

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

**PRİMER VE SEKONDER GLİOBLASTOMLARIN
METABOLOMİK YAKLAŞIMLA İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Mevlüt Özgür TAŞKAPILIOĞLU

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2023**

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

**PRİMER VE SEKONDER GLİOBLASTOMLARIN
METABOLOMİK YAKLAŞIMLA İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Mevlüt Özgür TAŞKAPILIOĞLU

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İncilay LAY**

**ANKARA
2023**

**PRİMER VE SEKONDER GLİOBLASTOMLARIN METABOLOMİK
YAKLAŞIMLA İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Mevlüt Özgür TAŞKAPILIOĞLU

Danışman: Prof. Dr. İncilay LAY

Bu tez çalışması 17.01.2023 tarihinde, jürimiz tarafından “Biyokimya Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Neslihan Çelik BUKAN
GÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Erdiñ DEVRİM
AÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Ebru BODUR
HÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Ayşe ERCAN
HÜEF Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Başak ÇELTİKÇİ
HÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

...../...../.....

Mevlüt Özgür TAŞKAPILIOĞLU

¹“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü tezele ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. İncilay LAY danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Prof. Dr. Mevlüt zgr TAŞKAPILIOğLU

TEŞEKKÜR

Bana akademik hayatımda yeni bir pencere açma imkanı veren, tez çalışmam boyunca emeğini, bilgisini, değerli vaktini hiç esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. İncilay LAY'a en içten sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Tüm doktora programı süresince desteklerini benden hiç esirgemeyen, daima bana yardımcı olmaya çalışan Tıbbi Biyokimya programındaki tüm hocalarıma teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Analizlerin yapılması ve değerlendirilmesinde yardımlarıyla desteklerini esirgemeyen ve çalışmaya katkı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalından Doç. Dr. Mustafa Çelebier ve Araş. Gör. Ozan Kaplan'a teşekkür ederim.

Bu programa devam ederken zaman zaman benim yerime görevlerimi üstlenen Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalındaki hocalarıma ve onlardan çaldığım zaman ile bu programa devam etmeme imkan veren değerli aileme çok teşekkür ederim.

ÖZET

Taşkapılıoğlu, M.Ö. Primer ve Sekonder Glioblastomların Metabolomik Yaklaşımla İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023. Glioblastom erişkin çağda görülen en sık beyin tümörüdür. Tüm tedavilere rağmen ortalama sağ kalım 15 ay civarındadır. Glioblastom farklı genetik yollarla gelişen primer ve sekonder alt türleri içerir. Bu çalışmada morfolojik olarak aynı olan ancak genetik olarak son derece farklı olan primer ve sekonder glioblastomlu hastalardan elde edilen doku örneklerinde bu tümörlerin gelişiminde ve patogeneğinde metabolom düzeyinde farklılıkları tespit etmek hedeflendi. Patogeneşte olası yolları belirlemek ve çalışmanın olası tedavi seçenekleri konusunda hipotez geliştirilmesinde ön çalışma olması amaçlandı. Altı adet normal, 37 adet primer glioblastom, 10 sekonder glioblastom ve 5 adet düşük evreli tümör dokusu Q-TOF LC/MS ile incelendi. Glioblastomlarda lipid mediatör olan prostaglandinler (PG'ler), tromboksanlar (TX'lar), lökotrienler (LT'ler), lipoksinlerden (LX'ler) oluşan eikozanoidlerin artışı ile ilişkili metabolitler izlendi. Safra asitleri ve metabolitlerinin glioblastomlarda arttığı saptandı. C21 steroid sentez artışı, C21, C19 ve C18 steroid metabolizmasının yavaşlaması gösterildi. Sekonder glioblastomalarda daha fazla olmak üzere tüm glioblastomalarda alfa-Tokotrienolün arttığı saptandı. Glioblastomlarda sağ kalımı uzatabilmek için eikozanoid, steroid, kolesterol, safra asitleri ve sentez yolları ile ilgili hedeflenmiş ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler:

Glioblastom, primer, sekonder, düşük evreli glial tümör, Q-TOF LC/MS, metabolomik

ABSTRACT

Taşkapılıoğlu, M.Ö. Metabolic Examination of Primary and Secondary Glioblastomas, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biochemistry Programme Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2023.

Glioblastoma is the most common brain tumor in adults. Despite all treatments, the average survival is around 15 months. Glioblastoma includes primary and secondary subtypes that develop by different genetic pathways. In this study, we aimed to determine the differences at the level of metabolome in the development and pathogenesis of these tumors in tissue samples obtained from patients with primary and secondary glioblastoma who are morphologically the same but genetically different. It was aimed to identify possible pathways in the pathogenesis and to be a preliminary study in the development of hypotheses about possible treatment options. Six normal, 37 primary glioblastoma, 10 secondary glioblastoma and 5 low-grade tumor tissues were analyzed by Q-TOF LC/MS. Metabolites associated with the increase of eicosanoids consisting of lipid mediators prostaglandins (PGs), thromboxanes (TXs), leukotrienes (LTs), lipoxins (LXs) were observed in glioblastomas. Bile acids and their metabolites were found to be increased in glioblastomas. C21 steroid synthesis increased, C21, C19 and C18 steroid metabolism down regulated. Alpha-Tocotrienol was found to be increased in all glioblastomas, especially in secondary glioblastomas. In order to prolong survival in glioblastomas, targeted further studies on eicosanoid, steroid, cholesterol, bile acids and synthesis pathways are needed.

Key Words:

Glioblastoma, primary, secondary, lowgrade glial tumor, Q-TOF LC/MS, metabolomics

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Etiyoloji	3
2.2. Patogenez	3
2.2.1. IDH Mutasyonu	3
2.2.2. Notch Yolağı	5
2.2.3. Seramid Sinyal Yolağı	5
2.2.4. Vasküler Endoteliyal Growth Faktör (VEGF) Sinyal Yolağı	6
2.2.5. PDGF Sinyali	7
2.2.6. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Yolağı	8
2.2.7. PI3K/AKT/mTOR Yolağı	9
2.2.8. Fosfat ve Tensin Homolog (PTEN) Sinyali	9
2.2.9. SHH Sinyali	10
2.3. Metabolomik	10
2.3.1. Kütle Spektrometrisi	11
2.3.2. Kritik Metabolitlerin Tespiti	13
2.3.3. Sistein Metabolizması	14
2.3.4. Nükleotidler	15
2.3.5. 2-Hidroksiglutarat	15
2.3.6. Tek Karbon Metabolizması	16

2.3.7. Beyin Tümörlerinde Metabolomik Çalışmaları	16
2.3.8. Metabolomikler ve Tedaviye Yanıt	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Cihazlar	21
3.2. Cam ve Sarf Malzemeler	21
3.3. Etik Kurul İzni	22
3.4. Örneklerin Toplanması	22
3.5. Örneklerin Hazırlanması	22
3.6. Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması:	23
3.7. Mobil Fazların Hazırlanması	24
3.8. Q-TOF LC/MS Çalışma Koşulları	24
3.9. Q-TOF LC/MS ile Hedeflenmemiş Metabolit Analizi	25
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
7. KAYNAKLAR	50
8. EKLER	61
EK-1: Grupların Kendi İçinde Karşılaştırılması	
EK-2: Grupların Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması	
EK-3: Turnitin Raporu	
EK-4: Etik Kurul Onayı	
9. ÖZGEÇMİŞ	67

SİMGELER ve KISALTMALAR

AKT	Serin/treonin-spesifik protein kinazı
APCI	Atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon
APPI	Atmosferik basınç fotoiyonizasyonu
ASAH	Asid seramidaz
CELF5	Splicing Factor CUGBP Elav-Like Family Member 5
Cox	Siklooksijenazlar
CSA	Sistein sülfirik asit
CysLT1	Sisteinil lökotrien 1
DESI	Desorpsiyon elektrosprey iyonizasyonu
DHET	Dihidroksieikosatrienoik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FT-ICR	Fourier dönüşüm iyon siklotron rezonansı
GC	Gaz kromatografisi
GSG1L	Germ Cell-Specific Gene 1-Like Protein
HG	Hidroksiglutarat
HILIC	Hidrofilik etkileşim kromatografisi
HMDB	Human metabolome database
IDH	İzositrat dehidrojenaz
IP-LC	İyon eşleştirme kromatografisi
LC	Sıvı kromatografi
LOX	Lipoksijenaz
LT	Lökotrien
LX	Lipoksin
LXR	Karaciğer X reseptörü
MALDI	Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu
MI	Miyo-inositol
MS	Kütle spektrometresi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PCA	Principal Component Analysis

PDGF	Platelet-derive büyüme faktörü
PEP	Fosfoenolpiruvat
PFBB	Pentafluorobenzyl bromidenin
PG	Fosfogliserat
PG	Prostaglandin
PI3K	Fostaditilinozitol 3- kinaz
PTEN	Fosfat ve Tensin Homolog
PTGS2	Prostaglandin-endoperoksit sentaz 2
RTK	Reseptör tirozin kinaz
S1P	Sfingozin-1-fosfat
SHH	Sonik hedgehog
Sp1	Özgüllük proteini 1
TCA	Trikarboksilik asit
THETA	Trihidroksieikosatrienoik asit
TMZ	Temozolomide
TX	Tromboksan
VEGF	Vasküler Endoteliyal Growth Faktör
α-KG	α -ketoglutarat
20-HETE	20- hidroksieikosatetraenoik asit

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. IDH1/2 enzimi izositratı α -KG'a çevirirken mutant IDH1/2 enzimi α -KG'ı 2-HG'a çevirir	4
2.2. Seramidleri sfingozine dönüştüren ve sfingosin kinaz tarafından sfingosin-1-fosfata (S1P) dönüştürülen bir lizozomal enzim olan asit seramidazın (ASAHI) reaksiyonu. Seramid apoptozu teşvik ederken, S1P uyarır ve proliferasyonu destekler	6
3.1. Tez akış şeması	27
4.1. Deney sonucu elde edilen kromotogram	28
4.2. PCA grafiğinde kontrol grubuna göre primer ve sekonder glioblastomların dağılımı	29
4.3. PCA grafisinde düşük evreli glial tümörler ile sekonder tümörlerin kesişim kümesinin olmadığı izlenmekte	29
4.4. PCA grafisinde primer ve sekonder glioblastom gruplarının ilişkisi	30
5.1. Steroid hormon biyosentezi	45

TABLULAR

Tablo	Sayfa
3.1. Standart doğru için standart çözeltiler ve derişimleri	24
3.2. C18 kolon için kullanılan gradient programı	25
3.3. LC/MS Q-TOF parametreleri.	25
4.1. Gruplar arasında > 1.5 kat değişikliğe sahip metabolitler (p<0.05)	31
4.2. Gruplar arasında > 1.5 kat değişikliğe sahip metabolitler (p<0.05)	35

1. GİRİŞ

Glioblastom üzerinde çok fazla çalışılmış bir kanser türü olmasına rağmen henüz literatürde primer ve sekonder glioblastomlardaki metabolomik farklılıkları ve bunların kişiye özel tedavilerin planlanmasındaki faydasını gösterecek yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmadaki amacımız morfolojik olarak aynı olan ancak genetik olarak son derece farklı olan primer ve sekonder glioblastomlu hastalardan elde edilen doku örneklerinde bu tümörlerin gelişiminde ve patogenezinde metabolom düzeyinde farklılıkları tespit etmek, olası yolları belirlemek ve olası tedavi seçenekleri konusunda hipotez geliştirilmesinde ön çalışma ortaya çıkarmaktır.

Bursa Uludağ Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalında klinik ve IDH, pTERT mutasyonları ile primer ve sekonder glioblastom tanısı doğrulanmış ve düşük evreli beyin tümörü ile epilepsi cerrahisi yapılırken elde edilen kontrol beyin dokusu örneklerinde Q-TOF LC/MS ile hedefsiz metabolomik analiz yapılmıştır. Biyoinformatik veri tabanları ve istatistikleri kullanılarak anlamlı metabolitler tespit edilmiş, yollara göre gruplandırılmış ve yorumlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Glioblastom erişkin çağda görülen en sık beyin tümörüdür ve malign santral sinir sistemi tümörlerinin %45.2'sini oluşturmaktadır. Tüm tedavilere rağmen ortalama sağ kalım 15 ay civarındadır (1). Hastaların sadece %5.5'i tanı aldıktan sonra 5 yıllık sağ kalım göstermektedir (2). Glioblastom farklı genetik yollarla gelişen primer ve sekonder alt türleri içeren; değişik yaş gruplarında sağ kalımda farklılık izlenen bir patolojidir (3). Glioblastomun yıllık insidansı 3.19/100000'dir. Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerde kadınlara oranla 1.58 kat daha fazla görülür. İnsidans yaşla beraber artar. 75-84 yaşları arasında pik yapar ve 85 yaşından sonra görülme sıklığı azalır. Toplumun yaşlanması ile beraber görülme sıklığı da artmaktadır.

Primer glioblastomlar tüm glioblastomların %80'ini oluşturur ve daha yaşlı hastalarda (ort 62y) görülmektedir. Sekonder glioblastomların ortalama görülme yaşı ise 45'dir. Bunlar düşük evreli astrositom veya oligodendrogliomun evresinin artışı ile ortaya çıkarlar. Sekonder glioblastomlar genellikle frontal lobda yerleşir, daha az nekroz gösterir ve primer glioblastoma göre prognozları daha iyidir.

Primer glioblastom erkeklerde daha sık görülürken sekonder kadınlarda daha sık izlenir (4). Sıklıkla supratentoriyal bölgede yerleşirken, serebellum ve spinal kordda nadiren görülür.

Glioblastomlar benzer histolojik özellikleri paylaşan ependimomlar, oligodendrogliomalar, optik yol gliomları ve karışık gliomalar gibi hücre türlerini içerirler (5). Bu tarz bir kategorizasyon gliomların histolojik yapısını anlamada faydalıdır ancak tümörün malignitesi hakkında bilgi vermemektedir. 2014 yılında bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü tarafından moleküler bilgilere dayanan yeni bir sınıflama ortaya konulmuştur (6,7). Glioblastomun heterojen yapısı tüm hastalar için etkili bir tedavi rejimi oluşturulmasını zorlaştırmaktadır (5). Günümüzde standart glioblastom tedavisi cerrahi, kemoterapi ve radtoterapiyi içeren multimodal bir tedavidir. Maksimal tümör rezeksiyonu kitle etkisini ortadan kaldırır ve sonuç sağ

kalım oranını uzatır (8). Cerrahi sonrası çoğu hasta aynı anda kemoterapi ve radyoterapi almaktadır. Günümüzde standart radyoterapi 6 hafta süre ile haftada 5 gün 2 Gray fraksiyone doz ile total 60 Gray doz verilmesidir (5). Cerrahiden hemen sonra uygulanan erken radyoterapi ile progresyonsuz sağ kalımda uzama izlenmiştir ancak sonuç sağ kalıma bir etkisi saptanamamıştır (9). Orta derecedeki etkinliği ve ciddi yan etkilerine rağmen kemoterapi glioblastomun standart tedavisinin bir parçası olmaya devam etmektedir.

2.1. Etiyoloji

Glioblastom oluşumuna neden olabilecek pek çok genetik ve çevresel faktör araştırılmıştır ancak hastaların çoğunda bir risk faktörü tespit edilememiştir. Pekçok diğer kanser gibi glioblastomlar sıklıkla sporodik olarak gelişirler. Bazı çalışmalar, alerji, bağışıklık faktörleri, bağışıklık genleri ve bazı tek nükleotid polimorfizmlerine karşı azalmış duyarlılıkla birlikte glioblastom gelişme riskini göstermiştir (10).

Allerjiler ve atopik hastalıklar ile glioblastom arasında zayıf bir ilişki saptanmıştır (11). Antiinflamatuvar ilaçların 10 yıldan az kullanılmasının da glioblastom gelişmesi açısından koruyucu etkinliği olduğu gösterilmiştir (12). Alkol kullanımı, sigara, cep telefonunu kullanımı, N- Nitroz maddelere maruziyet ve uyuşturucu kullanımı ile glioblastom gelişimi arasında bir bağ saptanamamıştır (13).

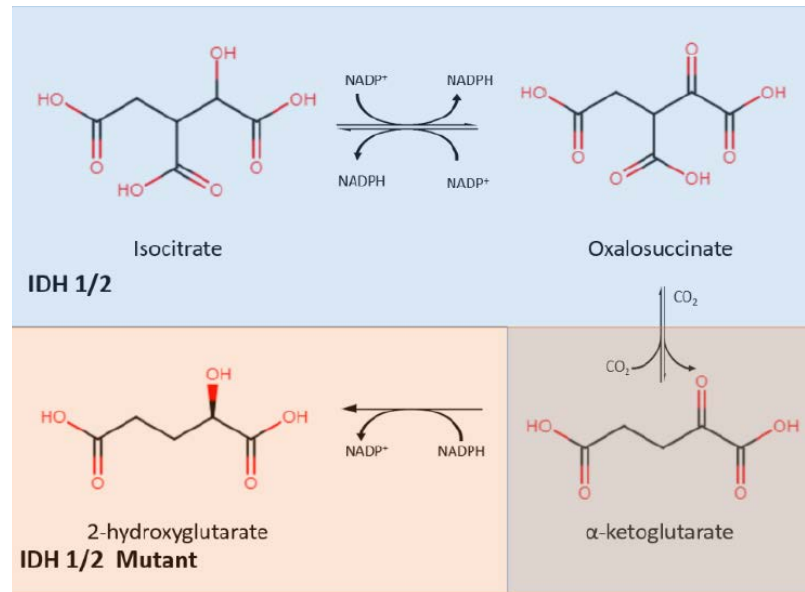
2.2. Patogenez

2.2.1. IDH Mutasyonu

İzositrat dehidrojenaz (IDH) sitrik asit siklusunda anahtar rol oynayan bir enzimdir. 3 izoformu vardır. IDH1, IDH2 ve IDH3. IDH1 peroksizomlar ve sitoplazmada bulunurken IDH2 ve IDH3 mitokondrial matrikste yer alır. Oksidatif dekarboksilasyon sırasında izositrat ve NADP⁺ IDH1 ve IDH2 ile α -ketoglutarat (α -KG), NADPH ve karbondioksite çevrilir (14). Bu işlem geri dönüşebilen çok basamaklı bir olaydır. İzositratın okzalosüksinat oluşumu için oksidasyonu ile başlar,

daha sonra α -KG oluşumu için dekarboksile olur (Şekil 2.1). α -KG pek çok enzim için kofaktör olarak işlev görür (15).

Sekonder glioblastomların neredeyse tamamında IDH'da mutasyonlara rastlanırken primer glioblastomlarda çok nadiren izlenmektedir (16). IDH mutasyonları olduğunda enzim fonksiyonlarında artış ve azalmalar izlenmektedir (17). Bu mutasyonlar izositrat için bağlanmayı azaltarak izositratın α -KG'a dönüşümünü önler. IDH mutasyonları aynı zamanda NADPH için bağlanma afinitesini artırır ve bu durum karboksilasyon olmadan sadece α -KG'yi düşürerek eksik reaksiyona ve α -KG yerine 2-hidroksiglutarat (2-HG) oluşumuna neden olur. Bir onkometabolit olan 2-HG'nin aşırı artışı kanserogeneizde etkilidir (18). Mutant IDH (mIDH) inhibitörlerinin keşfi profilerasyon gösteren kanser hücrelerinin saptanmasına yardım eden hedeflenmiş kanser tedavisilerinin gelişmesine neden olmuştur. mIDH1 inhibitörü AGI-5198, 2-HG'yi inhibe eder ve mIDH1 gliom hücrelerinin in vivo büyümesini engeller (19). Seçici bir R132H-IDH1 inhibitörü olan AG-5198 mIDH1'in 2-HG üretme yeteneğini neredeyse tamamen bloke eder ve gliogenezdaki genlerin ekspresyonunu indükler (20). Klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, AG-221'in (seçici bir mIDH2 inhibitörü) ilerlemiş solid tümörlere karşı inhibe edici etkisinin umut verici olduğunu göstermektedir (21).



Şekil 2.1. IDH1/2 enzimi izositratı α -KG'a çevirirken mutant IDH1/2 enzimi α -KG'ı 2-HG'a çevirir (22).

2.2.2. Notch Yolağı

Notch yolağı santral sinir sistemindeki nöronlarda dahil olmak üzere pek çok dokuda proliferasyon, apopitoz, hücre farklılaşmasında rol oynar. Kök hücrelerin başka bir forma dönüşmek yerine glial hücreler olarak gelişmesinde rol alır (23). Hücre süreçlerindeki kilit rolü nedeniyle, Notch sinyalinin tümörogeneze doğru sapması kolaydır. Bu yolda 4 reseptör yer alır; Notch-1, Notch-2, Notch-3 ve Notch-4. Notch-1 tümör supresyonunda rol oynar, aynı zamanda malign fenotipik gliomlarda progresyon ile ilişkilidir. Notch-2, gliom hücre proliferasyonunda rol oynayan Notch-3 ile beraber gliomlar için prognostik bir belirteçtir. Notch-4 tümörün agresivitesi ile ilişkili bulunmuştur (24).

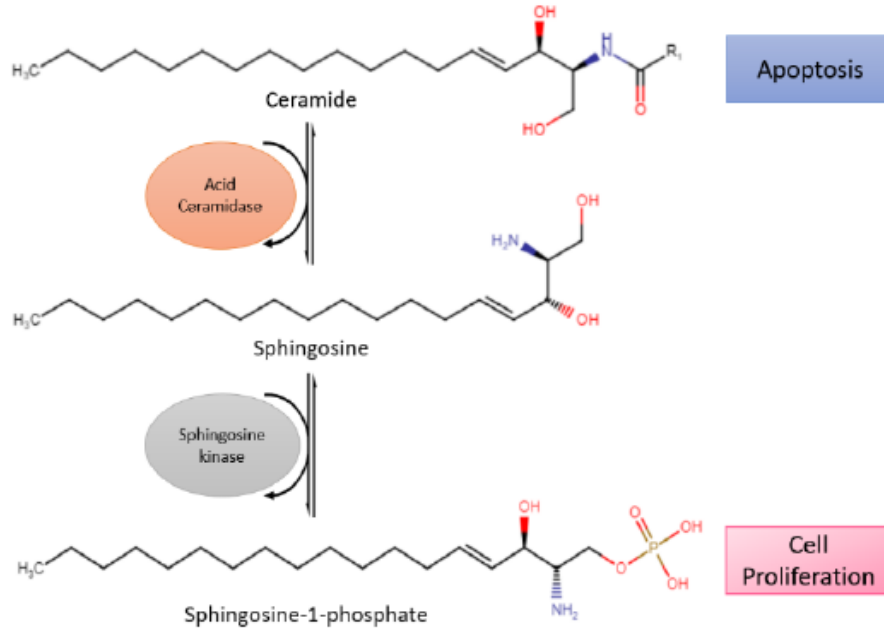
Çalışmalar Notch yolağının gliom hücre kültürlerinde tedavi için etkili bir hedef olduğunu göstermiştir (25). Notch yolağını inhibe eden ilaçlar α -sekretaz inhibitörleri, γ -sekretaz inhibitörleri ve diğer moleküller olarak 3 gruba ayrılabilir. Ying ve ark (26) glioblastom hücre kültürlerinde retinoik asit tedavisinin etkisini incelemişler ve retinoik asit ile tedavi edildiğinde intrasellüler Notch reseptörünün glioblastom nörosferlerini kurtarmaya zorlandığı ve Hes2, hey1 ve Hey2'de inhibisyona neden olduğunu saptamışlardır. Yazarlar glioblastom hücre kültürlerinde retinoik asitin hücre büyümesini ve farklılaşmayı durdurduğu sonucuna varmışlardır.

Fan ve ark (25) Notch-2 ile tümör hücresi büyümesini arttıran glioblastom nörosfer oluşumu ile ilgili çalışmalarında γ -sekretaz inhibitörleri kullanarak Notch yolağını inhibe etmiş ve in vivo olarak glioblastom nörosfer oluşumunu azalttığını göstermişlerdir.

2.2.3. Seramid Sinyal Yolağı

Asid seramidaz (ASAHI) seramidleri sfingozin ve serbest yağ asitlerine metabolize eden bir enzimdir (Şekil 2.2). Seramidler yaşlanmada ve hücre ölümünde rol alırlar (27). Ancak, bu metabolik yolağın bir ara ürünü olan sfingozin-1-fosfat (S1P) hücrenin sağkalımına ve çoğalmasına etki eder (28). Gliom hücreleri seramidlerden S1P'a değişim gösterir ve seramidden daha yüksek S1P

konsantrasyonuna neden olur. Daha az seramid miktarı ile apoptoz düşer ve gliom hücreleri daha fazla yayılma imkanı bulur (28). Glioblastomda ASAH1'in modifikasyonu, hücreler arası dokuya salgılanmasını ve malignite potansiyelini çevre dokulara yaymasını sağlamaktadır (29).



Şekil 2.2. Seramidleri sfingozine dönüştüren ve sfingosin kinaz tarafından sfingosin-1-fosfata (S1P) dönüştürülen bir lizozomal enzim olan asit seramidazın (ASAH1) reaksiyonu. Seramid apoptozu teşvik ederken, S1P uyarır ve proliferasyonu destekler (22).

Glioblastomlarda ASAH1 ekspresyonunun yüksek olduğu bilinmektedir. İrradiye edilmiş hücre kültürlerinde ve tümör dokularında, irradiye edilmeyenlere göre daha yüksek oranda ASAH1 saptanmış ve bu durum apoptoza direnç ve glioblastom nüksü lehine yorumlanmıştır (28). ASAH1'in fazla ekspresyonu antikanser tedavilerde potansiyel bir biyomarker olmasını sağlamıştır ancak şu an klinikte kullanılan bir ürün geliştirilememiştir.

2.2.4. Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) Sinyal Yoluğu

Potansiyel bir anjiyogenik sitokin olan VEGF oksijenin sağlanması için yeni kan damarlarının oluşumunu stimüle eder. Normal VEGF sinyal yoluğu hücreler oksijensiz kaldığında aktive olur. Hipoksi ile indüklenebilen faktör VEGF salınımına

ve VEGF'nin reseptörlerine (VEGFRs) bağlanmasına neden olur. Bu durum tirozin kinaz yolağını aktive ederek anjiyogenezis ile sonuçlanır. Bu durum normal şartlarda embriyolojik gelişim, yara iyileşmesi, kollateral sirkülasyon kas hasarını takiben aktifleşir (30).

VEGF, glioma kök hücrelerinde mikro ortamın işleyişini optimize eder ve anjiyogenezisin desteklenmesinde anahtar rol oynar. Glioblastomun mevcudiyeti için vasküler kaynaklar şarttır ve bu durum erken dönemde anjiyogenez ile sağlanır (30). VEGF yolağının bloklanması anjiyogenezi inhibe ederek etkili bir tedavi seçeneği olabilir. Çeşitli anti-anjiyogenik ajanlar çeşitli kanser türlerinde tedavilerde kullanılmaktadır (31). Anti-VEGF tedavisinin çok geniş şekilde kullanılmasına ve vazojenik ödemi azaltmadaki etkisi gösterilmesine rağmen sonuç sağ kalıma etkisi saptanamamıştır (32).

Günümüzde tivozanib, cediranib, lenvatinib, sorafenib, sunitinib ve pazopanib gibi çeşitli tirozin kinaz reseptörleri, VEGFR inhibisyonu için kullanılmakta; aynı zamanda TTAC-001 antibody, VXM01 aşısı ve bevacizumab kombine tedavileri ile çalışmalar halen devam etmektedir.

2.2.5. PDGF Sinyali

Platelet-derive büyüme faktörü (PDGF) glioblastom proliferasyonunu ve hayattta kalımı arttırdığı için tedavide potansiyel bir hedef haline gelmiştir (33). Normal glial hücrelerde PDGF sinyal yolağı; PDGFA, PDGFB, ve PDGFC gibi PDGF ligandlarının PDGFR α veya PDGFR β gibi PDGF reseptörlerine bağlanması ile başlar. PDGFR hücre yüzeyindeki reseptörü tirozin kinazdır. Bağlandıktan sonra dimerize olur ve reseptördeki çeşitli tirozin rezidülerinin fosforile olmasına neden olur. Bu aktive form pek çok protein kompleksine bağlanarak DNA sentezine ve hücre proliferasyonuna yol açan sinyal iletim yollarını aktive eder (34). Glioblastomlarda normal beyin dokusunda bulunmayan bir PDGF otokrin döngüsü sergilenir (35). Pek çok çalışmada PGGF'ün glioblastomlarda fazla eksprese edildiği gösterilmiştir. PDGFA ve PDGFB diğer ligandlara göre daha fazla ekspre edilir (36). PDGFR α glioblastomlarda artar, yeniden düzenlenir ve onkogenezde rol oynar (37).

Shih ve ark (38) PDGF ve PDGFR'nin glial hücre kültürlerinde fazla salındığını göstermişlerdir. Tümör proliferasyonunda otokrin sinyal hücre kültürlerinde PDGF inhibitörlerinin hücre büyümesini sınırladığı gösterilmiştir.

2.2.6. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Yolağı

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), epidermal büyüme faktörleri ve dönüştürücü büyüme faktör- α gibi hücre dışı sinyal ligandlarını hücre dışı yapısına bağlayan bir transmembran hücre RTK'dır. Normal glial hücrelerde reseptör sinyal ligandına bağlandığında yolak aktive olur ve inaktif monomerden aktif homodimer oluşumunu sağlar. Bu dimerizasyon intrasellüler tirozin kinaz aktivitesini artırır ve tirozin rezidülerinin EGFR'nin C terminalinde otoposforillenmesine neden olur. Bu otoposforilasyon DNA sentezine, hücre proliferasyonuna, göçüne ve adezyonuna yol açan birçok sinyal transdüksiyon kaskadının başlamasını uyarır (4).

Glioblastom patogeneğinde EGFR mutasyonları sık çalışılmış bir konudur. Primer glioblastomlarda EGFR amplifikasyonu %40 oranında görülürken sekonder glioblastomlarda nadiren izlenir (39). Pediatrik glioblastomlarda ise nadiren görülür veya hiç bulunmaz (40). Ohgaki ve ark (41) çalışmalarında EGFR amplifikasyonunu sadece 35 yaş üzerindeki glioblastomlu hastalarda tespit edebilmişlerdir. Artmış EGFR ekspresyonu olan hastaların tümörlerinin yaklaşık yarısında tedavi için ideal bir hedef olan EGFRvIII varyantı tespit edilmiştir (42).

Günümüzde çalışmalar tirozin kinaz inhibitörleri ve immünoterapiye yoğunlaşmıştır. Örneğin bir EGFR-TFI olan OSI-774 glioblastomda apoptozu artırır ve sekonder glioblastomda ümit verici bir ajan olabilir (43). Ancak başka bir TKI olan lapatinib ile faz I/II çalışmalarında sınırlı antitümöral aktivite saptanmıştır. TKI ümit verici ajanlar olmasına rağmen klinik kullanıma girmesi için zamana ihtiyaç duyulmaktadır (44).

2.2.7. PI3K/AKT/mTOR Yolağı

PI3K/AKT/mTOR yolağı hücre siklusu için yaşamsal intrasellüler bir sinyal yolağıdır. Fostaditilinozitol 3- kinaz (PI3Ks) fosforilasyonla serin/treonin-spesifik protein kinazı (AKT) aktive eden intrasellüler sinyal düzenleyici bir enzimdir. AKT rapamisinin memeli hedefini aktive eder (mTOR). mTOR değişik bağlayıcılar ile iki kompleks yapar; mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) (45). mTORC1 rapamisin duyarlıdır ve büyüme faktörleri, stress, enerji durumu, oksijen, amino asit konsantrasyonları ile aktive olarak glial hücre büyümesini hızlandırır (45). mTORC2 ise rapamisine duyarlı değildir, glial hücre proliferasyon motilitesini ve AGC protein kinazı aktive ederek sağ kalımı artırır (46). PI3K/AKT/mTOR yolağının fazla çalışması glioblastomlu hastaların sağ kalımını düşürür ve tümörün agresivitesini artırır (47).

2.2.8. Fosfat ve Tensin Homolog (PTEN) Sinyali

PTEN PIK sinyalini antagonize ederek AKT aktivasyonunu lipid fosfataz aktivitesi yardımı ile önleyen bir tümör baskılayıcıdır (48). Glioblastomlarda mutasyonlara bağlı olarak inaktive olduğu gösterilmiştir. Homolog genlerin bir tanesindeki tek bir mutasyon tümör büyümesini başlatmak için yetersizdir. Birinin veya ikisinin delesyonu kontrolsüz hücre büyümesi ile sonuçlanır (49). PTEN aynı zamanda gliom hücrelerini kemoterapi ve radyoterapiye duyarlı hale getirir (50).

Günümüzdeki çalışmalar PTEN mutasyonunun düzeltilmesine yoğunlaşmıştır. Glioblastoma hücre dizilerindeki hücresel proliferasyonu azaltan adeno-ilişkili virüs aracılı gen kullanılarak glioblastomda PTEN'in düzeltildiğini bildiren bir çalışma, bu hastalık için potansiyel bir tedavi olabileceğini göstermektedir (51). Bir diğer çalışmada, glioblastoma hücre dizilerinde (42MGBA ve T98G) mutant PTEN allelinin gen düzenleme kullanılarak düzeltilmesinin, hücre proliferasyonunun azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (52).

2.2.9. SHH Sinyali

Normal glial hücrelerde sinyal, sonik hedgehog (SHH) glikoprotein bağlanması ile başlar. Patched1 proteini ve ko-reseptörleri etkisiz hale getirilir ve Smoothened (SMO) proteininin inaktivasyonuna yol açar. SMO aktifleştğinde glioma ilişkili (GLI) transkripsiyon faktörleri nükleusa yerleşir. GLI nükleusa girdiğinde GLI1 ve GLI2 transkripsiyon faktörleri aktive olur. Bu aktivasyon, SHH sinyalinde hedef aktivasyonu arttırarak proliferasyona, anjiyogeneze, epitelden mezenşimal geçişe ve kök hücrelerinin kendini yenilemesine yol açar (53). Glioblastomalarda, tipik olarak Patched1'deki mutasyon ve/veya SMO'daki mutasyonların aktive edilmesi yoluyla SHH sinyalinin anormal aktivasyonu, yetişkin kök hücrelerinin glioblastom kök hücrelerine dönüşmesine yol açar. SMO inhibisyonu, GLI'nin aşağı yönde aktivasyonunu önlediğinden, SMO, SHH yolu inhibitörlerinin geliştirilmesi için önemli bir moleküler hedefdir (54).

2.3. Metabolomik

Metabolom, bir hücre veya canlıdaki metabolitlerin tümüne verilen isimdir. Metabolomlar; protein, hücre duvarı, RNA ve DNA gibi yapıların yapısında yer alır. Son 20 yılda biyokimya, farmakoloji ve toksikolojide metabolomik analizlere sıklıkla başvurulmaktadır. Metabolomik analizler, biyolojik sistemlerde 1kDa-1.5kDa'dan daha küçük moleküllerin tanımlanması ve ölçülmesini sağlar (55-57). Metabolitler biyokimyasal veya enzimatik aktivitenin doğrudan bir olduğundan bir bireyin fenotipindeki biyokimyasal değişikliklerle ilişkilendirilir (55,56). Metabolomun deşifre edilmesi, biyolojik bir sistemdeki değişiklikleri izlemeyi ve patolojik bir durumda bozulan yolları tanımayı sağlar. Kanser ve normal hücreler veya kanser alt tipleri arasındaki metabolik farklılıkların anlaşılması, tedavi edilemeyen glioma gibi tümörler için yeni terapötik hedefler bulunmasını sağlayabilir. Dahası, metabolomikler, yüksek verimli, tam otomatik ve nispeten düşük maliyetli tanısal yöntemlere sahip olduğundan, transkripsiyonel ve proteomik yaklaşımlardan daha pratiktir (56,57). Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve kütle spektrometresi (MS) analizleri, kapsamlı bir biyokimyasal

değerlendirme sunarken analitik testlerin hassasiyetini ve çözünürlüğünü de arttırmaktadır. Metabolomik analizi için yeni nesil yüksek çözünürlüklü analitik platformlar kullanılarak, küçük bir biyolojik numuneden, yüzlerce-binlerce küçük molekül tanımlanabilir. Bu nedenle metabolomikler, tümörün patogenetik mekanizmaları, teşhisi ve tedavi yanıtını izlemede yaygın olarak kullanılan bir strateji haline gelmiştir (56–59). Kolon, over, özofagus, ağız, meme ve prostat kanserlerinde, lösemide normal hücrelere göre metabolik farklılıkların tanınmasında önemini kanıtlamış olan (60–66) metabolomik araştırmaları, beyin tümörlerinin de agresif yapısına ilişkin yeni bilgiler sunmaktadır (67,68).

Metabolomik genellikle metodolojik olarak farklı iki bölümden oluşur. İlk olarak; analiz, metabolitlerin konsantrasyonunu ölçmek için global bir profillemeye aracı kullanırken, sonraki veri matrisi çok değişkenli istatistikler veya veri azaltma araçlarıyla sorgulanır. İkinci olarak, örüntü tanıma süreçleri denetimsiz ve denetimli tekniklere ayrılabilir. İlki, verilerle ilişkili doğuştan gelen varyasyonu görüntülerken, ikincisi verileri kümelemek için önceki bilgileri kullanır.

2.3.1. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisine dayalı yaklaşımlar, doğal olarak nükleer manyetik rezonans spektroskopisi tekniklerinden daha hassastır ve tümör metabolomunda bulunan daha düşük konsantrasyonlu metabolitlerin saptanabilmesini sağlar.

Kütle spektrometrisine dayalı yaklaşımların hassasiyeti, eksize edilmiş dokudaki iz metabolitlerini izlemek için de kullanılmıştır. Nörositomaların nörotransmitter profili çıkarılmış (69), Olsen ve arkadaşları (70) gliomadaki morfini saptamak için kuadrupol MS uçuş zamanı (flight time) kullanmışlardır. Hücre ölümü sırasında nöroblastoma hücrelerinde değişen lipid metabolitlerin ayırt edici olduğu gösterilmiştir (71). Beyin tümörü örneklerindeki CCM pikinin fosfatidilkolin ile değil de büyük ölçüde kolin, PC ve GPC ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (72).

Kütle spektrometrisi (MS), yüksek duyarlılığı ve geniş dinamik aralığı nedeniyle metabolomik için değerli bir analitik platform sağlar (73). Çalışma

prensipileri ve performansta farklılık gösteren çok yönlü bir tekniktir (73). Farklı iyon hızlandırma ve algılama yöntemlerine sahip çeşitli kütle analizörleri mevcuttur ve yüksek çözünürlüklü (HR; örneğin uçuş süresi (TOF), Fourier dönüşüm iyon siklotron rezonansı (FT-ICR), yörünge detektörü (Orbitrap)) ve düşük çözünürlük (LR; örneğin tek dört kutuplu (Q), üçlü dört kutuplu (QqQ) ve iyon tuzağı (IT)), ayrıca iyonların üretimi için elektron çarpması (EI) gibi sert iyonizasyon teknikleri ve kimyasal iyonizasyon (CI), elektrosprey iyonizasyon (ESI), atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon (APCI) dahil yumuşak iyonizasyon teknikleri atmosferik basınç fotoiyonizasyonu (APPI), matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ve desorpsiyon elektrosprey iyonizasyonu (DESI) gibi farklı ara yüzler vardır (73).

Son zamanlarda, tandem kütle spektrometresi (MS/MS) veya MS_n analizi, aynı veya farklı detektörlerin kombinasyonunu, yapısal açıklama için hibrit kütle analizörlerini ve metabolitlerin kantitatif analizini mümkün kılmıştır (74). MS_n analizinde metabolitlerin parçalanma modeli temel olarak çarpışmanın neden olduğu ayrışma (CID) ve yüksek enerjili çarpışma ayrışması (HCD) gibi düşük enerjili ayrışma ile elde edilir (75). IT-Orbitrap, Q-TOF ve IT-TOF gibi HR tandem kütle spektrometreleri, metabolit karakterizasyon güvenilirliğini önemli ölçüde artıran, yüksek kütle doğruluğuna sahip bileşiklerin ve ürün iyon bilgisi, izotopik dağılımı ve temel bileşimini sağlar (76). Bu nedenle, bu yöntemler hedeflenmemiş metabolomikler için tercih edilir (76). Aksine, çoklu reaksiyon izleme (MRM) kullanan üçlü dört kutuplu (QqQ) ve hibrit doğrusal iyon tuzağı üçlü dördütlü (QqQLIT) gibi tek reaksiyon izleme (SRM) şeklindeki LR tandem kütle spektrometreleri, kantitatif analiz için iyi seçicilik ve hassasiyet veya metabolik profil saptanmasını sağlar (77).

Çoğu uygulama, dokuda analizden önce bir doku ekstraktındaki metabolitleri başlangıçta ayırmak için gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografi (LC) kullanır. Tipik olarak EI veya CI kullanan GC-MS, uçucu ve termal olarak kararlı metabolitlerin analizi için idealdir (73). GC-MS ayrıca kimyasal türevlendirme yoluyla yarı uçucu veya uçucu olmayan metabolitleri analiz etmek için kullanılır; ancak bu uzun analiz süresine ve numune hazırlama değişkenliğine yol açar (73). Ek

olarak, tamamlanmamış türetme, degradasyon ve yan reaksiyonlar nedeniyle analit başına çoklu MS pikleri ve pik başına çoklu analitler gibi türevlendirme artefaktları, spektral yorumlamayı ve tanımlamayı daha zor hale getirir (78). Son zamanlarda, GC-QLT-Orbitrap hibrit cihazının geliştirilmesi, eser maddelerin analizi ve bilinmeyen metabolitlerin yapısal karakterizasyonu için GC/MS tabanlı metabolomiklerde önemli gelişmeler sağlamıştır (79).

GC-MS'nin aksine, API (ESI, APCI ve APPI) arayüzü ile birleştirilmiş LC-MS, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız metabolitlerin analizi için mükemmel hassasiyet (pikomolden femtomol seviyelerine kadar), seçicilik ve özgüllük kombinasyonu sağlar (80).

Kütle spektrometrik ölçümler (GC-MS veya LC-MS), kütleğe göre çok sayıda izotopomeri tanımlamadaki duyarlılıkları nedeniyle kararlı izotopların saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (81). Bununla birlikte, sadece kütle ile tanımlanan izotopomerler ($m + 1$, $m + 2$, $m + 3...$) konumsal izotopik etiketleme bilgisi sağlamaz. Konumsal izotopik zenginleştirmelerin ayrıntılı bir analizi için NMR veya tandem kütle spektrometresi kullanılmalıdır (80). Tandem kütle spektrometrisindeki (MS/MS) en son gelişmeler, izotopik olarak etiketlenmiş ^{13}C amino asitler ve glikolizin diğer ara maddeleri, pentoz fosfat yolu ve TCA döngüsü ara maddeleri için kütle parçalanmasına dayalı konumsal etiketlemenin belirlenmesine izin verir (82) (83).

2.3.2. Kritik Metabolitlerin Tespiti

Metabolomik analizindeki zorluklar, her metabolitin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Biyokimyasal reaksiyonlar sırasında sürekli oksidasyon/redüksiyon veya bozunma olduğundan, metabolizma çok hızlı değişir. Birçok metabolitin de sınırlı yarılanma ömrü oluşu, bu yöntemin zorluğunu oluşturur (84). Bu nedenle, numune toplama, saklama ve işleme, kromatografik ayırma, analitik enstrümantasyon, metabolit tespitini ve kantitatif tekrarlanabilirliği en üst düzeye çıkaran ve sonuçta yüksek kaliteli veriler sağlayan veri işleme ve analizi içeren deneysel bir prosedürü dikkatlice tasarlamak önemlidir (78). Biyoakışkanlar

için en yaygın kullanılan numune hazırlama yöntemleri "dilute and shoot", çözücü çökeltme ve ultrafiltrasyondur (85). Bu yöntemler arasında, ultrafiltrasyon, proteinin daha iyi uzaklaştırılmasını, polar metabolitlerin mükemmel bir şekilde kapsanmasını ve polar olmayan metabolitlerin metanol-su ve ardından kloroform kullanılarak membrandan doğrudan ekstraksiyonunu sağlar (85). Hücre metabolomikleri için, örnekleme hücre tipine bağlı olarak, ya yapışık kültürler olarak ya da süspansiyon içinde büyütülmesi için ayarlanması gerekir (86). Farklı metabolit ekstraksiyon prosedürü arasında, sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) en yaygın kullanılan yöntemdir (86). Katı faz ekstraksiyonu (SPE) veya katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) gibi diğer yöntemler özellikle hedefli analiz için kullanılır (86). Bununla birlikte, bu yeni protokollerin çoğu genellikle belirli bir analitik platform için geliştirilmiştir.

2.3.3. Sistein Metabolizması

Sistein, indirgenmiş glutasyon (GSH) ve homosistein gibi sistein metabolizmasına katılan metabolitlerin ve bunlara karşılık gelen disülfidlerin [sistin, oksitlenmiş glutasyon (GSSG) ve homosistin] analiz edilmesi çok zordur. Bunlar oldukça polardır ve biyokimyasal reaksiyonlar sırasında oksidasyona/ redüksiyona uğrama eğilimindedir (87). Tiyol grupları (-SH) kararsızdır ve oksidatif birleştirme reaksiyonları ile karşılık gelen disülfidlere kolayca dönüştürülür. Bu nedenle, biyolojik numunelerde bu metabolitleri doğru bir şekilde analiz etmek için tiyol grubunun (-SH) türetilmesi gereklidir. Tiyol analizinde ortam/ mobil fazın pH değeri en önemli parametredir ve bu bileşikler pH > 7'de hızla enzimatik olmayan otoksidasyona uğradığından pH 7'nin altında tutulmalıdır (88). UV ve floresans saptama ile birleştirilmiş HPLC, GC ve CE dahil olmak üzere çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir (87,89).

Elektrokimyasal detektör (ECD) ile birleştirilmiş HPLC, bu metabolitlerin türevlendirme olmaksızın kısa sürede analizine izin verir, ancak tekrarlanan analizlerde sinyal hassasiyeti kaybı olabilir (90). Bununla birlikte, yüksek hassasiyet ve yüksek verim kapasitesi nedeniyle, iyodoasetik asit, maleimidler, Ellman reaktifi, 4-floro-7-ulfamoilbenzofurazan (ABD-F) ve monobromobimane gibi tiyol reaktif

gruplarla -SH grubu örneklerin türevlendirilmesini içeren LC-MS/MS yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır (91). Türevlendirme aşaması yalnızca tiyollerin otooksidasyon ve bozunmaya karşı korur, ancak disülfitlerin enzimatik indirgenmesini önlemez. Doğrudan LC-MS/MS analizinde, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) -80 ° C'de saklanan numunelerin tedavisi ve deproteinizasyon için tiyol oksidasyonunu en aza indiren muamelesi için trikloroasetik asit kullanılır (88).

2.3.4. Nükleotidler

Nükleotidler, DNA sentezi ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyon da dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal yollarda önemli rol oynar ve bu metabolitlerin tam karakterizasyonu, özellikle redoks aktif (NAD/NADH, NADP/NADPH ve FAD/FADH) ve hidrolitik olarak kararsız nükleotidlerin kantifikasyonu için potansiyel olarak kritiktir. Kritik nükleotidlerin analizi için kapiler elektroforez CE, hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) ve iyon eşleştirme kromatografisi (IP-LC) gibi etkili kromatografik teknikler geliştirilmiştir (92).

2.3.5. 2-Hidroksiglutarat

D-2-hidroksiglutarik asit (D-2-HG), önemli bir onkometabolittir ve düşük dereceli gliomalarda dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde IDH mutasyonlarının iyi bilinen tanısal belirteçidir (93). 2-hidroksiglutarik asidin (2-HG) tanımlanması ve miktarının belirlenmesi zor değildir, ancak D ve L enantiyomer fraksiyonlarının karakterizasyonu hala kritiktir ve kapsamlı numune hazırlığı gerektirir. HPLC analizi için kiral kolonların kullanımı tam olarak geliştirilmemiştir ve önemli miktarda malzeme gerektirir, bu nedenle bu teknoloji nadiren kanser araştırmalarında kullanılır ve yalnızca metabolik bozukluk çalışmalarında bol biyolojik numunenin (örneğin idrar) enantiyomerik analizi için uygulanabilir (94). 2-HG'nin D ve L formlarını ayırt etmek için 2-HG enantiyomerleri, kiral karbonun türevlendirilmesiyle diastereoizomere dönüştürülür (95). GC-MS ve LC-MS ile 2-HG enantiyomerlerinin analitik tayinleri, kiral durağan faz ve kiral türetme fazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (94-96).

LC-MS'nin aksine, rapor edilen GC-MS yöntemleri iki aşamalı türetme süreçleri gerektirir ve enantiyomerlerin zayıf ayrılmasını sağlar (96). Ayrıca, daha spesifik analizler için MRM modunda 2-HG enantiyomerik formları analiz etmek için LC-MS yöntemleri kullanılabilir (95).

2.3.6. Tek Karbon Metabolizması

Format, bir karbon metabolizması ve de novo purin biyosentezi dahil olmak üzere birçok biyokimyasal yolda merkezi bir rol oynar ve küçük moleküler ağırlığı nedeniyle analizi zordur (97). Uygun bir türevlendirme reaktifinin seçimi, reaktiflerin ve katalizörlerin optimum konsantrasyonu ve tampon çözeltisinin pH'ı, format esterlerin istikrarsızlığı ve kolayca hidrolize edilebilir doğası analitik geliştirmedeki temel endişelerdir (98). Pentafluorobenzyl bromidenin (PFBB_r), GC kolonunda daha iyi tutulması, daha yüksek duyarlılığı ve pH 6.8-8.0'da format esterinin geliştirilmiş stabilitesi nedeniyle en uygun türevlendirme reaktifi olduğu bildirilmiştir (98).

2.3.7 Beyin Tümörlerinde Metabolomik Çalışmaları

Glikoz, yağ asidi ve anaplerotik amino asit metabolizmasının metabolik değişimi beyin kanserinde malign transformasyon ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir (99). Son zamanlarda, metabolomik çalışmaları, "metabolik fenotiplerin" yeni terapötiklerin geliştirilmesi ve beyin tümörlerinde tedavi yanıtının izlenmesi için büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (68).

İn vitro deneylerle karşılaştırıldığında sınırlı sayıda primer numuneye rağmen, bazı laboratuvarlar astrositom ve glioblastom hastalarından beyin biyopsilerini, plazma/serum, idrar ve BOS numunelerini analiz etmiştir. Bu çalışmalar, beyin kanseri hastalarının tanı ve prognozu ile ilişkili farklı metabolik kalıpları belirlenmesinde öncü rol oynamıştır (100). Metabolik enzim izositrat dehidrojenaz 1'deki (IDH1) mutasyonlar, düşük evreli gliomlarda ve sekonder glioblastomda tanımlanmıştır ve α -ketoglutaratın NADPH'ye bağlı olarak D-2-HG'ye indirgenmesiyle sonuçlanmıştır (93). Yüksek D-2-HG seviyesiyle ilişkili IDH

mutasyonları, gliomalarda tümör oluşumuna ve malign ilerlemeye katkıda bulunur, ancak LGG'ler de yüksek D-2-HG seviyesi aynı zamanda daha uzun sağkalımın ve temozolomide (TMZ) iyi yanıtın bir göstergesidir (93).

Glioma derecesi ile ilişkili diğer bir ilgili metabolik biyobelirteç, fosfatidilinositol lipid ailesinin sentezi için önemli bir osmolit ve substrat olan miyo-inositol (MI) 'dur (101). Astrosit proliferasyonunu içeren birçok beyin hastalığında artan MI konsantrasyonu bildirilmiştir. Kallenberg ve arkadaşları (101), düşük evreli gliomu olan hastalara ve kontrol deneklerine kıyasla glioblastomlu hastalarda MI düzeyinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Malign tümör hücreleri, sitozolik NADH/NAD⁺ oranını artıran ve böylece laktat dehidrojenaz aktivitesini hızlandıran aktif glikoliz ile glikozun çoğunu laktik aside dönüştürür (102). Glioblastomda, piruvat kinaz (PK) PKM2'nin M2 izoformunun yukarı regülasyonu, aerobik glikolizi destekleyerek Lac üretimini artırır (103). Aerobik glikolize geçiş, enerji üretimini sürdürmek için gerekli oksijen tüketimi seviyelerini düşürerek, tümör hipoksisinin gelişimi sırasında bu tümörlere fayda sağlayabilir. Fosfoenolpiruvat (PEP), 3-fosfoglisarat (3-PG) ve Lac dahil olmak üzere daha yüksek trioz fosfat glikolitik ara ürün seviyeleri, gliomalar için benzersiz belirteçleri temsil etmektedir (102).

Mörén ve meslektaşları (104), glioma hastalarından alınan tümör dokusu ve serum örnekleri üzerinde metabolik profillemeye yaparak ve oligodendrogliomalara kıyasla glioblastomun metabolik belirteçlerini belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada, oligodendrogliomalı hastalara kıyasla glioblastomlularda serum örneklerinde artmış bulunan sistein (Cys) dahil olmak üzere çeşitli metabolitlerin dönüşümü bildirilmiştir (104). Beyin tümöründeki sistein metabolizması, sistein/ glutamat antiporter sistemi xc⁻ yoluyla GSH sentezindeki rolü nedeniyle önemli ölçüde ilgi görmektedir (105). Glu, Cys ve Gly'nin bir tripeptidi olan GSH, santral sinir sistemindeki hücrelerin redoks durumunun önemli bir hücrel antioksidan ve anahtar düzenleyicidir (105). GSH sentezi, redoks stresi ve hipoksi sırasında glioma hücrelerinin hayatta kalmasında önemli bir rol oynar (105). GSH'nin beyin tümörlerinin klinik evresi ile ilişkisi üzerine yapılan araştırmalar, yüksek dereceli gliomalarda (yüksek evreli gliomlar, III ve IV) düşük dereceli gliomalara (düşük

evreli gliom, I ve II) kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük GSH seviyeleri göstermiştir (106). Sistin katabolizmasının metabolik bir ara ürünü olan sistein sülfonik asit (CSA) oluşumunu indükleyen yeni bir metabolik yol tanımlanmıştır ve glioblastomlarda derece II gliom ile karşılaştırıldığında 23 kat artmış CSA birikimi gösterilmiştir (107). Bu nedenle, hücre dışı L-Cys ve CSSC havuzunun sürekli tükenmesi için kistinaz enzimi ile Cys'nin sistemik tüketilmesi, tümör direncinin üstesinden gelmek ve kanser tedavisine duyarlılığı arttırmak için ilgi çekici bir tedavi planı olarak sunulmuştur (108).

Sisteine ek olarak, beyin kanseri için diğer amino asitler özellikle ilgi çekicidir. Örneğin, Glu, memeli santral sinir sisteminde beyin gelişimini ve işlevlerini düzenleyen ana eksitator nörotransmitterdir (109). Glutamaterjik sistem, gliom hücrelerinin hayatta kalması, proliferasyonu ve migrasyonunda önemli bir rol oynar (109). Gln, α -ketoglutarata metabolize olur ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde substrat seviyesinde fosforilasyon yoluyla enerji sağlar, böylece metabolik yakıt görevi görür (110). Glioblastomda, yağ asidi veya lipid sentezi için asetil-CoA'nın çoğu hem glikolizden hem de glutaminolizden gelir (111). Yeni bir çalışmada glioblastom hücrelerinin, % 90 glikoz ve % 60 Gln'yi Lac veya Ala'ya dönüştürdüğü gösterilmiştir (111). Gln'nin Lac'a hızlı dönüşümü (glutaminoliz), yağ asidi sentezini desteklemek için yeterli NADPH üretir. Ayrıca, metabolomik araştırmalar, sistin/ glutamat antiporter sistemi xc⁻ yoluyla Glu salımının malign gliomaların büyümesini teşvik ettiğini göstermiştir. Bu nedenle, glutamat reseptörlerinin ve taşıyıcılarının hedeflenmesi, beyin tümörleri için yeni bir terapötik yaklaşımı temsil edebilir (109).

Palanichamy ve arkadaşları (112) yakın zamanda primer ve sekonder glioblastom hücrelerini inceleyerek, glioblastom dokularını ve normal insan astrositlerini analiz etmişler ve onkojenik kinazların aktivasyonu, proliferasyon, sağ kalım ve tedavi direncinin gelişimi ile ilişkili dört anahtar metabolit (triptofan, metiyonin, kynurenin ve 5-metiltiyoadenozin) tanımlamışlardır. Yazarlar Triptofan-kynurenin metabolik yolak ürünlerinin potansiyel glioblastom tedavisi için benzersiz bir hedef olarak önermektedirler (112).

Ektopik ve ortotopik insan glioblastom ksenogreft modellerinde lipidomik imzaları araştırmışlar ve glikosfingolipidleri, gliserofosfoetanolaminleri, triaçilgliseroller ve gliserofosfoserinleri ektopik ve ortotopik tümör modellerinde en büyük katlama etkisine sahip dört ana lipit sınıfı olarak tanımlamışlardır (78). Bu çalışma, beyin ve glioblastom tümörlerinde bu lipit sınıflarının kontrol beyin dokusuna kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (78). Önceki lipidomik araştırmalarda, düşük dereceli astrositomlara göre malign gliomlarda veya derece IV astrositomda toplam lipid miktarının daha düşük olduğu da gözlenmiştir (113). Bu çalışmalar, anaerobik glikolizden elde edilen glikoza ek olarak, glioblastomun yakıt kaynağı olarak yağ asitlerine bağlı olduğunu göstermektedir (78).

2.3.8. Metabolomikler ve Tedaviye Yanıt

Bugüne kadar yapılan birkaç çalışma ile tümör derecesi ve alt tipine bağlı olarak gliomların metabolomundaki temel farklılıkları belirlemiştir. Metabolomiklerin başka bir uygulaması, tedaviye yanıtı değerlendirmek için metabolomdaki bu değişiklikleri değerlendirmektir. Wibom ve ark. (114), glioblastom için radyoterapi alan hastaların hücre dışı sıvısını incelemiştir. Çalışmada, glioblastomdan hücre dışı sıvıyı örneklemek için stereotaktik mikrodializ kateterleri kullanılmıştır. Mikrodializ kateterleri, kontrast tutan tümörün çevresindeki beyin parankimine implante edilmiştir. Çalışmada, radyoterapi ile tedavi edilen örneklerde tümör ve komşu beyin dokusunda metabolik değişiklikler saptanmıştır. Tandle ve arkadaşları (67) tarafından glioblastomlu hastalardan alınan idrar örneklerinden yararlanılarak daha az invaziv bir metabolomik test kullanılmıştır. Glioblastomlu ve sağlıklı kontrollerden alınan 46 numunenin hasta sağkalımında % 6,5'lik bir fark saptanmıştır. Bunlar mannitol, piroglutamin ve 7-metilguanin içerir. Ek olarak, hastaların RT alıp almadığına bağlı olarak, birkaç bileşimin seviyelerinde önemli farklılıklar gösterdiği gösterilmiştir. Bunlar, tümü RT alan hastaların idrarında önemli ölçüde yüksek olan Nasetilfenilalanin, N-asetiltriptofan, N-asetiltirozin ve N-asetilprolin dahil olmak üzere N-asetillenmiş metabolitleri içermektedir. Ek olarak, sitrat, izo-sitrat, alfa-ketoglutarat, süksinat, fumarat, malat ve 2-hidroksiglutarat içeren TCA döngüsü ara maddeleri de RT

sonrası önemli ölçüde yükselmiş olarak saptanmıştır. TCA döngüsüne dahil olan metabolitlerin yükselmesi, radyasyonun neden olduğu oksidatif strese ikincil olabilir. Bu, Wibom ve ark. verileriyle uyusmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan kimyasal, sarf ve cihazlar aşağıda sunulmuştur.

3.1. Cihazlar

1. Q-TOF/MS -Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Agilent 6530, ABD)
2. Biyokimya Analizörü (Beckman Coulter AU680, ABD)
3. Su Banyosu (Nüve B5)
4. Evaporatör (Univapo 150H)
5. Santrifüj (NüveNF-1200R)
6. Etüv (Thermo Scientific Heraeus)
7. Azot uçurucu (VLM GmbH 33689 Bielefeld 1302001)
8. Kuru Blok Isıtıcı (Allsheng MK200-1)
9. Vorteks Karıştırıcı (Velp Scientifica 2X)(Heidolph Reax 2000 shaker)
10. Elektronik Hassas Terazi (Mettler ToledoAG204)
11. Sonikatör (Bandalin Sonorex)
12. -80 °C Derin Dondurucu (MDF-U6086S)
13. -20 °C Derin Dondurucu (DF-300)
14. Distile su cihazı (mpMinipure SUPER OTO-UP OTO)

3.2. Cam ve Sarf Malzemeler

1. Cam malzemeler (Interlab)
2. Otomatik Pipetler (Isolab; 10-100 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL)
3. Pipet Uçları (Isolab; 10-100 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL)
4. Vial (vida kapaklı) (Shimadzu)
5. İnsert (Shimadzu)
6. Ependorf tüp (Polipropilen, 1,5-2 mL)

3.3. Etik Kurul İzni

Bu tez çalışması, 'T.C. Bursa Uludağ Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' tarafından 24.02.2021 tarihinde 2021-4/59 numaralı kararı ve 'Primer ve Sekonder Glioblastomların Metabolamik Açısından İncelenmesi' başlıklı dosya ile etik kurul izni almıştır. İlgili etik kurul onay sayfası Ek 1'de sunulmuştur.

3.4. Örneklerin Toplanması

Bursa Uludağ Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalında glioblastom ve düşük evreli beyin tümörü nedeni ile opere edilen beyin tümörü doku örnekleri -80°C ' de çalışılana kadar saklandı. Epilepsi cerrahisi için amigdalahipokampektomi yapılırken elde edilen kontrol beyin dokusu örnekleri -80°C ' de saklandı ve bu çalışmada kullanıldı.

Primer ve sekonder glioblastomlar klinik olarak ayırımı yapıldıktan sonra, hastalardan elde edilen tümör dokusu örneklerinde IDH, pTERT mutasyonlarına bakılarak primer, sekonder ayırımı doğrulanmıştır. Glioblastom dışındaki santral sinir sistemi kanserleri olan hastalar, pediatrik yaş grubundaki hastalar, yandaş kanseri olan hastalar ve metabolizma ilişkili hastalığı olanlar (hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperlipidemi, vs) olanlar çalışma dışında bırakılmıştır. Kontrol grubu için epilepsi cerrahisi amacı ile amigdalahipokampektomi sırasında alınan normal beyin parankim dokusu örnekleri kullanılmıştır.

Çalışma ve kontrol grubundaki bireyler veya yasal varisleri araştırma amaçlı çalışma için düzenlenmiş aydınlatılmış onam formlarını ve rıza formlarını okuyarak çalışmaya katıldıklarını kabul ettiler.

3.5. Örneklerin Hazırlanması

Tüm doku örneklerinin yaş ve kuru ağırlıkları ölçülmüş, eppendorf tüpe aktarılmıştır. Dokular 3 mL/g metanol ve 0.64 mL/g su eklenip homojenize

edildikten sonra -20 °C'de 10 dakika bekletilmeden önce vorteks (IKA vortex genius 3, Staufen, Almanya) ile 1 dakikalık çalkalama uygulanmıştır (bu prosedür için üç tekrar yapılmıştır). 3 mL/g diklorometan ve 1.5 mL/g su eklenmiştir. Heterojen karışım 1 dakika vortekslenip ve daha sonra -20 °C'de 10 dakika bekletilmiştir (bu prosedür için üç tekrar yapılmıştır). Nihai karışım homojenizatörde 1 saat bekletilmiş ve süpernatant +4 °C 40.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip (Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Almanya) lipid ve metabolit fazları ayrılmıştır. Tüm biyolojik materyalden elde edilen ekstraktlarda metabolit ve lipid fraksiyonları bir Labconco Vakum Santrifüjünde 4° C'de buharlaştırılmıştır. Metabolit fazı, 200 µL 50:50 (h/ h) su (Milli-Q): Asetonitril (ACN) karışımı ile yeniden çözündürülmüştür. 30 saniye vortex (IKA 320 orbital shaker, Staufen, Almanya) ile çalkalama uygulandıktan sonra 15 dakika 10000 rpm'de santrifüj uygulanmıştır.

3.6. Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

Altı normal ve 51 adet tümörlü beyin dokularından 5 mg tartılmış ve üzerlerine 5 mL saf etanol ilave edilerek 1000 µg/mL ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu ana stok çözeltilerden 100 µL alınmış ve saf etanol ile 1000 µL'ye tamamlanarak derişimleri 100 µg/mL olan ara stok çözeltiler hazırlanmıştır. LC-MS/MS analizinde kullanılacak çalışma standartları bu ara stok çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır.

Elli yedi beyin parenkim dokusu 10000 pmol/mL derişimindeki stok çalışma standartları % 20 asetonitril ile çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Stok standart çözeltiler ve çalışma standartları -80 °C'de saklanmıştır.

50- 1000 pmol/mL arasında değişen 5 farklı seride standart doğru için kullanılacak standart çözeltiler %20 asetonitril içinde hazırlanmış ve -80 °C'de saklanmıştır.

Standart doğru için standart çözeltilerinin derişimleri sırasıyla 1000 pmol/mL, 500 pmol/mL, 200 pmol/mL, 100 pmol/mL, 50 pmol/mL olarak belirlenmiştir. Bu derişimdeki çözeltilerin hazırlanması Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Standart doğru için standart çözeltiler ve derişimleri

	Karışım (1000 pmol/mL)	Kalibratör 4 (100 pmol/mL)	ACN:H ₂ O (%20)
Kalibratör 1 (1000 pmol/mL)	1000 µL	--	--
Kalibratör 2 (500 pmol/mL)	250 µL	--	250 µL
Kalibratör 3 (200 pmol/mL)	100 µL	--	400 µL
Kalibratör 4 (100 pmol/mL)	100 µL	--	900 µL
Kalibratör 5 (50 pmol/mL)	--	500 µL	500 µL

3.7. Mobil Fazların Hazırlanması

Mobil Faz A: % 0.1 formik asit içeren asetonitril, % 0.1 formik asit içeren su ile tampon çözeltiler hazırlandı.

Mobil Faz B: % 100 asetonitrilden oluşmaktadır.

Mobil fazlar çalışma öncesinde günlük olarak hazırlanmıştır. Kullanımdan önce 10 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletilerek degaze edilmiştir.

3.8. Q-TOF LC/MS Çalışma Koşulları

Analizler Agilent 6530 Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Q-TOF/MS) cihazında gerçekleştirilmiştir. İnerSustain C18 3 µm (150 x 2.1 mm) kolonu kullanılmıştır. Q-TOF LC/MS cihazı çalışma öncesi kolonun şartlanması için 1 saat hareketli faz geçişi ile yıkamaya bırakılmıştır. Asetonitril-Su hareketli fazını içeren gradient programıyla 100-1700 m/z değerleri arasında yer alan metabolitler pozitif ve negatif modda taranmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. C18 kolon için kullanılan gradient programı

Dakika	Asetonitril (% 0.1 Formik asit)	Su (% 0.1 Formik asit)
1	% 10	%90
12	%90	%10
13	%90	%10
20	%10	%90
25	%10	%90

Süpernatantlar viallere aktarılarak aynı anda cihaza yüklenmiştir. Tablo 3.3’de cihaz parametreleri sunulmuştur.

Tablo 3.3. LC/MS Q-TOF parametreleri.

Enjeksiyon Hacmi	10 µL
MS Tarama Aralığı	100-1700 m/z
Kurutucu Gaz Sıcaklığı	350 °C
Kurutucu Gaz Akışı	10 L/dakika
Kurutucu Gaz Basıncı	45 psi
Kapiler Voltajı	4000 V
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Akış Hızı	0.2 mL/dakika

3.9. Q-TOF LC/MS ile Hedeflenmemiş Metabolit Analizi

Elde edilen piklere ait veri XCMS online yazılım programı ile taranmış ve miktarı kontrol ve test grupları için farklılaşan metabolitler ($p < 0.05$ ve $Fold > 1.5$) HMDB (Human metabolome database)’de analiz edilmiştir

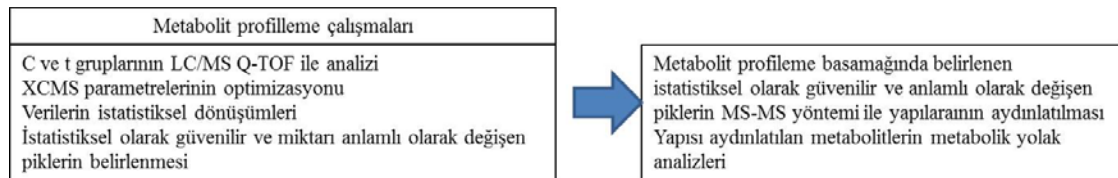
XCMS yazılımından sonuçlar eşleştirilmiş piklerin m/z, alıkonma zamanları, pik şiddetlerini veren bir excel dosyası halinde alınmıştır. Excel dosyasında isim

kolonu; her pik için program tarafından oluşturulan kimliği, fold; normalizasyon öncesi pik şiddetindeki değişimleri, t stat; t testi sonucunu, p value; t testi sonucunda bulunan p değerini, mzmed; o pikin tüm örnekleme bulunan m/z değerlerinin ortalamasını, mzmin; o pikin tüm örnekleme bulunan en küçük m/z değerini, mzmax; o pikin tüm örnekleme bulunan en büyük m/z değerini, rtmed; alıkonma zamanlarının ortalamasını, rtmin; alıkonma zamanlarının en küçük değerini, rtmax; alıkonma zamanlarının en büyük değerini, npeaks; pikin tüm örneklemin kaç tanesinde görüldüğünü, C ve T sütunları; pikin grupların içinde kaç numunede görüldüğünü, en sağdaki sütun ise pikin şiddetini ifade etmektedir. Alınan ham verilerde ilk işlem, hazırlanan dilüsyon serisi numunelerinde regresyon analizi işlemidir. Excel kullanılarak regresyon analizi uygulandı ve $r < 0.90$ değerinde olan pikler değerlendirme dışı bırakıldı. Analizler sırasında, kaynağı tespit edilemeyen sebeplerden dolayı bazı pikler bazı numunelerde görülemeyebilir. XCMS eşleştirilen pikin analiz setinin kaç tanesinde görüldüğünü belirten bir sonuç kolonu verir. Veri işlemde ikinci basamak numune setlerinde % 50'sinden fazla kayıp pik olan değerleri sonuçlardan çıkartılmıştır. Örnekler iki tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Üçüncü basamakta tekrarlı analizlerde pik şiddetlerinin ortalaması alınmıştır. Dördüncü işlem basamağında pikler normalizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Normalizasyon işlemi, pikin enjeksiyondaki tüm piklerin ortalamasına bölünmesi şeklinde olmuştur. Bu değerler C ve T grupları seçilerek birbiri ile 't istatistik testi' ile karşılaştırılmış ve $p < 0.05$ güven aralığında miktarı 1.5 kattan fazla değişen pikler tespit edilmiştir.

İstatistiksel analizler Windows IBM Sürüm 22.0 kullanılarak gerçekleştirildi. Parametrik dağılım gösteren veriler \pm standart sapma, parametrik dağılıma uymayan kategorik değişkenler ise medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) değerlendirildi. Gruplar arasında varyansların homojenliği Levene testi ile test edildi. Normal dağılım gösterdiği belirlenen parametreler bağımsız gruplar T Testi ile normal dağılım göstermeyen parametreler ise Mann-Whitney U Testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenler arasındaki ilişki Pearson testi ile belirlendi. En az bir değişkenin normal dağılıma uymadığı veya ordinal değişkenler arasındaki

ilişki ise Spearman testi ile belirlendi. P değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. İlgili veribankasından tespit edilen metabolitler tümörün oluşum mekanizması, evresi ve hastalık teşhis süreçleriyle ilişkilendirilmiştir. Bu amaçla metabolomik yolak analizleri yapılmıştır. Metabolik yolak analizleri için online KEGG veribankası kullanılmıştır. Ayrıca metabolomik çalışmalardan elde edilen veriler PCA (Principal Component Analysis) ile analiz edilerek kontrol ve test grupları arasında varsa anlamlı fark istatistiksel olarak teyit edilmiştir.

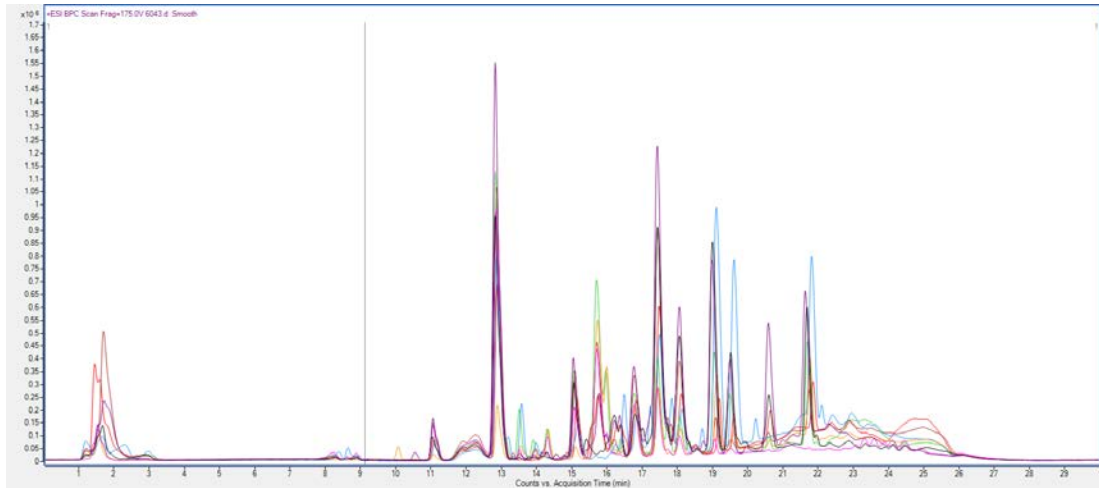
Çalışmaların son bölümünde, metabolit profillemeye basamağında belirlenen miktarı anlamlı olarak değişen ve istatistiksel olarak güvenilir piklerin yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Pikler MS/MS yöntemi ile fragmentlerine ayrılmış ve veri bankalarında taranarak sonuçlar incelenmiştir. Yapısı aydınlatılabilen metabolitlerin metabolit yolak incelemeleri ve kaynak taramaları ile hastalık ile bağlantıları araştırılmıştır. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalara ait iş akışını gösteren şema Şekil 3.1.'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Tez akış şeması

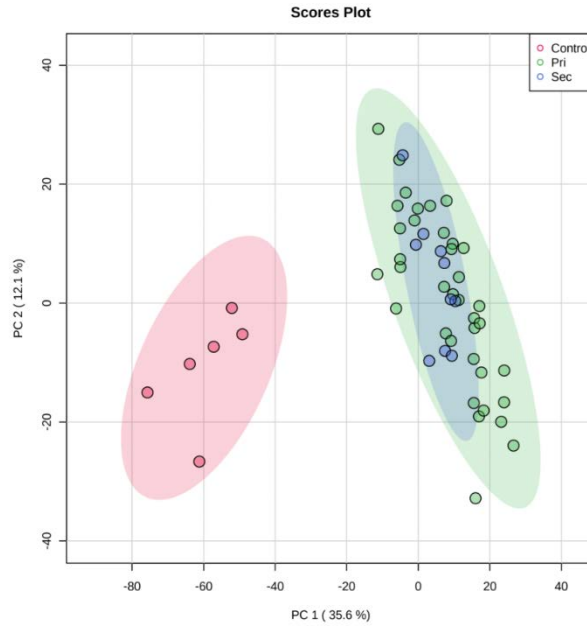
4. BULGULAR

Çalışmamızda Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda beyin tümörü nedeni ile opere edilen ve -80°C 'de saklanan 6 adet normal (K), 37 adet primer glioblastom (T2), 10 sekonder glioblastom (T1) ve 5 adet düşük evreli tümör (T3) dokusu kullanılmıştır. Hastaların 20 tanesi kadın, 32 tanesi erkek idi. Gruplar arasında yaş, cinsiyet arasında farklılık saptanmadı ($p<0.05$). 91002 adet pik değeri elde edildi. Şekil 4.1'de deneyler sonucu elde edilen kromotogram görülmektedir.



Şekil 4.1. Deney sonucu elde edilen kromotogram

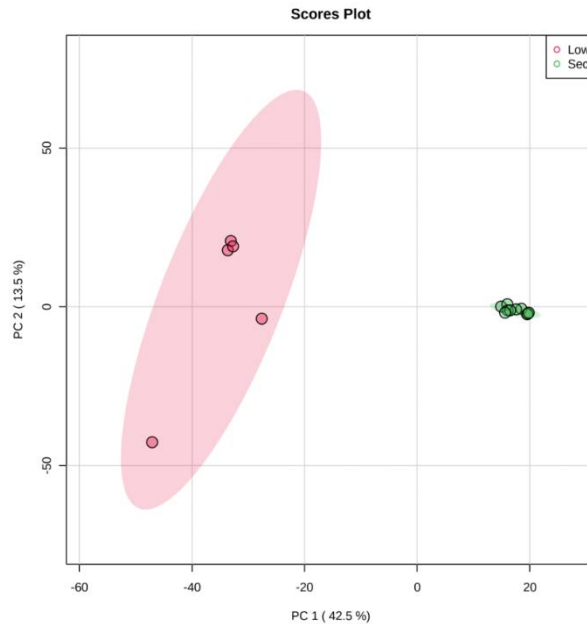
Metabolit profillemeye çalışmalarında yapılan ikinci işlem normalize edilen pikleri Metaboanalyst 5.0 programı kullanılarak Temel Bileşenler Analizi (PCA) matematiksel modelleme işlemine tabi tutmak olmuştur. PCA iki gruba ait m/z değerleri (kütle değeri) ve pik şiddetlerini baz alarak iki grubun birbirinden istatistiksel olarak farklılaşıp farklılaşmadığını gösterir. İki grup arasında miktarında değişim gösteren pikleri belirleyebilmek için, iki grubun birbirinden istatistiksel olarak farklılaşması gerekir. PCA grafisinde her bir nokta bir örnekleme göstermektedir. Şekil 4.2'de PCA grafiğinde kontrol grubuna göre primer ve sekonder glioblastomların dağılımı görülmektedir. Sekonder glioblastomlar, primer glioblastomların içinde yer alırken kontrol grubu primer ve sekonder glioblastomlar ile kesişim göstermemektedir.



Şekil 4.2. PCA grafiğinde kontrol grubuna göre primer ve sekonder gliblastomların dağılımı

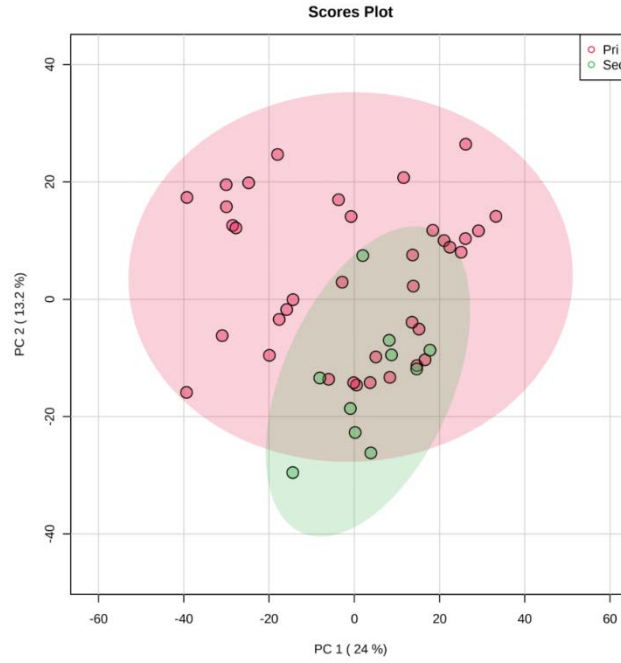
Sekonder gliblastomlar, primer gliblastomların içinde yer alırken kontrol grubu primer ve sekonder gliblastomlar ile kesişim göstermemektedir.

PCA grafisinde düşük evreli primer beyin tümörleri ile sekonder gliblastomların karşılaştırıldığı şekil 4.3’de gruplar arasında kesişim kümesi elde edilememiştir.



Şekil 4.3. PCA grafisinde düşük evreli glial tümörler ile sekonder tümörlerin kesişim kümesinin olmadığı izlenmekte

Primer ve sekonder glioblastomların karşılaştırıldığı PCA grafiğinde (Şekil 4.4) sekonder glioblastom grubunun büyük oranda primer glioblastom grubunun içinde yer aldığı izlenmektedir.



Şekil 4.4. PCA grafisinde primer ve sekonder glioblastom gruplarının ilişkisi

m/z değerleri baz alınarak HMDB metabolit veri bankasında taranmıştır. Tarama, bulunan m/z değerleri için 10 ppm hata payı içerisinde yapılmıştır. Sonuçlar m/z değerleri ile eşleşen bütün metabolitleri göstermektedir. Aynı m/z değerinde birden fazla metabolit bulunabilmektedir ve sadece m/z değeri bu metabolitleri karakterize etmek için yeterli değildir.

KEGG veri bankası taranarak metabolit numaraları belirlenmiştir. Metabolitleri kitlesi, bu kitle ile eşleşen metabolitin numarası, formülü, gruplar arasındaki değişim miktarları, KEGG numaraları ve bu numaralarla eşleşen metabolitler tespit edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Gruplar arasında > 1.5 kat değişikliğe sahip metabolitler (p<0.05)

m/z	Metabolitler	HMDB Kodu	KEGG Kodu	T1/K	T2/K	T3/K
493,33	alfa-Tokotrienol	HMDB0006327	C14153	9.83	5.35	2.92
453,28	Lökotrien D4	HMDB0003080	C05951	8.27	4.72	2.28
		HMDB0004385				
	▪ Lipoksin A4	HMDB0005082				
	▪ Lipoksin B4	HMDB0001403				
	▪ Prostaglandin D2	HMDB0001220				
	▪ Prostaglandin E2	HMDB0001381				
	▪ Prostaglandin H2	HMDB0001335				
	▪ Prostaglandin I2	HMDB0001452				
	▪ Tromboksan A2	HMDB0003252				
	▪ Tromboksan B2	HMDB0001320				
	▪ (13E)-11a-Hidroksi-9,15-diokzoprost-13-enoik asit					
	▪ 3,14-Dihidro-15-keto-PGE2	HMDB0002776				
371,24	▪ 20-Hidroksi-lökotrien B4	HMDB0001509	C04853	2.75	2.14	2.19
389,209	<i>Araşidonik asit</i>	HMDB0001043	C00219	-2.60	-4.40	-1.97
	▪ 11,12-DiHETrE	HMDB0002314				
	▪ 14,15-DiHETrE	HMDB0002265				
	▪ 5,6-DHET	HMDB0002343				
361,23	▪ 8,9-DiHETrE	HMDB0002311	C14773	2.10	1.73	1.55
434,25	Ganglioside GM2 (d18:1/12:0)	HMDB0004936	C04884	2.50	2.30	1.27
520,41	Seramid (d18:1/12:0)	HMDB0004947	C00195	1.65	1.58	1.73
472,35	Lizo fosfatidilkolin (18:1(9Z)/0:0)	HMDB0002815	C04230	3.28	2.78	2.29

Tablo 4.1. Gruplar arasında > 1.5 kat değişikliğe sahip metabolitler (p<0.05) (devamı)

<i>Safra asitleri</i>						
501,30	▪ 7 α ,12 α -Dihidroksi-4-kolesten-3-one	HMDB0002197				
	▪ 7 α ,24-Dihidroksi-4-kolesten-3-one	HMDB0012457				
	▪ 7 α ,26-Dihidroksi-4-kolesten-3-one	HMDB0012459				
	▪ 7 α ,25-Dihidroksi-4-kolesten-3-one	HMDB0060425				
	▪ 3 β -Hidroksi-5-kolestenoik asit	HMDB0012453				
	▪ <i>Calcitriol</i>	HMDB0001903	C01673	16,41	16,46	15,20
509,30	3 α ,7 α ,12 α -Trihidroksi-5 β -kolestanoik asit (Koprokolik asit)	HMDB0000601		7.86	4.58	2.11
505,33	3 α ,7 α , 26-Trihidroksi-5 β -kolestan	HMDB0012455	C05444	4.23	5.89	4.28
404,37	3 α ,7 α -Dihidroksi-5 β -kolestan	HMDB0006893	C05452	3.47	2.47	2.03
456,31	▪ 3 β ,7 α -Dihidroksi-5-kolestenoik asit	HMDB0012454				
	▪ Litokolilaurin	HMDB0000722				
	▪ Taurodeoksikolik asit	HMDB0000896				
	▪ <i>Tetrahidrokortizol</i>	HMDB0000949	C05465	2.63	2.97	3.23
434,34	▪ 3 α ,7 α ,12 α -Trihidroksi-5 β -kolestan-26-al	HMDB0003533	C01301			
	▪ 3 α ,7 α -Dihidroksikoprostanik asit	HMDB0000359	C04554	3,23	7,05	1,56
461,29	▪ Kenodeoksikolik asit	HMDB0000518				
	▪ Deoksikolik asit	HMDB0000626				
	▪ Hiyodeoksikolik asit	HMDB0000733	C15517	2,49	2,34	1,51

Tablo 4.1. Gruplar arasında > 1.5 kat değişikliğe sahip metabolitler (p<0.05) (devamı)

		HMDB0001231				
		HMDB0000359				
		HMDB0006894				
	▪ 27-Deoksi-5 β -siprinol ((3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-Kolestan-3,7,12,26-tetrol)	HMDB0006886				
	▪ 3 α ,7 α -Dihidroksi-5 β -kolestan-26-al					
	▪ 7 α ,12 α -Dihidroksi-5 α -kolestan-3-one	HMDB0006887				
	▪ 7 α ,12 α -Dihidroksi-5 β -kolestan-3-one					
	▪ 7- α ,27-Dihidroksikolesterol (5-Kolesten-3 β ,7 α ,26-triol)	HMDB0006281				
	▪ 7 α -Hidroksi-kolestene-3-one	HMDB0001993				
	▪ (24S)-7 α ,24-Dihidroksikolesterol (5-Kolesten-3 β ,7 α ,24(S)-triol)	HMDB0060136				
	▪ 7- <i>Dehidrodesmosterol</i>	HMDB0003896				
	▪ 20 α ,22 β - <i>Dihidroksikolesterol</i>	HMDB0006763				
401,34	▪ <i>Calcidiol</i>	HMDB0003550	C04722	1.94	1.62	1.50
439,38	3 α ,7 α ,12-Trihidroksi-5 β -kolestan	HMDB0001457	C05454	1.76	1.67	1.70
	<i>Steroidler</i>					
401,34	20 α ,22 β - <i>Dihidroksikolesterol</i>	HMDB0006763	C05501	1.94	1.62	1.50
		HMDB0000363				
	▪ 17 α -Hidroksipregnenolon	HMDB0011653				
	▪ 17 α ,20 α -Dihidroksipregn-4-en-3-one					
	▪ 21-Hidroksipregnenolon	HMDB0004026				
332,23	▪ 7 α -Hidroksipregnenolon	HMDB0060424	C18038	1.99	1.87	1.70

Tablo 4.1. Gruplar arasında > 1.5 kat değişikliğe sahip metabolitler (p<0.05) (devamı)

	▪ Tetrahidrokortikosteron	HMDB0000268				
389,209	▪ <i>Araşidonik asit</i>	HMDB0001043	C00219	-2.60	-4.40	-1.97
377,22	21-Hidroksi-5 β -pregnane-3,11,20-trion	HMDB0006756	C05480	-4.80	-3.41	-1.61
	▪ Androsteron glukuronid	HMDB0002829				
467,265	▪ Etiokolanolon glukuronid (5-izoandrosteron)	HMDB0004484	C11136	-6.83	-4.19	-2.10
	▪ Adrenosteron	HMDB0006772				
229,160	▪ 2-Metoksiestron	HMDB0000010	C05299	2.48	2.04	1.00
<i>Kolesterol sentezi ve izopren yapıları</i>						
529,329	3- β -Hidroksi-4- β -metil-5- α -kolest-7-ene-4- α -karboksilat	HMDB0011662	C04840	14.52	10.40	11.86
467,366	24,25-Dihidrolanosterol	HMDB0006839	C05109	2.62	2.80	1.50
169,033	Geranil 2-metilbutirat	HMDB0032291	C00341	-1.60	-1.88	-1.11
441,09	Farnesil pirofosfat	HMDB0000961	C00448	1.72	4.45	4.74
601,364	3-Hekzaprenil-4,5-Dihidroksibenzoik asit	HMDB0001063	C17554	4.29	3.69	1.89
		HMDB0000977				
	▪ 3-Hekzaprenyl-4-hydroxy-5-methoxybenzoic acid					
559,414	▪ 2-Hekzaprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinone	HMDB0006820	C05805	1.73	1.50	1.35

Tablo 4.2. Gruplar arasında > 1.5 kat değişikliğe sahip metabolitler (p<0.05)

m/z	Metabolitler	HMDB Kodu	KEGG Kodu	T1/T2	T1/T3	T2/T3
493,33	alfa-Tokotrienol	HMDB0006327	C14153	1.84	4.29	2.33
453,28	Lökotrien D4	HMDB0003080	C05951	1.75	3.63	2.07
		HMDB0001442	C04741C05959			
		HMDB0010199				
	▪ Prostaglandin E1		C14814C00639			
	▪ 11b-PGF2a	HMDB0004694				
	▪ 11,14,15- trihidroksieikosatrienoik asit (11,14,15-THETA)	HMDB0001139	C14782			
	▪ Prostaglandin F2a					
169,03	▪ 11,12,15-trihidroksieikosatrienoik asit (11,12,15-THETA)	HMDB0004684		-1.51	2.72	4.13
389,21	<i>Araşidonik asit</i>	HMDB0001043	C00219	-1.69	1.32	2.32
434,25	Ganglioside GM2 (d18:1/12:0)	HMDB0004936	C04484	-1.08	-1.95	-1.80
520,41	Seramid (d18:1/12:0)	HMDB0004947	C00195	-1.08	-3.95	-3.67
368,26	Dihidroseramid	HMDB0006752	C12126	1.22	2.09	1.71
	<i>Safra asitleri</i>					
509,30	3 α ,7 α ,12 α -Trihidroksi-5 β -kolestanoik asit (Koprokolik asit)	HMDB0000601		1.72	3.72	2.17
		HMDB0012454	C17335			
456,31	▪ 3 β ,7 α -Dihidroksi-5-kolestenoik asit					
	▪ 7 α -Hidroksi-3-okzo-4-kolestenoik asit	HMDB0012458	C17337	1,23	2,49	2,03
		HMDB0003533	C01301			
434,34	▪ 3 α ,7 α ,12 α -Trihidroksi-5 β -kolestan-26-al					
	▪ 3 α ,7 α -Dihidroksikoprostanik asit	HMDB0000359	C04554	-1,54	2,14	3,28
	▪ 7 α -Hidroksi-kolestene-3-one	HMDB0001993	C05455C01561			
401,34	▪ Calcidiol	HMDB0003550		-1,48	2,62	3,81

Tablo 4.2. Gruplar arasında > 1.5 kat değişikliğe sahip metabolitler (p<0.05) (devamı)

<i>Steroidler</i>						
337,22	Progesteron	HMDB0001830	C00410	1.70	7.43	4.38
389,21	▪ Tetrahidrokortikosteron	HMDB0000268	C05476C00219	-1.69	1.32	2.32
	▪ Araşidonik asit	HMDB0001043				
377,22	21-Hidroksi-5 β -pregnane-3,11,20-trion	HMDB0006756	C05480	1.41	2.99	2.12
467,265	▪ Androsteron glukuronid	HMDB0002829	C11135C11136	1.63	3.26	2.00
	▪ Etiokolanolon glukuronid (5-izoandrosteron)	HMDB0004484				
229,160	▪ Adrenosteron	HMDB0006772	C05285C05299	-1.22	-2.49	-2.05
	▪ 2-Metoksiestron	HMDB0000010				
<i>Kolesterol sentezi ve izopren yapıları</i>						
467,366	24,25-Dihidrolanosterol	HMDB0006839	C05109	1.07	-1.75	-1.87
169,033	Geranil 2-metilbutirat	HMDB0032291	C00341	-1.16	1.44	1.68
601,364	3-Hekzaprenil-4,5-Dihidroksibenzoik asit	HMDB0001063	C05200	1.16	2.27	1.95

5. TARTIŞMA

Primer, sekonder ve düşük evreli glioblastomlar ile sağlıklı kontrol glioblastom dokularında Q-TOF LC-MS/MS kullanılarak yapılan metabolomik çalışmamızda, glioblastomlarda eikozanoid, steroid, kolesterol biyosentez yolları ve safra asitleri, alfa-Tokotrienol, izopren taşıyan terpenler anlamlı şekilde ön plana çıkmıştır.

PCA yorumlaması şu şekildedir: Şekil 1’de sekonder glioblastomlar primer glioblastomların içinde yer alırken, kontrol grubu primer ve sekonder glioblastomlar ile kesişim göstermemektedir. Bu durum “düşük evreli tümörler yeteri kadar beklendiğinde evre atlayacaktır” teorisi ile uyumlu bulunmuştur. Şekil3.2’de ise sekonder glioblastomlar ile düşük evreli tümörler arasında bir kesişim izlenmemektedir. Bu durum bu örnekte yer alan düşük evreli tümörlerde sekonder glioblastom gelişmeyeceği veya düşük evreli tümörlerde henüz tümör progresyonunu sağlayan faktörlerin oluşmadığı şeklinde yorumlanabilir. Şekil 3.3’de primer ve sekonder glioblastomların kesişim kümesi izlenmektedir. Kesişim kümesi son yıllarda moleküler düzeyde oldukça değişim ve gelişim gösteren primer ve sekonder glioblastomların bilinenden daha fazla ortak yönü olabileceğini veya primer kabul edilen gruptan bazı tümörlerin aslında sekonder glioblastom olması gerektiği şeklinde yorumlanabilir

Alfa-Tokotrienol T1, T2 ve T3’de kontrole göre sırasıyla 9.83, 5.35 ve 2.92 kat artmış olarak gözlenmiştir. Alfa-Tokotrienol T1’de T2’ye göre 1.84, T1’de T3’e göre 4.29 ve T2’de T3’e göre 2.33 kat artmış olarak izlenmiştir. Alfa-Tokotrienol, benzopiran halkasının 6. karbonuna eklenmiş doymamış trimetiltrideka-3,7,11-trien-1-il zincirli 5,7,8-trimetiltokotrienol’dür. Doymamış zincir içermesi ile doymuş formdaki diğer tokoferollerden farklıdır. Bir kinon lipid olan alfa-Tocotrienol plazmada lipoproteinlerde bulunur ve inme ilişkili nörodejenerasyondan koruduğu düşünülmektedir (115). Diğer tokoferollere göre az çalışmaların olduğu bu formun E vitamini aktivitesi mevcuttur. Tokotrienollerin birçok tümörlerde apoptoz indüksiyonu ile ilişkili sitotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiş ve kanserlerde

adjuvan tedavi olarak tokoferollere göre daha etkin kullanılabileceği savunulmuştur (116,117). Tokotrienollerin Glioblastoma U87MG hücre hatlarında zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak büyümeyi inhibe ettiği, apoptotik morfolojilerini, çift zincirli DNA kırılmalarını, mitokondriyal membran geçirgenliğinin bozulmasına işaret eden sitokrom c salınımını artırdığı ve artan Bid, Bax seviyelerine yol açan kaspaz-8 aktivasyonu belirgin olduğu görülmüştür (118). E vitamini izomerleri farklı farmakodinamik profile sahiptir ve farklı tümör hücre tiplerinde her bir izomerin farklı antikanser etkileri tespit edilmiştir. Herbir izomerin antiproliferatif ve apoptotik aktivitesini metil gruplarının pozisyonları tanımlamaktadır (119-121). Glioblastoma U87MG hücre hatlarında yapılan çalışmada alfa- Tokotrienol ve delta-Tokotrienol'ün gamma formu kadar sitotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (118). Çalışmamızda sekonder glioblastomalarda belirgin olmak üzere tüm glioblastomalarda alfa-Tokotrienol'ün belirgin artmış olduğu, düşük evreli tümörlerde bu artışın primer ve sekonder glioblastomalara göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Sekonder glioblastomalarda daha fazla olmak üzere tüm glioblastomalarda alfa-Tokotrienol formunun apoptoz üzerinden antitümör aktivitesini göstermek üzere artmış olduğu düşünülebilir. Sekonder glioblastomalar, düşük evreli tümörlerden geliştiği için bir korunma mekanizması olarak apoptozu artırmak üzere alfa-Tokotrienolün ekspresyonunun indüklendiği hipotez edilebilir. Beyin tümörlerinde alfa- Tokotrienol başta olmak üzere, gama- ve delta-tokotrienollerin indüklediği spesifik apoptotik mekanizmalar halen belirsizdir ve bu konuda araştırmalar yeni tedavi seçeneklerini aydınlatmaya açıktır. Tokotrienollerin kan-beyin bariyerini geçebildikleri bildirilmiştir, glioblastomada adjuvan olarak tokotrienollerin kullanılması önerilebilir (122).

Lökotrien D4 (LTD4) T1, T2 ve T3'de kontrole göre sırasıyla 8.27, 4.72 ve 2.28 kat artmış olarak gözlenmiştir. LTD4, T1'de T2'ye göre 1.75, T1'de T3'e göre 3,63 ve T2'de T3'e göre 2.07 kat artmış olarak izlenmiştir. LTD4, lipoksijenaz (LOX) yolağı ile üretilen güçlü bir inflamatuvar mediatör sisteinil lökotriendir. LTD4, birçok inflamatuvar durumda yüksek seviyelerde bulunur ve kanser gelişimi için kronik inflamasyon alanları bir risk faktörüdür. LTD4, etkilerini G-protein-bağılı reseptör ailesine ait yüksek afiniteli spesifik hücre yüzeyi CysLT1 (sisteinil lökotrien

1) reseptörü aracılığıyla gösteren bir proinflamatuardır. CysLT1 regülatörü, kolon kanseri dokusunda yüksek bulunmuş ve LTD4 sinyalinin, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir. CysLT1'in aşırı ekspresyonunun, pankreas, akciğer ve meme kanserlerinde hücre göçünü ve metastazı artırdığı tespit edilmiştir (123). İnsan glioma hücrelerinde 5-LOX, CysLT1 ve CysLT2'nin ekspresyonunun arttığı ve glioma hücre proliferasyonuna katkıda bulunduğu gözlenmiştir (124). Glioblastoma A172 and U373 hücre hatlarında yapılan bir çalışmada CysLT1 antagonistlerinin hücre migrasyonu, invazyonu, proliferasyonu ve jlatinaz aktivitesini inhibe edici etkileri göstermiştir (125). Sonuçlarımız literatür ile uyumludur. Sekonder glioblastomalar önde olmak üzere tüm glioblastomalarda LTD4 yüksek bulunmuştur. Düşük evreli tümörlerde bu artışın primer ve sekonder glioblastomalara göre daha az gözlenmesi LTD4 sinyalinin artmış hücre göçü, tümör invazyonunda rolü olduğunu kanıtlamaktadır. Sekonder glioblastomalarda LTD4 artışı düşük evreli tümörlerden yüksek dereceli tümörlere geçişin bir göstergesi olabilir.

Glioblastomalarda kontrole göre artmış 20-hidroksi- Lökotrien B4 (20-OH-LTB4), artmış LOX yolağı aktivitesi ile uyumludur. 20-OH-LTB4 lökotrien B4'ün omega-hidroksillenmiş bir metabolitidir. 11,14,15- trihidroksieikosatrienoik asit (11,14,15-THETA)/11,12,15-trihidroksieikosatrienoik asit (11,12,15-THETA) T1'de T2'ye göre 1.51, T1'de T3'e göre 2.72 ve T2'de T3'e göre 4.13 kat artmış olarak izlenmiştir. 11,14,15-THETA ve 11,12,15-THETA, subakut hipokside araşidonik asitten 15-LOX ile sentezlenen endotel kaynaklı bir relaksasyon faktörüdür. Her iki metabolitin artışı, glioblastomalarda LOX yolağının önemini desteklemektedir.

Prostaglandin E1/11b-PGF2a/Prostaglandin F2a T1'de T2'ye göre -1.51, T1'de T3'e göre 2.72 ve T2'de T3'e göre 4.13 kat artmış olarak izlenmiştir. Lipoksin A4/Lipoksin B4/Prostaglandin D2/Prostaglandin E2/Prostaglandin H2/Prostaglandin I2/Thromboksan A2/Thromboksan B2/(13E)-11a-Hidroksi-9,15-diokzoprost-13-enoik asit/3,14-Dihidro-15-keto-PGE2 sekonder glioblastom başta olmak üzere tüm glioblastom tiplerinde kontrole göre artmış olarak gözlenmiştir. Bu metabolitlerin artışı eikozanoid sentezinin artışını ifade etmektedir. Eikozanoidler bir grup lipid mediatörlerdir ve prostaglandinler (PG'ler), tromboksanlar (TX'lar), lökotrienler (LT'ler), lipoksinlerden (LX'ler) oluşur. C-20 çoklu doymamış yağ asitlerinden, esas

olarak araşidonik (20:4n-6), dihomog- γ -linolenik (20:3n-6), ve eikosapentaenoik (20:5n-3) asitlerden, siklooksijenazlar (Cox-1 ve Cox-2) ve lipoksijenazlar (LOX) ile oluşurlar. Tüm eikozanoidler, reseptör aracılı G-protein bağılı sinyal yolları ile fonksiyonlarını gösterir. PG'ler ve TX'ler prostanooidler olarak tanımlanır. 1984 yılında intrakranial beyin tümörlerinin PG'ler ve TX'ları ürettiği tespit edilmiştir (126). Prostaglandin E1/Prostaglandin F2a, periferik kan akışını artıran güçlü vazodilatör ve trombosit agregasyonunu inhibe eden mediatörlerdir. 11b-PGF2, prostaglandin-F sentaz enzimi ile prostaglandin D2'den üretilir. Prostaglandin E1/11b-PGF2a/Prostaglandin F2a primer ve sekonder glioblastomlarda düşük evreli glioblastomlara göre ve Prostaglandin D2/Prostaglandin E2/Prostaglandin H2 tüm glioblastomlarda kontrole göre artmış izlenmiştir. Literatürde glioblastomlarda PG'lerin sentezinden sorumlu COX-2'nin induksiyonu birçok yayında rapor edilmiş ve tümör gelişimini destekleyen ana faktör olarak gösterilmiştir (127). COX2/prostaglandin-endoperoksit sentaz 2'nin (PTGS2), glioblastom hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu artırdığı rapor edilmiştir (128,129). Ayrıca yüksek COX-2 ekspresyonunun agresif glioblastomlarla ilişkili olduğu ve kötü prognozun güçlü bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (130). Prostaglandin E2'nin tümör ilişkili immunsupresyonda rol alarak immun regulasyonda da rol oynadığı düşünülmektedir (131-133). Sonuçlarımız literatür ile uyumlu olarak glioblastomlarda PG sentez artışını göstermektedir. Glioblastomlarda artmış (13E)-11a-Hidroksi-9,15-dioksoprost-13-enoik asit ve 3,14-Dihidro-15-keto-PGE2 PG artışını desteklemektedir. (13E)-11a-Hidroksi-9,15-dioksoprost-13-enoik asit PG sentezinde karbonil redüktaz için bir substrattır. 13,14-dihidro-15-keto-PGE2, prostaglandin E2 metabolitlerinden biridir.

Tromboksan A2/Tromboksan B2'nin glioblastomlarda kontrole göre arttığı gözlenmiştir. Prostanooidlerden olan tromboksanlar COX'lar ile sentezlenmiş Prostaglandin H2'den tromboksan sentaz ile oluşan ürünlerdir. Tromboksanlar, trombosit agregasyonu, vazokonstriksiyon ve bronkokonstriksiyona neden olurlar. Glioblastomlarda tromboksan sentazın yüksek oranda eksprese edildiği ve ekspresyon seviyelerinin malignite derecesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (134). Tromboksan sentazın ekspresyonu, tümör baskılayıcı gen p53 ve proto-onkojenik

faktör ets-1 tarafından antagonistik bir şekilde düzenlenir (135). Bu nedenle, apoptoza dirençli ve oldukça invaziv bir glioblastom fenotipinin gelişimi, tromboksan sentaz geninin ets-1 bağımlı transkripsiyonu üzerindeki p53 aracılı negatif kontrolün kaybindan kaynaklanıyor olabilir. Carroll ve arkadaşları (136) tromboksan sentaz inhibisyonunun proapoptotik, antiproliferatif ve antianjiyojenik etkilerle glioblastoma büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda tromboksanların artışı, glioblastomlarda tromboksan sentazın rolünü ve terapötik modülasyonunun potansiyel faydasını desteklemektedir.

Glioblastomlarda COX-2'nin terapötik bir hedef olma olasılığı denenmiş, fakat bir dizi popülasyon çalışmasından elde edilen tutarsız sonuçlar birkaç klinik deneyin erken sonlandırılmasına neden olmuştur (137). COX-2'nin beş prostanoid ürününün, çok sayıda pro- ve anti-inflamatuar sonucu düzenlemek için toplam dokuz G proteinine bağlı reseptörü aktive ettiği göz önüne alındığında, bu farklı sonuçların bekleneceği düşünülebilir. COX-2 kademesinin Jekyll ve Hyde doğası, aşağı akış prostanoid sentezlerini veya reseptörlerini hedeflemenin daha fazla özgüllük sağlayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda artış gösteren farklı prostanoidler, tedavi hedeflenmesinde aşağı akış prostanoid sentezleri veya reseptörleri ile ilgili çalışmaların yapılmasının yararlı olacağını göstermektedir.

11,12-DiHETrE/14,15-DiHETrE/5,6-DHET/8,9-DiHETrE glioblastomlarda kontrole göre yüksek bulunmuştur. 8,9-DiHETRE, 14,15-DiHET ve 11,12-DiHETrE sitokrom P450 (P450) eikozanoidlerdir. P450, araşidonik asidi 8,9-dihidroksieikosatrienoik aside dönüştürür. 5,6-DHET, araşidonik asidin monooksijenaz yolu ile oksijenlenmesinde oluşan bir epoksit ara ürünü ve cis-5(6)Epoksi-cis-8,11,14-eikosatrienoik asidin epoksit hidrolazlar tarafından hidroliz metabolitidir. P450 eikozanoidleri, vasküler tonus, renal tübüler taşıma, kardiyak kontraktilite, hücrel proliferasyon ve inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynar. Sonuçlarımız, lipid mediatör olan eikozanoidlerin her birinin glioblastomlarda rol oynadığını göstermektedir ve detaylı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Araşidonik asit, tüm glioblastomlarda kontrole ve sekonder glioblastomlarda primer glioblastoma göre azalmış olarak izlenmiştir. Eikozanoidler; prostaglandinler

(PG'ler), tromboksanlar (TX'lar), lökotrienler (LT'ler), lipoksinler (LX'ler) araşidonik asitten sentezlenmektedir. Araşidonik asit, sitokrom p450 (CYP450) enzimleri tarafından 5,6-, 8,9-, 11,12- ve 14,15-epoksieikosatrienoik asitlere (EET'ler), bunlara karşılık gelen dihidroksieikosatrienoik asitlere (DHET'ler) ve 20-hidroksieikosatetraenoik asit (20-HETE)'e dönüşürler. Yukarıda bahsedilen tüm metabolitlerin sentezi araşidonik asitten köken alır. Bahsedilen metabolitlerin artışı, glioblastomlarda araşidonik asidin yoğun şekilde kullanıldığını göstermektedir ve glioblastomlarda araşidonik asit azalışı kullanım yoğunluğu olarak yorumlanabilir. Lizo fosfatidilkolin (18:1(9Z)/0:0) tüm glioblastomlarda kontrole göre artmış olarak saptanmıştır. Araşidonik asit, plazma zarı gliserofosfolipidlerinden fosfolipaz A2 ve fosfolipaz C ile elde edilirken, lizofosfolipidler oluşur. Araşidonik asit eikazonidlerin sentezinde kullanılması nedeniyle azalırken, oluşan lizofosfolipidlerin kullanılmadığı için arttığı düşünülebilir (138).

3 α ,7 α ,12 α -Trihidroksi-5 β -kolestanoik asit (Koprokolik asit); 3 α ,7 α ,26-Trihidroksi-5 β -Kolestan; 3 α ,7 α ,12-Trihidroksi-5 β -kolestan; 3 α ,7 α -Dihidroksi-5 β -kolestan; 7 α ,12 α -Dihidroksi-4-kolesten-3-one/7 α ,24-Dihidroksi-4-kolesten-3-one/7 α ,26-Dihidroksi-4-kolesten-3-one/7 α ,25-Dihidroksi-4-kolesten-3-one/3 β -Hidroksi-5-kolestenoik asit; 3 β ,7 α -Dihidroksi-5-kolestenoik asit/Litokolilaurin/Taurodeoksikolik asit; Kenodeoksikolik asit/Deoksikolik asit/Hiyodeoksikolik asit; 27-Deoksi-5 β -siprinol((3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-Kolestan-3,7,12,26-tetrol)/3 α ,7 α -Dihidroksi-5 β -kolestan-26-al/7 α ,12 α -Dihidroksi-5 α -kolestan-3-one/7 α ,12 α -Dihidroksi-5 β -kolestan-3-one/7- α ,27-Dihidroksikolesterol(5-Kolesten-3 β ,7 α ,26-triol)/7 α -Hidroksi-kolestene-3-one/(24S)-7 α ,24-Dihidroksikolesterol(5-Kolesten-3 β ,7 α ,24(S)-triol); 3 α ,7 α ,12 α -Trihidroksi-5 β -kolestan-26-al/3 α ,7 α -Dihidroksikoprostanik asit; safra asitleri biyosentezinde oluşan metabolitlerdir. Safra asitleri ve metabolitlerinin glioblastomlarda belirgin arttığı gözlenmiştir. Yakın zamanda Zhang ve arkadaşları (139), glioblastomalarda alternatif 'splicing' mekanizmalarına dayalı bir biyoinformatik çalışma gerçekleştirmişlerdir. Glioblastom tümörogenezi ve prognozunda düzenleyici 'Germ Cell-Specific Gene 1-Like Protein (GSG1L)' ve 'Splicing Factor CUGBP Elav-Like Family Member 5 (CELF5)' in aşağı akış yolunda primer safra asidi sentez yolağını

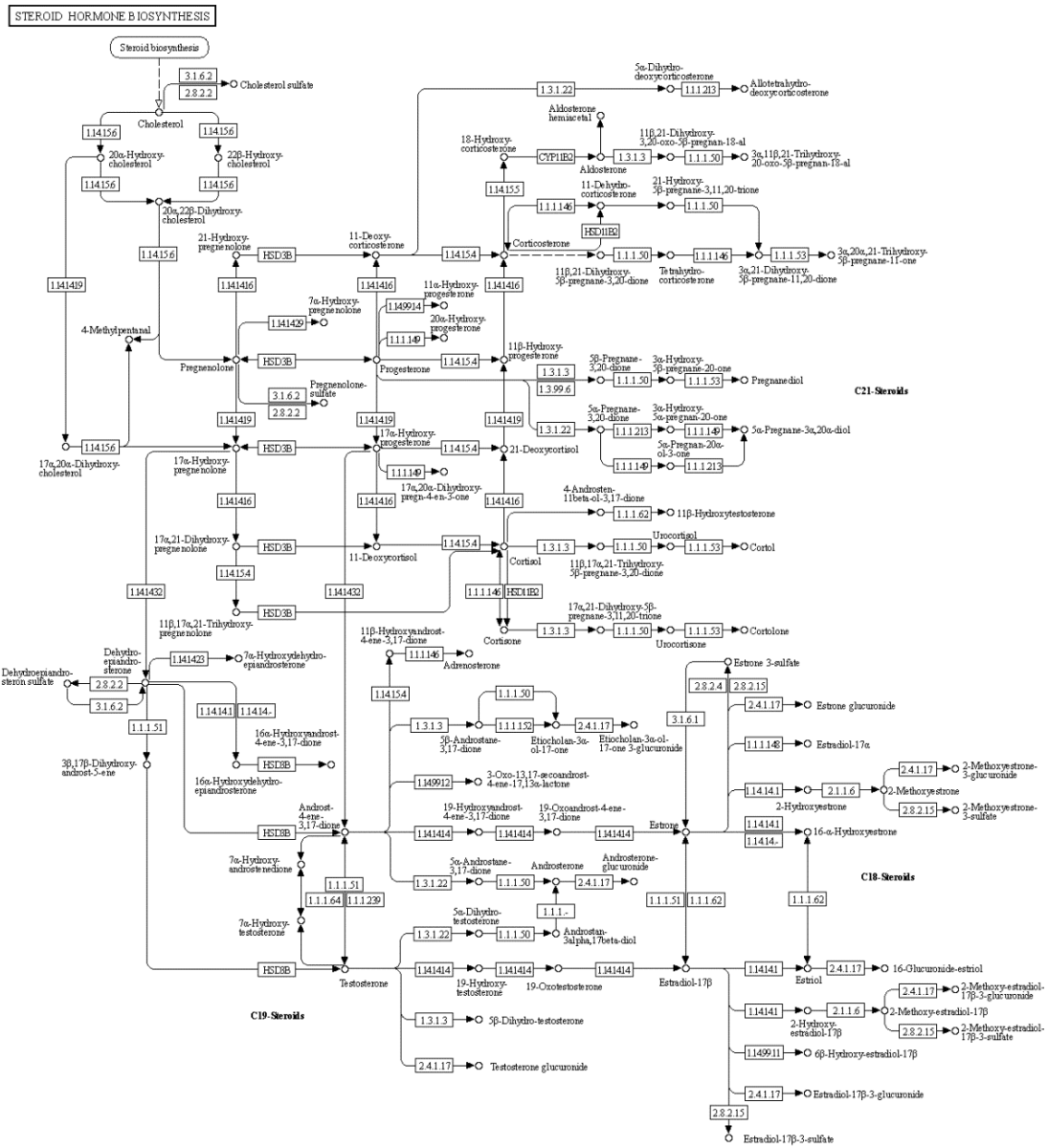
en anlamlı yolak olarak tespit etmişlerdir. *GSGIL* ve *CELF5*, hücre apoptozu ve tümör proliferasyonu gibi glutamatla ilgili süreçlerde yer aldığını gösteren çalışmalar vardır. Ayrıca, safra asidi sentezinde, bazı safra asidi tipleri, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)'a bağlı Bad yolunu düzenleyerek, glutamat tarafından nöronların apoptozisine neden olur (140). *GSGIL*, *CELF5* ve primer safra asidi sentezi ilişkisine dair henüz net bir çalışmaya rastlanmamıştır fakat araştırmacılar aralarındaki ilişkinin glutamata bağlı apoptoz olabileceğini öne sürmektedir (139). Safra asidi tiplerinin glioblastom, multipl miyelom, hepatom ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerde kanser gelişiminde sitotoksiteleri ile rol oynadıkları ve bağışıklık hücrelerine sinyal göndererek kanser gelişimini kontrol ettikleri gösterilmiştir (141,142). Ayrıca, glioblastom hücrelerinin yaşamı kolesterol düzeyleri ile net ilişkili olduğu bilinmektedir ve kolesterol düzeyi, ürünleri olan safra asitleri ile regüle edilmektedir. Glioblastom hücreleri, kolesterolü ve karaciğer X reseptörü (LXR) ligand sentezini baskılayarak hayatta kalmak için onları santral sinir sistemi kaynaklı kolesterole bağımlı hale getirir (143).

Progesteron, T1'de T2'ye göre 1.70, T1'de T3'e göre 7.43 ve T2'de T3'e göre 4.38 kat artmış olarak izlenmiştir. Beyine de etkileri olan bir C21 steroid hormondur (Şekil 4.1). Pregnenolondan dönüştürülen progesteron gonadal steroid hormonlarının yanısıra adrenal kortikosteroidlerin biyosentezinde bir ara molekül olarak görev yapar. Pregnenolonun sitokrom P450 ile sentezinde bir ara metabolit olarak meydana gelen 20 α ,22 β -Dihidroksikolesterol, T1, T2 ve T3'de kontrole göre artmış olarak gözlenmesi C21 steroidlerinin sentez artışını ve rolünü desteklemektedir. 17 α -Hidroksipregnenolon/17 α ,20 α -Dihidroksipregn-4-en-3-one/21-Hidroksipregnenolon/7 α -Hidroksipregnenolon glioblastomalarda artmış gözlenmektedir. 17 α -Hidroksipregnenolon, gonadal steroid hormonları ve adrenal kortikosteroidlerin delta-5 biyosentez yolundaki bir ara metabolittir. CYP17 ile pregnenolondan oluşur. CYP17'nin liyaz aktivitesinin, hidroksilaz aktivitesine oranı, üretilen C21'in C19 steroidlerine oranını belirler. Pregnenolondan sentez edilen 21-17 α -Hidroksipregnenolon/Hidroksipregnenolon/7 α -Hidroksipregnenolonun artışı C21 steroid sentezinde bir artış olduğunu desteklemektedir. 21-Hidroksi-5 β -pregnane-3,11,20-trion ve tetrahidrokortikosteronun glioblastomaların tüm tiplerinde kontrole

ve sekonder glioblastomlarda diğer tiplere göre azaldığı izlenmiştir. Her iki metabolit de C21-steroid hormon metabolizmasında yer almaktadır. 21-Hidroksi-5 β -pregnane-3,11,20-trion, 11-Dehidrokortikosteron'dan oluşan bir metabolittir. Tetrahidrokortikosteron da kortikosteronun başlıca üriner metabolitlerinden biridir. Progesteron, 20 α ,22 β -Dihidroksikolesterolün artmış olması C21 steroid sentez artışını, 21-Hidroksi-5 β -pregnane-3,11,20-trion ve tetrahidrokortikosteronun azalması C21 metabolizmasının yavaşladığını desteklemektedir. Yakın tarihli bir çalışmada glioblastom hücrelerinin kolesterolü progesteron, androstanedion, androstenediol, androstenedion gibi gliomanın ilerlemesine katkıda bulunabilecek kortikosteroidlere dönüştürebildiğini bildirilmiştir (144).

Androsteron glukuronid/Etiokolanolon glukuronid'in, glioblastomalarda kontrole göre azaldığı, T1/T2, T1/T3, T2/T3 oranlarının arttığı gözlenmiştir. Androsteron glukuronid, dolaşımda başlıca C19 steroid metabolitlerinden biridir. Androsteron glukuronid düzeyi artması, çeşitli patofizyolojik durumlarda periferik dokularda adrenal ve gonadal prekürsör C19 steroidlerin aktif androjenlere dönüşümünü yansıtır. Etiokolanolon glukuronid, testosteronun bir metabolitidir. Bir ketosteroid olan metabolit, ateş, immünostimülasyon ve lökositoya neden olur, glukoronidasyon toksik metabolitlerin suda çözünür hale getirilerek atılmasını sağlar. Androsteron glukuronid/Etiokolanolon glukuronid'in, glioblastomalarda kontrole göre azalması C19 steroid metabolizmasının yavaşladığını düşündürmektedir.

Adrenosteron/2-Metoksiestron, glioblastomalarda kontrole göre ve T1'de T2'ye göre 1.22, T1'de T3'e göre 2.49 ve T2'de T3'e göre 2.05 kat azalmış olarak izlenmiştir. Adrenosteron, androjen metabolizmasında androst-4-ene-3,17-dione'dan CYP11B ve 11beta-hidroksisteroid dehidrogenaz ile oluşan zayıf androjenik etkiye sahip bir steroid hormondur. 2-Methoxyestron, androjen ve östrojen metabolik yolunda oluşan bir metabolittir. Estron ve 2-hidroksiestron metabolizmasının bir yan ürünüdür. Estrondan farklı olarak, östrojen reseptörü için çok düşük afinitesi vardır ve önemli bir östrojenik aktiviteye sahip değildir. Sekonder glioblastomalarda daha belirgin olarak tüm glioblastomalarda bu metabolitlerin azalmış gözlenmesini, androjen ve östrojen metabolizmasının yavaşlaması olarak yorumlanabilir.



Şekil 5.1. Steroid hormon biyosentezi

Bir transkripsiyon faktörü olan özgüllük proteini 1 (Sp1), glioblastomlar da dahil birçok kanserde aşırı eksprese edilmektedir. Sp1, DNA hasarı tepkisini, hücre apoptozunu, hücre yaşlanmasını, bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğini ve kanser ilacı direncine yol açan tümör anjiyogenezini düzenler (145). Sp1'in, glioblastomlarda kemoteröpatik ilaç olarak kullanılan temozolomide karşı direnci, kolesterol metabolizmasını nörosteroidlere katalize eden sitokrom p450 (CYP) 17A1'in ekspresyonunu artırarak gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (146,147). Sonuçlarımız, son yıllarda yayınlanan çalışmalarla uyumludur.

Steroid (kolesterol) sentezinde bir ara metabolit olan 3- β -Hidroksi-4- β -metil-5- α -kolest-7-ene-4- α -karboksilatın glioblastomlarda belirgin artması kolesterol sentez artışını düşündürmektedir. 24,25-Dihidrolanosterol 6 izopren halkası içeren bir terpen ve sterol lipid moleküldür. Lanosterolün C24-25 pozisyonlardan hidroksillenmiş şeklidir. Kolesterol biyosentezinde, skualen lanosterol oluşturmak üzere halkalaşır ve oluşan lanosterol, 19 reaksiyon ile kolesterole dönüştürülür. Hidroksile lanosterol formunun düşük evreli tümörlerde belirgin olmak üzere glioblastomlarda kontrole göre arttığı gözlenmiştir. Kolesterol sentez artışı ile uyumludur. Geranil 2-metilbutirat da bir terpendir ve geranil pirofosfat formu kolesterol sentezinde yer almaktadır. Geranil 2-metilbutiratın primer glioblastomlarda belirgin olmak glioblastomlarda sağlıklılara göre azaldığı görülmektedir. Geranilin pirofosfatlı formuna ihtiyaç duyulduğu için Geranil 2-metilbutirat formunun azaldığı hipotez edilebilir. İzoprenil grupları taşıyan metabolitler glioblastomlarda artmış olarak gözlenmiştir. Kolesterol sentezinde meydana gelen garnezil ve farnezil izoprenil sağlayıcısıdır. Artmış kolesterol sentez hızı ile uyumludur. Bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır (148).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada primer ve sekonder glioblastomlar ile düşük evreli glial tümör örneklerinde metabolom düzeyindeki farklılıkları açığa çıkartmak; patogenezlerinde farklı olabilecek bir yolak tespit edilirse bu konuda hipotez geliştirmek ve buna göre olası tedavi seçenekleri konusunda ön çalışma yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, glioblastomlarda lipid mediatör olan prostaglandinler (PG'ler), tromboksanlar (TX'lar), lökotrienler (LT'ler), lipoksinlerden (LX'ler) oluşan eikozanoidlerin artışı ile ilişkili metabolitler izlenmiştir.

LTD4, hücre proliferasyonu, artmış hücre göçü ve tümör invazyonunda rolü gösterilen bir inflamatuvar mediatördür. Sekonder glioblastomlarda LTD4 artışı düşük evreli tümörlerden yüksek dereceli tümörlere geçişin bir göstergesi olabilir. Anlamli tespit edilen lökotrienlerle ilişkili metabolitler, glioblastomlarda artmış LOX yolağı aktivitesi ile uyumludur ve glioblastomalarda LOX yolağının önemini göstermektedir.

PG'ler, tümör ilişkili immunsupresyon, hücre proliferasyonu ve migrasyonunda rol oynamaktadır. PG'lerin sentezinden sorumlu COX-2'nin indüksiyonu tümör gelişimini destekleyen ana faktörlerden biridir. Anlamli tespit edilen PG'ler ve ilişkili metabolitler, düşük evreli tümörlerden yüksek dereceli tümörlere geçişin bir göstergesi olabilir. Sonuçlarımız, glioblastomlarda COX yolağının önemini doğrulamaktadır.

TX'lar, PGH2'den tromboksan sentaz ile oluşan ürünlerdir. Apoptoza dirençli ve invaziv glioblastom fenotipinin gelişimi, tromboksan sentaz geninin ets-1 bağımlı transkripsiyonu üzerindeki p53 aracılı negatif kontrolün kaybından kaynakladığı rapor edilmiştir. TX'ların artışı, glioblastomlarda tromboksan sentazın rolünü ve terapötik modülasyonunun potansiyel faydasını desteklemektedir.

Tüm eikozanoidler, fosfolipidlerden elde edilen araşidonik asitten sentezlenmektedir. Azalmış araşidonik asit, artmış lizo fosfatidilkolin artmış eikozanoid sentezi ile uyumludur.

Çalışmamız artış gösteren farklı etkilere sahip eikozanoidlerin, tedavi hedeflenmesinde aşağı akış eikozanoid sentezleri veya reseptörleri ile ilgili çalışmaların yapılmasının yararlı olacağını göstermektedir.

Safra asitleri ve metabolitlerinin glioblastomlarda arttığı gözlenmiştir. Safra asitlerinin glutamata bağlı apoptozda rol aldığı, bağışıklık hücrelerine sinyal göndererek kanser gelişimini kontrol ettikleri gösterilmiştir. Glioblastomlarda çok yakın bir zamanda yapılan biyoinformatik bir çalışma, tümörögenез ve prognozda primer safra asidi sentez yolağını en anlamlı yolak tespit etmiştir. Glioblastomlarda safra asidi sentezi ve safra asitleri metabolitleri ile ilgili çalışmaların yapılması yeni bilgiler sağlayacaktır.

Kolesterolden sentez edilen steroidler ile ilişkili metabolitler anlamlı tespit edilmiştir. Sonuçlarımız C21 steroid sentez artışını, C21 steroid metabolizmasının yavaşlamasını, C19 steroid metabolizmasının yavaşlamasını, C18 steroid metabolizmasının yavaşlamasını işaret etmektedir. Glioblastomlarda kemoteröpatik ilaç olarak kullanılan temozolomide karşı direncin, kolesterolün nörosteroidlere dönüşümü ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Glioblastomlarda steroidler le ilgili ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuçlarımız kolesterol sentez artışı ve prenilasyon artışı ilgili metabolitleri öne çıkarmaktadır. Kolesterol sentez artışı, safra asitleri ve C21 steroid sentez artışı ile uyumludur. Kanser patogenezi ve progresyonunda farklı proteinlerin prenilasyonunun önemi birçok yayında gösterilmiştir. Glioblastomlarda izoprenlerin artışı literatür bilgilerini desteklemektedir.

Sekonder glioblastomalarda daha fazla olmak üzere tüm glioblastomalarda alfa-Tokotrienol formunun apoptoz üzerinden antitümör aktivitesini göstermek

üzere artmış olduğu düşünülebilir. Glioblastomada adjuvan olarak tokotrienollerin kullanılması önerilebilir.

Glioblastomalarda eikazonoid, steroid, kolesterol, safra asitleri ve sentez yolları ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev.* 2014;23(10):1985–96.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol.* 2016;18(suppl_5):v1–75.
3. Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol.* 2000;28(1):164–70.
4. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* Mayıs 2007;170(5):1445–53.
5. Ferguson S, Lesniak MS. Percival Bailey and the classification of brain tumors. *Neurosurg Focus.* Nisan 2005;18(4):e7.
6. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2014;24(5):429–35.
7. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803–20.
8. Yamaguchi S, Kobayashi H, Terasaka S, Ishii N, Ikeda J, Kanno H, et al. The impact of extent of resection and histological subtype on the outcome of adult patients with high-grade gliomas. *Jpn J Clin Oncol.* 2012;42(4):270–7.
9. Aoki T, Hashimoto N, Matsutani M. Management of glioblastoma. *Expert Opin Pharmacother.* Aralık 2007;8(18):3133–46.
10. Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh R-F, Xiao Y, Decker PA, et al. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet.* Ağustos 2009;41(8):905–8.
11. Brenner A V, Linet MS, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Black PM, et al. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int J cancer.* 2002;99(2):252–9.
12. Scheurer ME, Amirian ES, Davlin SL, Rice T, Wrensch M, Bondy ML. Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. *Int J cancer.* 2011;129(9):2290–6.
13. Hochberg F, Toniolo P, Cole P, Salcman M. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *J Neurooncol.* 1990;8(1):55–60.
14. Fedøy A-E, Yang N, Martinez A, Leiros H-KS, Steen IH. Structural and functional properties of isocitrate dehydrogenase from the psychrophilic

- bacterium *Desulfotalea psychrophila* reveal a cold-active enzyme with an unusual high thermal stability. *J Mol Biol.* 2007;372(1):130–49.
15. Kaminska B, Czapski B, Guzik R, Król SK, Gielniewski B. Consequences of IDH1/2 Mutations in Gliomas and an Assessment of Inhibitors Targeting Mutated IDH Proteins. *Molecules.* 2019;24(5).
 16. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807–12.
 17. Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(5):345.
 18. Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. IDH mutation in glioma: new insights and promises for the future. *JAMA Neurol.* 2014;71(10):1319–25.
 19. Popovici-Muller J, Lemieux RM, Artin E, Saunders JO, Salituro FG, Travins J, et al. Discovery of AG-120 (Ivosidenib): A First-in-Class Mutant IDH1 Inhibitor for the Treatment of IDH1 Mutant Cancers. *ACS Med Chem Lett.* 2018;9(4):300–5.
 20. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science.* 2013;340(6132):626–30.
 21. Huang J, Yu J, Tu L, Huang N, Li H, Luo Y. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Front Oncol.* 2019;9:506.
 22. Rajaratnam V, Islam MM, Yang M, Slaby R, Ramirez HM, Mirza SP. Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. *Cancers (Basel).* 2020;12(4).
 23. Lino MM, Merlo A, Boulay J-L. Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target? *BMC Med.* 2010;8:72.
 24. Yan D, Hao C, Xiao-Feng L, Yu-Chen L, Yu-Bin F, Lei Z. Molecular mechanism of Notch signaling with special emphasis on microRNAs: Implications for glioma. *J Cell Physiol.* 2018;234(1):158–70.
 25. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells.* 2010;28(1):5–16.
 26. Ying M, Wang S, Sang Y, Sun P, Lal B, Goodwin CR, et al. Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. *Oncogene.* 2011;30(31):3454–67.
 27. Morad SAF, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(1):51–65.
 28. Doan NB, Nguyen HS, Al-Gizawiy MM, Mueller WM, Sabbadini RA, Rand SD, et al. Acid ceramidase confers radioresistance to glioblastoma cells. *Oncol Rep.* 2017;38(4):1932–40.
 29. Nguyen HS, Awad AJ, Shabani S, Doan N. Molecular Targeting of Acid

- Ceramidase in Glioblastoma: A Review of Its Role, Potential Treatment, and Challenges. *Pharmaceutics*. 2018;10(2).
30. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther*. Agosto 2015;152:63–82.
 31. Zirlik K, Duyster J. Anti-Angiogenics: Current Situation and Future Perspectives. *Oncol Res Treat*. 2018;41(4):166–71.
 32. Okuda T, Tasaki T, Nakata S, Yamashita K, Yoshioka H, Izumoto S, et al. Efficacy of Combination Therapy with MET and VEGF Inhibitors for MET-overexpressing Glioblastoma. *Anticancer Res*. 2017;37(7):3871–6.
 33. Mischel PS, Cloughesy TF. Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol*. 2003;13(1):52–61.
 34. Heldin C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*. 2013;11:97.
 35. Hovinga KE, Shimizu F, Wang R, Panagiotakos G, Van Der Heijden M, Moayedpardazi H, et al. Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate. *Stem Cells*. 2010;28(6):1019–29.
 36. Cantanhede IG, de Oliveira JRM. PDGF Family Expression in Glioblastoma Multiforme: Data Compilation from Ivy Glioblastoma Atlas Project Database. *Sci Rep*. 2017;7(1):15271.
 37. Westermarck B. Platelet-derived growth factor in glioblastoma-driver or biomarker? *Ups J Med Sci*. 2014;119(4):298–305.
 38. Shih AH, Holland EC. Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2006;232(2):139–47.
 39. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*. 1996;6(3):214–7.
 40. Kraus JA, Felsberg J, Tonn JC, Reifenberger G, Pietsch T. Molecular genetic analysis of the TP53, PTEN, CDKN2A, EGFR, CDK4 and MDM2 tumour-associated genes in supratentorial primitive neuroectodermal tumours and glioblastomas of childhood. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002;28(4):325–33.
 41. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64(19):6892–9.
 42. Felsberg J, Hentschel B, Kaulich K, Gramatzki D, Zacher A, Malzkorn B, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Variant III (EGFRvIII) Positivity in EGFR-Amplified Glioblastomas: Prognostic Role and Comparison between Primary and Recurrent Tumors. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017;23(22):6846–55.
 43. Halatsch M-E, Gehrke EE, Vougioukas VI, Bötterfür IC, A-Borhani F, Efferth T, et al. Inverse correlation of epidermal growth factor receptor messenger RNA

- induction and suppression of anchorage-independent growth by OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in glioblastoma multiforme cell lines. *J Neurosurg.* 2004;100(3):523–33.
44. Reardon DA, Groves MD, Wen PY, Nabors L, Mikkelsen T, Rosenfeld S, et al. A phase I/II trial of pazopanib in combination with lapatinib in adult patients with relapsed malignant glioma. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(4):900–8.
 45. Conciatori F, Bazzichetto C, Falcone I, Pilotto S, Bria E, Cognetti F, et al. Role of mTOR Signaling in Tumor Microenvironment: An Overview. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).
 46. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCL de SE. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal.* 2018;16(1):11.
 47. Lino MM, Merlo A. PI3Kinase signaling in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2011;103(3):417–27.
 48. Janbazian L, Karamchandani J, Das S. Mouse models of glioblastoma: lessons learned and questions to be answered. *J Neurooncol.* 2014;118(1):1–8.
 49. Romano C, Schepis C. PTEN gene: a model for genetic diseases in dermatology. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:252457.
 50. Lester A, Rapkins R, Nixdorf S, Khasraw M, McDonald K. Combining PARP inhibitors with radiation therapy for the treatment of glioblastoma: Is PTEN predictive of response? *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Spanish Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* 2017;19(3):273–8.
 51. Valdés-Rives SA, Casique-Aguirre D, Germán-Castelán L, Velasco-Velázquez MA, González-Arenas A. Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7403747.
 52. Hill VK, Kim J-S, James CD, Waldman T. Correction of PTEN mutations in glioblastoma cell lines via AAV-mediated gene editing. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176683.
 53. Takezaki T, Hide T, Takanaga H, Nakamura H, Kuratsu J-I, Kondo T. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. *Cancer Sci.* 2011;102(7):1306–12.
 54. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo H-W. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel).* 2016;8(2).
 55. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):263–9.
 56. Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* Temmuz 2004;4(7):551–61.
 57. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009;15(2):431–40.
 58. Liesenfeld DB, Habermann N, Owen RW, Scalbert A, Ulrich CM. Review of

- mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol.* 2013;22(12):2182–201.
59. Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;87:1–11.
 60. Jiménez B, Mirnezami R, Kinross J, Cloarec O, Keun HC, Holmes E, vd. 1H HR-MAS NMR spectroscopy of tumor-induced local metabolic “field-effects” enables colorectal cancer staging and prognostication. *J Proteome Res.* 2013;12(2):959–68.
 61. Wang H, Tso VK, Slupsky CM, Fedorak RN. Metabolomics and detection of colorectal cancer in humans: a systematic review. *Future Oncol.* 2010;6(9):1395–406.
 62. Zhang T, Wu X, Ke C, Yin M, Li Z, Fan L, et al. Identification of potential biomarkers for ovarian cancer by urinary metabolomic profiling. *J Proteome Res.* 2013;12(1):505–12.
 63. Davis VW, Schiller DE, Eurich D, Sawyer MB. Urinary metabolomic signature of esophageal cancer and Barrett’s esophagus. *World J Surg Oncol.* 2012;10:271.
 64. Tiziani S, Lopes V, Günther UL. Early stage diagnosis of oral cancer using 1H NMR-based metabolomics. *Neoplasia.* 2009;11(3):269–76, 4p following 269.
 65. Tiziani S, Kang Y, Harjanto R, Axelrod J, Piermarocchi C, Roberts W, et al. Metabolomics of the tumor microenvironment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* 2013;8(12):e82859.
 66. Bathen TF, Jensen LR, Sitter B, Fjøsne HE, Halgunset J, Axelson DE, et al. MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;104(2):181–9.
 67. Ahmed KA, Chinnaiyan P. Applying metabolomics to understand the aggressive phenotype and identify novel therapeutic targets in glioblastoma. *Metabolites.* 2014;4(3):740–50.
 68. Griffin JL, Kauppinen RA. A metabolomics perspective of human brain tumours. *FEBS J.* 2007;274(5):1132–9.
 69. Sugita Y, Yamada S, Sugita S, Sakata K, Morimatsu M, Shigemori M. The biochemical analysis of neurotransmitters in central neurocytomas. *Int J Mol Med.* 2001;7(5):521–5.
 70. Olsen P, Rasmussen M, Zhu W, Tonnesen E, Stefano GB. Human gliomas contain morphine. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2005;11(5):MS18-21.
 71. Bieberich E, Freischütz B, Suzuki M, Yu RK. Differential effects of glycolipid biosynthesis inhibitors on ceramide-induced cell death in neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 1999;72(3):1040–9.
 72. Miller BL, Chang L, Booth R, Ernst T, Cornford M, Nikas D, et al. In vivo 1H

- MRS choline: correlation with in vitro chemistry/histology. *Life Sci.* 1996;58(22):1929–35.
73. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem.* 2011;286(29):25435–42.
 74. Want EJ, Cravatt BF, Siuzdak G. The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization. *Chembiochem.* 2005;6(11):1941–51.
 75. Schuhmann K, Herzog R, Schwudke D, Metelmann-Strupat W, Bornstein SR, Shevchenko A. Bottom-up shotgun lipidomics by higher energy collisional dissociation on LTQ Orbitrap mass spectrometers. *Anal Chem.* 2011;83(14):5480–7.
 76. Meyer MR, Maurer HH. Current applications of high-resolution mass spectrometry in drug metabolism studies. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(5):1221–31.
 77. Huang J, Si L, Fan Z, Hu L, Qiu J, Li G. In vitro metabolic stability and metabolite profiling of TJ0711 hydrochloride, a newly developed vasodilatory β -blocker, using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J Chromatogr B, Anal Technol Biomed life Sci.* 2011;879(30):3386–92.
 78. Pandey R, Caflisch L, Lodi A, Brenner AJ, Tiziani S. Metabolomic signature of brain cancer. *Mol Carcinog. Kasim* 2017;56(11):2355–71.
 79. Peterson AC, Hauschild J-P, Quarmby ST, Krumwiede D, Lange O, Lemke RAS, et al. Development of a GC/Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer, part I: design and characterization. *Anal Chem.* 2014;86(20):10036–43.
 80. Antoniewicz MR. Tandem mass spectrometry for measuring stable-isotope labeling. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24(1):48–53.
 81. Metallo CM, Walther JL, Stephanopoulos G. Evaluation of ^{13}C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells. *J Biotechnol.* 2009;144(3):167–74.
 82. Iwatani S, Van Dien S, Shimbo K, Kubota K, Kageyama N, Iwahata D, et al. Determination of metabolic flux changes during fed-batch cultivation from measurements of intracellular amino acids by LC-MS/MS. *J Biotechnol.* 2007;128(1):93–111.
 83. Rühl M, Rupp B, Nöh K, Wiechert W, Sauer U, Zamboni N. Collisional fragmentation of central carbon metabolites in LC-MS/MS increases precision of ^{13}C metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng.* 2012;109(3):763–71.
 84. Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(5):613–46.
 85. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(6):1523–48.
 86. León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, Lahoz A. Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis.* 2013;34(19):2762–75.

87. Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem.* 1980;106(1):55–62.
88. Squellerio I, Caruso D, Porro B, Veglia F, Tremoli E, Cavalca V. Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;71:111–8.
89. Isokawa M, Shimosawa T, Funatsu T, Tsunoda M. Determination and characterization of total thiols in mouse serum samples using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *J Chromatogr B, Anal Technol Biomed life Sci.* 2016;1019:59–65.
90. Rabenstein DL, Saetre R. Mercury-based electrochemical detector of liquid chromatography for the detection of glutathione and other sulfur-containing compounds. *Anal Chem.* 1977;49(7):1036–9.
91. Johnson JM, Strobel FH, Reed M, Pohl J, Jones DP. A rapid LC-FTMS method for the analysis of cysteine, cystine and cysteine/cystine steady-state redox potential in human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008;396(1–2):43–8.
92. Coulier L, Bas R, Jespersen S, Verheij E, van der Werf MJ, Hankemeier T. Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2006;78(18):6573–82.
93. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765–73.
94. Rashed MS, AlAmoudi M, Aboul-Enein HY. Chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry in the determination of the configuration of 2-hydroxyglutaric acid in urine. *Biomed Chromatogr.* 2000;14(5):317–20.
95. Poinsignon V, Mercier L, Nakabayashi K, David MD, Lalli A, Penard-Lacronique V, et al. Quantitation of isocitrate dehydrogenase (IDH)-induced D and L enantiomers of 2-hydroxyglutaric acid in biological fluids by a fully validated liquid tandem mass spectrometry method, suitable for clinical applications. *J Chromatogr B, Anal Technol Biomed life Sci.* 2016;1022:290–7.
96. Gibson KM, ten Brink HJ, Schor DS, Kok RM, Bootsma AH, Hoffmann GF, et al. Stable-isotope dilution analysis of D- and L-2-hydroxyglutaric acid: application to the detection and prenatal diagnosis of D- and L-2-hydroxyglutaric acidemias. *Pediatr Res.* 1993;34(3):277–80.
97. Lamarre SG, Morrow G, Macmillan L, Brosnan ME, Brosnan JT. Formate: an essential metabolite, a biomarker, or more? *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(3):571–8.
98. Kage S, Kudo K, Ikeda H, Ikeda N. Simultaneous determination of formate and acetate in whole blood and urine from humans using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B, Anal Technol Biomed life Sci.*

- 2004;805(1):113–7.
99. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029–33.
 100. Kelimu A, Xie R, Zhang K, Zhuang Z, Mamtimin B, Sheyhidin I. Metabonomic signature analysis in plasma samples of glioma patients based on (1)H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurol India*. 2016;64(2):246–51.
 101. Kallenberg K, Bock HC, Helms G, Jung K, Wrede A, Buhk J-H, et al. Untreated glioblastoma multiforme: increased myo-inositol and glutamine levels in the contralateral cerebral hemisphere at proton MR spectroscopy. *Radiology*. 2009;253(3):805–12.
 102. Nakamizo S, Sasayama T, Shinohara M, Irino Y, Nishiumi S, Nishihara M, et al. GC/MS-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid (CSF) from glioma patients. *J Neurooncol*. 2013;113(1):65–74.
 103. Mukherjee J, Phillips JJ, Zheng S, Wiencke J, Ronen SM, Pieper RO. Pyruvate kinase M2 expression, but not pyruvate kinase activity, is up-regulated in a grade-specific manner in human glioma. *PLoS One*. 2013;8(2):e57610.
 104. Mören L, Bergenheim AT, Ghasimi S, Brännström T, Johansson M, Antti H. Metabolomic Screening of Tumor Tissue and Serum in Glioma Patients Reveals Diagnostic and Prognostic Information. *Metabolites*. 2015;5(3):502–20.
 105. Chung WJ, Lyons SA, Nelson GM, Hamza H, Gladson CL, Gillespie GY, et al. Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *J Neurosci*. 2005;25(31):7101–10.
 106. Zengin E, Atukeren P, Kokoglu E, Gumustas MK, Zengin U. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in different types of intracranial tumors within their relative peritumoral tissues. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111(4):345–51.
 107. Prabhu A, Sarcar B, Kahali S, Yuan Z, Johnson JJ, Adam K-P, et al. Cysteine catabolism: a novel metabolic pathway contributing to glioblastoma growth. *Cancer Res*. 2014;74(3):787–96.
 108. Cramer SL, Saha A, Liu J, Tadi S, Tiziani S, Yan W, et al. Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat Med*. 2017;23(1):120–7.
 109. de Groot J, Sontheimer H. Glutamate and the biology of gliomas. *Glia*. 2011;59(8):1181–9.
 110. Seyfried TN, Kiebish MA, Marsh J, Shelton LM, Huysentruyt LC, Mukherjee P. Metabolic management of brain cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807(6):577–94.
 111. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis.

- Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(49):19345–50.
112. Palanichamy K, Thirumoorthy K, Kanji S, Gordon N, Singh R, Jacob JR, et al. Methionine and Kynurenine Activate Oncogenic Kinases in Glioblastoma, and Methionine Deprivation Compromises Proliferation. *Clin cancer Res* 2016;22(14):3513–23.
 113. Campanella R. Membrane lipids modifications in human gliomas of different degree of malignancy. *J Neurosurg Sci.* 1992;36(1):11–25.
 114. Wibom C, Surowiec I, Mören L, Bergström P, Johansson M, Antti H, et al. Metabolomic patterns in glioblastoma and changes during radiotherapy: a clinical microdialysis study. *J Proteome Res.* 2010;9(6):2909–19.
 115. Khosla P, Patel V, Whinter JM, Khanna S, Rakhkovskaya M, Roy S, et al. Postprandial levels of the natural vitamin E tocotrienol in human circulation. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):1059-68.
 116. Kashiwagi K, Harada K, Yano Y, Kumadaki I, Hagiwara K, Takebayashi J, et al. A redox-silent analogue of tocotrienol inhibits hypoxic adaptation of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365:875–881.
 117. Takahashi K, Loo G. Disruption of mitochondria during tocotrienol-induced apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(2):315–324.
 118. Lim SW, Loh HS, Ting KN, Bradshaw TD, Zeenathul NA. Cytotoxicity and apoptotic activities of alpha-, gamma- and delta-tocotrienol isomers on human cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14:469.
 119. Tan B, Mueller AM. Tocotrienols in cardiometabolic diseases. In *Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols*. Edited by Watson RR, Preedy VR. New York: CRC Press; 2008:257–273.
 120. Birringer M, Pfluger P, Kluth D, Landes N, Brigelius-Flohe R. Identities and differences in the metabolism of tocotrienols and tocopherols in HepG2. *Cells. J Nutr* 2002; 132:3113–3118.
 121. McIntyre BS, Briski KP, Tirmenstein MA, Fariss MW, Gapor A, Sylvester PW. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids* 2000; 35(2):171–180.
 122. Chandan KS, Savita K, Sashwati R, Packer L. Molecular basic of vitamin E action. *J Biol Chem* 2000; 275(17):13049–13055.
 123. Magnusson C, Liu J, Ehrnstrom R, Manjer J, Jirstrom K, Andersson T, et al. Cysteinyl leukotriene receptor expression pattern affects migration of breast cancer cells and survival of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2011;129:9–22.
 124. Ishii K, Zaito M, Yonemitsu N, Kan Y, Hamasaki Y, Matsuo M. 5-lipoxygenase pathway promotes cell proliferation in human glioma cell lines. *Clin Neuropathol* 2009;28:445–452
 125. Piromkraipak P, Sangpaioj K, Tirakotai W, Chaithirayanon K, Unchern S, Supavilai P, et al. Cysteinyl Leukotriene Receptor Antagonists Inhibit

- Migration, Invasion, and Expression of MMP-2/9 in Human Glioblastoma. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(2):559-573.
126. Cooper C, Jones HG, Weller RO, Walker V. Production of prostaglandins and thromboxane by isolated cells from intracranial tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1984;47(6):579-84.
 127. Jiang J, Qiu J, Li Q, Shi Z. Prostaglandin E2 Signaling: Alternative Target for Glioblastoma? *Trends Cancer.* 2017;3(2):75-78.
 128. Tian Y, Yang T, Yu S, Liu C, He M, Hu C. Prostaglandin E2 increases migration and proliferation of human glioblastoma cells by activating transient receptor potential melastatin 7 channels. *J Cell Mol Med.* 2018;22(12):6327–37.
 129. Cook PJ, Thomas R, Kingsley PJ, Shimizu F, Montrose DC, Marnett LJ, et al. Cox-2-derived PGE2 induces Id1-dependent radiation resistance and self-renewal in experimental glioblastoma. *NeuroOncol.* 2016;18(10):1379–89.
 130. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res.* 2001;61(11):4375–4381.
 131. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol.* 2012;188(1):21–28.
 132. Wang D, DuBois RN. The role of prostaglandin E(2) in tumor-associated immunosuppression. *Trends Mol Med.* 2016;22(1):1–3.
 133. Kesarwani P, Kant S, Prabhu A, Chinnaiyan P. The interplay between metabolic remodeling and immune regulation in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2017;19(10):1308-1315
 134. Giese A, Hagel C, Kim EL, Zapf S, Djawaheri J, Berens ME, et al. Thromboxane synthase regulates the migratory phenotype of human glioma cells. *Neuro Oncol* 1999;1,3–13.
 135. Kim E, Gunther W, Yoshizato K, Meissner H, Zapf S, Nusing RM, et al. Tumor suppressor p53 inhibits transcriptional activation of invasion gene thromboxane synthase mediated by the proto-oncogenic factor ets-1. *Oncogene* 2003;22,7716–7727.
 136. Schmidt NO, Ziu M, Cargioli T, Westphal M, Giese A, Black PM, et al. Inhibition of thromboxane synthase activity improves glioblastoma response to alkylating chemotherapy. *Transl Oncol.* 2010;3(1):43-9.
 137. Qiu J, Shi Z, Jiang J. Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme. *Drug Discov Today.* 2017;22(1):148-156.
 138. Jantke J, Ladehoff M, Kürzel F, Zapf S, Kim E, Giese A. Inhibition of the arachidonic acid metabolism blocks endothelial cell migration and induces apoptosis. *Acta Neurochir (Wien).* 2004;146(5):483-94
 139. Huang R, Li Z, Li C, Wang G, Yan P, Peng L, et al. Germ Cell-Specific Gene 1-Like Protein Regulated by Splicing Factor CUGBP Elav-Like Family

- Member 5 and Primary Bile Acid Biosynthesis are Prognostic in Glioblastoma Multiforme. *Front Genet.* 2020;10:1380.
140. Castro RE, Sola S, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. The bile acid tauroursodeoxycholic acid modulates phosphorylation and translocation of bad via phosphatidylinositol 3-kinase in glutamate-induced apoptosis of rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;311, 845–852.
 141. Brossard D, El Kihel L, Clement M, Sebbahi W, Khalid M, Roussakis C, et al. Synthesis of bile acid derivatives and in vitro cytotoxic activity with proapoptotic process on multiple myeloma (KMS-11), glioblastoma multiforme (GBM), and colonic carcinoma (HCT-116) human cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* 2010;45, 2912–2918.
 142. Ma C, Han M, Heinrich B, Fu Q, Zhang Q, Sandhu M, et al. Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. *Science* 2018;360.
 143. Villa GR, Hulce JJ, Zanca C, Bi J, Ikegami S, Cahill GL, et al. An LXR-Cholesterol Axis Creates a Metabolic Co-Dependency for Brain Cancers. *Cancer Cell.* 2016;30(5):683-693.
 144. Pinacho-Garcia LM, Valdez RA, Navarrete A, Cabeza M, Segovia J, Romano MC. The effect of finasteride and dutasteride on the synthesis of neurosteroids by glioblastoma cells. *Steroids.* 2020;155:108556.
 145. Beishline K, Azizkhan-Cliford J. Sp1 and the “hallmarks of cancer.” *FEBS J.* 2015;282(2):224–58.
 146. Yang WB, Chuang JY, Ko CY, Chang WC, Hsu TI. Dehydroepiandrosterone induces temozolomide resistance through modulating phosphorylation and acetylation of Sp1 in glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2019;56(4):2301–13.
 147. Lin HY, Ko CY, Kao TJ, Yang WB, Tsai YT, Chuang JY, et al. CYP17A1 maintains the survival of glioblastomas by regulating SAR1-mediated endoplasmic reticulum health and redox homeostasis. *Cancers (Basel).* 2019;11(9):1378.
 148. Wan W, Xiao W, Pan W, Chen L, Liu Z, Xu J. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase is critical for glioblastoma growth and survival by activating Ras/Raf/Mek/Erk. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2022;89(3):401-411.

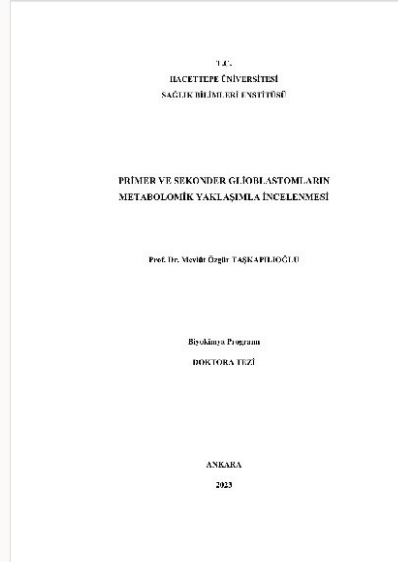
69	432.3223	C17335	M-[1-]	0.0017206	C17335	3-oxo-7-oxo-bicyclo[3.2.1]octane-2-one	M-D0011454	0.02255641	1.57561866	-	5.18989389	-	1.27751605	-
70	434.3468	O04694	M-[1-]	0.00709443	O04694	Guaiacol	M-D0000439	0.00197320	1.45011243	-	2.33040537	-	1.27928200	-
71	434.3321	O01301	M-[1-]	0.0021361	O01301	3a,7a,12a-Trihydroxy-6-oxocyclohex-2-enal	M-D0000513	0.034070716	1.21504011	-	7.04746911	-	1.56116566	-
72	435.3468	O04554	M-[1-]	0.0015454	O04554	3a,7a-Dihydroxy-6-oxocyclohex-2-enal	M-D0000515	0.034070716	1.21504011	-	7.04746911	-	1.56116566	-
73	435.3468	C17334	M->CO->M-[1-]	0.000304367	C17334	3-oxo-methylene-cyclohex-2-ene	M-D0011453	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
74	435.3468	O01301	M-[1-]	0.000304367	O01301	3a,7a,12a-Trihydroxy-6-oxocyclohex-2-enal	M-D0000513	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
75	435.3468	O04554	M-[1-]	0.000304367	O04554	3a,7a-Dihydroxy-6-oxocyclohex-2-enal	M-D0000515	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
76	435.3468	C17339	M->CO->M-[1-]	0.000304367	C17339	4-cyclohex-2-en-1-one	M-F734347	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
77	435.3468	C17331	M->CO->M-[1-]	0.000304367	C17331	7-oxo-2,3-dihydro-4-cyclohex-2-ene	M-D0011457	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
78	435.3468	C17336	M->CO->M-[1-]	0.000304367	C17336	7-oxo-2,3-dihydro-4-cyclohex-2-ene	M-D0011459	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
79	435.3468	O0457	M->CO->M-[1-]	0.000304367	O0457	7a,12a-Dihydroxy-6-oxocyclohex-2-ene	M-D0001197	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
80	435.3468	C17332	M->CO->M-[1-]	0.000304367	C17332	7a,12a-Dihydroxy-6-oxocyclohex-2-ene	M-D00060425	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
81	435.3468	O0373	M->CO->M-[1-]	0.000304367	O0373	Catechol	M-D0001303	0.03630983	1.65095748	-	7.08722894	-	1.79434443	-
82	436.3577	O04130	M->C[1-]	0.00069051	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.01228259	5.57031813	-	11.2336706	-	1.22838796	-
83	436.3777	O0444	M->CO->M-[1-]	0.00051867	O0444	3-oxo-7-oxo-bicyclo[3.2.1]octane-2-one	M-D0011455	0.00321793	1.76458976	-	1.67261173	-	1.69530427	-
84	436.3777	O0454	M->CO->M-[1-]	0.00051867	O0454	3-cyclohex-2-en-1-one	M-D0011457	0.00321793	1.76458976	-	1.67261173	-	1.69530427	-
85	441.0978	O0448	M->C[1-]	0.00080133	O0448	6-oxocyclohex-2-en-1-one	M-D0000961	0.00673465	1.713260712	-	4.452364314	-	4.74237045	-
86	448.3410	O05849	M->CO->M-[1-]	0.000304367	O05849	3a,7a,12a-Trihydroxy-6-oxocyclohex-2-enal	M-D0000292	0.005422064	1.753867931	-	1.55490259	-	1.22838796	-
87	448.3368	O04721	M-[1-]	0.0022136	O04721	3a,7a,12a-Trihydroxy-6-oxocyclohex-2-enal	M-D0000393	0.00617059	1.86644095	-	1.70389207	-	1.70061406	-
88	453.2776	O0861	M->CO->M-[1-]	0.000304367	O0861	acetone	M-D0000300	1.45306116	8.27074305	-	4.72203705	-	2.27831708	-
89	455.3111	C17335	M->C[1-]	0.0021361	C17335	3-oxo-7-oxo-bicyclo[3.2.1]octane-2-one	M-D0011454	0.01218184	2.62630584	-	2.97146777	-	3.22157281	-
90	456.3127	O02582	M->CO->M-[1-]	0.00142667	O02582	acetone	M-D0000722	0.01218184	2.62630584	-	2.97146777	-	3.22157281	-
91	456.3127	O0463	M->CO->M-[1-]	0.00142667	O0463	acetone	M-D0000986	0.01218184	2.62630584	-	2.97146777	-	3.22157281	-
92	456.3127	O0466	M->CO->M-[1-]	0.00142667	O0466	acetone	M-D0000989	0.01218184	2.62630584	-	2.97146777	-	3.22157281	-
93	461.2880	O02528	M->COO[4-]	0.001802567	O02528	Cyclohexanone	M-D0000518	0.00318975	2.465238343	-	2.33875535	-	1.512028364	-
94	461.2880	O0483	M->COO[4-]	0.001802567	O0483	Cyclohexanone	M-D0000626	0.00318975	2.465238343	-	2.33875535	-	1.512028364	-
95	461.2880	C15517	M->COO[4-]	0.001802567	C15517	Cyclohexanone	M-D0000733	0.00318975	2.465238343	-	2.33875535	-	1.512028364	-
96	466.3454	O05849	M-[1-]	0.0006713	O05849	3a,7a,12a-Trihydroxy-6-oxocyclohex-2-enal	M-D0000292	0.007010976	3.75247069	-	4.12122813	-	1.37152538	-
97	467.2648	C11135	M-[1-]	0.00095133	C11135	Acetone	M-D0000239	1.07038116	6.83075063	-	4.18831971	-	2.03846906	-
98	467.2648	C11136	M-[1-]	0.00095133	C11136	Acetone	M-D0000494	1.07038116	6.83075063	-	4.18831971	-	2.03846906	-
99	467.3983	O03109	M-[1-]	0.00168373	O03109	2,4-dihydroxy-6-oxocyclohex-2-enal	M-D0000639	0.002137416	2.6464261	-	2.93833671	-	1.50279802	-
100	472.3557	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
101	472.3589	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
102	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
103	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
104	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
105	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
106	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
107	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
108	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
109	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
110	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
111	473.3543	O04130	M->CO->M-[1-]	0.000712151	O04130	isoPC[18:1]B2II	M-D0000215	0.007453677	3.544907359	-	5.174530726	-	6.112077248	-
112	1056.7539	O06126	M->COO[4-]	0.00068007	O06126	Galactonolactone	M-D00004812	0.002090383	1.581288036	-	1.581288036	-	1.512898582	-

EK-3: Turnitin Raporu**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Mevlüt Özgür Taşkapılıoğlu
Ödev başlığı: PRİMER VE SEKONDER GLİOBLASTOMLARIN METABOLOMİK ...
Gönderi Başlığı: PRİMER VE SEKONDER GLİOBLASTOMLARIN METABOLOMİK ...
Dosya adı: tez_son__L.docx
Dosya boyutu: 1,010.21K
Sayfa sayısı: 118
Kelime sayısı: 24,527
Karakter sayısı: 171,241
Gönderim Tarihi: 10-Şub-2023 08:01ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2010689837



PRİMER VE SEKONDER GLİOBLASTOMLARIN METABOLOMİK YAKLAŞIMLA İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 24	% 22	% 9	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 4
2	profdrahmetbekar.com İnternet Kaynağı	% 3
3	www.numankaraarslan.com İnternet Kaynağı	% 3
4	www.medicabil.com İnternet Kaynağı	% 2
5	avesis.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
6	tip.acibadem.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
7	Renu Pandey, Laura Cafilisch, Alessia Lodi, Andrew J. Brenner, Stefano Tiziani. "Metabolomic signature of brain cancer", Molecular Carcinogenesis, 2017 Yayın	% 2
8	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	

EK-4: Etik Kurul Onayı

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Primer ve Sekonder Glioblastomların Metabolik Açısından İncelenmesi							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2021-4/59	Tarih: 24 Şubat 2021							
	<p>Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelendi.</p> <p>1-Araştırmanın başvurusu dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna,</p> <p>2-Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kaşesi bulunan "Onam" formlarının kullanılması ve bu formun çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına,</p> <p>3-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine,</p> <p>4-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırmacılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.</p>								
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI		Prof.Dr. Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU							
ÜYELER									
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *	İmza	
Prof.Dr. Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UU.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İznil
Prof.Dr. Elif BAŞAĞAN MOGOL Başkan Yardımcısı/Başkan Vek.	Anesteziyoloji	Bursa UU.Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. M. Serraç YILMAZ Üye	Farmakoloji	Bursa UU.Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Başka bir toplantıda
Prof.Dr. Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UU.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Yenidoğan BD	F <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	Bursa UU. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Kağan HUYSAI Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	F <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	F <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özen ÖZ GÜL Üye	İç Hastalıkları Endokr. ve Metab.	BUÜ.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Endokrinoloji ve Metabolizma BD	F <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk	Bursa UU.Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAGDILEK Üye	Biyofizik	Bursa UU.Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Nezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	Bursa UU.Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Selen MİGAL Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	F <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı

* Toplantıda Bulunma

9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Mevlüt Özgür Taşkapılıoğlu