

ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM), primer beyin ve merkezi sinir sistemi neoplazmalarının %16'sını içeren en yaygın malign beyin tümörüdür. Yetişkinlerdeki tüm beyin tümörlerinin %60'ından fazlasını oluşturur. GBM'ye karşı çeşitli modern tedavilere rağmen hala çok kötü prognozlu ölümcül bir hastalıktır. Hastalar genellikle tanıdan itibaren yaklaşık 14 ila 15 aylık bir ortalama hayatta kalma süresine sahiptir. Tedavinin ilk basamağında genellikle radyoterapi ve temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır. Metile edici bir ajan olan TMZ, hastalarda yüksek DNA onarım enzimi MGMT ile uzaklaştırılır ve hastalar TMZ'ye dirençli hale gelir. Ayrıca ikinci basamak tedavide kullanılan kemoterapötik ajanların çoğu kan-beyin bariyerini geçemez. Bu bilgiler doğrultusunda araştırmanın amacı, bitkisel bir steroid olan epibrassinolidin (EBR) kan-beyin bariyerini geçtiğini ve TMZ'ye dirençli GBM hücre modellerinde apoptotik ölümü tetiklediğini göstermektir. Buna göre hedef, EBR'nin tek başına veya TMZ varlığında TMZ'ye dirençli LN18 GBM hücre hattında hücre canlılığı, hayatta kalma, koloni oluşumu ve apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkilerini göstermektir. Bağlı hücre canlılığı, MTT deneyi ile belirlendi. EBR tedavisinden sonra LN18 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli koloni oluşturma deneyi ile incelendi. EBR tedavisi sonrası hücrelerin üç boyutlu formasyon oluşturma özelliklerindeki değişim, asılı damlacık ve 3D Matrigel teknikleriyle gözlemlendi. EBR'nin apoptotik etkilerini saptamak için DiOC6 ve DAPI fluoressan boyama yapıldı. EBR ve TMZ kombine tedavisinin LN18 hücrelerinde bağlı hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. EBR varlığında TMZ'nin tek başına TMZ tedavisine kıyasla koloni oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği de gözlenmiştir. Kombine ilaç tedavisi ayrıca matrigel veya asılı damla yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen LN18 3D hücre kültüründe koloni çaplarını da inhibe etmiştir. Ayrıca TMZ ve EBR'nin kombine tedavisinin mitokondriyal membran potansiyelini azalttığını ve artan apoptotik indüksiyonun bir sonucu olarak DNA fragmentasyonunu arttırdığını gözlemledik. Tüm bu bilgiler, EBR'nin TMZ'ye dirençli LN18 GBM hücre hattında TMZ'nin etkinliğini arttırmak için güçlü bir aday olduğunu göstermektedir.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor containing 16% of all primary brain and central nervous system neoplasms. Despite various modern therapies against GBM, it is still a deadly disease with an extremely poor prognosis. Patients generally have an average survival time of about 14 to 15 months from diagnosis. Radiotherapy and temozolomide (TMZ) are generally used in the first step of treatment. TMZ, a methylating agent, is removed in patients by the high DNA repair enzyme MGMT, and patients become resistant to TMZ. In addition, most of the chemotherapeutic agents used in second-line therapy cannot pass through the blood-brain barrier. In line with this information, the aim of our research is to demonstrate that Epibrassinolide (EBR), a herbal steroid, passes through the blood-brain barrier and triggers apoptotic death in TMZ-resistant GBM cell models. Accordingly, our goals are to demonstrate the effects on cell viability, survival, and colony formation, as well as the effects on apoptotic cell death, to model the effect of EBR alone or in the presence of TMZ in TMZ-resistant LN18 GBM cell line. Relative cell viability was determined by MTT assay. Colony forming potential of LN18 cells after EBR treatment was examined by clonogenic assay. The change in the three-dimensional formation-forming properties of cells after the EBR treatment was observed with the Hanging Drop and 3D Matrigel techniques. DiOC6 and DAPI fluorescent staining was performed to detect the apoptotic effects of EBR. We observed that EBR and TMZ combined therapy decreased relative cell viability in LN18 cells. It has also been observed that TMZ, in the presence of EBR significantly inhibited colony formation compared to alone TMZ treatment. The combined drug treatment also inhibits colony diameters in LN18 3D cell culture performed using matrigel or hanging drop method. We also observed that the combined treatment of TMZ and EBR reduced mitochondrial membrane potential, and increased DNA fragmentation as a result of the increased apoptotic induction. All this information suggests that the EBR is a strong candidate for enhancing the efficacy of TMZ in the TMZ resistant LN18 glioblastoma cell line.