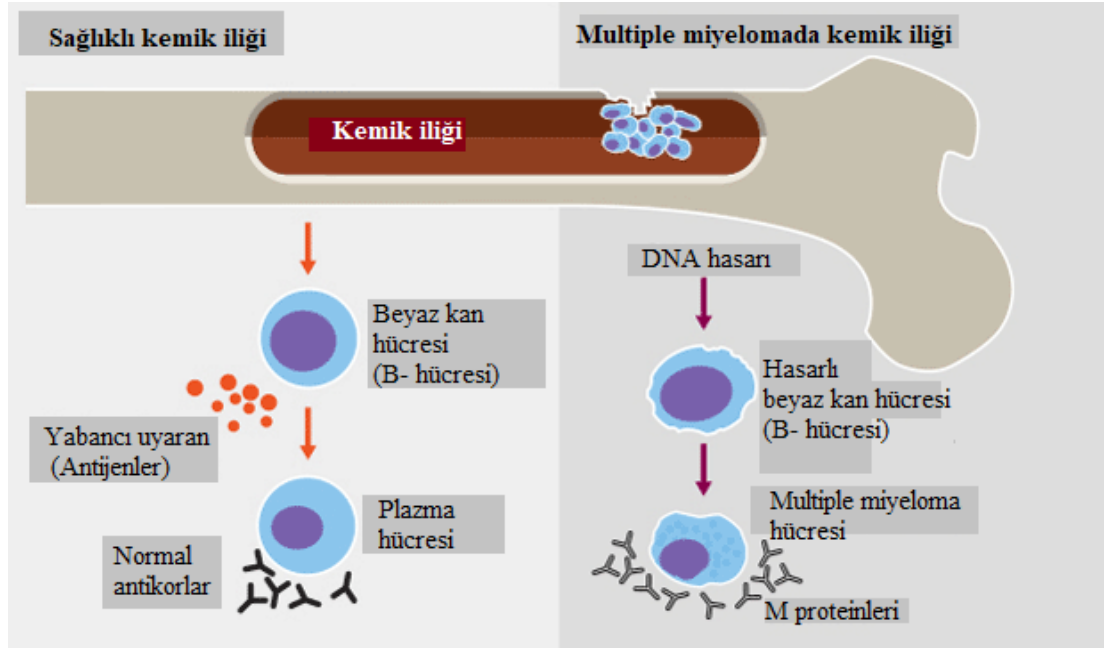
Lenf düğümlerinin germinal merkezlerinde B lenfositlerinin normal olgunlaşması sırasında, immünglobulinlerin değişken bölgesindeki bir dizi gen yeniden düzenlenir. Bu şekilde meydana gelen somatik hipermutasyon, B lenfositlerin malign tümör hücrelerine dönüşmesine yol açmaktadır. B Lenfositler uzun ömürlü ve monoklonal antikor üreten plazma hücrelerine dönüştükten sonra germinal merkezlerin dışında onkojenik olaylar meydana gelir ve ilerlemeye devam eder [7].

MM'ye yol açabilecek mutasyonlar genellikle kromozomaldır ve vakaların yaklaşık % 50'sinde esas olarak 9, 11 ve 15. kromozomları etkileyen hiperploidi olarak kendini göstermektedir [8].

Geri kalan % 50 ise translokasyonları, onkojenik yolları aktive edebilen genlerin veya tümörü baskılayan genlerin aktivitesini azaltabilen silmeleri içerir (örn. Kromozom 13 ve 17) [9].

Kemik iliğindeki plazma hücreleri, olgunlaşmış B hücreleri formunda bir tür beyaz kan hücreleridir. MM hastalarının plazma hücrelerinin morfolojisi, tipik plazma hücrelerine benzeyen küçük, olgun farklılaşmış hücrelerden çapı 20-30 µm olan büyük, olgunlaşmamış farklılaşmamış hücelere kadar değişebilir. Şekil 2.1 de multipl miyelomda kemik iliği yapısı gösterilmiştir. Normal plazma hücreleri, antikorlar üreterek vücuda giren patojenlerin tanınması ve uzaklaştırılmasında görev alır [10]. Plazma hücreleri miyelom hücrelerine dönüştüğünde, bu yeni oluşan malign miyelom hücreleri M proteini de denilen immüoglobülinleri üretir. Bu anormal antikor, M proteini, patojenlere saldıramaz. Böylelikle vücut tarafından ihtiyaç duyulmaz. M proteinleri ayrıca kemik iliğinde hızla çoğalarak kemik iliğinde bulunan diğer kan hücreleri ve antikorların da normal bir şekilde üretilmesini sekteye uğratmaktadır [11]. Hastalık ilerlediğinde miyelom hücreleri kemikteki katı bölgelerin yumuşamasına ve osteolitik lezyonların oluşmasına yol açmaktadır [12].

Kötü huylu plazma B hücrelerinin çoğalması, tümör nekroz faktörü (TNF), interlekin 6 (IL-6) ve benzeri gibi çeşitli faktörler tarafından tetiklenmektedir. Kemik ağrısı ve kırıkları, anemi, sık enfeksiyonlar ve böbrek yetmezliği MM'nin yaygın semptomlarıdır. Kötü huylu plazma hücrelerinin salgıladığı monoklonal antikorlar kanda ve idarda da yüksek seviyelerde bulunmaktadır [13].



Şekil 2.1. MM'de kemik iliği yapısı

MM, oldukça agresif ilerleyen ve günümüzde tedavi edilemez olarak kabul edilen hastalıktır. Son yıllarda MM tedavisinde başarılı gelişmeler olmasına rağmen, tedavi edilemez bir hastalık olmaya devam etmektedir. MM tedavisinin geçmişi 1960'lı yıllara dayanmaktadır. Hastalarda başlangıçta tedaviye cevap alındığı halde tekrar nüksettiği bilinmektedir [14].

Monoklonal antikorlar, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, kemoterapötik ajanlar, immünomodülatörler (talidomid, lenalidomid ve pomalidomid) ve proteozom inhibitörleri (bortezomib, carfilzomib gibi) gibi yeni geliştirilen ajanlar hastalık seyrinin iyileşmesi yönünde çok büyük katkılar sağlamışlardır [15]. Ancak, ortalama yaşam süresinin uzamasında otolog kök hücre tedavisi ile beraber bu yeni yaklaşımlara rağmen MM'de tam şifa halen sağlanamamaktadır. MM tedavisinin temel taşlarını oluşturan bu tedaviler, MM hastalarının kemik iliğinde yerleşen ısrarcı kalıntı hastalığını ortadan kaldırmakta her zaman başarılı olamamakta ve nüks büyük bir sorun olmaktadır. Daha da önemlisi dirençli hastalık en önemli ölüm nedeni olarak ortaya çıkmaktadır [16].

Türkiye'de, SGK ile Ankara Üniversitesi tarafından gerçekleştirilen ortak bir veri analizinde; 2011-2017 yılları arasında tedavi gören 11.000 miyelom

hastasının yaşam analizleri sonucunda 2011'de ortanca yaşam süresinin 3 yıl iken son yıllarda bunun ancak 7-8 yıla uzadığı, hastaların çoğunun çok masraflı tedavilere rağmen ülke ortanca yaşam süresine ulaşamadığı görülmüştür. Sonuç olarak, yeni terapötik gelişmeler sağkalım süresini arttırılmasına büyük bir katkı sağlanmış olsa da MM'de yanıt oranları halen %20'yi geçmemektedir [17].

2.2.2. Tedavisi

MM gelişiminde multifaktöriyel olarak birçok sistem bozukluğunun etkili olduğu bilinmektedir. MM'de hücreler arası sinyal iletiminin, programlı hücre ölümünün, hücre dışı matris elemanlarının, sitokin-kemokinlerin ve kemik iliği mikroçevresinin önemli rolü bulunmaktadır. Hastalığın biyolojisinde malign hücrelerin yerleşip çoğaldığı kemik iliği mikroçevresinden aldığı desteğin hem prognostik hem de ilaç direncindeki önemi giderek aydınlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ECM (ekstraselüler matris), sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi bileşenlerin, MM sürecindeki önemini vurgulamaktadır [18]. Bu hastalığın, kemik iliği çevresiyle olan bu ilişkisi, hem plazma hücrelerinin hayatta kalımını ve büyümesini arttırmakta hem de ilaç direncine yol açmaktadır Bu bağlantı aynı zamanda homing, anjiyogenez ve osteolizizi de şiddetlendirerek hastalığın ilerlemesinde kritik rol oynamaktadır. Kanser hücresinin metabolik yollarının çoğu sağlıklı hücreler için de geçerlidir. Bu durum ilaç toksisitesine yol açabildiği için, kanser hücre-mikroçevre hücre arası iletişimi engelleyebilecek antikanser etkili yeni ilaç adaylarının geliştirilmesi büyük önem kazanmaktadır.

Geçtiğimiz yıllarda, MM tedavisi için çeşitli kemoterapi dışı ilaçlar üretilmiş ve kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Günümüzde bu yeni ilaçlar; immünomodülatör ilaçlar, proteazom inhibitörleri ve monoklonal antikolarlar olarak 3 kategoriye ayrılabilir [18].

İmmünomodülatör ilaçlar, malignitelerle savaşmak için vücudun kendi bağışıklık sistemini kullanmaktadırlar. MM hastalarında kullanılan ve etkili olduğu bilinen ilk immünomodülatör ilaç talidomidir. Günümüzde MM

tedavisinde kullanılan diğer Lenalidomid ve pomalidomid, řu anda MM tedavisinde kullanılan diğer immünomodülatör ilaçlardır [19].

MM için mevcut ilaç tedavileri, esas olarak proteazom inhibitörlerine ve immünomodülatör ilaçlara (örneğin, lenalidomid, talidomid) odaklanmaktadır. En belirgin olanı, malign plazma hücrelerinde yaygın bir belirteç olan CD38'i eksprese eden hücreleri nötralize etme işlevi gören daratumumab'dır [20].

2.3. MM tedavisinde kullanılan ilaçlar

Günümüzde MM için çeşitli tedavi rejimleri kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinin seçilmesi ve uygulanması sürecinde, hastalığın hangi aşamada olduğu göz önüne alınarak tercih yapılmalıdır. Nüks veya refrakter miyelomda, proteozom inhibitörleri, immünmodulatör ilaçlar ve monoklonal antikolar (gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilcalar tek başlarına ya da çoğunlukla ikili ve/veya üçlü kombinasyonlar halinde uygulanmaktadırlar [21].

Hastalığın devam ettiği süreçte ilaç tedavisi hastanın durumuna göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bortezomib tedavisinin ardından hastalıkta tekrarlama durumunda olan hastalarda, farklı bir proteazom inhibitörüyle tedaviye yanıt alınabilmektedir. Lenalidomid ile tedavi sırasında relaps olan hastalarda da pomalidomid tedavisine yanıt alınabilmektedir. Aynı sınıfta bulunan ilaçların kullanımı, Faz 3 araştırmaları ile onaylanmış ve bu ilaçlar arasında çapraz direnç gelişiminin olmadığı kanıtlanmıştır [22].

Günümüzde multipl miyelom tedavisinde kullanılan proteazom inhibitörleri ve immünomodülatörler, tümör hücrelerinde birçok basamağı inhibe ederek etkilerini göstermektedirler. Bu basamaklar; büyüme ve çoğalmayı da sağlayan çok sayıda farklı yolağı içermektedir. Proteazom inhibitörleri, apoptotik yolları tetiklemeyle birlikte, nükleer faktör-kappa B (NF-κB) inhibisyonu da sağlayarak anjiyogenezi, sitokin sinyalizasyonuna ve hücre adezyonuna da engel olarak etkilerini göstermektedirler [23]. İmmünomodülatuar ajanlar da benzer şekilde apoptozu tetikler ve sitokin döngüsünü inhibe ederler. Buna ek olarak multipl miyelomda oluşan tümör hücrelerine karşı T hücre ve doğal katil hücre (NK) immün yanıtını arttırırlar [24].

2.3.1. Proteazom inhibitörleri

Proteazom, hücrede işlevini kaybetmiş ya da hasara uğramış proteinlerin parçalanmasını ve ortadan kaldırılmasını sağlayan yapılardır. Hücre içi proteinlerin; antijen sunumu, dna tamiri ve apoptoz gibi çeşitli işlevlerde görev almaları nedeniyle proteazomların aktivitesi bu mekanizmaları da etkilemektedir. Böylelikle bu durum tümör hücrelerinin de büyümesinde ve gelişmesinde de etkili olmaktadır. Proteazom inhibitörleri, proteazomun aktivitesini engelleyerek, apoptoza uğramayan anormal hücrelerde apoptozu tetiklemekte ve böylece antitümör aktivite göstermektedir. Bu mekanizma son yıllarda kanser tedavisinde önemli gelişmeler elde edilmesini sağlamıştır. Proteozom inhibitörlerinin buna ek olarak anjiyogenezi, hücreler arası etkileşimi ve hücre göçünü de inhibe ettiği bilinmektedir. Günümüzde klinik çalışmalarda birçok proteozom inhibitörünün multipl myelom ve solid tümörlerin tedavisi için kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Hücre içinde fazla miktarda üretilen proteinleri parçalayan proteazom kompleksi, MM hücrelerinde oldukça aktif görev almaktadır. Bu nedenle, proteazom inhibitörleri, proteinlerin hücreden atılmasını engelleyerek ve hücre içinde kalmasını sağlayarak MM hücre ölümünü indüklemektedir. Tümör hücreleri, büyük bir protein sentez kapasitesine sahip olmakla birlikte bu arttırılmış sentetik metabolizma çoğu zaman işlevsiz ve yanlış katlanmış proteinlerin (örneğin M paraproteini) birikmesine yol açar. Normal fizyolojik koşullar altında hücre, proteinlerin sitoplazmik ve endoplazmik retikulumla ilişkili olarak parçalanmasını teşvik ederek dengeli bir metabolizmayı sürdürür. Bununla birlikte, proteazomal inhibitörlerin varlığında, MM kanser hücreleri bu protein fazlalığını atamazlar ve sonuç olarak hücrelerde apoptoz gerçekleşir [25].

2.3.1.1. Bortezomib

Bortezomib, klinik kullanıma uygun olduğu gösterilen ve FDA tarafından onaylanan ilk spesifik proteazom inhibitörüdür. Bir boronik asit dipeptid olan bortezomible yapılan prelinik çalışmalar, bu ajanın güçlü bir sitotoksik ve büyüme inhibe edici ajan olduğunu göstermiştir. Bortezomib tedavisi, hem osteoblast farklılaşmasını teşvik ederek hem de osteoklast aktivitesinin reseptör aktivatörünü azaltarak kemik iliği mikro ortamını iyileştirir [25]. Robert

Orlowski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ileri hematolojik malignitelere karşı ilk kez bortezomibin kullanıldığı klinik araştırma gerçekleştirildi. İxazomib ve carfilzomib, şu anda MM tedavisinde kullanılan diğer proteazom inhibitörleridir [25].

Monoklonal antikolar, belirli hücelere saldırmak için özdeş bağışıklık hücreleri tarafından yapılan proteinlerdir. Kanser hücrelerinin yüzeyindeki antijenleri spesifik olarak hedeflemek için tasarlanmış monoklonal antikolar da MM tedavisinde kullanılabilir. Daratumumab ve elotuzumab, şu anda MM tedavisi için kullanılan ticari olarak temin edilebilen monoklonal antikolardır [26].

2.3.1.2. Karfilzomib

Karfilzomib, çoğunlukla refrakter veya nükseden MM vakalarında kullanılan ikinci nesil bir proteazom inhibitörüdür. Karfilzomibin etki mekanizması apoptozu teşvik etmek ve kemik lezyonlarını iyileştirmek de dahil olmak üzere bortezomib ile aynı olmakla birlikte geri dönüşümlü olan bortezomibden geri dönüşümsüz bir etki göstermesiyle farklılık göstermektedir [26].

2.3.1.3. İxazomib

20S geri dönüşümlü bir proteozom inhibitörüdür. MM'de klinik araştırma altındaki ilk oral proteazom inhibitörüdür. Klinik öncesi çalışmalar, MM hücre dizileri ve ksenograft modellerinde antitümör aktivite göstermiştir. Faz I / II klinik çalışmalarda, ixazomib genel olarak yönetilebilir toksisitelere sahip olmuştur ve bugüne kadar sınırlı periferik nöropati gözlemlenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen ön veriler, ixazomibin nükseden / refrakter MM'de tek bir ajan olarak ve yeni teşhis konmuş hastalarda kombinasyon rejimlerinin bir parçası olarak aktif olduğunu göstermektedir. Lenalidomid-deksametazon ile kombinasyon halinde Faz III çalışmaları devam etmektedir [26].

2.3.2. İmmünomodülatörler (IMiD'ler)

MM'nin, çeşitli etmenlerle immün sistemin gerilemesiyle bağlantılı olduğu bilinmektedir. Fonksiyonel antikolar üreten plazma hücrelerinin yetersiz

bulunması nedeniyle humoral yanıtın azalması ve T yardımcı hücrelerle tetiklenen B lenfosit farklılaşmasının azalması bu gerilemedeki başlıca etmenlerdir. İmmünomodülatör özelliğe sahip ilaçların son yıllarda MM tedavisinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. İmmünomodülatör ilaçlar, T lenfositlerin ve doğal öldürücü T (NKT) hücrelerin aktivasyonunu sağlayan IL-2 üretimini artırarak işlev göstermektedir. Ek olarak, immünomodülatörler TNF-a, IL-1b ve IL-6'nın sitokin seviyelerini düşürmekte, böylece MM'deki proinflamatuvar durumu geciktirmektedir [27].

2.3.2.1.Talidomid

IMiD'lerin ilk nesli, glutamik asitten türetilen bir bileşik olan talidomid olarak kabul edilmektedir. Başlangıçta hamile kadınlarda yatıştırıcı etkisiyle bu amaçla kullanılan talidomidin, yapılan araştırmalar sonucunda yeni doğan bebeklerde ileri derecede gelişim gerilemesine neden olduğu ortaya çıktığında terapötik ajan olarak kullanımı sürdürülemez hale gelmiştir. IMiD'lerin günümüze MM tedavisi amacıyla kullanımı, daha az yan etki gösteren talidomid türevlerine dayanmaktadır. IMiD'lerin anti-kanser aktivitelerine katkı sağlayan ve doğrudan immünomodülatör olmayan bazı etkileri de olduğu bilinmektedir. Bu etkiler, malign hücrelerin proliferasyonu ve hayatta kalmasıyla bağlantılı olan, MM hücreleri-kemik iliği mikroçevresi etkileşiminin yanı sıra birtakım anti-anjiyojenik özellikler ve anti-mitojenik aktiviteyi de içermektedir [28].

2.3.2.2.Lenalidomid

İkinci nesil bir IMiD olan lenalidomid, talidomidin etkinliğini geliştirmek amacıyla moleküler yapısına bir amino grubunun eklenmesi ve bir karbonil grubunun çıkarılması yöntemiyle geliştirilmiştir. Son yıllarda lenalidomidin MM ve diğer B lenfosit malignitelerine karşı etkili bir ajan olduğu gösterilmiştir [29,30].

2.3.2.2.Pomalidomid

Pomalidomid, talidomidin moleküler yapısından karbonil grubu çıkarılmadan bir amino grubu eklenmesiyle türetilir. Pomalidomidin, düşük doz deksametazon

ile kombinasyon halinde refrakter / relaps MM hastaların tedavisi için kullanımı onaylanmıştır. Pomalidomid; immünomodülatör, anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik özelliklerinin yanı sıra regülatör T hücrelerini aktive ederek ve plazma hücreleri üzerinde NK hücre aracılı sitotoksikite etkisi göstererek etki etmektedir. Bunlara ek olarak kemikteki osteoklast aktivitesini azalttığı da bilinen pomalidomidin, lenalidomide benzer yan etkilere sahip olduğu bilinmektedir [31].

2.3.3. Monoklonal antikolar

2.3.3.1 Daratumumab

IgG monoklonal antikoru olan daratumumab, CD38 yüzey glikoproteinine karşı geliştirilmiştir. CD38, myelom hücrelerinde yoğun olarak ifade edilmekle birlikte normal lenfoid ve myeloid hücrelerde düşük miktarda eksprese edilmektedir. Daratumumab'ın, lenalidomid ve bir proteozom inhibitörüyle tedavi sonrası (2 basamak), pomalidomid ve deksametazon ile kombine şekilde kullanımı kabul almış bir tedavi yöntemidir. Etkinlik ve güvenilirliği birçok çalışmada değerlendirilmiş ve onaylanmıştır [29].

2.3.3.2. Elotuzumab

Miyelom hücreleri ve doğal katil hücreler (NK) üzerinde bulunan yüzey proteini SLAMF7'ye karşı geliştirilen bir monoklonal antikordur. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 1-3 basamak tedavi görmüş olan hastaların lenalidomid ve deksametazon ile kombine şekilde kullanılmasını onaylanmıştır [29].

2.3.2.3. Isatuximab

Bu monoklonal antikoru, CD38 yüzey proteinine karşı geliştirilmiştir. Yapılan faz 3 çalışmalarında bortezomib ve lenalidomid tedavisi olmuş hastalarda başarılı sonuçları olduğu gösterilmiştir [29].

2.3.4. Diğer İlaçlar

Kortikosteroidler, melfalan, siklofosfamid, doksorubisin gibi ilaçlar da MM tedavisinde kullanılan diğer ilaçlardır [32].

2.3.4.1. Deksametazon

Glukokortikoidler (GC), sahip oldukları immünosupresan, antiinflamatuvar ve proapoptotik özelliklerinden dolayı MM tedavisinde de kullanılmaktadır. GC'ler, hücre sitoplazmasında bulunan glukokortikoid reseptörlerine bağlanarak kötü huylu plazma hücrelerine etki edebilmektedir. MM tedavisinde kullanılan glukokortikoid ilaçlardan en yaygın kullanılanı deksametazondur (DEX). DEX, endojen kortizolden 27 kat daha güçlü immünosupresan özelliklere sahip sentetik bir kortikosteroiddir. DEX, tek başına veya diğer terapötiklerle kombinasyon halinde MM tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Dexametazonun; vücutta sıvı tutulumuna bağlı olarak hipertansiyon ve kalp problemlerine yol açabildiği, hiperglisemi veya mide bozuklukları gibi yan etkilere neden olabildiği gösterilmiştir. DEX'in etki mekanizmasının; kötü huylu hücrelerin bulunduğu bölgeye lökosit gönderilmesini tetikleyerek iltihabı azaltmak olduğu ve böylelikle basınç ve ağrıyı azalttığı belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, DEX; malign hücreler üzerinde proapoptotik etkilere sahiptir [33].

2.3.5. Histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri

MM de dahil olmak üzere birçok kanserin oluşumu sadece genetik değişikliklerle açıklanamamakta, aynı zamanda histon modifikasyonu gibi anahtar epigenetik süreçlerdeki değişiklikleri de içermektedir [33,34]. Son yıllarda, gen mutasyonlarıyla ilgili yapılan yeni çalışmalar ve uygulanacak tedaviler arasında epigenetik mekanizmalar da bulunmaktadır. Bunun en büyük nedenlerinden biri epigenetik değişimlerin büyük oranda geri dönüşümlü olmasıdır.

Lizin kalıntılarının yan zincirinde meydana gelen asetilasyon gibi histon modifikasyonları, lizinin pozitif yükünü nötralize ederek, transkripsiyon faktörlerinin aktif gen ekspresyonu için promotörlere ve güçlendiricilere erişilebilirliğinin artmasına yol açmaktadır. Aksine, histonun deasetilasyonunun, kromatin yoğunlaşması ve transkripsiyonel baskılama ile bağlantılı histonların asetilasyonunun, yapılarına göre dört sınıfa (sınıf I, II, III ve IV) ayrılan 18 enzimden oluşan histon deasetilazlar (HDAC) tarafından

düzenlendiği bilinmektedir. Epigenetik değişiklik süreçleri, epigenetik tedavi stratejileri için büyük önem taşıyan DNA metiltransferaz ve histon deasetilaz gibi enzimlerin aktivitelerine bağlıdır. HDAC'lerin düzensiz çalışması veya anormal ekspresyonu, MM dahil birçok kanserin patogenezinde rol oynamaktadır. Mithraprabhu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Sınıf I HDAC'nin, özellikle HDAC1'in aşırı ekspresyonunun MM'de zayıf prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, HDAC'lerin MM tedavisi için etkili ajanlar olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, HDAC inhibitörlerinin (HDACi) kullanıldığı yeni terapötik stratejiler, son yıllarda MM tedavisi için ilgi çekici olmaktadır. Klinik öncesi çalışmalardan elde edilen veriler, HDAC'nin MM hücrelerinde apoptozu tetiklediğini ve hücre döngüsü üzerine etki ederek aktivite gösterdiğini kanıtlamıştır [35].

Histon deasetilasyon enzimleri , histon deasetilaz inhibitörlerinin (HDAC) varlığında inhibisyona uğrar ve böylelikle histon içinde asetilasyon artar. Bu artış, kanserli hücrelerde hücresel süreçleri değiştirir, bu yüksek asetilasyon, histon birikimine neden olur ve tümörlerde gerilemeyle sonuçlanır [] . HDAC inhibitörleri dört sınıfta incelenmektedir: kısa zincirli yağ asitleri, hidroksamik asitler, halkalı tetrapeptidler ve benzamidler. HDAC inhibitörleri hematolojik kanserlerin tedavisinde olduğu gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bir histon deasetilaz inhibitörü olan panobinostatın., bortezomib ve deksametazon ilaçlarıyla beraber kullanımının anti-miyelom etki gösterdiği belirlenmiştir [36,37].

2.4. MM için kombine terapötik rejimler

Antikanser ilaçların birlikte uygulanması ile etki gösteren kombinasyon tedavisi, kanser hücrelerinde direnci kırmak için en sık kullanılan yaklaşımlardan biridir. Kombinasyon halinde hastaya verilen ilaçlar, her biri kanser hücrelerinde farklı bir biyokimyasal mekanizmayı hedefleyecek şekilde seçilerek sinerjik etki elde edilmesi hedeflenir [38,39].

MM tedavisi için etkili olduğu belirlenen birkaç ilacın kombine kullanımının, hasta prognozunu önemli ölçüde iyileştirdiği belirlenmiştir. MM kombinasyon tedavisi, hastalığın ilerlemesini etkili bir şekilde yavaşlatarak, remisyon

süresini uzatarak ve relaps / refrakter fazları azaltarak etki göstermektedir. MM'nin belirteçleri arasında malign plazma hücrelerinin ve B lenfositlerinin heterojen klonlarının üretimi olduğu bilinmektedir, bu nedenle kombinasyon tedavi rejimlerinin seçimi büyük ölçüde hastadaki dominant ve minör klonların oranına bağlı olmaktadır [40,41]. Örneğin, yeni tanı konmuş hastalarda IMiD'leri içeren kombinasyon tedavilerinin yanıtı % 90-100 iken, relaps / refrakter hastalıkta yeniden ortaya çıkan minör klonları taşıyan hastalarda bu oran % 50-65'e düşmektedir. Bu nedenle, hastalık durumuna göre optimum ilaç kombinasyonlarını belirlemek çok önemlidir; yeni teşhis edilmiş vakalara karşı nükseden / tedaviye dirençli hastalıkta uygulanması gereken kombine tedaviler farklılık göstermektedir [42,43].

2.5. Yeni ilaçların tasarımı ve geliştirilmesi

Son yıllarda özgün ilaç moleküllerinin tasarlanması ve sentezlenmesi yeni birtakım teknolojiler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. İlaç etken maddelerinin tasarımı ve araştırılması çalışmaları, in silico sistemlerin gelişmesiyle günümüzde hız kazanmıştır. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (CADD), bu alanda geliştirilen yeni bir teknoloji olup, bu yöntemin birkaç alanda kombine halde kullanılarak ilaç geliştirme stratejilerinde oldukça etkili olduğu bilinmektedir [44,45]. Bu ve benzeri teknolojiler, özgün bir ilaç adayının geliştirilmesi sürecinde zaman ve maliyeti en aza indirmeye olanak sağlamaktadır. Günümüze dek, aralarında FDA onaylı ilaçlar da dahil çok sayıda klinik çalışmada bu tekniklerin ilaç tasarımına katkısı gösterilmiştir [46,47]. Günümüzde MM tedavisi, melfalan, siklofosfamid ve prednizon gibi geleneksel ilaçlarla veya talidomid, lenalidomid ve bortezomib gibi sonradan geliştirilen ajanlarla sağlanmaktadır. Bu tedaviler genel olarak başarılı olsa da, kemik iliğinde yerleşen bu minimal rezidüel hastalığı tamamen yok etmeyi başaramamaktadırlar. Yapılan çalışmaların sonucunda, kemik iliğinin bileşenlerini oluşturan ECM (ekstraselüler matriks), sitokinler, kimokinler ve büyüme faktörlerinin, MM alt populasyonları için koruyucu bir ortam oluşturduğu belirlenmiştir. MM'nin kemik iliği eksenine olan bağılılığı plazma hücrelerinin hayatta kalımını arttırmasına ek olarak ilaç direncine de neden olmaktadır. Buna ek olarak, homing, anjiyogenez ve osteolizis de bu durumun

bir etkisi olarak hastalığın ilerlemesinde etkili olmaktadır [48,49]. Bu nedenle, antikolar, peptidler ve sinyal yolağı inhibitörleri gibi; plazma hücreleriyle kemik iliğı bileşenleri arasındaki bağlantıyı azaltan/yok eden yeni ajanlar geliştirilmektedir. Bu terapilerin minimal rezidüel hastalığın tedavisinde etki göstererek hastalık prognozunu iyileştireceğı düşünölmektedir.

MM'de tümör hücrelerinin, kemik iliğı mikro çevresinden köken aldığı bilinmektedir. Bu durum, kemik iliğı ekstra selöler matriks (BM/ECM) üyeleri (fibronektin, laminin, VCAM-1, proteoglikanlar, kolajenler ve hyaluronan) ve hücrelerin yüzeyinde bulunan birtakım adezyon molekülleri (integrinler, heparan sülfat proteoglikanlar ve hyaluronan reseptörleri CD44 ve RHAMM) arasında oluşun etkileşimler aracılığıyla gerçekleşmektedir [50,51]. BM/ECM ve MM hücreleri arasındaki bu etkileşim, hem MM hücrelerinin hayatta kalımı, proliferasyonu ve göçüne de neden olan çeşitli sinyal yollarını aktive etmekte hem de ilaç direncine yol açmaktadır. Hücre adezyonu aracılı ilaç direnci (CAM-DR) olarak bilinen bu durumun MM hücrelerinin terapötik ajanların etkilerinden korunmasına neden olduğu düşünölmekte ve bu durum, yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için son derece önem taşımaktadır [52,53].

2.6. Benzoksazol ve Benzamid Türevleri

Benzoksazol halka sistemi, düzlemsel heterosiklik bileşikler sınıfına girer ve nükleik asitlerde bulunan olan purin bazlarına yapısal olarak benzerlikleriyle dikkat çekerler. Bu yapısal benzerlik, hücrede nükleik asit sentezini engelleyerek kemoterapötik aktivite elde edilmesini sağlar [54].

Doğal ürünlerde buldukları gibi sentetik moleküllerin de yapısında bulunan benzoksazoller, proteinler ile reaksiyonlara girebilmekte ve lipofilik özellikleriyle hidrofobik etkileşimler kurabilmektedirler [55,56]. Kimyasal modifikasyonlara izin veren esnek yapıları sayesinde yan zincirlerinin karakteristiğinin değışmesi de mümkündür. Tüm bu özellikleri bu moleküllerin terapötik tedavilerde kendilerine yer bulmalarını sağlamıştır.

Benzoksazol türevlerinin sitotoksik ve antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma sonucunda farklı biyolojik aktiviteye sahip türevleri olduğu

belirlenmiştir. Benzoksazol türevlerinin, anti-inflamatuvar [57] antikanser [58] ve proteaz inhibitörü aktivitesi [59] gösterdiği belirlenen türleri bulunmaktadır. Bunlar ek olarak hücre yolakları da etkilediği bilinen benzaoksazollerin antikanser ajan olarak potansiyelleri de son yıllarda dikkat çekici olmuş ve bu konuda çalışmalar hızlandırılmıştır.

Benzoksazol türevlerinin metabolitleri de son yıllarda yapılan çalışmalarda dikkat çekmektedir. Benzoksazollerin ilkin metabolitlerinin amid türevleri olduğu bilinmektedir. Bu metabolitler faz I reaksiyonları ile moleküler yapılarındaki oksazol halkasının açılması sonucu oluşmaktadır [60,61]. Benzoksazol metaboliti benzamit türevlerinin aktivitelerinin incelendiği çalışmalarda da benzoksazol halkası içeren türevlere benzer şekilde antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri olduğu gösterilmiştir. Bunlara ek olarak benzamit türevlerinin, ve antikanser etkilerinin olduğuyla ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada sentezlenen 4- amino-N-(2-aminofenil) benzamit molekülünün tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarıyla birlikte benzamit türevlerinin antikanser etkilerinin araştırılmasıyla ilgili çalışmalar artmıştır. Benzamit türevleri böylelikle HDAC inhibitörlerinin de önemli bir sınıfını da oluşturmaktadır [62,63].

2.6.1. N-(2-hidroksi-4 nitrofenil)-4 etil benzamit (XT5)

Son yıllarda yapılan anti-kanser araştırmaları, G-protein-bağlı reseptörlerden olan proteazla aktive edilen reseptörler (PAR) ile tümör oluşumu arasındaki ilişkiye işaret etmektedir. PAR, hücre proliferasyonu, enflamasyon ve kan pıhtılaşması dahil olmak üzere farklı biyolojik etkiler gösteren çeşitli dokularda eksprese edilmektedir. PAR ailesinin, özellikle PAR1'in ifadesinin, meme, kolon, böbrek, dahil olmak üzere birçok tümör progresyonunda rol aldığı gösterilmiştir [64,65].

Miyelom ve kemik iliği mikroçevresiyle ilgili yapılan araştırmalar sonucunda PAR-1'in miyelom hücrelerinde de ifade edildiği anlaşılmıştır. Buna ek olarak MM hastaları ve hücre hattı örneklerinden alınan malign plazma hücrelerinde PAR1'in varlığı ile PAR1'e bağlandığı bilinen heparinin etkileri gösterilmiştir.

Yakın zamanda bu alanda yapılan çalışmalarda anti-trombotik etkiye sahip olan heparinin, kullanıldığı MM hastalardaki tedavi başarısındaki artış gösterilmiştir [66,67].

Elde edilen olumlu sonuçların yanısıra heparinin ciddi yan etkileri nedeniyle, aynı mekanizmada etkili olan farklı molekül arayışları önem kazanmıştır. Bu arayış sonucunda heparin benzeri etkili bir ilaç molekülü arayışı sırasında birçok yeni molekül bulunmuştur. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya bölümünde, tasarımı ve sentezi gerçekleştirilen aday moleküller arasından PAR1'e bağlanarak kanser hücrelerinin mikroçevreden aldığı desteği kesebilecek olan moleküller seçilmiştir. Benzoksazol ve benzamid yapısı taşıyan bazı bileşikler arasından seçilen özgün moleküllerden özellikle benzamid türevi N-(2-hidroksi-4 nitrofenil)-4 etil benzamit (XT5)'in yüksek *in vitro* anti-miyelom etki gösterdiği tespit edilmiştir .

Benzamit türevi N-(2-hidroksi-4 nitrofenil)-4 etil benzamit (XT5) molekülü, insan MM hücre dizilerine karşı en yüksek anti-MM etkiye sahip molekül olarak seçilmiştir [68,69].

Günümüzde MM tedavisinde kullanılan standart ilaçlardan Talidomid ve Melfalan ile karşılaştırılması sonucunda XT5 molekülünün standart ilaçlardan çok daha etkili bağlanma özelliği olduğu görülmüştür. İnsan MM hücre dizilerinin yanı sıra, taze insan MM hücreleri üzerinde yapılan *in vitro* toksisite çalışmalarında, XT5'in yine en etkili molekül olduğu teyit edilmiştir. İlâveten XT5'in anti-MM etkisine karşın normal insan fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği de belirlenmiştir [70].

Heparin molekülünün anti-miyelom etkilerinin bulunmasının ardından devam eden miyelom-mikroçevre araştırmaları sırasında heparinin etki ettiği Proteaz aktive edici reseptör 1(PAR-1)'in miyelom hücrelerince ifade edildiği bildirilmiştir [71]. Ankara Üniversitesi Farmasötik Kimya bölümünde yürütülen moleküler doking çalışmaları sonucu PAR-1 ile bağlanabilme özelliği olan 11 özgün molekül belirlenmiştir. Bu moleküllerden özellikle XT5'in en potent *in vitro* anti-miyelom etki gösterdiği belirlenmiştir. Sözü edilen bu moleküllerin insan PAR-1 ile etkileşimleri ve mekanizmasını incelemek üzere moleküler

docking yöntemi Autodock Vina programı kullanılarak uygulanmış, enzim ile etkileşimler PAR-1 reseptör antagonistleri Vorapaxar (1c), Atopaxar (1d); Artesunate (1e) ile kıyaslanmıştır [54] 2017 yılında yapılan bir çalışmada da XT5 molekülünün K562 KML hücre serisinde apoptotik etkileri bildirilmiştir [72,73].

XT-5 molekülünün anti-MM etkinliği, RPMI-8226 ve U266 insan MM hücre hatlarında değerlendirilmiş olup IC₅₀ değeri 10 µM olarak belirlenmiştir. Bu değer *in vivo* fare MM modelinde uygulanması planlanan doz 5 mg/kg olarak hesaplanmıştır.

XT5 molekülün L929 Fibroblast hücrelerinde 72. saat MTT canlılık testi verileri, %50 toksisitenin 10uM dan sonra başladığı göstermektedir [74]. Daha sonra kordon kanı normal lenfositleri üzerinde yapılan MTT deneyinde bu dozda toksisite gözlenmemiştir. XT-5 molekülünün anti-MM etkinliği, RPMI-8226 ve U266 insan MM hücre hatlarında değerlendirilmiştir [73].

Miyelom-mikroçevre etkileşme özelliğinden (PAR1 bağlanma gösterebilen) yola çıkarak seçilen yeni bileşiklerin apoptozis, sitokin-kemokin, bağlanma ve direnç gelişimi yönünden mevcut standart ilaçlarla karşılaştırmalı değerlendirilmiştir.

Bir aday ilaç molekülü olan XT5 ile MM hasta kemik iliğinden taze izole edilen plazma hücrelerinde *in vitro* MTT testleri, yeni tanı olgularda daha sıklıkla, dirençli nüks olgularda ise daha az sıklıkla anti-MM etki olduğunu göstermektedir.

Yeni ilaçların geliştirilmesi sürecinde temel amacın terapötik etkisi yüksek ve toksik etkileri olmayan veya en az olan ilaç tedavilerini klinik aşamaya getirmek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle yeni üretilen ilaç moleküllerinin etkinliğinin yanı sıra olası toksik etkilerinin de incelenmesi gerekmektedir. Bu tez kapsamında yeni aday ilaç molekülünün fare modelinde etkinliğinin yanı sıra toksik potansiyeli değerlendirilecektir. Elde edilecek sonuçlarla aday molekülün en etkin ve en az toksik dozunun belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2.7. Deneysel Hayvan Modelleri

Yarım yüzyıldan fazla bir süredir, hayvan modellerinin katkısı sayesinde insan kanser türleri için geliştirilen tedavilerde önemli ilerleme kaydedilmiştir [75]. Bununla birlikte, bu alandaki çalışma sonuçlarının fare modellerinden klinik deneylere çevrilmesi, insan ve fare türleri arasındaki genetik farklılıklar nedeniyle uzun yıllar başarısız olmuştur. İnsan hücrelerinin ve dokularının laboratuvar faresine implantasyonu, sağlam bağışıklık sistemine sahip konakçı fare tarafından insan dokularının reddini indükleyecektir. Kanser araştırmaları için ilk üretilen atimik fare modelinden, en son keşfedilen genetiği değiştirilmiş ve yüksek derecede bağışıklığı yetersiz fare türlerine kadar, bu alanda kullanılan ksenograft modeller insan kanserlerine karşı tedavileri geliştirmek için değerli araçlar olmuşlardır [76].

Deneysel fare modelleri, çeşitli insan hücre ve dokularının insanlarda olduğu gibi engraft edildiği ve işlev gösterebildiği modellerdir. Son yıllarda bu modelleme, insan hastalıklarının patogenezinin anlaşılmasında oldukça etkili ve önemli olmaktadır [77,78]. Bu amaçla, ksenograftları reddetmeyen, hücrelerin ve dokuların farklılaşmasını ve büyümesini destekleyen yüksek derecede immün yetmezliği olan fareler oldukça önemli araçlardır. Çıplak (nude) ve şiddetli kombine immün yetmezlik (SCID) farelerinin keşifleri, ksenotransplantasyon için immün yetmezliği olan farelerin geliştirilmesinde ilk gelişmelerdir [79]. 1962 yılında üretilen nude farelerin ilk immünyetmezlikli fare türü olduğu bilinmektedir. Prdkscid geninin bir NOD farenin kendi içinde melezlenmiş suşuna katılması yoluyla oluşturulan obez olmayan diyabetik (NOD) / SCID farelerin geliştirilmesi de insanlaştırılmış farelerin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur.

Nude ve scid farelerin keşfinden beri çeşitli immünyetmezlikli fareler, insanlaştırılmış fareler oluşturulmak üzere denenmektedir. SCID farelere insan fetal karaciğer ve timüs yoluyla insan T ve B hücrelerinin nakledilmesiyle oluşturulan SCid-hu modeli, etkili bir fare modeli olarak düşünülse de bu farede engraft oranlarının çok yüksek olmadığı belirlenmiştir [80]. 1998 yılında Goldman ve arkadaşlarının yaptığı çalışma [81] sonucunda IL-2Rcnull geninin aktarıldığı farelerde gelişmiş insan hücre

engrafmanı özellikleri olduğunu bildirmiştir. Bu fareler T, B ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin eksik olmasıyla ve makrofaj ve dendritik hücre etkinliklerinin az olmasıyla çok yönlü immünyetmezlik özellikleri göstermektedir [82]. Bu farelerde, köken aldıkları farelerden çok daha etkin şekilde insan hücre engrafmanları görüldüğü belirlenmiştir. Buna ek olarak bu farelerde insan hematopoietik kök hücrelerin, çok yönlü iyi farklılaşmış insan hematopoietik hücrelerine dönüşümünde artış olduğu gözlenmiştir [83]. Böylelikle, mutant IL2rc geninin bulunması, 2000 li yılların başında immünyetmezlikli NOD/SCID farelerden insanlaştırılmış farelerle ilgili yapılan çalışmaların artmasına önayak olmuştur [84].

IL-2Rcnull genini taşıyan immünyetmezlikli fare türleri son derece etkin yüksek engrafman oranları ve insan hücre farklılaşmaları göstererek insan hastalık modellerinin geliştirilmesinde dikkate değer ilerlemelere yol açmıştır. Bu kategoriye giren fare türleri arasında, 2002 yılında rapor edilen NOG (NOD/Shi-Prkdcscid Il2rctm1Sug/Jic) [85] ve 2005 yılında ilk kez üretilen NSG fare, B BRG fareler bulunmaktadır [129]. BALB c farelere IL-2Rcnull geninin aktarılmasıyla oluşturulan İmmünyetmezlikli BRG fareler NSG ve NOG farelere alternatif olarak düşünülerek üretilmiştir. Bu farelerle ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen verilere göre NSG ve NOG farelerin insan doku ve hücreleri için en iyi alıcılar olduğunu göstermektedir. Bu türler için İnsan hücrelerinin engrafman başarısı azalan sırada şu şekilde sıralanmaktadır: NSG=NOG>NRG>BRG>NOD / SCID>B6RG [86].

Engrafman başarısı az olan SCID ve Nod/SCID farelerin dezavantajı timik lenfomanın bu türlerde sıklıkla görülmesi ve bu farelerin ileri yaşlarında T ve B hücrelerin gelişmesi durumuna açık olmalarıdır [87]. NOG ve NSG farelerde bu iki olasılığın olmaması türlerinin engrafman başarısını arttırmaktadır. Bunun nedeninin IL-2Rc nın inaktif olması ve bu genin IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 ve IL-21 gibi , T ve B hücre gelişimi için önemli olan sitokinlerle bağlantılı olması olduğu düşünülmektedir. Birbirine oldukça benzeyen NSG ve NOG fare türlerinde IL-2 Rc mutasyonu bakımından bir farklılık olduğu bilinmektedir. NOG farede IL2rg mutasyonu, ekprese edilen ve sitokinlere

bağlanabilen ancak sinyal veremeyen bir protein üretirken, NSG farelerindeki mutasyon, sitokinlere bağlanamayan tam bir eksikliği kapsamaktadır [88].

2.7.1. NSG (NOD/SCID IL-2R γ [null]) fareler

Primer insan hücrelerinin, dokuların ve tümörlerin engrafmanında önemli bir adım; IL-2 reseptörü gamma zincirinde (IL2R γ null) mutasyon olan immün yetmezlikli farelerin geliştirilmesi ile atılmıştır. IL2R γ geni, IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 ve IL21 reseptörlerin yüksek affinite sinyalinden sorumludur ve bu reseptörler aracılığıyla oluşan sinyal eksikliği, hem kazanılmış hem de doğal immün sistemi zayıflatmaktadır [89]. SCID, Rag1null veya Rag2null mutasyonları ile kombine edildiğinde kazanılmış bağışıklığı tamamen yetersiz ve doğal bağışıklığı ciddi derecede eksik olan, insan hücre doku ve tümörlerinin engrafmanı için oldukça kullanışlı bir fare türü olan NOD/SCID IL-2R γ (null) (NSG) elde edilmiştir. Shultz ve arkadaşları bu yeni fare türünde CD34 pozitif hematopoietik hücre engrafmanını göstermişlerdir [89,90].

NSG fareler, IL2R γ ve NOD-SCID farelerin 8-10 jenerasyon geri çaprazlamasıyla elde edilmiş bir türdür. Bu farelerin immünyetmezlik derecesi, kendisini oluşturan ebeveyn türlerin immün eksikliklerine bağlıdır. SCID türünden gelen mutasyon, NSG farelerin fonksiyonel T ve B hücrelerin eksikliğini verirken, NOD türü NK ve makrofaj fonksiyonlarının eksikliğiyle immünyetmezliğe neden olmaktadır [91].

İnterlökin-2 (IL-2) reseptörü gamma zinciri eksik olan NSG fareler yakın zamanda hastalık modelleri geliştirmek için kullanılmaya başlanmıştır. Bu türün, daha fazla immün baskılamayla birlikte NK hücre eksikliği, makrofajlarda ve dendritik hücre fonksiyonundaki hatalar ve ek olarak olgun B ve T lenfositlerinin eksikliğine bağlı olarak SCID ve NOD/SCID farelere kıyasla tümör engrafmanında belirgin gelişmeler gösterdiği belirlenmiştir [92].

NSG (NOD-SCID IL2R γ - / -)fareler ileri derecede immün yetmezliğe sahip olmalarına rağmen geleneksel ,kendi içinde melezlenmiş fareler kadar uzun yaşayabilirler. NSG farelerinin ömrü, 37 haftaya kadar yaşayan NOD-SCID farelerine kıyasla 90 haftadan daha fazladır, bu da terapötik tedavilerin uzun vadeli etkilerini ve güvenliğini gözlemlemeyi mümkün kılmaktadır [93].

Çıplak (nude) farelerin gelişiminden bu yana immünyetmezlikli fareler insan tümör biyolojisini, anjiyogenezi ve metastazın mekanizmalarını araştıran çalışmalarda kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu farelerin NK hücre aktivitesinin de dahil olduğu bağışıklık sistemlerinin tümör büyümesini ve metastazı engelleyebileceği bilinmektedir. NK hücre aktivitesine sahip NUDE farelerle birlikte düşük olmasına rağmen NK hücre fonksiyonuna sahip SCID ve NOD-SCID farelerin de tümör hücrelerin büyümesi için uygun bir mikroçevre sağlamadığı anlaşılmaktadır. NSG farelerin, NK hücrelere sahip olmamaları bu farelerin insan tümör hücrelerinin büyümesi için serbest bir ortam oluşmasına neden olmaktadır [94].

NSG farelerle ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar, bu farelerde; tümör hücre hatları, tümör kök hücreleri ve primer katı tümörler de dahil olmak üzere çeşitli tümör implantlarının başarılı sonuçlarını göstermektedir. Bu tümör çeşitleri arasında melanoma [95], pankreas kanseri [96] akciğer kanseri [97], meme kanseri [98] nöroblastoma [99], ve bunlara ek olarak akut miyeloid lösemi (AML) [100], akut lenfoblastik lösemi (ALL) [101] ve Hodgkin lenfoma gibi hematolojik kanser türleri de bulunmaktadır. NSG farelerin keşfiyle ve kullanımının yaygınlaşmasıyla NOD/SCID farelerine kıyasla çok daha az hücre enjekte edilerek başarıya ulaşıldığı kanıtlanmıştır [102].

NSG farelerin, diğer immün yetmezliği olan fare modellerine göre daha verimli birincil insan tümör ksenograftlarının implantasyonuna ve büyümesine izin verdiği bilinmektedir. Bu konuya ilişkin Agliano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan akut lösemi hücrelerinin NSG farelere intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda NOD SCID fareler %32 oranında engrafman başarı gösterirken NSG farelerin %70 oranında engrafman başarısı gösterdiği belirlenmiştir [103].

NSg farelerde, diğer immünyetmezlikli farelere göre çok daha hızlı ve kolay tümör engrafmanının gerçekleştiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada; nöroblastoma tümör hücrelerinin, NSG olmayan immünyetmezlikli farelerde bazal membran benzeri matriks ekstraktının varlığında büyütülebildiği ancak bu ekstraktın, tümör hücrelerinin tümörjenik özelliklerini modüle edebilen proteinler ve büyüme faktörleri içerdiği belirlenmiştir. Sartelet ve

arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonucunda NSG farelerde nöroblastoma tümör hücrelerinin bazal membran benzeri matriks kullanılmadan diğer immünyetmezlikli farelere göre iki katı oranda tümör büyümesinin görüldüğü bildirilmiştir [104,105].

Yüksek metastaz insidansının görülmesi; NSG farelerde oluşturulan insan ksenograft modellerin bir başka özeliğidir. Carreno ve arkadaşlarının bu konuya ilişkin yaptıkları çalışmada, melanom pulmoner metastaz modeli kullanılarak dört immünyetmezlikli fare türü; SCID, NOD-SCID, NSB ve NSG fareler karşılaştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda, NSG farelerde akciğer metastazının en hızlı geliştiği, bu durumun da NK hücre eksikliğine bağlı olduğu görülmüştür [106,107].

Son yıllarda NSG farelerle oluşturulan ksenograft modeller, klinik kanser araştırmaları için oldukça dikkat çekici olmaya başlamıştır. İnsan tümör hücrelerinin sahip olduğu yüksek homing (hücrelerin kemik iliğinde vasküler bölgeden ekstrasvasküler bölgeye göç etmesi) yeteneği, NSG farelerde oluşturulan modellerde de korunabilmekte, böylelikle tümörün patogenezinin incelenmesine katkı sağlamaktadır. Miyakawa ve arkadaşlarının NSG cinsi immünyetmezlikli fareye insan multipl miyelom hücre hattını intravenöz olarak enjekte etmesinin ardından farelerde multipl miyelomun kemik iliği bölgesinde yerleştiği ve arka bacaklarda paralizle sonuçlandığı görülmüştür [108,109,110].

Tümör oluşturulan NSG farelerde, sitokinler aracılığıyla immünoregülasyon uygulanabilmektedir. Bu yöntem, özellikle IL- 2, IL-15, TNF, ve GM-CSF gibi farklı sitokinlerle veya hücre bazlı tedaviler ve bazı spesifik antikolarla uygulanabilmektedir. Seitz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NSG farelere rabdomiyosarkoma (RMS) ksenograft modeli oluşturulmuş ve farelere eş zamanlı olarak hematopoietik kök hücre nakli uygulanmıştır [111]. Çalışma sonucunda, farede insan benzeri immün sistem hücrelerinin oluştuğu ve implante edilen tümör hücrelerinin canlılığını azalttığını bildirmişlerdir. Böylelikle insanlaştırılmış farelerde oluşturulan modellerin gelecekteki immünoterapi araştırmaları için dikkat çekici olduğunu vurgulamışlardır. İmmünoterapi alanında çalışmalar yapan başka bir araştırma ekibi, benzer

şekilde NSG farelerde hematopoietik kök hücre ve meme kanseri hücrelerini eş zamanı olarak uygulamış ve IL-15 in NK hücreleri üzerindeki uyarıcı etkisini incelemiştir. Farelere IL-15 tedavisi uyguladıktan sonra NK hücre oluşümünün indüklendiği görülmüştür [112].

2.7.2. Fare Miyelom modelleri

Fare miyelom modelleri, multipl miyelom patogenezinin anlaşılması, hastalık direnci mekanizmalarının belirlenebilmesi, ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilebilmesi için kritik araçlardır. MM ve ekstramedüller plazmasitomanın birçok prelinik modeli tanımlanmış ve yaygın olarak kullanılmasına rağmen, çok azı malign plazma hücresi-kemik iliği mikroçevresi etkileşimlerini yeterince açıklayıcı olmaktadır. Bu nedenle in vivo hastalık modeli oluştururken uygun modeli seçmek araştırma için en önemli zorunluluktur [113]. Oluşturulacak model seçimi ve uygulama protokolü; konakçının bağışıklık sistemi ve insan hücre hatları veya primer MM hücrelerinin kullanımı gibi faktörlere bağlıdır.

Multipl miyelomun prelinik fare modelleri, büyük oranda farelerde insan miyelomunun ksenograft modellerini ve genetik olarak tasarlanmış modelleri içerir. Ksenograft fare miyelom modelleri, primer insan MM hücrelerinin immün yetmezliği olan farelere nakledilmesi sonucu farede MM oluşumuyla sonuçlanan bir protokolü içermektedir [114].

Farede MM modeli oluşümünün ilk örneği 5TMM modelidir. 1979 yılında yapılmış bir çalışmada, kendi içinde melezlenmiş (inbred) bir fare türü olan C57BL/KalwRij farelerin, yaşları ilerledikçe monoklonal proliferatif b hücre bozuklukları gösterdiği belirlenmiştir. Bu farelerin %80 inde, insanlardakine benzer şekilde, anlamı bilinmeyen monoklonal gamopati (MGUS) denilen plazma hücrelerinin anormal protein oluşturmasıyla karakterize durum görüldüğü saptanmıştır. Bu farelerden de yaşı oldukça ileri bir kısmında da MM geliştiği saptanmıştır. Bu şekilde MM oluşan farelerden izole edilen MM hücreleri, genç farelere nakledildiğinde hücrelerin kemik iliğinde koloni oluşturduğu ve MM ile sonuçlandığı belirlenmiştir. Bu yöntem tekrarlanarak oluşturulan fare miyelom modeline 5TMM modeli denilmektedir ve miyelom modellerinin temelini oluşturmaktadır [114,115].

5TMM modeli, farede MM modelleri arasında bir kilometre taşı olsa da takip eden yıllarda birçok araştırmacı yeni miyelom modelleri oluşturmaya devam etmiş ve miyelomun patogenezi aydınlatmaya çalışmıştır. Bu yöntemler genel olarak subkutanöz veya intravenöz olarak MM hücrelerinin fareye nakledildiği ksenograft modellerdir [116].

İnsan MM hücre hatlarının, bağışıklığı zayıflamış farelere enjekte edildiği ksenograft modeller (örneğin, şiddetli kombine immün yetmezlik (SCID), NUDE, obez olmayan diyabetik (NOD) / SCID, vb. fareler) son yıllarda dikkat çekici olmaya başlamıştır. MM hücrelerinin intravenöz enjeksiyonu sistemik şekilde hastalığı indüklemek amacıyla kullanılır. Kuyruk damarında MM hücrelerinin nakliyle oluşturulan bu modelde tümör engraftman hızı enjekte edilen hücre hattına göre değişmektedir [117].

Subkutan veya intratibial enjeksiyonlar uygulandığı farede lokal hastalık oluşturulabilmektedir. Bu modeller, MM hücrelerinin kemik iliğine mikroçevresinden bağımsız olarak vücut bölgelerinde tümör gelişimine ve takibine olanak vermektedir [118].

JJN3, OPM2, U266, U266-GFP, XG1, RPMI-8226, RPMI-8226-Luc, MM.1S, HuNS1, L363, KMM-1 de dahil olmak üzere çeşitli hücre hatları ve primer hasta kökenli multiple miyelom hücreleri de NSG farelerde denenmiştir [119].

JJN3, U266 veya OPM2 hücrelerin intravenöz şekilde NSG farelere nakledilmesinin parapleji, serumda paraprotein ölçümü, osteolitik lezyonlar ve trabeküler kemik kaybı dahil olmak üzere klasik MM özellikleri ile sonuçlandığı belirlenmiştir [120].

U266, KMM-1, MM.1S ve RPMI-8266 gibi insan miyelom hücre hatlarının intravenöz enjeksiyonunu kullanan birkaç NOD / SCID miyelom modeli tanımlanmıştır [121]. Benzer şekilde, çok sayıda insan miyelom hücre hattı ve ölümcül olmayan dozda ışınlanmış SCID fareleri ile başarılı tümör engraftmanları bildirilmiştir [122]. Bu modellerde, ksenograft hücrelerin intravenöz enjeksiyonu, kemik iliğini içeren ancak ilik alanıyla sınırlı olmayan tümörle sonuçlandığı görülmüştür. JJN3, OPM2 ve U266 hücre hatlarının

intravenöz enjeksiyonunu takiben NOD / SCID modellerde osteolitik kemik lezyonlarının gelişimi gösterilmiştir.

Buna ek olarak, ışınlanmış NOD / SCID farelere KMM-1 insan MM hücre hattının intravenöz enjeksiyonunun, kemik iliğinde plazma hücresi infiltrasyonunun yanı sıra; dalak, akciğerler karaciğer ile yaygın iskelet dışı hastalık tutulumuna neden olduğu belirlenmiştir [123] .

Kanser mekanizmasının anlaşılması amacıyla yapılan çalışmalarda, in vivo kanser modellerinin in vitro çalışmalara oranla birçok avantajı olduğu bilinmektedir. Kanser hücreleriyle günümüze dek yapılan in vitro çalışmalar, malign hastalıkların genetiğinin ve biyokimyasının anlaşılması için oldukça katkı sağlamışlardır. Ancak, in vitro çalışmalar, her seferinde bir değişkenin incelenebileceği deneylerin tasarlanabildiği kontrollü bir ortamın avantajını sunmaktadır. Bununla birlikte maligniteler, canlı bir mekanizmanın karmaşık ve çok değişkenli ortamında meydana gelmektedir. Bu da, birçok uyarının aynı anda kanser hücreleriyle etkileşme girdiği bir durumu beraberinde getirmektedir. Buna ek olarak kanser hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılmasının tümör oluşumuyla sonuçlanmadığı bilinmektedir.

Tümör hücreleri için oldukça elverişli bir ortam sunan in vivo modeller, dış uyarılar yoluyla hücrelerin sinyal alıp vermesini, besin, kan ve bağışıklık sistemiyle olan ilişkiyi de kapsamaktadır. İnsan tümörlerinin temel ve karakteristik yönlerini içeren hayvan modelleri, gelişmekte olan bir tümörün maruz kaldığı sayısız etkileşimi incelemek için son derece faydalı modellerdir [124]. Özellikle fare gibi küçük kemirgenlerin, genetik olarak istenilen özelliklerde türlerin üretilmesine izin vermeleri nedeniyle model oluşturmada oldukça kullanışlı olduğu bilinmektedir.

In vivo deneyler genellikle tümörün belli bir konakçıda büyüüp büyümediğinin takibini esas almaktadır. Havan modelinde tümör oluşumunun incelendiği çalışmalarda yüzeysel tümör büyümesi kaliper ölçümüyle izlenebilirken, internal tümörler bir uçtan bir uca hacim ölçümüyle değerlendirilmektedir. Ancak bu yöntemler, tümörün saptanması, karakterize edilmesi ve ölçülebilmesi için hayvanın sakrifiye edilmesini gerektirmektedir [125].

Biyolüminesans görüntüleme (BLI), bir deney hayvanında oluşturulan tümörün hacmindeki değişikliklerin ve uygulanan tedaviye yanıtın uzun süreli olarak değerlendirilmesine olanak sağlayan kantitatif bir yöntemdir. BLI; oksijen varlığında, lusiferaz ile katalize edilen reaksiyonlar sonucunda lusiferin substratı üzerinde yayılan ışığı ölçmeye yarayan bir yöntemdir [126,127].

Uzun yıllardır ve günümüzde de bu yöntem, farelerde implante edilmiş tümörlerin ve transgenik farelerde spontan tümör gelişimini görüntülemek için kullanılmaktadır [128]. BLI'nin hücre hatlarının tümörjenitesini değerlendirmek, metastazı belirlemek ve kemoterapiye yanıtı izleyebilmek için oldukça kullanışlı bir yöntem olduğu bilinmektedir [129].

MM'nin deneysel ksenograft modelleri, lokalize tümör ilerlemesini (SCID-hu ve subkutanöz plazmasitom modelleri ve kemik iliğinden sistemik yayılan hastalığı) içermektedir [130,131]. Tüm vücut görüntüleme yöntemleri (GFP ya da lusiferin) bu iki sistemde de başarılı ile kullanılmaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kimyasal maddeler

Bu tez çalışması kapsamında toksisitesi ve etkinliği incelenen XT5 molekülü, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde sentezi yapılan, benzoksazol metaboliti ve benzamid türevi bir moleküldür. Moleküler formülü : CH_3CH_2-) olup, molekül ağırlığı 286,29'dur. Farelerde biyoluminesans görüntüleme için kullanılan D-lusiferin maddesi Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. XT5 ilacının çözücüsü olarak BioShop marka %99,9 saflıkta dimetil sülfat (DMSO) kullanılmıştır. XT5 molekülü hayvanlara uygulanırken mısır yağının içinde sulandırılarak verilmiştir. Farelerde biyoluminesans görüntülemesinden önce anestezi uygulaması için inhalasyon anesteziği Isoflurane solüsyonu kullanılmıştır.

3.1.2. Deney Hayvanlarının Temini

XT5 molekülünün olası toksisitesinin incelenmesi amacıyla 8-12 haftalık dişi Wistar albino (*Rattus norvegicus*) sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 150-250 gr ağırlık arasında olup rasgele gruplandırılmıştır. Sıçanlar Ankara Üniversitesi Deney hayvanları Merkezinden temin edilmiş, barınma ve bakımları aynı merkezde sağlanmıştır. Deney hayvanlarının kullanımıyla ilgili gerekli etik kurul izni Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik kurulundan alınmıştır (Karar No: 2019-19-175).

MM modelde XT5 etkinliğinin incelenmesi amacıyla model oluşturmak üzere seçilen NOD/SCID IL-2R γ (null) (NSG) fareler Kobay A.Ş aracılığıyla Jackson Laboratory'den temin edilmiştir. Fareler, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezindeki özel laboratuvarlarında barındırılmıştır. İleri derecede immünyetmezlikli olmaları nedeniyle olan bu farelerin bakımları özel havalandırma sistemine sahip IVC kafeslerde sürdürülmüştür.

3.1.3. Laboratuvar Koşulları

Çalışmada kullanılan sıçan ve farelerin barındırıldığı laboratuvarın sıcaklığı ortalama $22,5\pm 1,5^{\circ}\text{C}$, nisbi nemi $47,1\pm 1$ dir. Laboratuvar ışıklandırması fotoperiyot ile otomatik olarak ayarlanmış ve yarım gün aydınlık, yarım gün karanlık şeklindedir.

Sıçanlara yem olarak standart deney hayvanı yemi, içme suyu olarak musluk suyu verilmiştir. NSG farelerin yemleri ışınlanmış şekilde hazırlanan özel yemlerdir. Farelerin kafeslerinde kullanılan talaşlar ve içme suları otoklavlanarak verilmiştir. IVC kafeslerin hepa filtreleri 10 günde bir değiştirilerek temiz tutulmuştur. NSG farelere yapılan işlemler laboratuvardaki laminar flow içerisinde streil koşullarda yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıçan gruplarında XT5 uygulamaları

3.2.1.1. Sıçanların gruplandırılması ve XT5 uygulanması

8-12 haftalık Wistar sıçanlar, XT5 uygulaması için gruplara ayrılmıştır. Çizelge 3.1.'de deney grupları verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sıçanların gruplandırılması

Deney grupları	Gruptaki hayvan sayısı (n)
Kontrol (1 hafta)	n=3
5 mg/kg (1 hafta)	n=3
10 mg/kg (1 hafta)	n=5
50 mg/kg (1 hafta)	n=5
Kontrol (8 hafta)	n=5
5 mg/kg (8 hafta)	n=5
10 mg/kg (8 hafta)	n=5
50 mg/kg (8 hafta)	n=5

XT5'in sıçanlara uygulanacak dozları in vitro çalışmaları sonucuna göre belirlenen IC50 dozunun (10 µM) katları olacak şekilde hesaplanmıştır. Buna göre sıçanlara uygulanacak olan dozlar 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg olarak seçilmiştir. Benzamid türevi moleküllerin toksisitesinin incelendiği çalışmalarda bu moleküllerin uygulama şeklinin intraperitoneal olduğu görülmüştür [132,133]. Bu literatürler baz alınarak sıçanlara XT5 uygulaması intraperitoneal şekilde yapılmıştır. XT5'in akut ve uzun süreli etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla sıçanlara ayrı gruplarda 1 hafta ve 8 hafta süreyle yağ içinde çözülmüş XT5 uygulanmıştır. 1 hafta süreli uygulama grubunda tüm sıçanlara her gün aynı saatte XT5 uygulaması yapılmıştır. MM tedavisi için günümüzde kullanılan ilaçlardan borteomibin ve deksametazonun uygulandığı çalışmalarda bu ilaçların haftada iki kez uygulandığı görülmüştür [134,135]. Bu çalışmada da sıçanlara 8 hafta süreli uygulama gruplarında XT5 uygulaması sıklığı haftada 2 kez olarak belirlenmiştir. Deney protokolünde; 8 hafta süreyle 3 ayrı gruba sırasıyla 5mg/kg,10mg/kg ve 50mg/kg XT5 uygulanmıştır. Her grupta 5 sıçan olmak üzere, XT5 uygulanmayan kontrol grubuna sadece yağ verilmiştir. 1 hafta süreyle sırasıyla 5mg/kg,10mg/kg ve 50mg/kg XT5 uygulanan gruplarda her grupta 3 sıçan olacak şekilde ayarlanmıştır. Kontrol grubuna aynı şekilde sadece yağ verilmiştir. Sıçanların vücut ağırlıkları haftada iki kez ölçülmüştür.

1 haftalık ve 8 haftalık uygulama süreleri sonucunda sıçanlar kurban edilmiştir.

3.2.1.2. Biyokimyasal analizler

Uygulama süresi sona eren ve kurban edilen sıçanların kalbinden toplanan kanların bir kısmı biyokimyasal analizler için jelli vakumlu tüplere alınarak serumları ayrıştırılmıştır. Bunun için 500g'de 10 dakika santrifüj edilen kanların serumları toplanarak, bu örneklerde ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), GGT (Gama glutamil transferaz), üre, total protein ve albumin değerleri ölçülmüştür.

3.2.1.3. Hematolojik analizler

Sıçanlardan toplanan kanlardan 1'er ml kan hematolojik analizler için ayrılmıştır. Bunun için heparinli tüplere alınan kan örneğinde lökosit, monosit, eritrosit, trombosit, hemoglobin, hematokrit, MCH, MCHC ve MCV ölçümleri yapılmıştır.

3.2.1.4. Histopatolojik inceleme

Nekroskopi sonrası sıçanlardan çıkarılan karaciğer, böbrek, kalp, pankreas ve beyin dokuları %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde tespit edilmiştir. Tespit edilen doku ve organlar yıkama işlemi ardından rutin doku takibine alınarak parafinde bloklanmıştır. Parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında hazırlanan kesitler hematoksilin-eozin (HE) ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.2.1.5. Komet testi

Alkali komet testi, Singh ve ark. tarafından geliştirilen metot esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem uygulanırken hücreler deterjan veya tuz gibi ajanlarla lizise uğrattılır ve DNA lupları açılır. Etidyum bromür boyaması ile bu lupları görünür hale getirilir. DNA'da olası bir hasar DNA'daki bu lupların görüntülenmesi ile belirlenebilmektedir. Lizis edilen hücreler elektroforeze aktarılır ve nükleozom yapısı boyamanın ardından mikroskopta incelenir. Sonuçta hasar oluşumu, DNA'nın oluşturduğu komet kuyruğunun görüntülenmesiyle belirlenmiş olur [136].

Sıçanlardan alınan periferik kan örneklerindeki lenfositlerin izolasyonu için histopak yöntemi kullanılmıştır. Temiz bir tüpe histopak solüsyonu eklendikten sonra 1/2 oranında PBS ile seyreltilmiş kan örnekleri 1:1 oranında olacak şekilde yavaşça eklenip 20 dak. 2000 rpm'de örnekler santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından tüpün ortasında kalan lenfositlerin bulunduğu bulutsu kısım (buffy coat) temiz bir tüpe alınıp üzerine 1:1 oranında PBS ile eklendi ve 10 dak. 2500 RPM'de santrifüj işlemi yapılarak 2 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemlerinden sonra süpernatant uzaklaştırılıp lenfositleri içeren pelet PBS içinde homojenize edilerek deneylerde kullanılmıştır.

%1'lik Normal erime dereceli agaroz (NMA) ile kaplanan lamalar oda sıcaklığında 2-4 saat bekletilerek havada kurutulmuştur.

Kan örneklerinden izole edilen lenfosit solusyonunun üzerine 37°C sıcaklıktaki %0.8'lik düşük erime dereceli agaroz (LMA)'dan 750 µl konulmuş, hafifçe pipetaj yapılarak hücre ve LMA karışımının 100 µl'si NMA ile kaplanmış lamalar üzerine damlatılmıştır. Lameller ile kapatıldıktan sonra agarın katılaşması için en az 30 dakika beklenmiştir. Sonrasında lizis aşamasına geçilmiştir.

Taze hazırlanan ve +4°C'de muhafaza edilen lizis çözeltisi lamaların dizili olduğu şalelere aktarılmıştır. Lamalar +4°C'de bir gece boyu lizis çözeltisinde bekletilmiştir. Bu aşamada hücreler lizise uğradığı için ekstra hasarların önlenmesi için yöntemin diğer aşamaları karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Lizis çözeltisi içindeki lamalar şalelerden çıkartıldıktan sonra buzlu kısmı eksi kutba gelecek şekilde ışık geçirmeyen elektroforez tankı içerisine sırayla yatay olarak dizilmiştir. Lamalar DNA denatürasyonu için elektroforez tamponu içinde 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra 200 mA, 25V'da 40 dakika elektroforez gerçekleştirilmiştir.

Nötralizasyon tamponunda bekletilen lamalar şalelerden çıkartılıp, üzerine 2 µg/ml EtBr boya çözeltisinden 70 µL damlatılmıştır. Üzeri 24×60 mm'lik lamel ile kapatıldıktan sonra saklama kutuları içine yatay şekilde dizilmiştir. Kutular buzdolabına kaldırılarak lamaların 30 dakika boyanması sağlanmıştır.

Boyanan lamalar; 565 nm eksitasyon filtresi ve 590 nm bariyer filtresi içeren, CCD kamera ataçmanlı floresan mikroskopta 20× büyütmede incelenmiştir. Görüntüleme aşamasında her lam için; rastgele seçilen farklı bölgelerin hem 20× hem de 10× büyütmede fotoğrafları çekilmiştir. Her doz için ikişer lam kullanılmış, her lamda 50 hücre incelenmiştir. Her bir hücredeki DNA hasarı; bilgisayar destekli Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd.,USA) görüntü-analiz programı ile analiz edilmiştir. Analizlerde her bir hücre için; baş uzunluğu (µm), baş yoğunluğu (% DNA), kuyruk uzunluğu(µm), kuyruk yoğunluğu (% DNA), kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA göçü (kuyruk migrasyonu) gibi DNA hasar parametreleri ölçülmüştür. Genotoksik etkili bileşiğin belirlenmesi için yapılan istatistiksel analizlerde kuyruk uzunluğu

(DNA göçü ile oluşan kuyruk yapısı), kuyruk yoğunluğu (DNA % = DNA göçü sonucunda kuyrukta bulunan DNA miktarı) ve kuyruk momenti (Kuyruk uzunluğu X Kuyruk% DNA/100) hasar parametreleri değerlendirilmiştir.

3.2.2. MM Model oluşturma

3.2.2.1. Hücre kültürü

Son yıllarda yapılan deneysel fare MM modeli oluşturmak için birkaç farklı hücre hattı tanımlanmıştır. Bunlar arasında RPMI8226, U266, H929, KMM1 ve MM1.S hücre hatları bulunmaktadır. Bu çalışmada NSG farelerde MM model oluşturmak üzere MM.1S-GFP-Luc-neo hücre hattı seçilmiştir. Bu hücre hattı genetik olarak GFP, lusiferaz ve neomisin genlerini taşıma özelliğinde olup, tümör takibinde en etkili yöntem olan biyoluminesans görüntüleme kullanılabilmektedir [137].

MM1S hücreler, %10 fetal buzağı serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI1640 besiyerinde inkübe edilmiştir. Hücrelerin inkübasyon şartları 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içermektedir. Yeterince çoğalan hücreler, RPMI1640 besiyerinde yıkanarak 1ml besiyerinde süspansiyon edilmiştir. Hücre canlılığını saptamak amacıyla tripan mavisi çözeltisi eklenerek thoma lamında hücre sayısı ve canlılığı belirlenmiştir. Canlılığı yaklaşık %95 ve üzeri olan hücreler sağlıklı kabul edilmiştir.

3.2.2.2. NSG farede MM model oluşturma

MM1S Hücrelerin farelere enjeksiyonundan önce lusiferaz özellikleri test edilmiştir. Bunun için, lusiferaz özellikli MM1S hücrelere D-lusiferin eklenerek biyoluminesans cihazında ışımaya özelliklerine bakılmıştır. Lusiferaz özelliğini koruyan ve canlılığı yüksek hücrelerden her bir fare için 1×10^6 sayıda hücre ayrılarak 200 mikrolitre PBS içerisinde fareye enjekte edilmiştir.

Enjeksiyon için ilk önce fare kısıtlama cihazına yerleştirilmiş ve damarları genişletmek için 5-10 dakika boyunca sıcak (kırmızı) lambanın altına koyulmuştur.

- Kuyruk % 70'lik alkol ile ıslatılmış bir gazlı bezle silinmiş ve iki yanal kuyruk

damarından biri bulunmuştur.

- İğnenin eğimi yukarı bakacak ve damara hemen hemen paralel olacak şekilde, iğneyle kuyruk damarına girilerek hücreler damara enjekte edilmiştir.

3.2.2.3. Biyoluminesans görüntüleme

NSG farelere MM1S hücrelerin enjeksiyonundan sonra 10.,12.,15.,19.23.27. günlerde biyoluminesans görüntüleme yapılmıştır. Bunun için farelere intraperitoneal yolla fare başına 1,5 mg doz D-luciferin enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 10 dk sonra anestezi cihazında O₂ ve isoflurane karışımıyla fareler uyutulmuş ve Xenogen IVIS 50 cihazında görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucunda tutulum olduğu tespit edilen farelerde MM olduğu kabul edilerek ilaç tedavisine başlanmıştır.

3.2.2.4. MM Model ilaç uygulama grupları

MM olduğu saptanan farelerde farklı dozlarda ve farklı zaman aralıklarıyla XT5 uygulaması yapılarak doz optimizasyonu deneyleri yapılmıştır.

Böylelikle XT5'in etkin dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için MM olan farelerde 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarda XT5 uygulanmıştır. Çizelge 3.2 de farelerin gruplandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Farelerin gruplandırılması

Deney grupları	Gruptaki hayvan sayısı (n)
Kontrol (1 hafta)	n=2
5 mg/kg	n=2
10 mg/kg	n=2
BTZ+DEX	n=2

XT5'in etki gösterdiği sürenin belirlenebilmesi amacıyla, her gün ve haftanın belirli günleri uygulama yapılacak şekilde farklı sürelerde uygulama yapılmıştır. Kontrol grubu olarak, XT5 uygulanmayan MM fareler normal

yaşam süreleri boyunca takip edilmiştir. 15. Gün görüntülemesinde tümör oluşumu görülen farede 15-24. günler arası haftada 2 kez XT5 uygulanmış, 24. Günden itibaren her gün XT5 uygulanmıştır. 15. günde tümör başlangıcı görülen diğer farede, 15. Günden itibaren her gün XT5 uygulaması yapılmıştır. 15. Günde tümör başlangıcı görülen diğer bir farede haftada 2 kez 10 mg/kg XT5 uygulaması yapılmıştır. Miyelom grubundaki başka bir fareye 15. Gün tümör başlangıcı görülmüş ve o güne itibaren her gün 10 mg/kg XT5 uygulanmıştır.

Haftada iki gün uygulaması, pozitif kontrol grubuna verilen ilaçlar olan deksametazon ve bortezomibin literatürde uygulama sıklığı göz önüne alınarak seçilmiştir [138,139] .Bu ilaçların, miyelomlu farelere miyelom hastalarına da uygulanan yöntemle benzer şekilde haftanın 1., 4., 8. ve 11. günleri ilaç uygulaması yapılmıştır. Takip eden hafta ilaç uygulaması yapılmamış, bir sonraki hafta tekrar 1., 4., 8. ve 11. günler uygulama yapılmıştır.

Bortezomib ve deksametazon ilaçları, pozitif kontrol grubu olarak MM oluşan farelerde uygulanmıştır. Farelere uygulanan bortezomib ve deksametazon dozları benzer literatüre göre seçilmiştir.

3.2.2.5. Histopatolojik incelemeler

Nekropski sonrası farelerden çıkarılan karaciğer, böbrek, kalp, pankreas ve beyin dokuları %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde tespit edilmiştir. Ön-arka ekstremiteler ve kolumna vertebralis ise formalin solüsyonuna alınmadan önce hidroklorik asitli dekalsifikasyon solüsyonu ile dekalsifiye edilmiştir. Tespit edilen doku ve organlar yıkama işlemi ardından rutin doku takibine alınarak parafinde bloklanmıştır. Parafin bloklardan 4-5 mikronluk alınan kesitler hematoksilin-eozin (HE) ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.2.3. İstatistiksel analizler

Elde edilen sonuçlar, istatistiksel olarak SPSS Statistics for Windows programı ile yapılmıştır. Normal dağılıma uygunluğunun kontrol edilmesi

Saphiro-Wilk yöntemiyle araştırılmıştır. Dağılımı normal olan değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA), post-hoc karşılaştırmalarında Tukey testi kullanılmıştır. Farklılıklar $p < 0,05$ önem kontrolü düzeyinde tespit edilmiş, veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Genotoksisite testleri için, istatistiksel analizler GraphPad Prism 5 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Doz grupları ve kontrol arasında DNA hasar parametreleri açısından anlamlı farklılık olup olmadığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi için ANOVA çoklu varyans analizi ve gruplar arasındaki farklılığın karşılaştırılması için ise post test olarak Tukey testi kullanılmıştır. Anlamlı farklılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

4.SONUÇLAR

4.1 Sıçanlarda Toksikite Testleri Sonuçları

4.1.1. Vücut Ağırlıkları Ölçümü

XT5'in olası toksik etkilerinin belirlenebilmesi için 8-10 haftalık Wistar albino sıçanlara kontrol grubuna yağ olacak şekilde, XT5 gruplarına 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında XT5 uygulanmıştır. Akut ve uzun süreli etkilerin gözlemlenebilmesi amacıyla 1 haftalık ve 8 haftalık olmak üzere iki farklı uygulama süresi seçilmiştir. 8 haftalık gruptaki sıçanlar haftada bir, 1 haftalık gruptaki sıçanlar her gün tartılarak vücut ağırlıkları kaydedilmiştir. İki uygulama süresinde de gruplar arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Çizelge 4.1.'de 8 haftalık uygulama süresi boyunca yağ kontrol ve XT5 uygulama gruplarının başlangıç ve bitiş ağırlıkları verilmiştir. Sıçan ağırlıklarının 8 haftada değişimlerinin ortalama değerleri açısından grupları arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır. Çizelge 4.1'de 8 haftalık uygulama süresi boyunca yağ kontrol ve XT5 uygulama gruplarının başlangıç ve bitiş ağırlıkları ve ağırlık artışı gösterilmiştir. Şekil 4.1.'de kontrol grupları ve uygulama gruplarının ortalama kazandıkları vücut ağırlıklarına ait grafik gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. 8 haftalık uygulama süresi boyunca yağ kontrol ve XT5 uygulama gruplarının başlangıç ve bitiş ağırlıkları ve ağırlık artışı

Doz	Başlangıç Ağırlığı (g)	Bitiş Ağırlığı (g)	Ağırlık Artışı (g)
Kontrol	218,6±10,0	249,4±11,4	30,8±14,4
5 mg/kg	225,8±18,1	259,0±15,7	33,2±4,9
10 mg/kg	215,6±13,3	240,8±5,5	25,2±10,6
50 mg/kg	233,2±9,2	253,6±11,3	20,4±4,5

4.1.1. Biyokimyasal ve Hematolojik Analiz Sonuçları

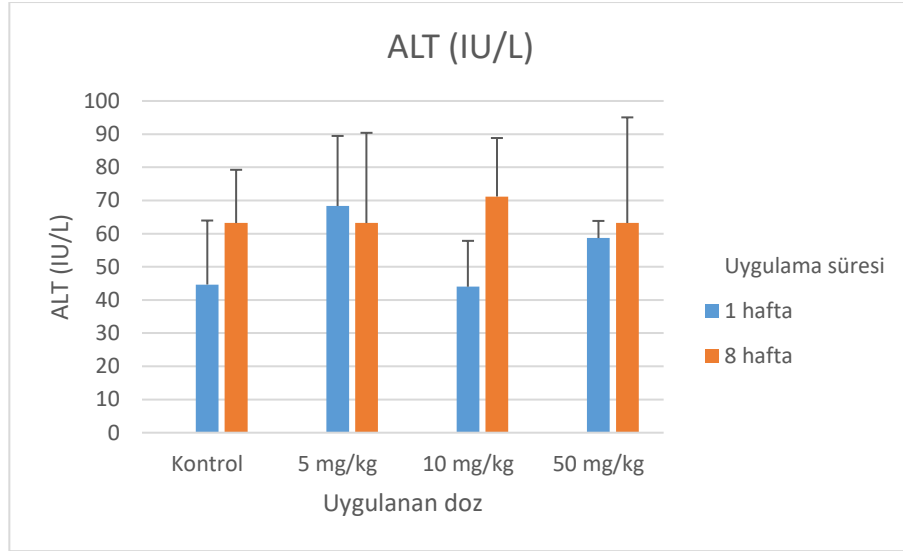
Uygulama süreleri sona erdikten sonra sakrifiye edilen sıçanların kan örneklerinde biyokimyasal ve hematolojik analiz sonuçları Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir. Kontrol grubu ve 5mg/kg, 10mg/kg ve 50 mg/kg XT5 uygulama gruplarının ALT ölçüm sonuçlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.2.'de 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının ALT analiz sonuçları verilmiştir. Sıçanların AST ölçümlerinin sonucunda, kontrol grubu ve 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg XT5 uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.3.'de 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının AST analiz sonuçları verilmiştir. Sıçanların 1 haftalık ve 8 haftalık uygulama süreleri sonucunda ölçülen total protein değerlerinde kontrol grubu ve 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg XT5 uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.4.'te 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının total protein analiz sonuçları gösterilmiştir. Sıçanların 1 haftalık ve 8 haftalık uygulama süreleri sonucunda ölçülen üre değerlerinde kontrol grubu ve 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg XT5 uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.5.'de 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının üre değeri analiz sonuçları gösterilmiştir. Sıçanların 1 haftalık ve 8 haftalık uygulama süreleri sonucunda ölçülen albümin değerlerinde kontrol grubu ve 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg XT5 uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Şekil 4.6.'da 1 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının albümin değeri analiz sonuçları verilmiştir. Şekil 4.7.'de 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının albümin değeri analiz sonuçları verilmiştir. Sıçanların 1 haftalık ve 8 haftalık uygulama süreleri sonucunda ölçülen GGT değerlerinde kontrol grubu ve 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg XT5 uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Çizelge 4.2. 1 haftalık uygulama süresi sonunda sıçanların biyokimyasal test sonuçları

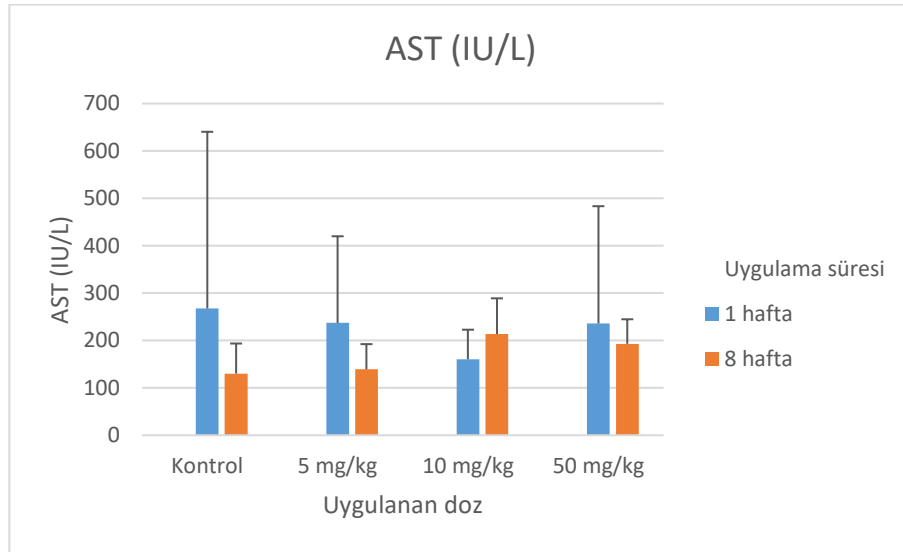
	Kontrol	XT5 (5 mg/kg)	XT5 (10 mg/kg)	XT5 (50 mg/kg)
ALT (IU/L)	93,33±86,64	129±102,5	44±5,57	58,67±2,08
AST (IU/L)	267,67±150,07	470,33±447,5	160,33±25,15	236±99,59
Total protein (g/dl)	7,34±0,29	6,94±0,46	6,91±1,69	7,5±0,79
Üre (mg/dl)	45,73±1,95	46,33±7,42	49±1,31	44,5±2,86
Albumin (g/dl)	5,07±0,24	5,15±0,38	5,21±0,49	5,35±0,1
GGT(IU/L)	2,33±2,08	1±1	0,67±0,58	1,33±1,53

Çizelge 4.3. 8 haftalık uygulama süresi sonunda sıçanların biyokimyasal test sonuçları

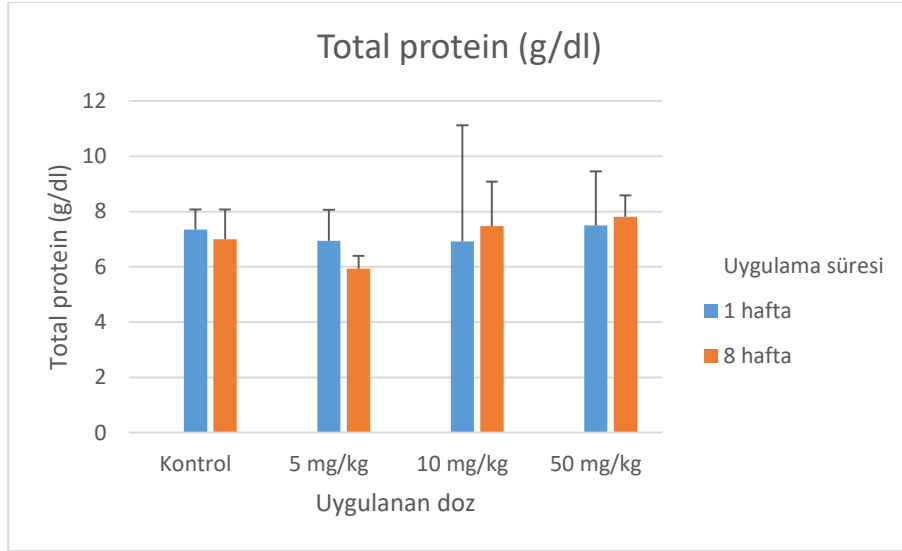
	Kontrol	XT5 (5 mg/kg)	XT5 (10 mg/kg)	XT5 (50 mg/kg)
ALT (IU/L)	63,2±12,93	63,2±21,9	71,2±14,2	63,2±25,66
AST (IU/L)	130,2±51,08	139,2±42,77	213,4±60,87	193±41,73
Total protein (g/dl)	7±0,86	5,93±0,37	7,48±1,29	7,8±0,63
Üre (mg/dl)	48,56±6,94	48,86±7,68	45,8±4,63	49,84±7,86
Albumin (g/dl)	N/A	N/A	5,8±1,29	4,42±1,91
GGT(IU/L)	1±0	0,4±0,55	2,06±1	0,88±0,88



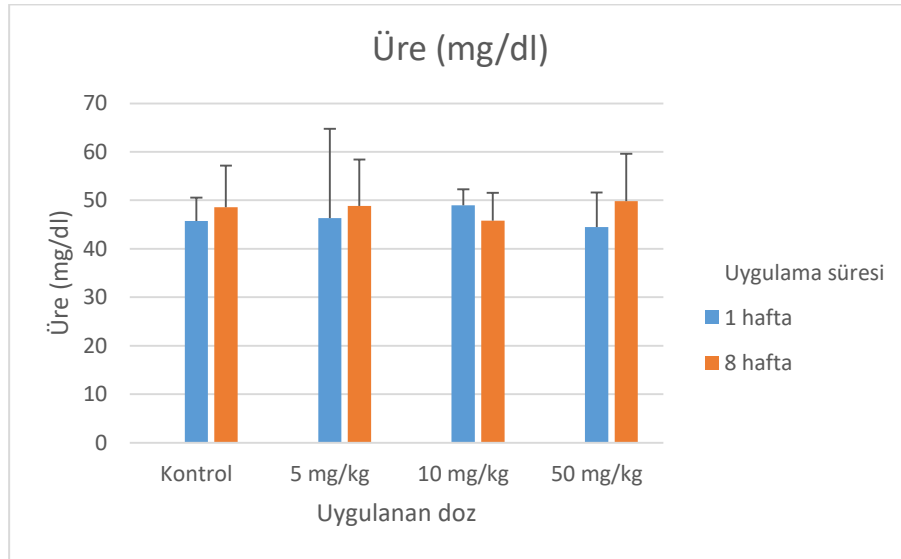
Şekil 4.2. 1 ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının ALT analiz sonuçları



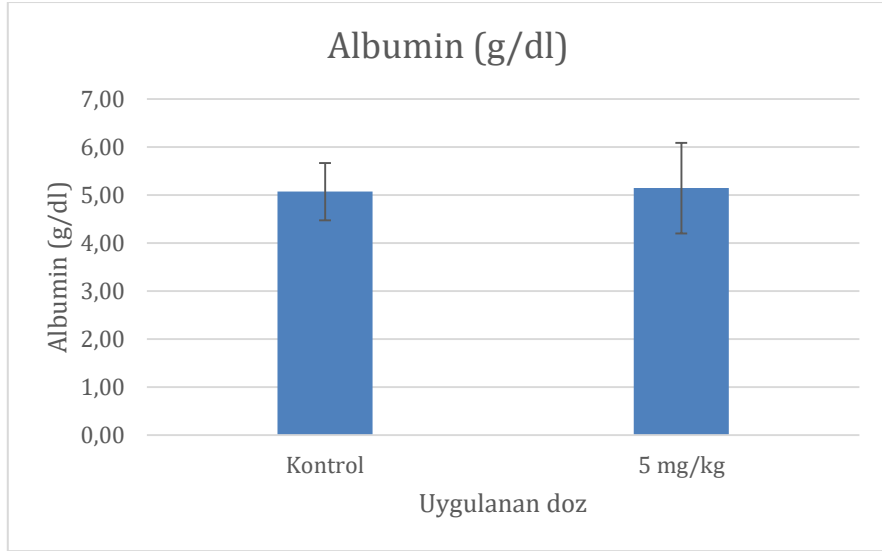
Şekil 4.3. 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının AST analiz sonuçları



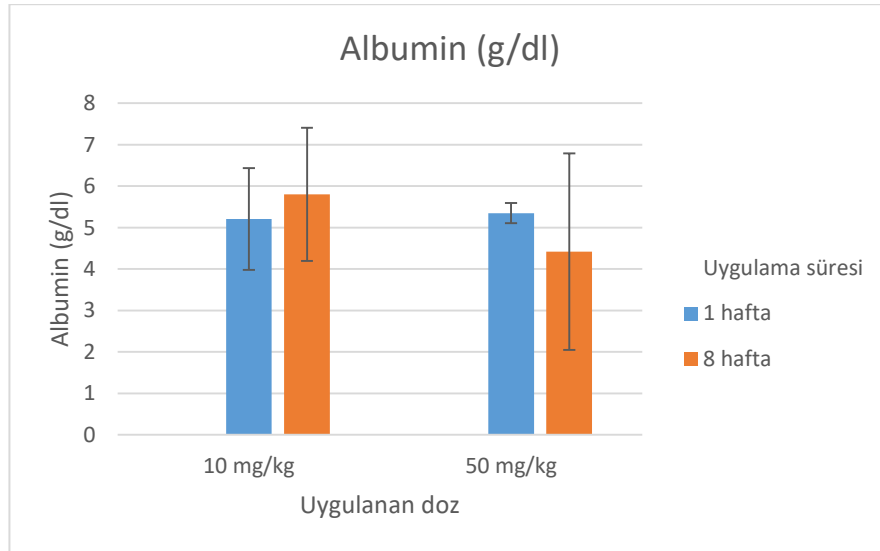
Şekil 4.4. 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının total protein analiz sonuçları



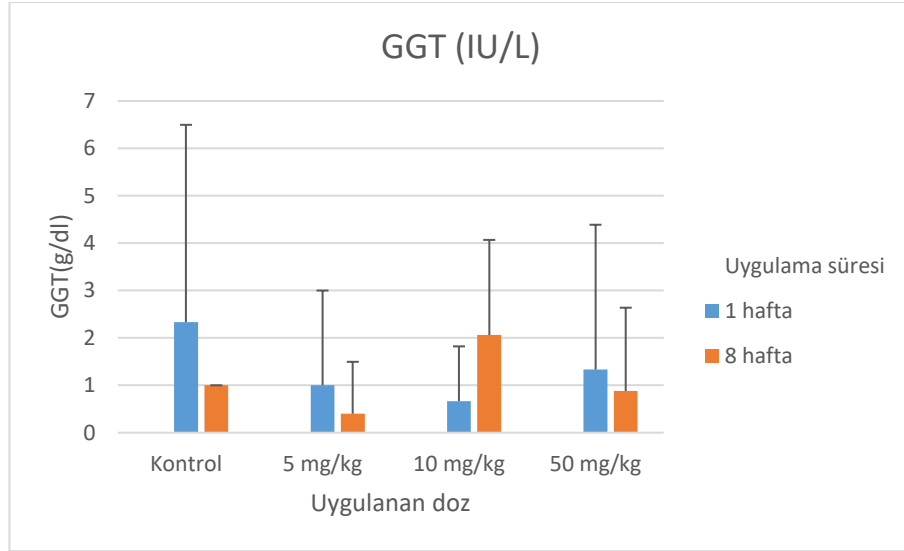
Şekil 4.5. 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının üre analiz sonuçları



Şekil 4.6. 1 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının albümin analiz sonuçları



Şekil 4.7. 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının albümin analiz sonuçları



Şekil 4.8. 1 haftalık ve 8 haftalık süre sonunda kontrol grubu ve uygulama gruplarının GGT değeri analiz sonuçları

Çizelge 4.3. 1 haftalık uygulama süresi sonunda sıçanların tam kan analiz sonuçları

	Kontrol	XT5 (5 mg/kg)	XT5 (10 mg/kg)	XT5 (50 mg/kg)
Lökosit($10^9/l$)	4,6±2,2	2,8±1,8	5,3±0,4	2,9±2,5
Lenfosit ($10^9/l$)	3,5±1,6	2,2±1,4	4,3±0,31	2,3±1,9
Monosit ($10^9/l$)	0,2±0,17	0,7±0,12	0,1±0,6	0,1±0,15
Eritrosit ($10^{12}/l$)	4,0±2,3	6,7±0,7	6,3±1,1	4,9±2,4
Hemoglobin(g/dl)	9,6±2,79	13,5±2,3	12,5±1,8	10,3±4,9
Hematokrit %	25,8±10,9	36,7±4,8	34,1±5,7	26,3±13,9
MCV (fl)	52,5±10,9	54,5±1,1	54,±1,5	53,4±0,5
MCH (pg)	31,9±20,2	20,3±1,0	20,3±1,1	21,1±0,6
MCHC (g/dl)	29,8±8,2	36,7±1,74	36,9±1,73	39,3±1,53
Trombosit ($10^9/l$)	523,6±300,9	168,3±79	451,7±13,3	194,3±45,2

Çizelge 4.4 8 haftalık uygulama süresi sonunda sıçanların tam kan analiz sonuçları

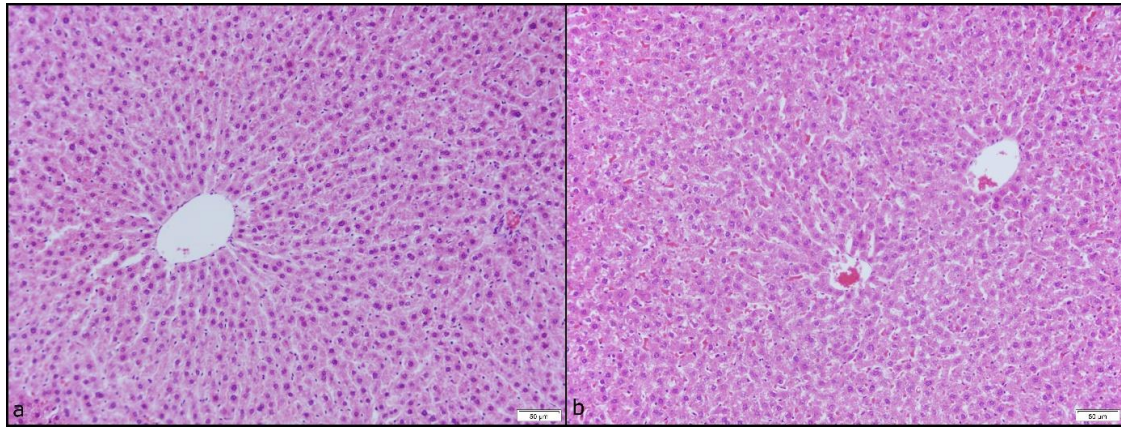
	Kontrol	XT5 (5 mg/kg)	XT5 (10 mg/kg)	XT5 (50 mg/kg)
Lökosit (10⁹/l)	4,7±2,2	2,8±1,83	5,37±0,4	2,9±2,5
Lenfosit (10⁹/l)	3,7±1,6	2,2±1,46	4,37±0,31	2,3±1,9
Monosit(10⁹/l)	0,2±0,17	0,1±0,12	0,7±0,06	0,13±0,15
Eritrosit (10¹²/l)	4,5±2,5	6,7±0,79	6,31±1,19	4,9±2,4
Hemoglobin (g/dl)	9,5±2,7	13,5±2,31	12,5±1,8	10,3±4,8
Hematokrit %	25,3±10,9	36,7±4,8	34,3±5,71	26,53±13,59
MCV (fl)	52,5±10,9	54,7±1,17	54,3±1,55	53,4±0,56
MCH (pg)	31,9±20,2	20,3±1,05	20,03±1,1	21,1±0,64
MCHC (g/dl)	29,7±8,2	36,7±1,74	36,9±1,73	39,63±1,53
Trombosit (10⁹/l)	52,7±300,6	168,3±79	451,67±132,3	194,3±45,5

4.1.2. Histopatolojik İncelemeler

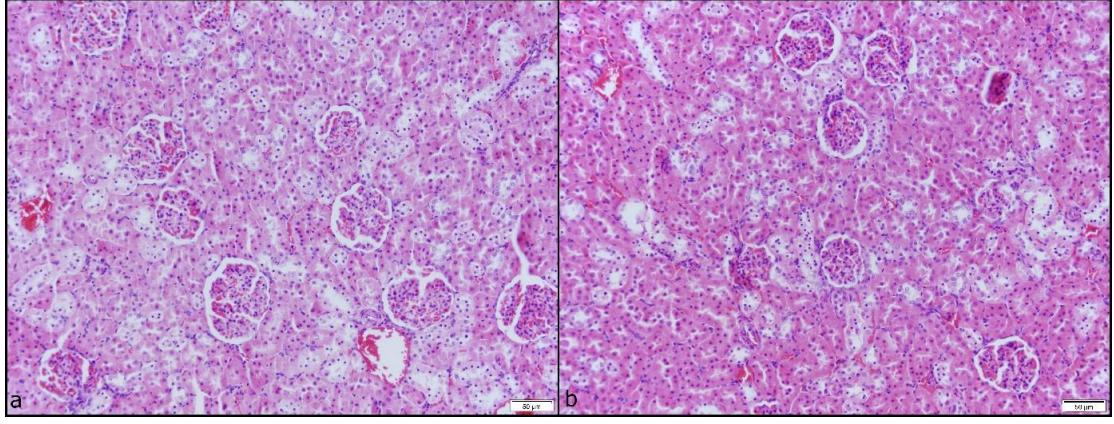
Sıçanlar uygulama sürelerinin sonunda sakrifiye edilerek yapılan nekropsi sonrasında çıkarılan organlardan hazırlanan histolojik kesitler (karaciğer, böbrek, kalp, pankreas, akciğer, beyin) ışık mikroskopunda incelenmiştir.

1 hafta uygulama süresi sonunda kontrol grubu ve 5mg/kg XT5 grubu karaciğerin genel histolojik görünümü Şekil 4.14.'de verilmiştir. 1 hafta uygulama süresi sonunda kontrol grubu ve 5 mg/kg XT5 grubu böbreğin genel histolojik görünümü Şekil 4.15.'te verilmiştir. 1 hafta uygulama süresi sonunda kontrol grubu ve 5mg/kg XT5 grubu kalp kasının genel histolojik görünümü Şekil 4.16.'da verilmiştir. 1 haftalık uygulama süresi sonunda kontrol grubu ve 10 mg/kg XT5 grubu pankreasın genel histolojik görünümü Şekil 4.17.'da

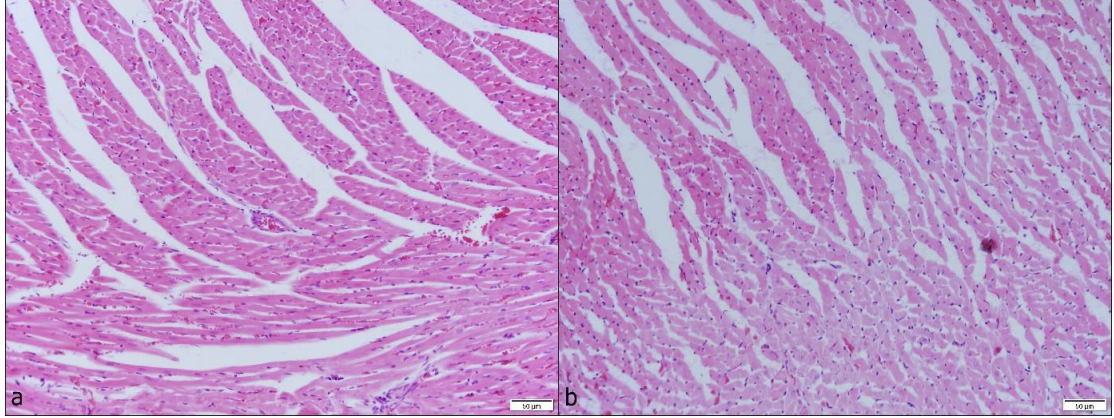
verilmiştir. Kontrol grubu ve 50mg/kg XT5 grubu beyin talamus genel histolojik görünümü Şekil 4.18.'de verilmiştir. Kontrol grubu ve 10mg/kg XT5 grubu akciğerin genel histolojik görünümü Şekil 4.19.'da verilmiştir. 8 hafta uygulama süresi sonunda kontrol ve 10 mg/kg XT5 grubuna ait akciğerin genel histolojik Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.



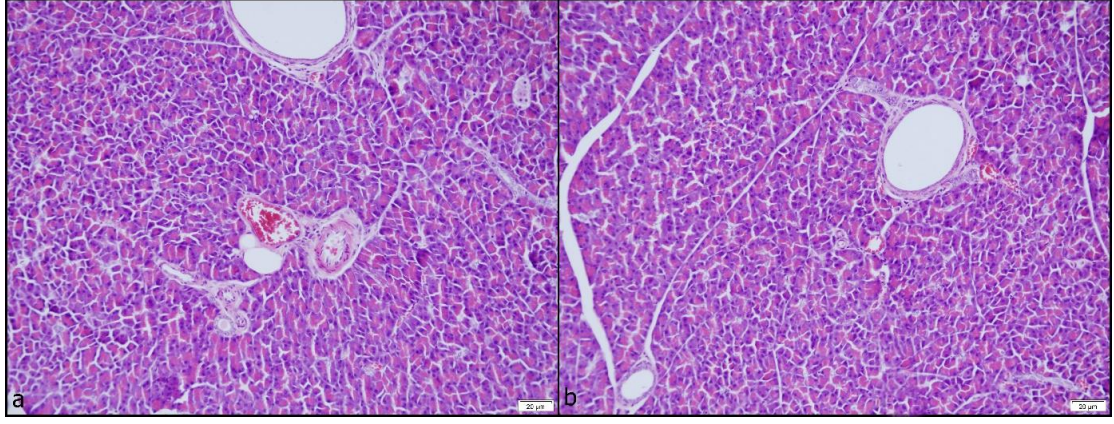
Şekil 4.14. 1 haftalık uygulama süresi sonunda kontrol grubu (a) ve 5 mg/kg XT5 grubu (b) karaciğerin genel histolojik görünümü. H&E X400



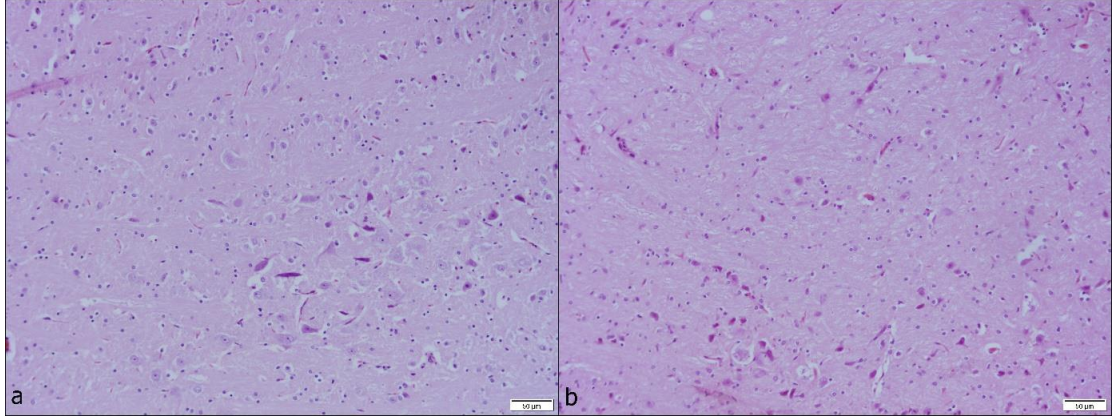
Şekil 4.15. Kontrol grubu (a) ve 5 mg/kg XT5 grubu (b) böbreğin genel histolojik görünümü. H&E X400



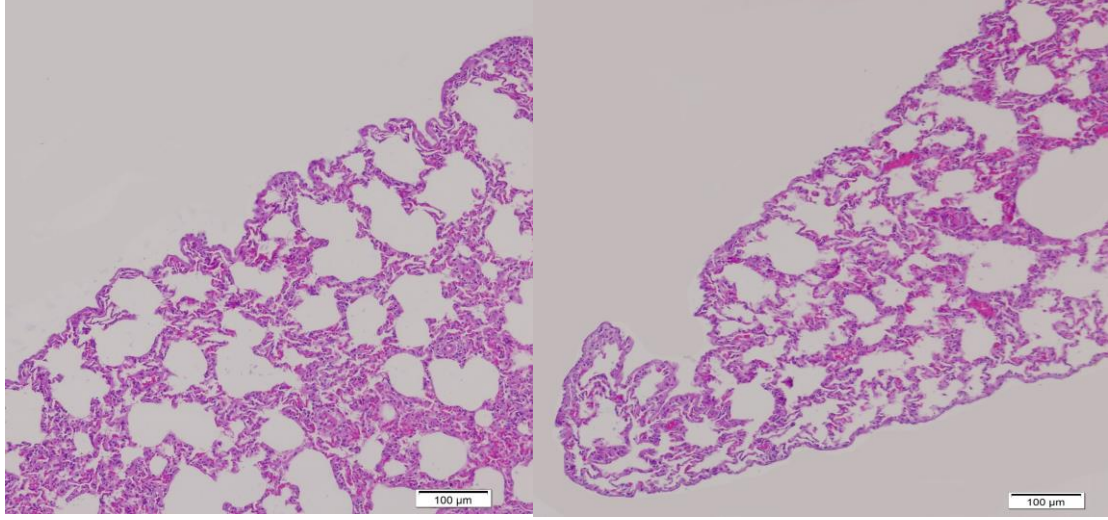
Şekil 4.16. Kontrol grubu (a) ve 5 mg/kg XT5 grubu (b) kalp kasının genel histolojik görünümü. H&E X400



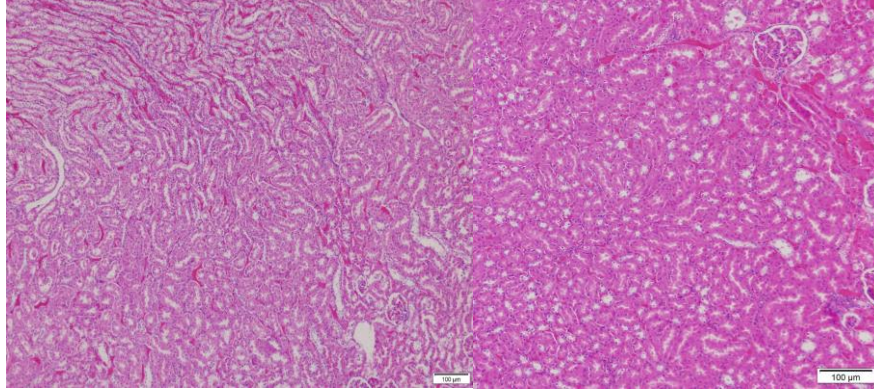
Şekil 4.17. 1 hafta uygulama süresi sonunda kontrol grubu (a) ve 10 mg/kg XT5 grubu (b) pankreasın genel histolojik görünümü. H&E x400



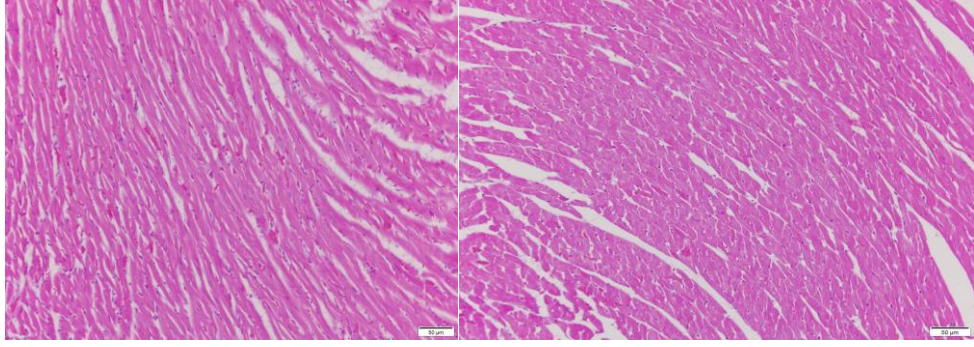
Şekil 4.18. 1 hafta uygulama süresi sonunda kontrol grubu (a), 50 mg/kg XT5 grubu (b) beyin talamus bölgesinin genel histolojik görünümü. H&E X200



Şekil 4.19. 8 hafta uygulama süresi sonunda kontrol grubu ve 10 mg/kg XT5 grubu akciğerin genel histolojik görünümü. H&E X100



Şekil 4.20. 8 hafta uygulama süresi sonunda kontrol ve 50 mg/kg XT5 grubuna ait böbreğin genel histolojik görünümü. H&E X100



Şekil 4.21. 8 hafta uygulama süresi sonunda kontrol ve 50 mg/kg XT5 grubuna ait kalbin genel histolojik görünümü. H&E X100

4.1.3. Komet testi sonuçları

1 hafta ve 8 hafta süresince 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında XT5 uygulanan sıçanların lenfositlerinde olası DNA hasarı alkali komet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kuyruk uzunluğu , kuyruk yoğunluğu, ve kuyruk momenti parametreleri şeklinde gösterilmiştir.

Kuyruk uzunluğu verileri incelendiğinde, hem 1 haftalık hem de 8 haftalık uygulama sonucunda değerlendirilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p < 0.0001$) görülmesine rağmen, kontrol grubu ve dozlar karşılaştırıldığında uygulanan hiç bir dozun kuyruk uzunluğunu artırmadığı gözlenmiştir. Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu verileri Şekil 4.20'de verilmiştir.

KUYRUK UZUNLUĞU	1.HAFTA				8.HAFTA			
	kontrol	5mg	10mg	50mg	kontrol	5mg	10mg	50mg
n	300	300	300	300	500	500	500	500
Ortalama	47,06	50,55	44,54	43,88	50,13	47,07	42,34	40,06
Standart sapma	10,88	18,04	11,89	10,83	23,03	21,86	9,132	7,826
Kontrole göre artış (Kat)		1,07	0,95	0,93		0,94	0,84	0,80
p Değeri	< 0.0001				< 0.0001			

1.HAFTA KUYRUK UZUNLUĞU

gruplar

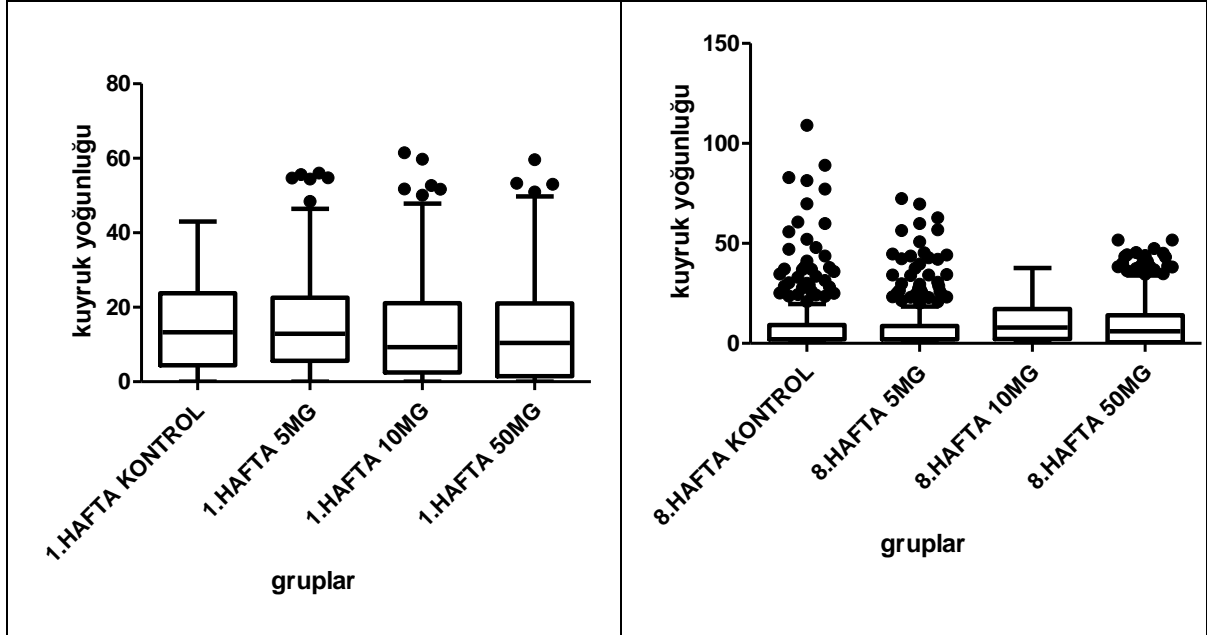
8.HAFTA KUYRUK UZUNLUĞU

gruplar

Şekil 4.19. Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların periferel kan lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu verileri

Kuyruk yoğunluğu verileri incelendiğinde, 1 haftalık uygulama sonucunda değerlendirilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p= 0.009$) görülmesine rağmen, kontrol grubu ve dozlar karşılaştırıldığında uygulanan hiç bir dozun kuyruk yoğunluğunu artırmadığı gözlenmiştir. 8 haftalık uygulama sonucunda ise değerlendirilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p> 0.05$) görülmemektedir. Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk yoğunluğu verileri şekil 4.20’de gösterilmiştir.

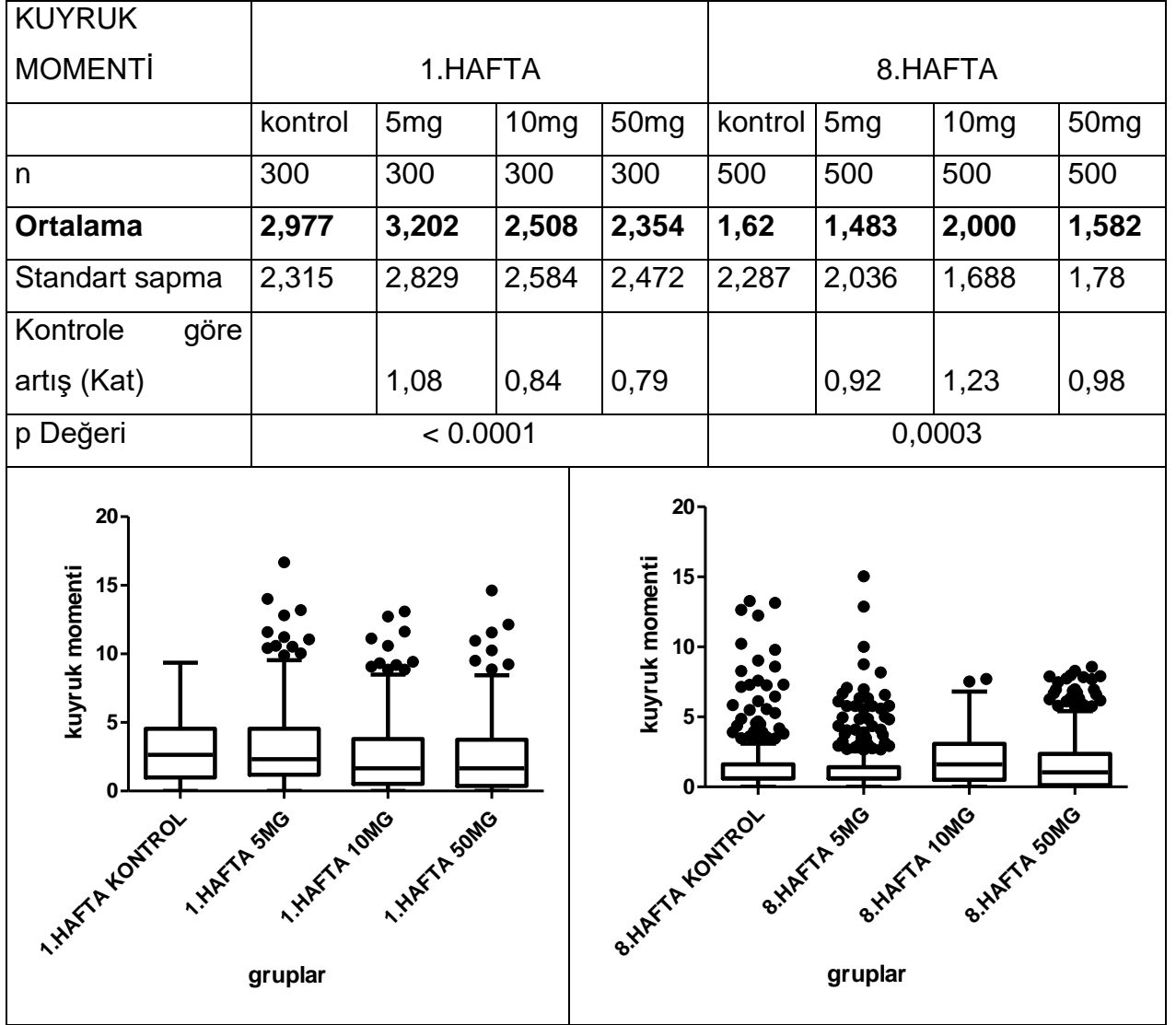
KUYRUK YOĞUNLUĞU	1.HAFTA				8.HAFTA			
	kontrol	5mg	10mg	50mg	kontrol	5mg	10mg	50mg
n	300	300	300	300	500	500	500	500
Ortalama	15,23	15,78	13,41	13,03	9,668	8,64	10,56	9,192
Standart sapma	11,78	12,59	14,05	12,95	16,46	13,22	9,23	10,45
Kontrole göre artış (Kat)		1,04	0,88	0,86		0,89	1,09	0,95
p Değeri	0,009				0,1299			



Şekil 4.20. Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların periferal kan lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk yoğunluğu verileri

Kuyruk momenti verileri incelendiğinde, hem 1 haftalık hem de 8 haftalık uygulama sonucunda değerlendirilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p < 0.05$) görülmesine rağmen, kontrol grubu ve dozlar karşılaştırıldığında uygulanan hiç bir dozun kuyruk momentini artırmadığı

gözlenmiştir. Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk momenti verileri şekil 4.21' de gösterilmiştir.



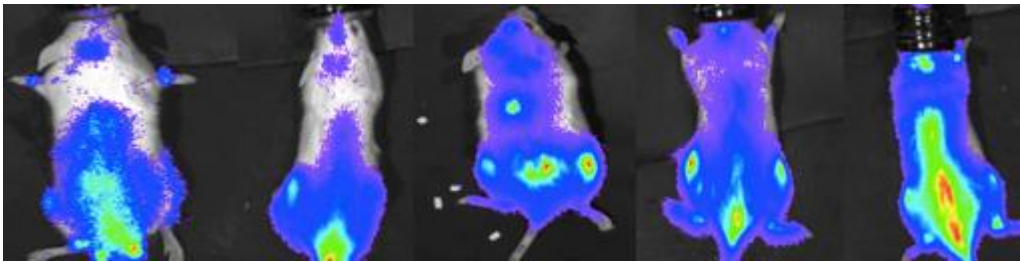
Şekil 4.21. Farklı dozlarda XT5 uygulanan sıçanların periferel kan lenfositlerinde komet testi sonucu elde edilen kuyruk momenti verileri

4.2. NSG farede MM model oluşumu ve XT5 etkinliği

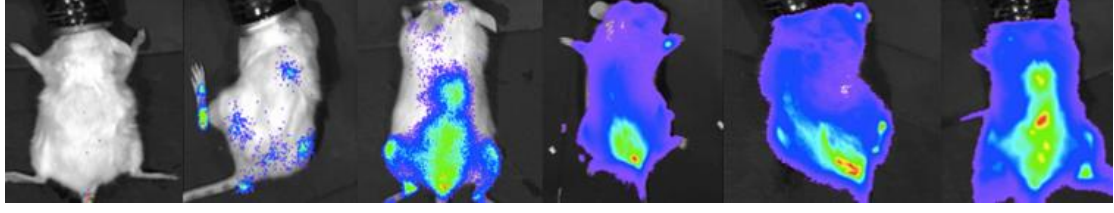
4.2.1. Farede MM1.S hücre enjeksiyonunu takiben biyoluminesans görüntüleme ile tümör takibi

NSG farelere MM.1S hücrelerin enjeksiyonundan sonra 10.,12.,15.,19.,23. ve27. günlerde bioluminesans görüntüleme yapılmıştır. XT5 in 10 mg/kg uygulama başlangıcında farede miyelom yükünün düşük düzeyde olması nedeniyle bu sonuçlar sadece XT5 toksisitesi amacıyla değerlendirmeye alınmıştır. Farelerden 15. gün bioluminesans görüntülemesinde tümör başlangıcı görülene o gün başlayarak her gün 5 mg/kg XT5 uygulaması yapılmıştır. Farenin 18. gün görüntülemesinde tümörün yayılmadığı, 22. gün görüntülemesinde ise tümörün yok olduğu görülmüştür.

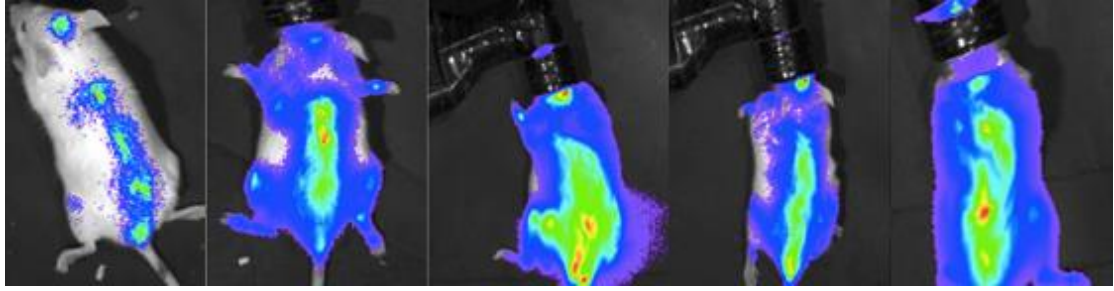
Miyelom grubundaki diğer bir fareye 15 gün görüntülemesinde tümör başlangıcı görülmüş ve haftada 2 kez 10 mg/kg XT5 uygulamasına başlanmıştır. Farenin 19. , 24. ve 28. günlerinde yapılan görüntülemelerde tümörde gerilemenin olmadığı görülmüştür. 15. gün yapılan bioluminesans görüntülemesinde tümör başlangıcı görülen fare 6'ya, her gün uygulama yapılacak şekilde 10mg/kg XT5 verilmiştir. Farenin 18. gün görüntülemesinde tümör boyutunun küçüldüğü, 22. gün görüntülemesinde tümörün tamamen kaybolduğu görülmüştür. Şekil 4.22. de Kontrol grubunda bulunan farenin 12. 15. 19. 22. ve 27. gününe ait bioluminesans görüntüleri verilmiştir.



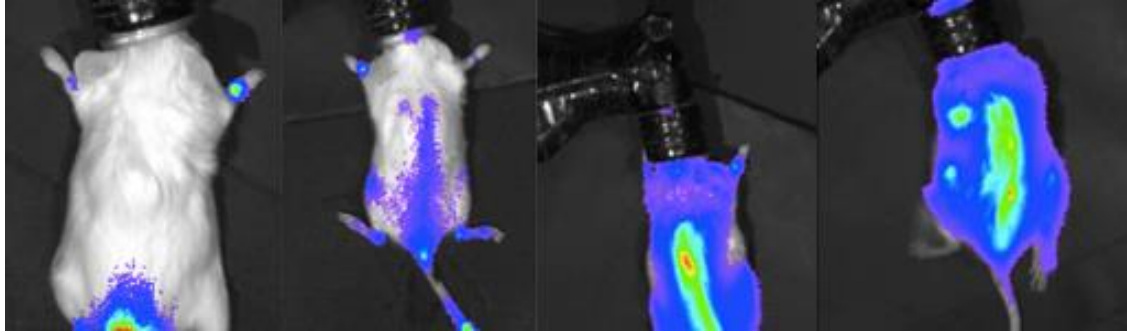
Şekil 4.22. Kontrol grubunda bulunan farenin 12. 15. 19. 22. ve 27. gününe ait bioluminesans görüntüleri



Şekil 4.23. Kontrol grubunda bulunan farenin 10. 12. 15. ve 19. Gününe ait biyolüminesans görüntüleri



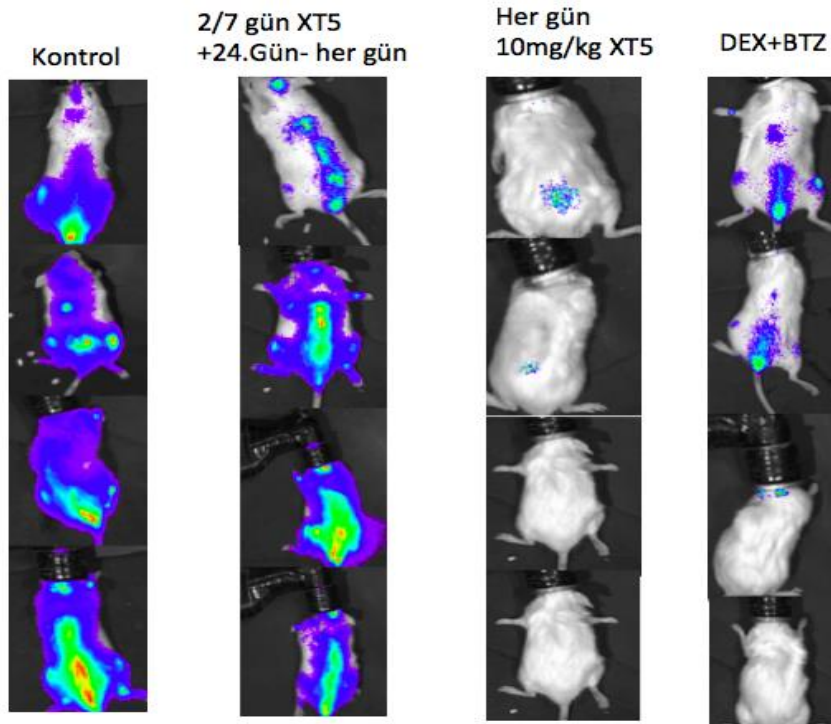
Şekil 4.24. 5 mg/kg XT5 uygulama grubunda bulunan farenin 12. 15. 19. 22. ve 27. gününe ait biyolüminesans görüntüleri



Şekil 4.25. 10 mg/kg XT5 (haftada iki kez) uygulama grubunda bulunan farenin 15. 19. 24. ve 28. Gününe ait biyolüminesans görüntüleri



Şekil 4.26. 10 mg/kg XT5 (her gün) uygulama grubunda bulunan farenin 15.18. 22. ve 24.gününe ait biyoluminesans görüntüleri



Şekil 4.27. MM1S uygulamasının 10-15. gününden başlayarak ilaç uygulanmayan (kontrol), farklı doz ve sıklıkta XT5 ile Deksametazon ve Bortezomib uygulama sonrası bioluminisans görüntüleme sonuçları

4.2.2. Farelerin vücut ağırlıkları

Miyelom modeli oluşturulan tüm NSG farelerin 7., 10.,15.,19.,21.,24. ve 27. günlerde vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Kontrol gruplarında kilo kaybının ilaç uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Çizelge 4.5.'de farelerin vücut ağırlıkları verilmiştir.

Çizelge 4.5. Farelerin vücut ağırlıkları

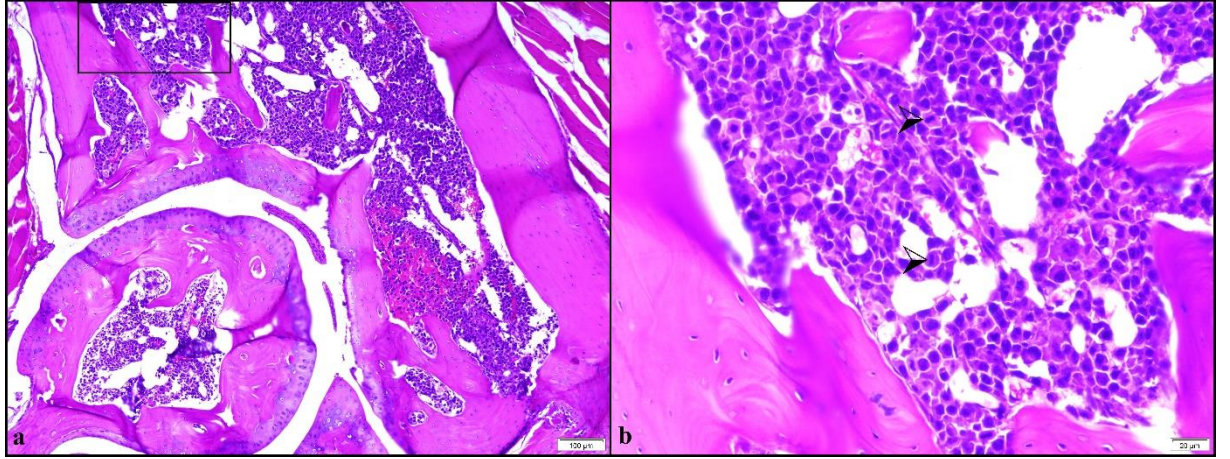
Grup	Başlangıç Ağırlığı (g)	Bitiş Ağırlığı (g)	Kilo kaybı (g)
Kontrol	22,3±2,1	18,4±1,4	3,8±1,4
5 mg/kg	25,8±1	21,9±1,7	3,2±0,9
10 mg/kg	21,6±3,3	20,8±1,5	1,2±0,6
BTZ+DEX	23,2±1,2	21,6±1,3	1,4±0,5

MM modeli oluşturulan bütün farelerin kemik iliklerinin incelenmesinde kemik iliğinde atipik, oval şekilli, büyük bazofilik sitoplazmalı, çekirdeğin ekzantirik yerleşim gösterdiği ve hiperkromatik boyandığı, pleomorfizm gösteren neoplastik plazma hücreleri gözlenmiştir. XT5 uygulaması yapılan farelerde mitotik indeksin yüksek olduğu gözlenirken, DEX+BTZ grupları ve XT5 uygulanan farelerde daha az mitotik aktivite görülmüştür.

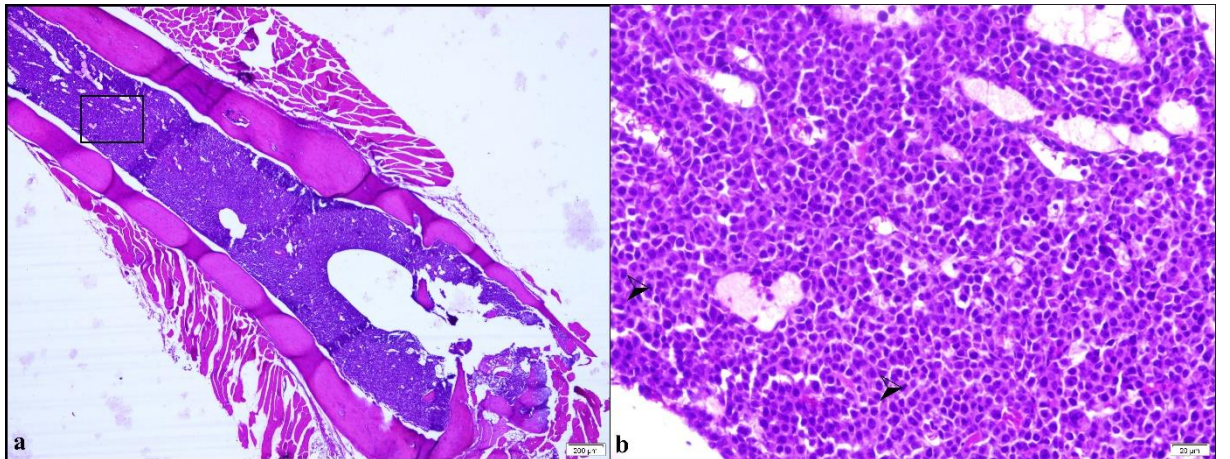
XT5 uygulaması yapılmayan kontrol grubuna ait fare 1'de ön ekstremitte (skapula, humerus, radius-ulna), arka ekstremitte (femur, tibia-fibula), servikal, torakal ve lumbal vertebra kemik iliğinin atipik özelliklere sahip, geniş bazofilik sitoplazmalı, yuvarlak/oval hiperkromatik ekzantrik yerleşimli çekirdeğe sahip, anizositozis ve anizonükleozis gösteren plazma hücrelerinden oluştuğu gözlenmiştir. Yağ dokusu çoğu sahada gözlenmezken, kemik iliğinde damarlaşma dikkati çekmiştir. Neoplazik hücrelere tek tük megakaryosit, nötrofil lökosit ve lenfosit eşlik ettiği görüntülenmiştir. Skapulada kemik iliğindeki neoplazik hücreler çevredeki kaslar arasına invaze olmuş şekilde ve servikal vertebrada bir bölgede kemik dokuda osteolitik değişiklikler

gözlenmiştir. Ayrıca servikal ve lumbal vertebralarda medulla spinaliste ve kaslarda kanama alanlarına rastlanmıştır.

Böbrekte, korteksteeki tübüller ve glomeruluslar arasında fokal odak halinde ve böbrek çevresi yağ dokuda damar etrafında; pankreasta tamamen bir loba infiltrate olmuş durumda; midede lamina propriyada bezler arasında ve karaciğerde tek tük sinuzoidlerde benzer morfolojik özelliklere sahip neoplazik myeloid hücreler dikkati çekmiştir.

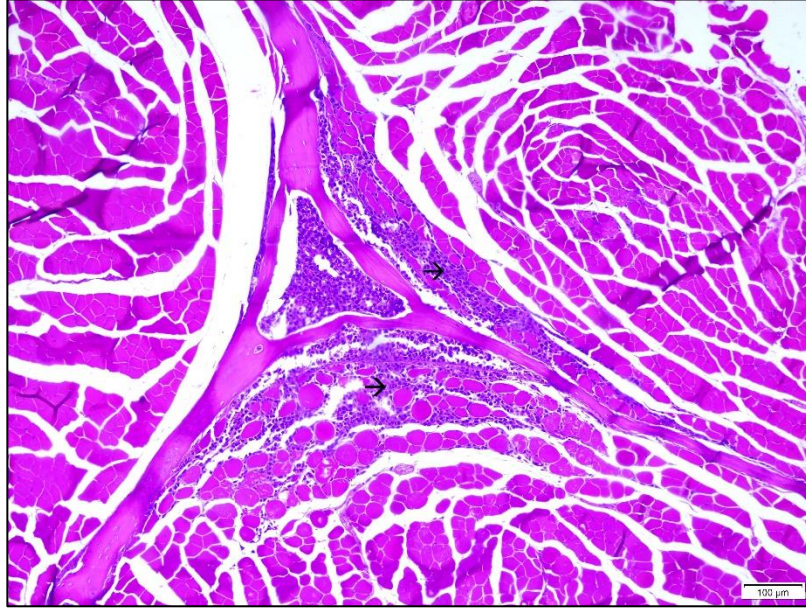


Şekil 4.28. Kontrol grubunda sol humerus-radius/ulna birleşiminde kemik iliğinde yer alan neoplazik hücrelerin genel görünümü (a), a'da kare ile büyütülen alan (b), mitotik aktivite gösteren neoplazik hücreler (ok başları). H&E X400

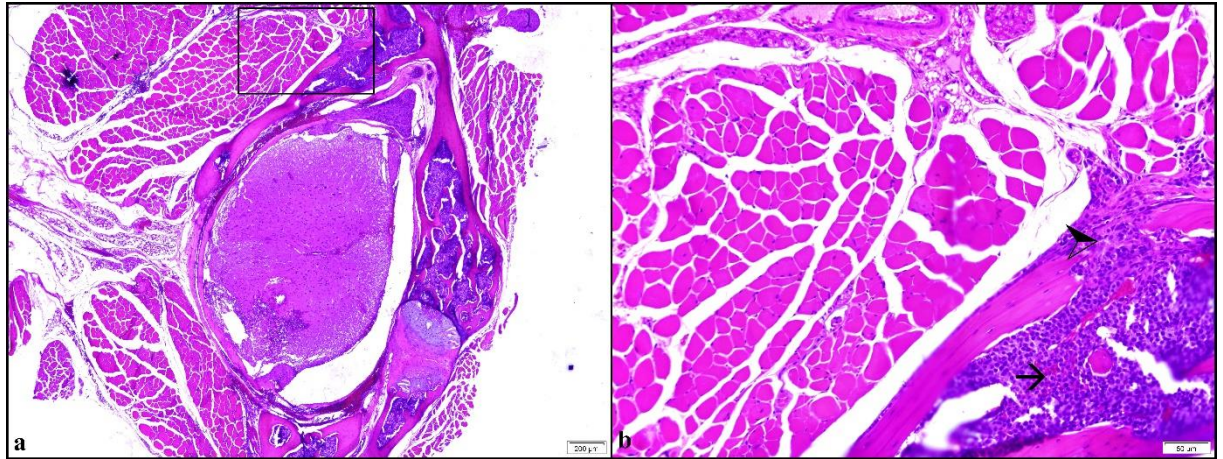


Şekil 4.29. Kontrol grubunda sağ femur kemik iliğinde yer alan neoplazik hücrelerin genel görünümü (a), a'da kare ile büyütülen alan (b),

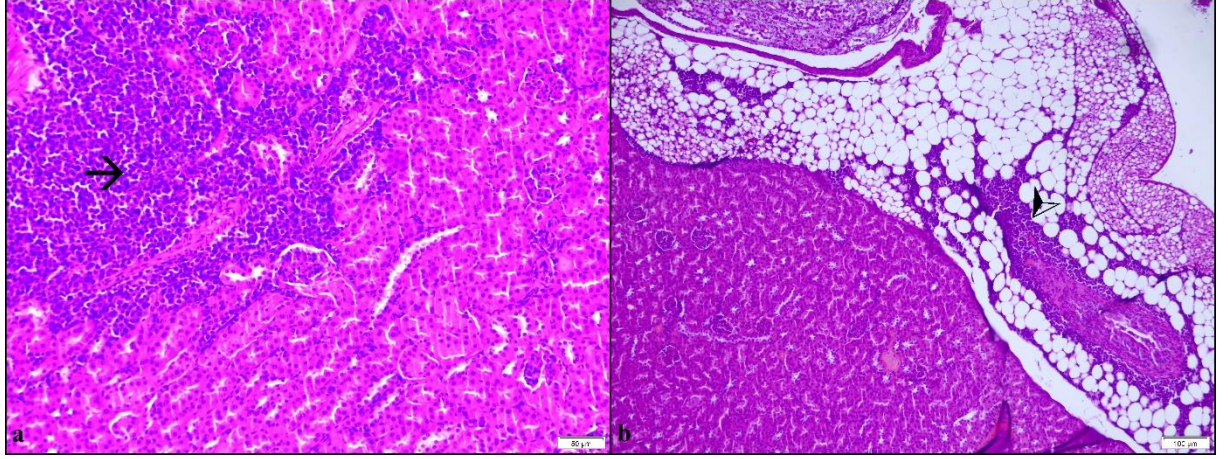
mitotik aktivite gösteren neoplazik hücreler (ok başları). H&E
X400



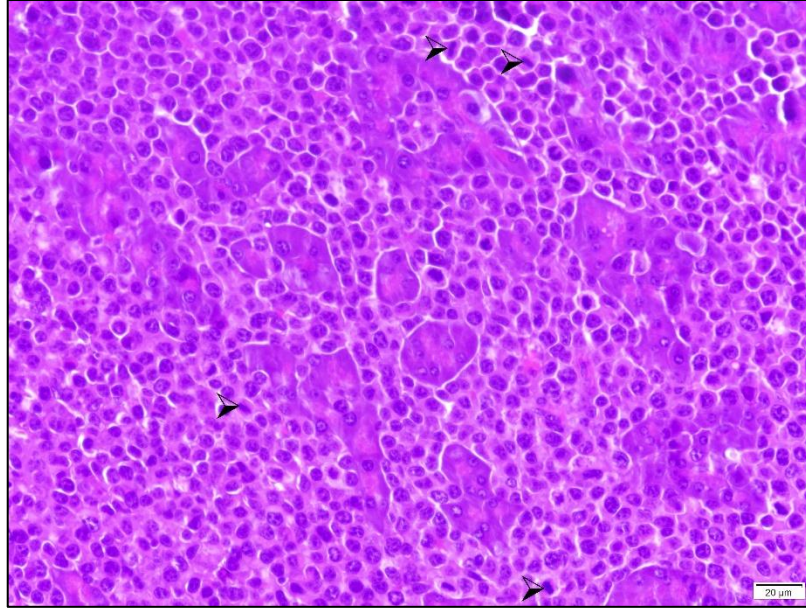
Şekil 4.34. Kontrol grubunda sağ skapula, çevre kas dokuya invaze olmuş neoplazik hücreler (oklar). H&E X400



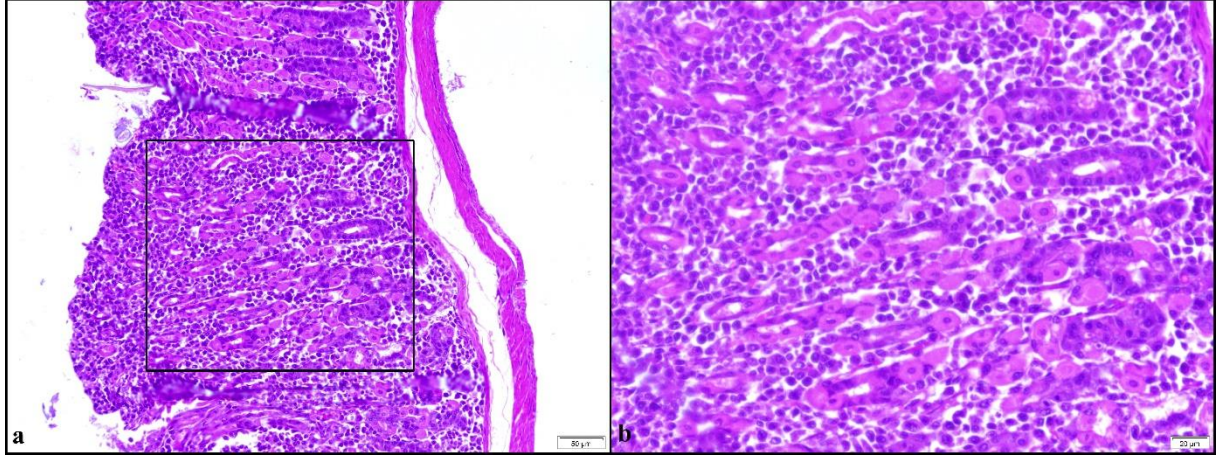
Şekil 4.35. Kontrol grubunda servikal vertebra, kemik iliğinde yer alan neoplazik hücrelerin genel görünümü (a), a'da kare ile büyütülen alan (b), neoplazik hücreler (ok), kemikte osteolitik değişiklik (ok başı). H&E X400



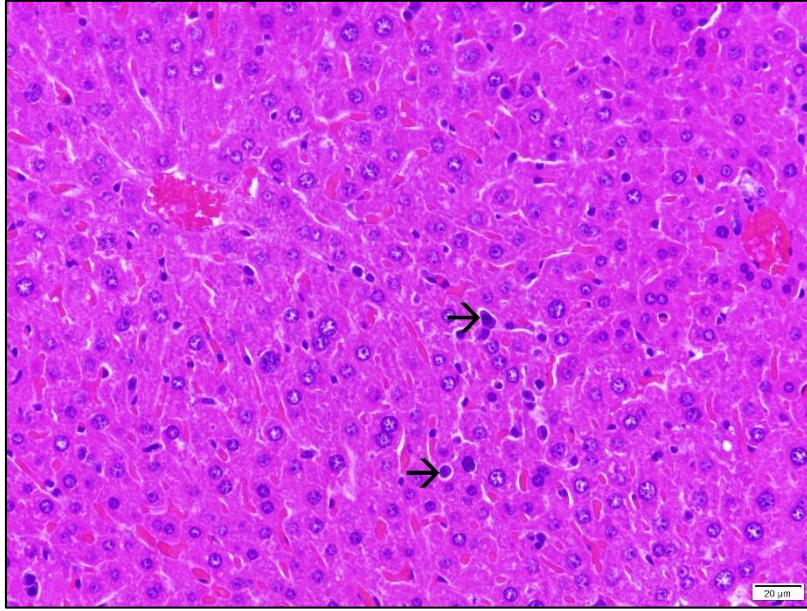
Şekil 4.36. Kontrol grubunda böbrek, tubülüs ve glomeruluslar arasında neoplazik hücreler (ok) (a). Böbrek çevresi yağ dokuda damar çevresindeki neoplazik hücre grubu (ok başı) (b). H&E X400



Şekil 4.37. Kontrol grubunda pankreas asinuslar arasındaki neoplazik hücrelerdeki mitoz (ok başları). H&E X400



Şekil 4.38. Mide lamina propriyada bezler arasındaki neoplazik hücrelerin genel görünümü(a), a'da kare ile büyütülen alan (b). H&E X400



Şekil 4.39. Karaciğer sinuzoidlerde neoplazik hücrelerin görünümü (oklar). H&E X400

TARTIŞMA VE SONUÇ

Multipl Miyelom ile ilgili son yıllarda yeni ilaç geliştirilmesi dirençli hastalık gelişimine büyük katkılar sağlamıştır. Geleneksel tedavi yöntemlerinin ve nakillerin etkilerinin yetersiz kaldığı dirençli hastalığın tedavisi için, başarılı hayvan modelleri bu araştırmalara hız kazandırmaktadır [138,139].

Multipl miyelomda oluşan habis plazma hücrelerinin çoğalmasının, büyük oranda içinde bulunduğu mikroçevreyle (osteoblast, osteoklast, endotelial hücreler ve kemik iliği stromal hücreler) olan bağlantısıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Söz konusu bu etkileşim hastalıkta sıklıkla karşılaşılan ilaç direncinin gelişmesinde de rol oynamaktadır [140]. Ancak bu etkileşimler aynı zamanda kemik iliği mikroçevresi için zarar verici de olabilmektedir.

Multipl miyelom tedavisinde günümüzde kullanılan ilaçlardan proteazom inhibitörleri ve immünmodülatör ilaçlar, öne çıkmaktadır. Bu kategorideki ilaçlar, tümör hücrelerine avantaj sağlayan birçok yolağı etkileyebilmektedirler.

Apoptotik yolları aktive eden yapıları sayesinde proteazom inhibitörleri, nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) inhibisyonunu tetiklemektedirler. Bunun sonucunda da anjiyogenezi, sitokin sinyalizasyonunu ve hücre göçünü önlemektedirler. İmmünmodülatör grubundaki ajanlar da apoptozu tetikleyici, etkilerinin yanında tümör hücreleriyle savaşacak T lenfosit ve doğal katil hücrelerin immün yanıtını arttırmaları [142].

Türkiye SGK verileri üzerinde yapılan bir araştırmada miyelom hastalarının yaşam analizleri sonucunda 2011'de ortalama yaşam süresinin 3 yıl iken son yıllarda bunun 7-8 yıla uzadığı, hastaların çoğunun çok masraflı tedavilere rağmen ülke ortalama yaşam süresine ulaşamadığı görülmüştür [143]. Sonuç olarak, yeni terapötik gelişmeler sağkalım süresini arttırılmasına büyük bir katkı sağlanmış olsa da MM'de yanıt oranları halen % 20'yi geçmemektedir. Bu nedenlerle kesin etkili ve yan etkisi en aza indirilmiş yeni türevlerin keşfine yönelik yeni ilaç geliştirme çalışmalarına gereksinim vardır.

AÜ Eczacılık Fakültesinde yapılan çalışmalar sonucunda Heparin benzeri etkili bir ilaç molekülü arayışı sırasında birçok yeni molekül bulunmuştur. PAR1'e bağlanarak kanser hücresinin mikroçevreden aldığı desteği kesebilecek olan aday moleküller arasından, yeni N-(2-hidroksi-4 nitrofenil)-4 etil benzamid (XT5) molekülü, insan MM hücre dizilerine karşı en yüksek anti-MM sitotoksik etkiye sahip molekül olarak seçilmiştir.

Heterosiklik bileşiklerden benzoksazol metaboliti ve benzamid türevi olan XT5, özgün bir molekül olarak sentezlenmiş ve anti-kanser etkileri moleküler modelleme yöntemleri ile incelenmiştir.

XT5, piyasada MM tedavisinde kullanılan ilaçlardan yapıca farklı olup, anti-kanser ve mikroçevre ile de etkileşme olasılığı olan dual etkili bir ilaç olarak geliştirilme olasılığı bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında literatürde ilk kez olarak bu yeni molekülün in vivo toksisitesinin araştırılması amacıyla sağlıklı sıçanlarda farklı dozlarda XT5 uygulaması yapılmıştır.

İmmün-yetmezlikli farelere tümör hücresi enjekte edilerek oluşturulan ksenograft modeller, en etkin kullanılan hayvan modelleridir. SCID, Rag1null veya Rag2null mutasyonları ile kombine edildiğinde kazanılmış bağışıklığı tamamen yetersiz ve doğal bağışıklığı ciddi derecede eksik olan, insan hücre doku ve tümörlerinin engrafmanı için kullanışlı bir fare türü olan NOD/SCID IL-2R γ (null) (NSG) elde edilmiştir. İnterlökin -2 (IL-2) reseptörü gamma zinciri eksik olan NSG fareler yakın zamanda MM modelleri geliştirmek için kullanılmaya başlanmıştır. Bu türün, daha fazla immün baskılamayla birlikte NK hücre eksikliği, makrofajlarda ve dendritik hücre fonksiyonundaki hatalar ve ek olarak olgun B ve T lenfositlerinin eksikliğine bağlı olarak diğer immünyetmezlikli SCID ve NOD/SCID farelere kıyasla tümör engrafmanında belirgin gelişmeler gösterdiği belirlenmiştir [149]. Tümör hücrelerinin hem iskelet hem ekstraskelatal bölgelerde yayıldığı SCID ve NOD/SCID modellerinin aksine bu hücre tipleri NSG farelere nakledildiğinde sadece kemik iliğine yerleştiği ve başka organlarda saptanmadığı belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında MM modeli oluşturmak için, bu sebeplerden dolayı, NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ ya da kısa adıyla NSG fare türü seçilmiştir.

Çalışma kapsamında ksenograft fare modeli, immün-yetmezlikli farelere, lüsiferaz ve green florescence protein (GFP) eksprese eden transgenik MM.1S (pMMp-Luc-neo) hücre serilerinin enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. Sistemik (intravenöz enjeksiyonla) veya lokal hastalık (subkutan veya intratibial enjeksiyonlarla) oluşturmak üzere kullanılan çeşitli miyelom hücre hatlarından seçilen MM1.S, lüsiferaz enzim aktivitesi sonucunda lüsiferin pigmentiyle tepkimeye girdiğinde ışımaya özelliği göstermekte ve aynı zamanda GFP(+) özellikli hücrelerdir.

Miyelom modelinin oluşumu, gelişim aşamaları (omurilik, femur ve/veya dalak gibi multipl miyeloma özgü bölgelerde tutulumlar) ve XT5 molekülünün etkisi, MM1.S hücre hatlarının lüsiferaz aktivitesi doğrultusunda oluşan ışımaya biyoluminesans cihazında görüntülenmesi ile takip edilmiştir. NSG farelerde MM.1Sluc hücre hattı ile myelom modeli farelerde 2. Haftadan itibaren biyoluminesans cihazında ışımaya belirlenmiştir.

Yeni ilaç geliştirilmesinde temel amacın terapötik etkisi yüksek ve toksik etkileri olmayan veya en az olan ilaç tedavilerini klinik aşamaya getirmek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle yeni üretilen ilaç moleküllerinin prelinik çalışmalarda etkinliğinin yanı sıra, eş zamanlı olarak, olası toksik etkilerinin de incelenmesi önemlidir. Bu tez çalışması kapsamında yeni aday ilaç molekülünün fare modelinde etkinliğinin yanı sıra toksikoloji deneylerinde sıklıkla kullanılan Wistar albino sıçanlarda farklı dozlarda denenen ilaç uygulamasıyla, sonrasında sıçan doku ve kan örneklerinde histolojik incelemeler ve biyokimyasal testlerle toksikolojik incelemeler yapılmıştır. Devamında yapılan genotoksik testlerle de ilacın toksik potansiyeli değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasında, XT5 molekülünün olası ilk olarak toksik etkileri incelenmiştir. Bu amaçla sıçanlara 1 hafta ve 8 hafta olmak üzere iki farklı süreyle 3 farklı dozda uygulama yapılmıştır. Kontrol grubuna sadece yağ verilmiştir.

8 hafta süreyle haftada iki kez XT5 uygulaması yapılan sıçanlarda haftalık olarak vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Kontrol grubu, 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50

mg/kg XT5 uygulanan sıçanların vücut ağırlıklarındaki artışın arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

1 hafta süreyle her gün XT5 uygulaması yapılan sıçanlarda günlük olarak vücut ağırlıkları ölçülmüştür. sıçanların vücut ağırlıklarındaki artışın gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir.

Vücutta çeşitli fonksiyonlarda görev alan ALT, AST, GGT, üre, total protein ve albümin enzimleri, olası karaciğer ve böbrek hasarında değişkenlik göstererek bu fonksiyonların bozulduğuna dair belirteçler olarak görev yapmaktadır. Karaciğer hasarlarında biyokimyasal belirteç olan enzim aktivitelerine bakılmıştır. Toksik etki ve enfeksiyonun neden olduğu kalp ve karaciğer hasarlarının tanısında önemli olan, hücre hasarının belirteçleri bu enzimlerin hastalık durumlarında yükseldiği bilinmektedir. Bu değerlerin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemesi, XT5 molekülünün enfeksiyon gibi bir olumsuz etkiye neden olmadığını söyleyebiliriz.

Sıçanların hematolojik incelemeleri kapsamında tam kan sayımları yapılmış ve lökosit, monosit, eritrosit, trombosit, hemoglobin, hematokrit, MCH, MCHC ve MCV değerleri saptanmıştır. 1 haftalık ve 8 haftalık uygulama sürelerinde kontrol grupları ve 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg XT5 uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kan değerlerinde hücre sayısının yükselmesi gibi olası değişimler, vücudun olası tehlikelere karşı savunma sistemi olarak devreye girmektedir. Bu sonuçlara dayanarak XT5 molekülünün farede enfeksiyona ve savunma amaçlı hücre sayısının artmasına neden olacak bir durum oluşturmadığı söylenebilir.

Sıçanların dokularında yapılan histolojik incelemelerde genel olarak gruplardaki histopatolojik bulgular incelendiğinde kayda değer önemli bir bulgu gözlenmemiş, gözlenen bulgularında gruplar arasında bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

Sıçanların histopatolojik incelemelerinde, kontrol ve uygulama gruplarında belirgin bir doku hasarına rastlanmamıştır. Sıçan gruplarının çoğunun akciğerlerinde görülen alveol lümeni kanamasının nedeninin, sıçanların kafeslerinde kullanılan talaşlar olduğu ve deney hayvanlarında yaygın görülen

bir durum olabileceği düşünölmüştür [150]. Bu durumun XT5'in olumsuz bir etkisi olmadığı kanaatine varılmıştır.

DNA hasarlarının belirlenmesi için kullanılan komet yöntemi, yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı genotoksisite testlerindedir. Hücrelerin agaroz gömölmesini takiben lizise edilmesi ve elektroforez uygulanmasına dayanır. Sonuçta hasarlı DNA kuyruklu yıldız benzeri bir şekil oluşturur ve yöntem adını bu şekilden alır [151,152].

Komet yönteminin en büyük uygulama avantajlarından biri in vitro ve in vivo çalışılabilmesidir. In vivo çalışmalarda birtakım ajanların neden olduğu hasar canlı doku ve kan örneklerinde çalışılabilir. Böylelikle yeni sentezlenen ilaçlar veya antikanser etkili maddelerin olası genotoksik etkileri belirlenebilmektedir. Bu tez çalışmasında XT5 molekülünün olası genotoksik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla sağlıklı sıçanlara farklı dozlarda (5mg/kg, 10 mg/kg ve 50 mg/kg) XT5 verilmiş ve sıçanların kanında komet testi uygulanmıştır. Sonrasında ilaç uygulaması yapılmayan kontrol grubuyla karşılaştırılma yapılmış ve sonuçta XT5 uygulaması yapılan sıçanlarda XT5'in genotoksik bir hasara neden olmadığı görölmüştür.

Benzamid türevi bileşiklerin genotoksik etkileriyle ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sınırlı sayıdaki çalışmalardan biri olan Martelli ve ekibinin yaptığı çalışmada, etil benzamid türevi iki ilacın genotoksik etkileri belirlenmiştir. Metoklopramid ve prokainamid ilaçlarının değerlendirildiği bu çalışma sonucunda metoklopramidin birtakım mutajenik etkileri olduğu ve prokainamidin genotoksik etkisi olmadığı görölmüştür [153].

Sıçanlarda elde edilen bu sonuçlar XT5 molekülünün 50 mg/kg a kadar uygulamasının toksik bir etkisi olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

XT5'in miyelom üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla immünyetmezlikli NSG farelerde miyelom modeli oluşturularak XT5 etkinliği incelenmiştir.

Kontrol grubu olan farelere XT5 uygulaması yapılmamış, miyelom farelerin normal yaşam süreleri takip edilmiştir. Kontrol grubundaki bir fare, 27. Günde paralize olup 29. Günde ölmüştür.

Kontrol grubundaki ikinci fare, 25. günde paralize olup, 28. günde ölmüştür. Miyelomun mekahnimasının ve patolojisinin incelenmesinde ksenograft fare modellerinin seçilmesindeki en büyük avantajlardan biri, tümörün vücuda yayılan etkisinin gözlenebilmesidir. NSG farede femurlar ve omurilik üzerinde başlayan tümör yayılımının tüm vücuda yayıldığı görülmektedir. MM de kemik iliği mikroçevresinin ve miyelomda oluşan tümör hücrelerinin arasındaki etkileşimlerin hasatlığın patogenezi için oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu etkileşimlerin de etkisiyle; multipl miyelomda osteoklastların artan aktivasyonunun ve osteoblastların inhibisyonunun sonucu olarak kemik rezorpsiyonu artar. Osteoblastlar tarafından gerçekleştirilen kemik oluşumu ile osteoklastlar tarafından sağlanan kemik parçalanması arasındaki ince dengenin ayrılması, MM nin en zararlı komplikasyonlarından biri olan yaygın kemik yıkımına yol açar. Doğrudan hücre-hücre teması veya yakındaki kemik iliği stromal hücrelerinden çözünebilir faktörlerin salınması, kemik rezorpsiyonunun devam etmesi ve tümör hücresinin hayatta kalımını kısır döngü şeklinde sürmesine neden olmaktadır [154]. Bu durum tümörün vücuda yayılmasını takiben arka bacakların paralize olmasıyla farelerde kendini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında miyelom modeli oluşturulan farelerde akut fare ölümü gibi majör bir toksisiteye yol açıp açmayacağını gözlemlemek amacıyla 5-10 mg/kg XT5 uygulaması da denenmiştir. 24. güne kadar haftada iki kez (1., 4., ve 8., 11. günler)olan uygulama daha sonra her güne çıkarılmıştır. Bu dozlarda farede miyelomun progresi dışında fizik muayene bulgularına yansıyan bir toksisite gözlenmemiş ve fare 34. günde miyelom sonucu paralizi olarak ölmüştür. Bu farede XT5 uygulamasının biyoluminisans görüntüleme ile tümörü başlangıçta geriletmediği ancak sonrasında yetersiz olduğu belirlenmiştir. Bu durum dozun artırılması ve/veya başka anti-miyelom ilaçlarla kombine kullanımı gereksimini düşündürmektedir.

Bir başka fareye 15. gün biyoluminesans görüntülemesinde tümör başlangıcı görülmüş ve o gün başlayarak her gün 5 mg/kg XT5 uygulaması yapılmıştır. Farenin 18. gün görüntülemesinde tümörün yayılmadığı, 22. gün görüntülemesinde ise tümörün yok olduğu görülmüştür. Farede görülen bu gerileme, XT5'in her gün uygulamasına bağlı olabilir. Ancak bu farede 15. günde görülen tümör, diğer farelere göre daha küçük boyutta olduğu için gerilemesinin daha hızlı olabileceğini düşündürmektedir. Farelerin türleri ve genetik özellikleri aynı olmasına ve aynı hücre serisinden eşit sayıda MM1S hücresinin fareye uygulanmasına rağmen MM1S den kaynaklanan nedenlerle tümör gelişimi farklılık gösterebilmektedir.

Miyelom grubundaki diğer bir fareye 15 gün görüntülemesinde tümör başlangıcı görülmüş ve haftada 2 kez 10 mg/kg XT5 uygulamasına başlanmıştır. Farenin 19. , 24. ve 28. günlerinde yapılan görüntülemelerde tümörde gerilemenin olmadığı görülmüştür. Farenin 28. günde arka bacaklarının paralize olması ve 29. günde ölmesi, haftada 2 kez 10 mg/kg XT5 uygulamasının yetersiz olduğunu göstermektedir. 15. gün yapılan biyoluminesans görüntülemesinde tümör başlangıcı görülen fare 6'ya, her gün uygulama yapılacak şekilde 10mg/kg XT5 verilmiştir. Farenin 18. gün görüntülemesinde tümör boyutunun küçüldüğü, 22. gün görüntülemesinde tümörün tamamen kaybolduğu görülmüştür. Bu durum 10 mg/kg dozda her gün XT5 uygulamasının anti miyelom etki gösterdiği şeklinde açıklanabilir. Ancak fare 4 te olduğu gibi bu farede de tümör seviyesi 15. günde diğer farelerdeki tümörlere kıyasla görece şekilde küçük boyutta olarak görüntülenmiştir. Tüm bu deneylerde XT5 in 5-10 mg/kg dozlarında toelere edilebilir ama yeterli etkinlikte olmadığı görülmektedir. Sıçanda toksisitesi saptanmayan 50 mg/kg dozlarına çıkılması ile ilerde bu doz- etkinlik araştırması devam ettirilebilecektir.

Multiple miyelomda klinik belirtilerden biri hastalarda görülen kilo kaybıdır [155]. Miyelomlu farelerin vücut ağırlıkları haftada iki kez ölçülmüştür. Tümör oluşumu görülen ve XT5 ile gerileme görülmeyen bütün farelerde 3. Haftada belirgin kilo kaybı görülmüştür. Tümör başlangıcında XT5 uygulanan ve tümörü yok olan fare 4 ve fare 6 da belirgin anlamlı bir kilo kaybı

görülmemiştir. Bu durum XT5 uygulamasının, miyelomun yaygın görülen semptomlarını da azaltma etkisinin olduğunu kanıtlar nitelikte sayılabilir.

MM oluşturulan farelerin tümünün kemik iliğinin histolojik incelemesinde atipik plazma hücreleri görülmüştür. Araştırmamızda sakrifiye edilen farelerde yaygın miyelom infiltrasyonu saptanırken tüm dokular değerlendirilmiş ve dokularda 5-10 mg/kg dozunda histopatolojik toksisiteye işaret eden bir bulgu saptanmamıştır. Miyelom farelerde kanserin etkilerinin tamamen yok olması için benzer bir ilaç uygulama protokolü gerektiği düşünülebilir.

Sonuç olarak, Üniversitemizde yeni geliştirilen ve in vitro olarak anti-miyelom etkisi gösterilmiş olan ilaç adayı molekül XT5'in bu tez çalışması kapsamında en etkin ve en az toksik dozunun belirlenmesine yönelik deneysel çalışmalar yapılmıştır. XT5 molekülünün fare miyelom modelinde tümör gerilmesini düşündüren ilk verilerin ışığında bundan sonraki araştırmalar planlanmaktadır. Tez çalışmasının verileri 5-50 mg/kg dozlarında genotoksik, hepatotoksik, miyelosupresif ve genel durumu etkileyecek somatik bir toksisite saptanmamıştır. Bu veriler ışığında XT5 in anti-miyelom etkili diğer ilaçlarla da birlikte etkinlik çalışmalarının önü açılmış bulunmaktadır

7. KAYNAKLAR

- [1] Norouzi, M., Amerian, M., Amerian, M. & Atyabi, F. Clinical applications of nanomedicine in cancer therapy, *Drug Discov, Today* 25, (2020)107–125.
- [2] Torre, L. A. Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, (2015),87–108.
- [3] Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* 144, (2019),1941–1953
- [4] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer, *Cell*, (2000), 57-70
- [5] Kazandjian, D., Dew, A., & Hill, E. (2020). The changing role of high dose melphalan with stem cell rescue in the treatment of newly diagnosed multiple myeloma in the era of modern therapies—back to the future!. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, (2020),101-150.
- [6] Kazandjian D, Landgren O. A look backward and forward in the regulatory and treatment history of multiple myeloma: approval of novel-novel agents, new drug development, and longer patient survival. *Semin Oncol* (2016), 682–689.
- [7] Alanazi, F., Kwa, F. A., Burchall, G., & Jackson, D. E. (2020). New generation drugs for treatment of multiple myeloma. *Drug discovery today*, 25(2), (2020),367-379.
- [8] Fonseca, R., Bailey, R. J., Ahmann, G. J., Rajkumar, S. V., Hoyer, J. D., Dewald, G. W. (2002). Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(4), (2002),1417-1424.
- [9] Chesi, M., & Bergsagel, P. L. (2013). Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *International journal of hematology*, 97(3), 313-323.

- [10] Fairfield, H., Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2016) 32–51.
- [11] Andrews, S.W., Multiple myeloma: the bone marrow microenvironment and its relation to treatment. *Br. J. Biomed. Sci.* 70 (3), (2013) , 110–120
- [12] Tosi, P., Gamberi, B. & Giuliani, N. Biology and treatment of multiple myeloma. *Biol. Blood Marrow Transplant*, (2006), 81–86
- [13] Rollig, C. et al. (2015) Multiple myeloma. *Lancet* 385 (9983), 2197–2208.
- [14] Engelhardt M, Terpos E, Kleber M, Gay F, Wäsch R, Morgan G, Cavo M, van de Donk N, Beilhack A, Bruno B, Johnsen HE, Hajek R, Driessen C, Ludwig H, Beksac M, Boccadoro M, Straka C, Brighen S, Gramatzki M, Larocca A, Lokhorst H, Magarotto V, Morabito F, Dimopoulos MA, Einsele H, Sonneveld P, Palumbo A; European Myeloma Network. European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2014 Feb;99(2):232-42.
- [14] Durie BG, Miguel JF, Blade J, Rajkumar SV. Clarification of the definition of complete response in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015 Dec;29(12):2416-7. doi: 10.1038/leu.2015.290. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26487274.
- [15] Laubach JP, Voorhees PM, Hassoun H, Jakubowiak A, Lonial S, Richardson PG. Current strategies for treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*. 2014 Feb;7(1):97-111.
- [16] Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V. Multiple myeloma ASH 50th anniversary review Multiple myeloma. *Blood* 111, 2962–2971 (2008).
- [17] Abdi, J., Chen, G., & Chang, H. (2013). Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget*, 4(12), 2186.

- [18] Meads, M. B., Gatenby, R. A., & Dalton, W. S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature reviews cancer*, 9(9), 665-674.
- [19] Teicher, B.A. and Tomaszewski, J.E. (2015) Proteasome inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 96 (1), 1–9
- [20] Frankland-Searby, S., & Bhaumik, S. R. (2012). The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1825(1), 64-76.
- [21] Richardson, P.G. et al. (2010) Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 116 (5), 679–686].
- [22] Richardson, P.G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Munshi, N., Anderson, K., New drugs for myeloma, *Oncologist*, 12(6), 664-89, 2007
- [23] Von Metzler, I. et al. (2007) Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. *Leukemia* 21 (9), 2025–2034
- [24] Teicher, B.A. and Tomaszewski, J.E. (2015) Proteasome inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 96 (1), 1–9].
- [25] Schlafer, D. et al. (2017) Safety Of proteasome inhibitors for treatment of multiple myeloma. *Expert Opin. Drug Saf.* 16 (2), 167–183].
- [26] Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V. Multiple myeloma ASH 50th anniversary review Multiple myeloma. *Blood* 111, 2962–2971 (2008).
- [27] Quach, H. et al. (2010) Mechanism Of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia* 24 (1), 22–32].
- [28] Kim, J.H. and Scialli, A.R. (2011) Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol. Sci.* 122 (1), 16

- [29] Castelli, R. et al. (2013) Therapeutic options for patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiencies: from pathophysiology to the clinic. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35 (1), 181–190
- [30] Ferrajoli, A. et al. (2008) [Lenalidomide Induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111 (11), 5291–5297 22]
- [31] Chanan-Khan, A.A. et al. (2013) Pomalidomide: the new immunomodulatory agent for the treatment of multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 3 e143–e143 26
- [32] Smith, L.K. and Cidlowski, J.A. (2010) Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog. Brain Res.* 182, 1–30].
- [33] Eckschlager, T. et al. (2017) Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (7), 1414
- [34] Imai, Y. et al. (2019) HDAC inhibitors exert anti-myeloma effects through multiple modes of action. *Cancers* 11 (4), 475 30]
- Esteller M, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.*2007;8:286–98.,
- [35] Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med.* 2010;16:716.,
- [36] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429:457–63
- [37] Eckschlager, T. et al. (2017) Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (7), 1414]
- [38] Ohguchi, H. et al. (2018) The biological significance of histone modifiers in multiple myeloma: clinical applications. *Blood Cancer J.* 8 (9), 83–83].

- [39] Marsoni S, Damia G, Camboni G. A work in progress: the clinical development of histone deacetylase inhibitors. *Epigenetics*. 2008;3:164–71
- [40] Fang MH, Ji XM. Histone modification and its application in therapy for hematologic malignancies. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2009;17:816–20..
- [41] Zahreddine, H. & Borden, K. L. B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front. Pharmacol.* 4 MAR, 1–8 (2013).
- [42] Nooka, A.K. and Lonial, S. (2016) Novel combination treatments in multiple myeloma. *Oncology* 30 (5), 451–465 47].
- [43] Demmer, C. S., Bunch, L., Benzoxazoles and oxazolopyridines in medicinal chemistry studies, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97:778-85, 2015.
- [44] Chiarotto, I., Feroci, M., Orsini, M., Sotgiu, G., Inesi, A., Electrogenated N-Heterocyclic Carbenes: N-Functionalization of Benzoxazolones, *Tetrahedron*, 65(18), 3704-10, 2009.
- [45] Koksall, M., Gokhan, N., Kupeli, E., Yesilada, E., Erdogan, H., Analgesic and anti-inflammatory activities of some new mannich bases of 5-nitro-2- benzoxazolinones, *Archives of Pharmacal Research*, 30, 19-424, 2007
- [46] Xiang, P., Zhou, T., Wang, L., Sun, C. Y., Hu, J., Zhao, Y. L., Yang, L., Novel benzothiazole, benzimidazole and benzoxazole derivatives as potential antitumor agents: synthesis and preliminary in vitro biological evaluation, *Molecules*, 17(1), 873-83, 2012
- [47] El-Hady, H. A., Abubshait, S. A., Synthesis of imidazolinone and benzoxazole derivatives, and evaluation of their anticancer activity, *Research on Chemical Intermediates*, 41(3), 1833-1841, 2015
- [48] Jonckers, T.H., Rouan, M. C., Haché, G., Schepens, W., Hallenberger, S., Baumeister, J., Sasaki, J. C., Benzoxazole and benzothiazole amides as novel pharmacokinetic enhancers of HIV

protease inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(15), 4998-5002, 2012.

[49] Bray, H. G., Clowes, R. C., Thorpe, W. V., The metabolism of aminophenols, o-formamidophenol, benzoxazole, 2-methyl- and 2-phenyl- benzoxazoles and benzoxazolone in the rabbit, *Biochemical Journal*, 51(1), 70–78, 1952

[50] Yildiz-Oren, I.; Yalcin, I.; Aki-Sener, E.; Ucarturk, N. Synthesis and structure-activity relationships of new antimicrobial active multisubstituted benzazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 2004, 39, 291-298,

[51] Ertan-Bolelli, T.; Musdal, Y.; Bolelli, K.; Yilmaz, S.; Aksoy, Y.; Yildiz, I.; Aki-Yalcin, E.; Yalcin, I. Synthesis, biological evaluation of 2-substituted-5-(4-nitrophenylsulfonamido) benzoxazoles as human *gst p1-1* inhibitors and description of the binding site features. *Chem. Med. Chem.*, 2014, 9(5), 984-99

[52] Li, Z., Zhan, P., Naesens, L., Vanderlinden, E., Liu, A., Du, G., De Clercq, E., Liu, X., Synthesis and preliminary biologic evaluation of 5-substituted-2-(4-substituted phenyl)-1,3-benzoxazoles as a novel class of influenza virus A inhibitors, *Chemical Biology and Drug Design*, 79(6), 1018-24, 2012.

[53] Ji, X-Y., Wang, H-Q., Hao, L-H., He, W-Y., Gao, R-M., Li, Y-P., Li, Y-H., Jiang, J-D., Li, Z-R., Synthesis and Antiviral Activity of N-Phenylbenzamide Derivatives, a Novel Class of Enterovirus 71 Inhibitors, *Molecules*, 18, 3630-3640, 2013.

[54] Jiang, Z., Wang, H., Li, Y., Peng, Z., Li, Y., Li, Z., Synthesis and antiviral activity of a series of novel N-phenylbenzamide and N-phenylacetophenone compounds as anti-HCV and anti-EV71 agents, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(3):201-209, 2015.

[55] Xin, M., Wen, J., Tang, F., Tu, C., Shen, H., Zhao, X., The discovery of novel N-(2-pyrimidinylamino) benzamide derivatives as potent hedgehog signaling pathway inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(24), 6777-83, 2013.

[56] Zhao, H., Anyika, M., Girgis, A., Blagg, B. S. J., Novologues containing a benzamide side chain manifest anti-proliferative activity against two breast cancer cell lines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16;24(15), 3633-7, 2014.

[57] Tyagi, P., Chandra, S., Saraswat, B. S., Ni(II) and Zn(II) complexes of 2-((thiophen-2-ylmethylene)amino)benzamide: synthesis, spectroscopic characterization, thermal, DFT and anticancer activities, *Spectrochimica Acta. Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 200-9, 2015.

[58] Berger, M.R., Bischoff, H., Fritschi, E., Henne, T., Herrmann, M., Pool, B.L., Satzinger, G., Schmähl, D., Weiershausen, U., Synthesis, toxicity, and therapeutic efficacy of 4-amino-N-(2'-aminophenyl)-benzamide: a new compound preferentially active in slowly growing tumors, *Cancer Treatment Reports*, 69(12):1415-24, 1985.

[59] Ekblad, T., Lindgren, A. E., Andersson, C. D., Caraballo, R., Thorsell, A. G., Karlberg, T., Spjut, S., Linusson, A., Schüler, H., Elofsson, M., Towards small molecule inhibitors of mono-ADP-ribosyltransferases, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 95, 546-51, 2015.

[60] Suzuki, T., Ando, T., Tsuchiya, K., Fukazawa, N., Saito, A., Mariko, Y., Yamashita, T., Nakanishi, O., Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(15), 3001-3, 1999.

[61] Monneret, C., Histone deacetylase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(1):1-13, 2005.

[62] Lu, A., Luo, H., Shi, M., Wu, G., Yuan, Y., Liu, J., Tang, F., Design, synthesis and docking studies on benzamide derivatives as histone deacetylase inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(16),4924-7, 2011.

[62] Camerer, E. (2007). Protease signaling in tumor progression. *Thrombosis research*, 120, S75-S81.

[63] Darmoul, D., Gratio, V., Devaud, H., Peiretti, F., & Laburthe, M. (2004). Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Molecular Cancer Research*, 2(9), 514-522.

[64] Gratio, V., Walker, F., Lehy, T., Laburthe, M., & Darmoul, D. (2009). Aberrant expression of proteinase-activated receptor 4 promotes colon cancer cell proliferation through a persistent signaling that involves Src and ErbB-2 kinase. *International journal of cancer*, 124(7), 1517-1525.

[65] Bergmann, S., Junker, K., Henklein, P., Hollenberg, M. D., Settmacher, U., & Kaufmann, R. (2006). PAR-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: PAR1-mediated EGFR activation promotes cell migration. *Oncology reports*, 15(4), 889-893.

[66] Jin, S. X., Zhuang, Z. Y., Woolf, C. J., & Ji, R. R. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*, 23(10), 4017-4022.

[67] Kaufmann, R., Rahn, S., Pollrich, K., Hertel, J., Dittmar, Y., Hommann, M., ... & Settmacher, U. (2007). Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: Cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *Journal of cellular physiology*, 211(3), 699-707.

[68] Kaufmann, R., Henklein, P., Henklein, P., & Settmacher, U. (2009). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits thrombin-induced hepatocellular carcinoma cell invasion and p42/p44-MAPKinase activation. *Oncology reports*, 21(5), 1261-1267.

[69] Beksac M, Waage A, Bringhen S, Kristinsson SY, Sucak GT, Gimsing P, Lupparelli G, Fıratlı-Tuğlular T, Juliusson G, Turesson I, Palumbo A. Does low-molecular-weight heparin influence the antimyeloma effects of thalidomide? A retrospective analysis of data from the GIMEMA, Nordic and Turkish myeloma study groups. *Acta*

Haematol. 2015;133(4):372-80. doi: 10.1159/000370023. Epub 2015 Mar 24.PMID: 2582429

[70] Oksuzoglu, E., Tekiner-Gulbas, B., Alper, S., Temiz-Arpaci, O., Ertan, T., Yildiz, I., Diril, N., Sener-Aki, E., Yalcin, I. 2008. "Some Benzoxazoles and Benzimidazoles as DNA Topoisomerase I and II Inhibitors", *J. Enz. Inh. and Med.Chem.*, 23(1), 37-42.

[71] Kaplan-Ozen, C., Tekiner-Gulbas, B., Foto, E., Yildiz, I., Diril, N., Aki, E., Yalcin, I. 2013. "Benzothiazole derivatives as human DNA topoisomerase II α inhibitors", *Med. Chem. Res.*, 22(12), 5798-5808.

[72] Esin Aki-Yalcin, Tugba Ertan-Bolelli, Tugba Taskin-Tok, Serap Yilmaz, Kayhan Bolelli, Ozum Ozturk, Ilkay Yildiz and Ismail Yalcin. Molecular Modeling Studies on DNA-Topoisomerase II Inhibitors, 2nd International BAU-Drug Design Symposium 2014, Bahçeşehir University, Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey, IL-8: p18, 17-19 April 2014.

[73] Hidayat AN, Aki-Yalcin E, Beksac M, Tian E, Usmani SZ, Ertan-Bolelli T, Yalcin Insight into human protease activated receptor-1 as anticancer target by molecular modelling. *I.SAR QSAR Environ Res.* 2015;26(10):795- 807. doi: 10.1080/1062936X.2015.1095799. Epub 2015 Oct 26.PMID:26501801

[74] Ozkan T, Hekmatshoar Y, Ertan-Bolelli T, Hidayat AN, Beksac M, Aki-Yalcin E, Yalcin I, Sunguroglu A. "Determination of the apoptotic effect and molecular docking of benzamide derivative XT5 in K562 cells". *Anticancer Agents Med Chem.* 2017 Dec 29. doi: 10.2174/1871520618666171229222534. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29298654.

[75] Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 118–130.

Ito M, Kobayashi K, Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rcnull (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 324: 53–76.

- [76] Legrand N, Weijer K, Spits H. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *J Immunol* 2006; 176: 2053–2058.
- [77] Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983; 301: 527–530.
- McCune J, Kaneshima H, Krowka J, Namikawa R, Outzen H, Peault B et al. The SCID-hu mouse: a small animal model for HIV infection and pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 399–429.
- [78] McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 1988; 241: 1632–1639.
- [79] Goldman JP, Blundell MP, Lopes L, Kinnon C, Di Santo JP, Thrasher AJ. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br J Haematol* 1998; 103: 335–342.
- [80] Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N et al. Functional human T lymphocyte development from cord blood CD341 cells in nonobese diabetic/ Shi-scid, IL-2 receptor cnull mice. *J Immunol* 2002; 169: 204–209.
- [81] Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Katamura K et al. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD341 cells using the NOD/ SCID/ccnull mice model. *Blood* 2003; 102: 873–880.
- [82] Ishikawa F, Shimazu H, Shultz LD, Fukata M, Nakamura R, Lyons B et al. Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *FASEB J* 2006; 20: 950–952.
- [83] Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004; 304: 104–

107.

[84] Pearson T, Shultz LD, Miller D, King M, Laning J, Fodor W et al. Non-obese diabetic- recombination activating gene-1 (NOD-Rag1null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2rcnull) null mice: a radioresistant model for human lympho- haematopoietic engraftment. *Clin Exp Immunol* 2008; 154: 270–284.

[85] Brehm MA, Cuthbert A, Yang C, Miller DM, Dilorio P, Laning J et al. Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rcnull mutation. *Clin Immunol* 2010; 135: 84–98.

[86] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K et al. NOD/SCID/ ccnull mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002; 100: 3175–3182.

[87] Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2Rcnull mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005; 174: 6477–6489.

Custer RP, Bosma GC, Bosma MJ. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am J Pathol* 1985; 120: 464–477.

[88] Bosma MJ. B and T cell leakiness in the scid mouse mutant. *Immunodefic Rev* 1992; 3: 261–276.

[89] Shultz L.D., Goodwin N., Ishikawa F., Hosur V., Lyons B.L., Greiner D.L. 2014. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mice. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014: 694–708.

[90] Cao, X., Shores, E. W., Hu-Li, J., Anver, M. R., Kelsail, B. L., Russell, S. M., ... & Leonard, W. J. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor γ chain. *Immunity*, 2(3), 223-238.

- [91] DiSanto, J. P., Müller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., & Rajewsky, K. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(2), 377-381.
- [92] Ohbo, K., Suda, T., Hashiyama, M., Mantani, A., Ikebe, M., Miyakawa, K., ... & Sugamura, K. (1996). Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain.
- [93] Shultz, B.L. Lyons, L.M. Burzenski, B. Gott, X. Chen, S. Chaleff, M. Kotb, S.D. Gillies, M. King, J. Mangada, D.L. Greiner, R. Handgretinger, Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells, *J. Immunol.* 174 (2005)
- [94] C.U. Kirchgessner, C.K. Patil, J.W. Evans, C.A. Cuomo, L.M. Fried, T. Carter, M.A. Oettinger, J.M. Brown, DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect, *Science* 267 (1995) 1178–1183.
- [95] Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T.V. Rajan, D.L. Greiner, et al., Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice, *J. Immunol.* 154 (1995) 180–191.
- [96] Miyakawa, Y., Ohnishi, Y., Tomisawa, M., Monnai, M., Kohmura, K., Ueyama, Y., ... & Nakamura, M. (2004). Establishment of a new model of human multiple myeloma using NOD/SCID/ γ cnnull (NOG) mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(2), 258-262.
- [97] Dewan, M. Z., Watanabe, M., Terashima, K., Aoki, M., Sata, T., Honda, M., ... & Yamamoto, N. (2004). Prompt tumor formation and maintenance of constitutive NF- κ B activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID/ γ Cnull mice. *Cancer science*, 95(7), 564-568.
- [98] M. Ito, H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K.

Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji, T. Heike, T. Nakahata, NOD/SCID/ γ (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells, *Blood* 100 (2002) 3175–3182.

[99] E. Quintana, M. Shackleton, M.S. Sabel, D.R. Fullen, T.M. Johnson, S.J. Morrison, Efficient tumour formation by single human melanoma cells, *Nature* 456 (2008) 593–598.

[100] H. Suemizu, M. Monnai, Y. Ohnishi, M. Ito, N. Tamaoki, M. Nakamura, Identification of a key molecular regulator of liver metastasis in human pancreatic carcinoma using a novel quantitative model of metastasis in NOD/ SCID/ γ macnull (NOG) mice, *Int. J. Oncol.* 31 (2007) 741–751.

[101] M.R. Simpson-Abelson, G.F. Sonnenberg, H. Takita, S.J. Yokota, T.F. Conway Jr., R.J. Kelleher Jr., L.D. Shultz, M. Barcos, R.B. Bankert, Long-term engraftment and expansion of tumor-derived memory T cells following the implantation of non-disrupted pieces of human lung tumor into NOD-scid IL2R γ (null) mice, *J. Immunol.* 180 (2008) 7009–7018.

[102] A.K. Wege, W. Ernst, J. Eckl, B. Frankenberger, A. Vollmann-Zwerenz, D.N. Mannel, O. Ortmann, A. Kroemer, G. Brockhoff, Humanized tumor mice—a new model to study and manipulate the immune response in advanced cancer therapy, *Int. J. Cancer. J. Int. du Cancer* (2011).

[103] H. Sartelet, L. Durrieu, F. Fontaine, C. Nyalendo, E. Haddad, Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/IL2rg null (NSG) mice, *In Vivo* 26 (2012) 19–29.

[104] A. Agliano, I. Martin-Padura, P. Mancuso, P. Marighetti, C. Rabascio, G. Pruneri, L.D. Shultz, F. Bertolini, Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/ IL-2R γ null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains, *Int. J. Cancer. J. Int. du Cancer* 123 (2008) 2222–2227

[105] E. Quintana, M. Shackleton, M.S. Sabel, D.R. Fullen, T.M.

Johnson, S.J. Morrison, Efficient tumour formation by single human melanoma cells, *Nature* 456 (2008) 593–598.

[106] H. Suemizu, M. Monnai, Y. Ohnishi, M. Ito, N. Tamaoki, M. Nakamura, Identification of a key molecular regulator of liver metastasis in human pancreatic carcinoma using a novel quantitative model of metastasis in NOD/ SCID/gammacnull (NOG) mice, *Int. J. Oncol.* 31 (2007) 741–751.

[107] Shultz, F. Bertolini, Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/ IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains, *Int. J. Cancer. J. Int. du Cancer* 123 (2008) 2222–2227.

[108] H. Sartelet, L. Durrieu, F. Fontaine, C. Nyalendo, E. Haddad, Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/Il2rg null (NSG) mice, *In Vivo* 26 (2012) 19–29.

[109] B.M. Carreno, J.R. Garbow, G.R. Kolar, E.N. Jackson, J.A. Engelbach, M. Becker- Hapak, L.N. Carayannopoulos, D. Piwnica-Worms, G.P. Linette, Immunodeficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 3277–3286.

[110] Y. Miyakawa, Y. Ohnishi, M. Tomisawa, M. Monnai, K. Kohmura, Y. Ueyama, M. Ito, Y. Ikeda, M. Kizaki, M. Nakamura, Establishment of a new model of human multiple myeloma using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 258–262.

[111] G. Seitz, M. Pfeiffer, J. Fuchs, S.W. Warmann, I. Leuschner, C. Vokuhl, P. Lang, R. Handgretinger, S. Armeanu-Ebinger, Establishment of a rhabdomyosarcoma xenograft model in human-adapted mice, *Oncol. Rep.* 24 (2010) 1067–1072.

[112] C. Munz, T. Dao, G. Ferlazzo, M.A. de Cos, K. Goodman, J.W. Young, Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells, *Blood* 105 (2005) 266–273.

- [113] Lwin, S. T., Edwards, C. M., & Silbermann, R. (2016). Preclinical animal models of multiple myeloma. *BoneKEy reports*, 5.
- [114] Asosingh, K., Radl, J., Riet, I. V., Camp, B. V., & Kerken, K. (2000). The 5TMM series: a useful in vivo mouse model of human multiple myeloma. *Hematology Journal*, 5, 1, 351-356.
- [115] Hu, J., Van Valckenborgh, E., Menu, E., De Bruyne, E., & Vanderkerken, K. (2012). Understanding the hypoxic niche of multiple myeloma: therapeutic implications and contributions of mouse models. *Disease models & mechanisms*, 5(6), 763-771.
- [116] Rossi, M., Botta, C., Arbitrio, M., Grembiale, R. D., Tagliaferri, P., & Tassone, P. (2018). Mouse models of multiple myeloma: technologic platforms and perspectives. *Oncotarget*, 9(28), 20119.
- [117] Mitsiades CS, Mitsiades NS, Bronson RT, Chauhan D, Munshi N, Treon SP et al. Fluorescence imaging of multiple myeloma cells in a clinically relevant SCID/NOD in vivo model: biologic and clinical implications. *Cancer Res* 2003; 63: 6689–6696.)
- [118] Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br J Cancer* 2006; 95: 961–965.
- [119] Dewan M, Watanabe M, Terashima K, Aoki M, Sata T, Honda M, et al. Prompt tumor formation and maintenance of constitutive NF- κ B activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID/ γ Cnull mice. *Cancer Sci* 2004;95:564–8.
- [120] Lawson MA, Paton-Hough JM, Evans HR, Walker RE, Harris W, Ratnabalan D, et al. NOD/SCID-GAMMA mice are an ideal strain to assess the efficacy of therapeutic agents used in the treatment of myeloma bone disease. *PLoS One* 2015;10: e0119546.
- [121] Fuhler GM, Brooks R, Toms B, Iyer S, Gengo EA, Park MY, et al. Therapeutic potential of SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1 (SHIP1) and SHIP2 inhibition in cancer. *Mol Med* 2012;18:65–75.

- [122] Bartee E, Chan WM, Moreb JS, Cogle CR, McFadden G. Selective purging of human multiple myeloma cells from autologous stem cell transplantation grafts using oncolytic myxoma virus. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:1540–51.
- [123] Iriuchishima H, Takubo K, Miyakawa Y, Nakamura-Ishizu A, Miyauchi Y, Fujita N, et al. Neovascular niche for human myeloma cells in immunodeficient Mouse bone. *PLoS One* 2012;7:e30557.
- [124] Schueler J, Wider D, Klingner K, Siegers GM, May AM, Wäsch R, et al. Intratibial injection of human multiple myeloma cells in NOD/SCID IL-2R γ (null) mice mimics human myeloma and serves as a valuable tool for the development of anticancer strategies. *PLoS One* 2013;8:e79939.
- [125] Hurchla MA, Garcia-Gomez A, Hornick MC, Ocio EM, Li A, Blanco JF, et al. The epoxyketone-based proteasome inhibitors carfilzomib and orally bioavailable oprozomib have anti-resorptive and bone-anabolic activity in addition to antimyeloma effects. *Leukemia* 2013;27:430–40.
- [126] Udi J, Schüler J, Wider D, Ihorst G, Catusse J, Waldschmidt J, et al. Potent in vitro and in vivo activity of sorafenib in multiple myeloma: induction of cell death, CD138-downregulation and inhibition of migration through actin depolymerization. *Br J Haematol* 2013;161:104–16.
- [127] Mitsiades CS, Mitsiades NS, Bronson RT, Chauhan D, Munshi N, Treon SP et al. Fluorescence imaging of multiple myeloma cells in a clinically relevant SCID/NOD in vivo model: biologic and clinical implications. *Cancer Res* 2003; 63: 6689–6696., Mitsiades CS, Mitsiades N. CC-5013 (Celgene). *Curr Opin Investig Drug* 2004; 5: 635–647.,
- [128] Paton-Hough J, Chantry AD, Lawson MA. A review of current murine models of multiple myeloma used to assess the efficacy of therapeutic agents on tumour growth and bone disease. *Bone* 2015; 77: 57–68.

- [129] Hjorth-Hansen H, Seifert MF, Borset M, Aarset H, Ostlie A, Sundan A et al. Marked osteoblastopenia and reduced bone formation in a model of multiple myeloma bone disease in severe combined immunodeficiency mice. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 256–263. 30.
- [130] Tsunenari T, Koishihara Y, Nakamura A, Moriya M, Ohkawa H, Goto H et al. New xenograft model of multiple myeloma and efficacy of a humanized antibody against human interleukin-6 receptor. *Blood* 1997; 90: 2437–2444. 31.
- [131] Torcia M, Lucibello M, Vannier E, Fabiani S, Miliani A, Guidi G et al. Modulation of osteoclast-activating factor activity of multiple myeloma bone marrow cells by different interleukin-1 inhibitors. *Exp Hematol* 1996; 24: 868–874. 32.
- [132] Baptista, T., Lacruz, A., Pàez, X., Hernández, L., & Beaulieu, S. (2002). The antipsychotic drug sulpiride does not affect bodyweight in male rats. Is insulin resistance involved?. *European journal of pharmacology*, 447(1), 91-98.
- [133] Crescimanno, G., Mannino, M., Casarrubea, M., & Amato, G. (2000). Effects of sulpiride on the orienting movement evoked By acoustic stimulation in the Rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66(4), 747-750.
- [134] Yamamoto, Shota, et al. "Behavioral and pharmacological characteristics of bortezomib-induced peripheral neuropathy in rats." *Journal of pharmacological sciences* 129.1 (2015): 43-50.
- [135] Duggett, N. A., & Flatters, S. J. (2017). Characterization of a rat model of bortezomib - induced painful neuropathy. *British journal of pharmacology*, 174(24), 4812-4825.
- [136] Singh, R. K., Mishra, S. K., Kumar, N., & Singh, A. K. (2010). Assessment of DNA damage by comet assay in lymphocytes of workers occupationally exposed to petroleum fumes. *International Journal of Genetics*, 2(1), 18.

- [137] Runnels, Judith M., et al. "Optical techniques for tracking multiple myeloma engraftment, growth, and response to therapy." *Journal of biomedical optics* 16.1 (2011): 011006.
- [138] Rème, Thierry, et al. "Growth and immortalization of human myeloma cells in immunodeficient severe combined immunodeficiency mice: a preclinical model." *British journal of haematology* 114.2 (2001): 406-413.
- [139] Feo-Zuppari, F. J., Taylor, C. W., Iwato, K., Lopez, M. H., Grogan, T. M., Odeleye, . (1992). Long-term engraftment of fresh human myeloma cells in SCID mice.
- [140] Yang, H. H., Ma, M. H., Vescio, R. A., & Berenson, J. R. (2003). Overcoming drug resistance in multiple myeloma: the emergence of therapeutic approaches to induce apoptosis. *Journal of clinical oncology*, 21(22), 4239-4247.
- [141] Solly, S. (1844). Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Medico-chirurgical transactions*, 27, 435.
- [142] Adams, J. (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer*, 4(5), 349-360.
- [143] Reil, T. D., Sarkar, R., Kashyap, V. S., Sarkar, M., & Gelabert, H. A. (1999). Dexamethasone suppresses vascular smooth muscle cell proliferation. *Journal of Surgical Research*, 85(1), 109-114.
- [144] Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M. V., ... & San Miguel, J. F. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The lancet oncology*, 15(12), e538-e548.
- [145] Mahindra, A., Laubach, J., Raje, N., Munshi, N., Richardson, P. G., & Anderson, K. (2012). Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nature reviews Clinical oncology*, 9(3), 135-143.
- [146] Beksac, M., Ataca, P., Kirazli, B., Dalva, K., Hidayat, A. N., Yalcin, (2015). Frequency Of Protease Activated Receptor1 (PAR1)

Expression And The In Vitro Effects Of XT5 And XT2B, Two Novel PAR1 Binding Molecules, On Primary And Bortezomib Refractory Myeloma Cell Lines. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 15, e235.

[147] Ozkan, T., Hekmatshoar, Y., Ertan-Bolelli, T., Hidayat, A. N., Beksac, M., Aki-Yalcin, E., & Sunguroglu, A. (2018). Determination of the apoptotic effect and molecular docking of benzamide derivative XT5 in K562 cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(11), 1521-1530.

[148] Lwin, S. T., Edwards, C. M., & Silbermann, R. (2016). Preclinical animal models of multiple myeloma. *BoneKEy reports*, 5.

[149] Miyakawa, Y., Ohnishi, Y., Tomisawa, M., Monnai, M., Kohmura, (2004). Establishment of a new model of human multiple myeloma using NOD/SCID/ γ cnnull (NOG) mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(2), 258-262.

[150] Burn, C. C., Peters, A., Day, M. J., & Mason, G. J. (2006). Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Laboratory animals*, 40(4), 353-370.

[151] Yaccoby, S., Wezeman, M. J., Henderson, A., Cottler-Fox, M., Yi, Q., Barlogie, B., & Epstein, J. (2004). Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer research*, 64(6), 2016-2023.

[152] Potrata, B., Cavet, J., Blair, S., Howe, T., & Molassiotis, A. (2011). Understanding distress and distressing experiences in patients living with multiple myeloma: an exploratory study. *Psycho - Oncology*, 20(2), 127-134.

[153] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic

toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206–221, 2000.

[154] Collins, A. R., The comet assay: a heavenly method!, *Mutagenesis*, 30, 1–4, 2015.

[155] Martelli, A., Campart, G.B., Canonero, R., Mattioli, F., Brambilla, G., Testing of metoclopramide and procainamide for their ability to induce genotoxic effects in cultured mammalian cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 131(2):185-91, 1995.

[156] Ocio, E. M., Vilanova, D., Atadja, P., Maiso, P., Crusoe, E., Fernández-Lázaro, D& San-Miguel, J. F. (2010). In vitro and in vivo rationale for the triple combination of panobinostat (LBH589) and dexamethasone with either bortezomib or lenalidomide in multiple myeloma. *haematologica*, 95(5), 794.