

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**C60 FULLEREN NANOPARÇACIKLARIN GLİOBLASTOM
U373 HÜCRELERİ GELİŞİMİ VE İSTİLASI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVDA BAYSAL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Viktor NEDZVETSKYI**

BİNGÖL-2021

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde benden desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Victor NEDZVETSKYI'ye teşekkür ederim. Ayrıca her zaman yanımda olan maddi ve manevi katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, beni her daim anlayışla karşılayan aileme ve arkadaşlarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Sevda BAYSAL

Bingöl 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. GBM ve Tümör Mikroçevresi	2
1.2. GBM’de Hücre İstilas ve Biyolojik Mekanizmalar	3
1.3. GBM’de WNT Sinyal Yolağı.....	5
1.4. GBM’de EGFR Sinyal Yolağı.....	6
1.5. GBM’de PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı.....	7
1.6. Glioma Hücrelerinde Epitel-Mezenkimal Geçiş	8
1.7. Hücre İskeletinin Glial Hücrelerdeki Rolü.....	9
1.7.1. Glial Fibriller Asidik Proteini (GFAP)	9
1.7.2. Fibronektin (FN)	10
1.8. Nanoteknoloji	11
1.8.1. C60 Fulleren.....	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM	15
2.1. Hücre Kültürü ve Kültür Kaplarına Hücre Ekimi	15
2.2. Yara İyileşmesi Testi	16
2.3. Protein İzolasyonu	16
2.4. SDS- PAGE ve Western Blot	16
2.5. Hücre Canlılık Testi/Tripan Mavisi.....	18
2.6. İmmünohistokimya.....	18
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	20

4. SONUÇ VE ÖNERİLER	27
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	36

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
GBM	: Glioblastoma Multiforme
TME	: Tümör Mikro Çevresi
ECM	: Hücre Dışı Matriks
NO	: Nitrik Oksit
EMT	: Epital Mezenkimal Geçiş
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
PI3K	: Fosfatidilinositol-3 Kinaz
RTK	: Reseptör Trizon Kinaz
GSK3	: Glikojen Sentaz Kinaz 3
FOXO	: Forkhead Box 0
TSC	: Tümör Skleroz Kompleksi
GFAP	: Glial Fibriller Asidik Proteini
AF	: Ara Filament Ağı
MS	: Multipl Skleroz
FN	: Fibronektin
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Glioma hücre mikroçevresi	2
Şekil 2. Beyin tümörü mikroçevresinin hücrel bileşenleri.....	3
Şekil 3. GBM'nin çoğalması ve istilası mekanizması.....	5
Şekil 4. GBM istilasına dahil olduğu bildirilen üç ana sinyal yolu (PI3K-AKT ve WNT)..	8
Şekil 5. İnsan GFAP ekleme varyantlarının transkriptleri ve GFAP'nin hücre göçündeki rolü	10
Şekil 6. FN'nin fonksiyonlar şeması	11
Şekil 7. Nanoteknolojinin kanser tespiti ve teşhisindeki aşamaları	12
Şekil 8. Fullerenin biyomedikal uygulamaları	13
Şekil 9. Kontrol grubu ve C60 fulleren'e maruz bırakılan U373 hücrelerinin migrasyon testinin sonuçları	20
Şekil 10. C60 fulleren'e maruz bırakılan glioblastoma U373 hücrelerinde hücre canlılığı kontrolü	21
Şekil 11. C60 fulleren'e maruz bırakılan glioblastoma U373 hücrelerinde GFAP proteini kontrolü	22
Şekil 12. C60 fulleren'e maruz bırakılan glioblastoma U373 hücrelerinde tübülün proteini kontrolü	22
Şekil 13. C60 fulleren'e maruz bırakılan glioblastoma U373 hücrelerinde aktin proteini kontrolü	23

C60 FULLEREN NANOPARÇACIKLARIN GLİOBLASTOM U373 HÜCRELERİ GELİŞİMİ VE İSTİLASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

ÖZET

Glioblastoma Multiforme (GBM), birincil Merkezi Sinir Sistemi tümörü olup, tüm beyin tümörleri arasındaki en sık görülen, en agresif ve en ölümcül olanıdır. Tedavi stratejileri arasında cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapi bulunmaktadır. Ancak GBM hücrelerinin istilaya eğilimli olmaları nedeniyle bu tedavi stratejileri yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle yeni tedavi stratejileri araştırılmakta ve özellikle de hedefe yönelik ilaç tedavi yöntemleri üzerinde durulmaktadır. Tam olarak bu noktada nanoteknoloji kullanılmaktadır. Nanoteknoloji ile üretilen nanoparçacıklar ve özellikle C60 fullerene güçlü antikanser aktivite, güçlü antioksidan etki, antimikrobiyal etki, antiviral etki ve radikal süpürücü özellikleri ile GBM tedavisinde hem hedefe yönelik ilaç hem de yeni bir teknoloji olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki etkisinin mekanizmalarını netleştirmek için glioblastoma U373 hücrelerinde C60 fullerene'in istila aktivitesi ve hücre iskeleti proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Mevcut çalışmanın sonucunda, C60 fullerene'in glioblastoma U373 hücresinin özellikle hücre iskeletini, fibronektin üretimini ve hareketliliğini etkilemek için güçlü olduğunu göstermiştir. Ayrıca mevcut çalışmanın sonuçlarında gözlenen veriler bir bütün halinde değerlendirildiğinde C60 fullerene, hücre iskeleti ana yapıları olan ara filamentleri ve mikrotübülleri zıt yönde etkilemiştir. Bununla birlikte, C60 fullerene'in glioblastoma hücre göçü üzerindeki inhibitör etkisine, GFAP yukarı regülasyonu ve Tübülün aşağı regülasyonu eşlik ettiği tespit edilmiştir. C60 fullerene nanoparçacıkları, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi üzerindeki etkinin yanı sıra glioblastoma hücrelerinin reaktivitesini de düzenler. Bu nedenle C60 fullerene, GBM istilasında rol oynadığı gibi glioblastoma hareketliliğinin baskılanmasında da rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: U373 glioblastoma hücre hattı, nanopartikül, C60 fullerene, GFAP, hücre göçü.

THE EFFECT OF C60 FULLEREN NANOPARTICLES ON CYTOSKELETON AND MIGRATION OF GLIOBLASTOMA U373 CELLS

ABSTRACT

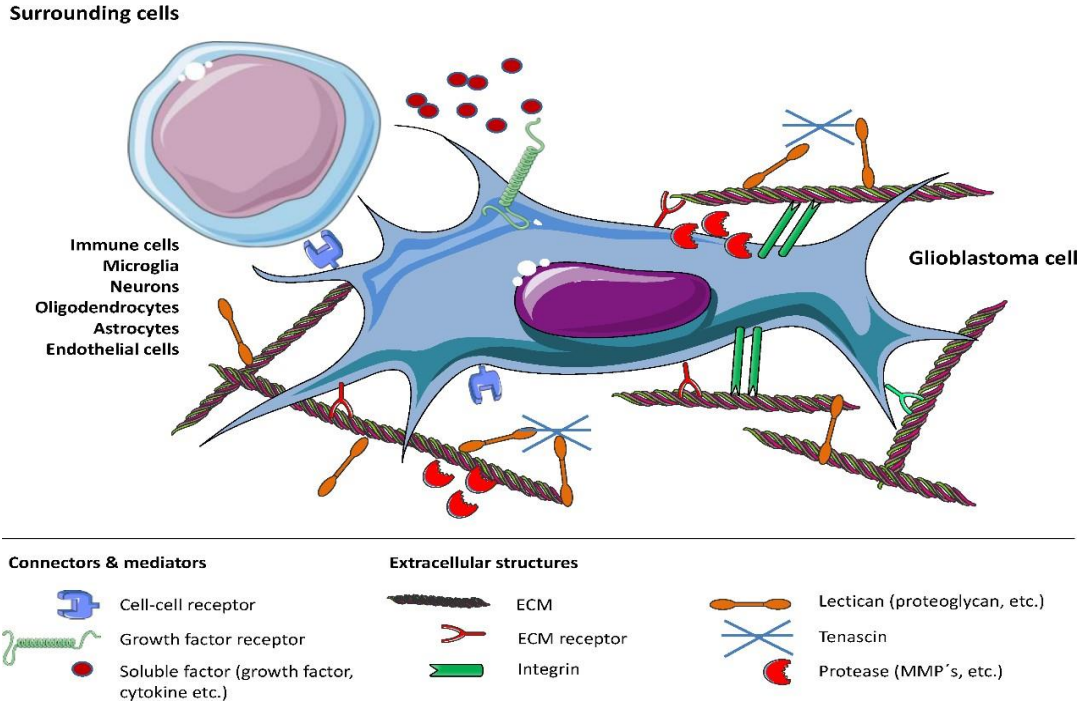
Glioblastoma Multiforme (GBM) is the primary Central Nervous System tumor and is the most common, most aggressive and deadly of all brain tumors. Treatment strategies include surgery, radiotherapy, and chemotherapy. However, these treatment strategies are insufficient because GBM cells are prone to invasion. For this reason, new treatment strategies are being researched and especially targeted drug treatment methods are emphasized. This is exactly where nanotechnology is used. Nanoparticles produced with nanotechnology and especially C60 fullerene are used as both a targeted drug and a new technology in GBM treatment with their strong anticancer activity, strong antioxidant effect, antimicrobial effect, antiviral effect and radical scavenging properties. The aim of this study was to examine the effect of C60 fullerene on the invasion activity and expression of cytoskeletal proteins in glioblastoma U373 cells to clarify the mechanisms of the effect of nanoparticles on cancer cells. The result of the present study showed that C60 fullerene is particularly potent to affect the cytoskeleton, fibronectin production and motility of glioblastoma U373 cell. In addition, when the data observed in the results of the current study were evaluated as a whole, C60 fullerene affected the intermediate filaments and microtubules, which are the main cytoskeletal structures, in the opposite direction. However, the inhibitory effect of C60 fullerene on glioblastoma cell migration was found to be accompanied by GFAP upregulation and Tubulin downregulation. C60 fullerene nanoparticles regulate the reactivity of glioblastoma cells as well as the effect on cytoskeletal reorganization. Therefore, C60 fullerene may play a role in the suppression of glioblastoma motility as well as in GBM invasion.

Keywords: U373 glioblastoma cell line, nanoparticle, C60 fullerene, GFAP, cell migration.

1. GİRİŞ

Birçok kanser türünde hayatta kalma oranları, erken teşhis ve tedavilere yönelik yapılan çalışmaların artması ile son yıllarda önemli ölçüde iyileşmiştir (Akhavan et al. 2019). Ancak beyin tümörleri, tüm kanser türleri arasında hala hayatta kalma oranı en düşük olan kanserler arasındadır (Aldape et al. 2019). Çünkü beyin tümörlerinin standart tedavilere dirençli doğası, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirmesinde büyük bir engel oluşturmaktadır (Akhavan et al. 2019).

Yetişkinlerde en sık görülen ve ölümcül olan birincil Merkezi Sinir Sistemi (MSS) tümörü olan Glioblastoma Multiforme (GBM), glial hücrelerden köken almaktadır (William et al. 2017; So et al. 2021). GBM tüm gliomalar arasında en sık tanı alan ve en agresif olanıdır (Tilak et al. 2021). Beyindeki tüm kötü huylu primer tümörlerinin neredeyse %80'ini oluşturur (Hanif et al. 2017). Glioma hastalarında yaygın olarak kullanılan tedavi stratejileri klinik tedaviler, cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapidir (Yi et al. 2013). Gliomların modern kemoterapisi, invazyon ve metastazlara karşı yeterince etkili olmadığından, hastaların sadece %10'u tedaviden 5 yıl sonra hayatta kalmaktadır (Fatehi et al. 2018; Ostrom et al. 2014). Cerrahi tedaviden sonra ise ortalama 18 aylık sağ kalım süresine sahiptirler. GBM, istilaya son derece eğilimlidir ve bu nedenle her yıl dünya çapında binlerce hastanın ölümüne neden olur (Aulakh et al. 2019; Fatehi et al. 2018). GBM hastalarının çoğu aynı tedavileri alır ve şu anda GBM hastaları için çok az sayıda hedefe yönelik tedavi mevcuttur (Taylor et al. 2019). Bu nedenle GBM'de oluşan moleküler genetik değişiklikler ile mevcut uygulamalar arasında bağlantı sağlanarak alternatif tedavi yolları geliştirmek için araştırmalar ve çalışmalar sürdürülmektedir (Sunguroğlu ve Taşpınar 2010).



Şekil 1. Glioma Hücre Mikroçevresi (Vollmann-Zwerenz et al. 2020)

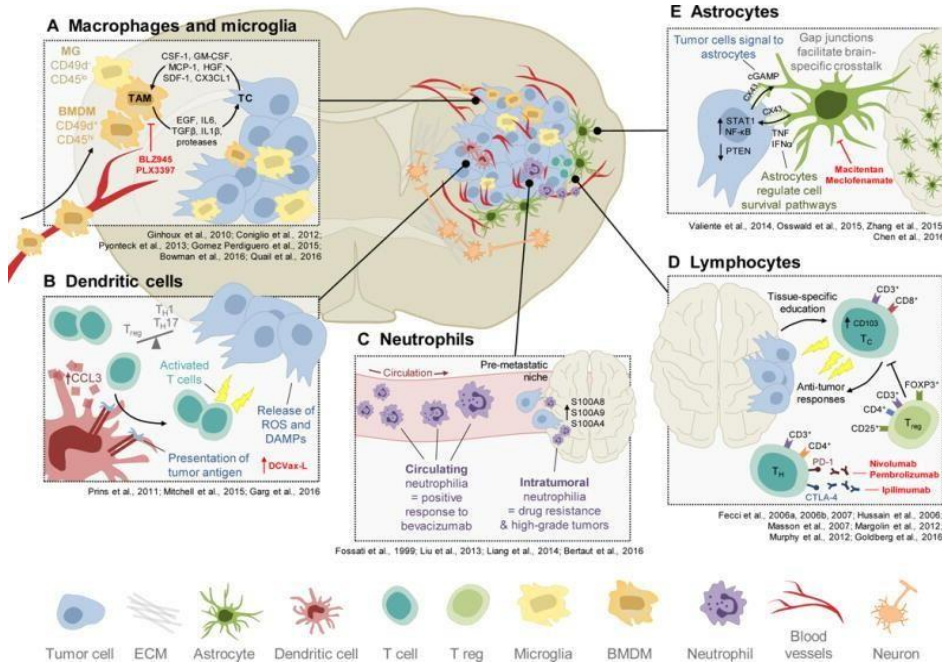
1.1. GBM ve Tümör Mikroçevresi

Tümör Mikro Çevresi (TME), kanser hücrelerinin yanı sıra normal olan birçok hücre tipini de içerir. Bunlar; endotelyal hücreler, perisitler, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, mikroglia, astrositler ve nöronlar olarak sıralanabilir. Bu hücrelerden bazıları beyin kanserli olmayan kısmını diğer dokulardan ayıran özellikleri taşımasıyla birlikte aynı zamanda beyin tümörlerinde de yaygın olarak bulunmaktadır. Beyin hücre dışı matrisi (ECM), beyinde bulunan diğer TME'lerden birçok yönüyle önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Kollajenler, laminler ve fibronektin de dahil olmak üzere MSS'de bulunmayan diğer dokularda stroma boyunca bol miktarda hücre dışı matris proteinleri bulunur. Bu hücre dışı matris proteinleri sadece beyindeki vasküler bazal membranlar ile birlikte bulunmaktadır (Quail and Joyce 2017). Glioma hücrelerinin göç edebilmelerinin yanı sıra istila için bu hücre dışı matris proteinlerini parçalayarak fiziksel bariyer olan ECM'yi geçebilmelidir (Paw et al. 2015).

Beyindeki normal hücreler tarafından üretilen biyomoleküller; sitokinler, kemokinler, hormonlar ve nitrik oksit (NO) olarak sayılabilir. MSS'de bulunan TME'ler ile GBM

arasındaki yakın etkileşim tümör gelişimi için esastır. Bundan dolayı TME’de bulunan hücrelerin GBM ve beyin dokusunda ona komşu olan diğer tüm yapıları düzenlediği düşünülmektedir (Zhang et al., 2020).

ECM, GBM’nin mikro çevresinin hücresel olmayan bileşenini oluşturur ve MSS’nin biyokimyasal sinyal kaynağı olarak fizyolojisine katkıda bulunur. ECM aynı zamanda beyin hacminin yaklaşık olarak %20’sini oluşturmaktadır. Tümör hücrelerinin gelişimi sırasında ECM ile GBM hücreleri arasındaki etkileşimler, tümör hücrelerinin istilasını ve göçünü düzenler (Zhang et al. 2020). Ayrıca ECM proteinlerinin bölünmesi de tümör hücrelerinin göçünü kolaylaştırabildiği gibi hücre içi sinyallemeyi düzenleyebilir (Yamada et al. 2010).



Şekil 2. Beyin tümörü mikroçevresinin hücresel bileşenleri (Quail and Joyce 2017)

1.2. GBM’de Hücre İstilas ve Biyolojik Mekanizmalar

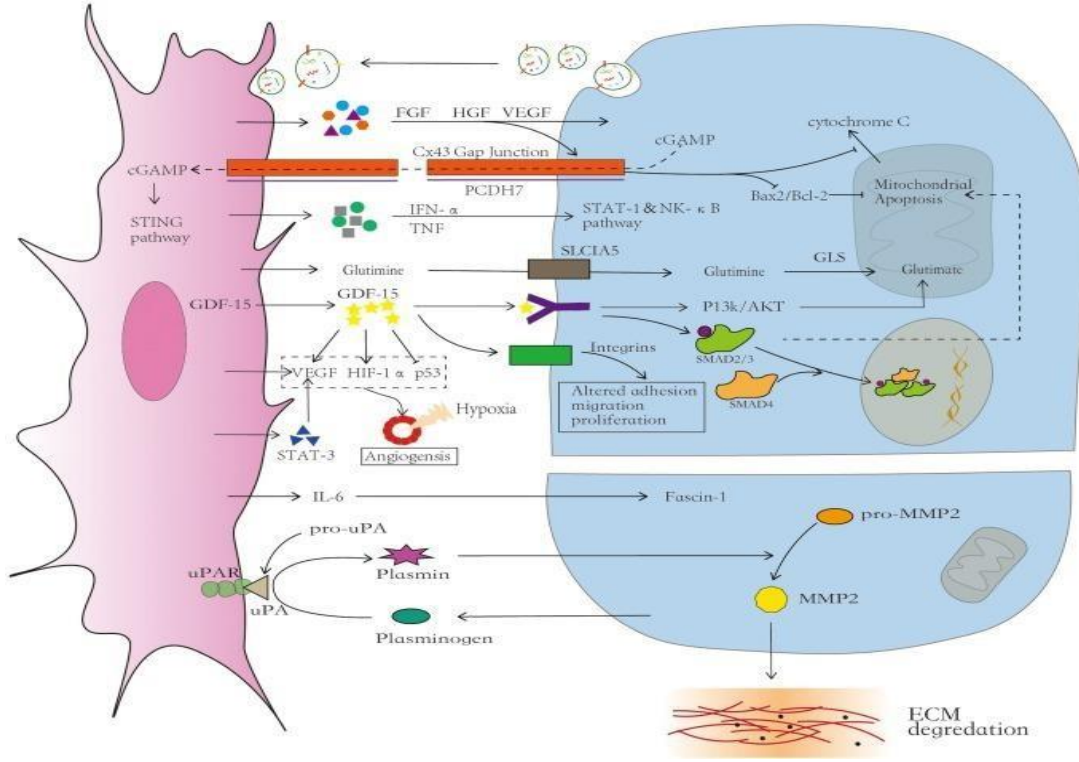
Çeşitli kanser türlerinde olduğu gibi GBM dokusuna ait tümör hücrelerinde de yaşam fonksiyonlarına ait sinyallerinin aktivasyonundaki değişiklik, anjiyogenez, kontrolsüz çoğalma, doku invazyonu yapabilme ve apoptoza direnç gelişimi görülmektedir (Sunguroğlu ve Taşpınar 2010).

GBM hücreleri beyine göç ettiğinde, astrositler, nöronlar, endotel hücreleri ve ECM dâhil olmak üzere çeşitli hücrelerle etkileşime girerler. Ayrıca beyindeki dar alanlara sızmak için hücre gövdelerini küçültebilirler; böylece beyin bölgelerini istila edebilir ve ameliyattan kaçabilirler. Beyin tümörü hücreleri, ECM'yi değiştirerek ya da bozarak göç ve istila için uygun bir mikro ortam yaratır (So et al. 2021).

Glioma hücrelerinin büyümesi, göçü ve farklılaşması sırasında tümör hücreleri ECM ile yakın bir etkileşime girer. Hücreler ve çevreleri arasında bulunan etkileşimler dokuların sağlıklı yapısını koruyan önemli bir faktördür. Beyinde serebral endotel hücrelerin vasküler oluşturmak amacıyla MSS'yi istila etmesi dışında ECM bulunmamaktadır. Büyüme kontrolünün kaybı, onkogenезin karakteristik bir özelliği olduğu gibi ECM kontrolünün kaybı da invazyon ve metastaza doğru malign hücre progresyonunda karakteristik bir özelliktir. Hücre yapışması, ECM'nin proteolitik bozulması ve hücre göçü sırasında ortaya çıkan tüm değişiklikler birçok dokuya tümör hücresi istilası sırasında iletilmiştir. Beyin tümörü hücreleri, MSS dışında ortaya çıkan tümörlerin bazı istilacı özelliklerini paylaşabilse de, beyin ECM'sinin özel yapısı ve bileşimi bu tümörler için benzersiz istilacı mekanizmaların varlığını düşündürür. Ayrıca, beyin tümörü hücreleri ve onların ECM'si arasındaki etkileşim, oldukça invaziv davranışlara sahip olmasına rağmen bu hücrelerin metastaz yapabilme özelliğinin zayıf kaldığına dair gözlemleri açıklayabilir (Tysnes and Mahesparan 2001).

GBM hücreleri, sitokin üretmek için normal glial hücrelerden yararlanır ve böylece glioma istilasını uyarır (Le et al. 2003; Proia et al. 2008; Shabtay-Orbach et al. 2015). Sonuç olarak, GBM malignitesi, beyindeki tümör ve normal glial hücreler arasındaki etkileşim ile ortaya çıkar (Oliveira et al. 2017; Priego et al. 2018). Dahası, GBM hücreleri, temel sinyal yollarının bozulmasıyla başlatılan son derece yüksek bir metabolik hıza sahiptir (Nakada et al. 2007). Glioma progresyonunu ve invazyonunu inhibe etmek için anti-tümör aktivitelerinden biri, malign hücrelerde programlanmış hücre ölümünün başlamasıdır (Mellai and Schiffer 2007). Bu durum son on yılda en çok çalışılan nokta olmaya devam etse de, GBM de dahil olmak üzere birçok tümör apoptoz başlangıcına karşı yüksek bir direnç sahiptir (Jahan et al. 2017). GBM ve glia arasındaki etkileşim düşünüldüğünde GBM ilerlemesinin etkili inhibisyonu, GBM ile glial mikro ortam arasındaki sinyalleşme faktörlerinin ve her ikisinin de hücrel reaktivitesinin bastırılması

olabilir. GBM ortamında astrosit reaktivitesini sınırlandırarak, anjiyogenezin inhibisyonu (Yang et al. 2018). ECM bölünmesinin baskılanması ve tümör ilerlemesinin önlenmesi ile glioma invazyonu ve ilerlemesinin diğer baskılayıcı yolu gerçekleştirilebilir (Le et al. 2003; Agarwal et al. 2018; Mahabir et al. 2014).



Şekil 3. GBM'nin çoğalması ve istilası mekanizması (Xie et al. 2014)

1.3. GBM'de WNT Sinyal Yolağı

Kanserle birlikte birçok hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında sinyal yolları önemli rol oynamaktadır. Bu yollardan biri olan Wnt sinyal yolağı 1982'de fare meme kanserinde keşfedilmesi sonucunda hücre göçü ve çoğalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Nusse and Varmus 1982). Wnt sinyal yolağı kanser hücresinin gelişim göstermesi için önemli sayılabilecek kritik bir düzenleyici özelliğini sağlamaktadır (Lee et al. 2016). Wnt sinyal yolağının anormal aktivasyonu, birçok kanser türünde kanserin ilerlemesini destekler niteliktedir. Aynı zamanda bu sinyal yolağının multifonksiyonel bir yolak olması, hastalığın seyrinde ve anormalliklerin saptanmasında hedef olarak kullanılmasını zora sokmaktadır. Çünkü bu sinyal yolağı sağlıklı insanların fizyolojik

reaksiyonlarında da yer aldığından hedef yolak olarak belirlenmesi tedavi stratejilerini kısıtlamaktadır (Paw et al. 2015).

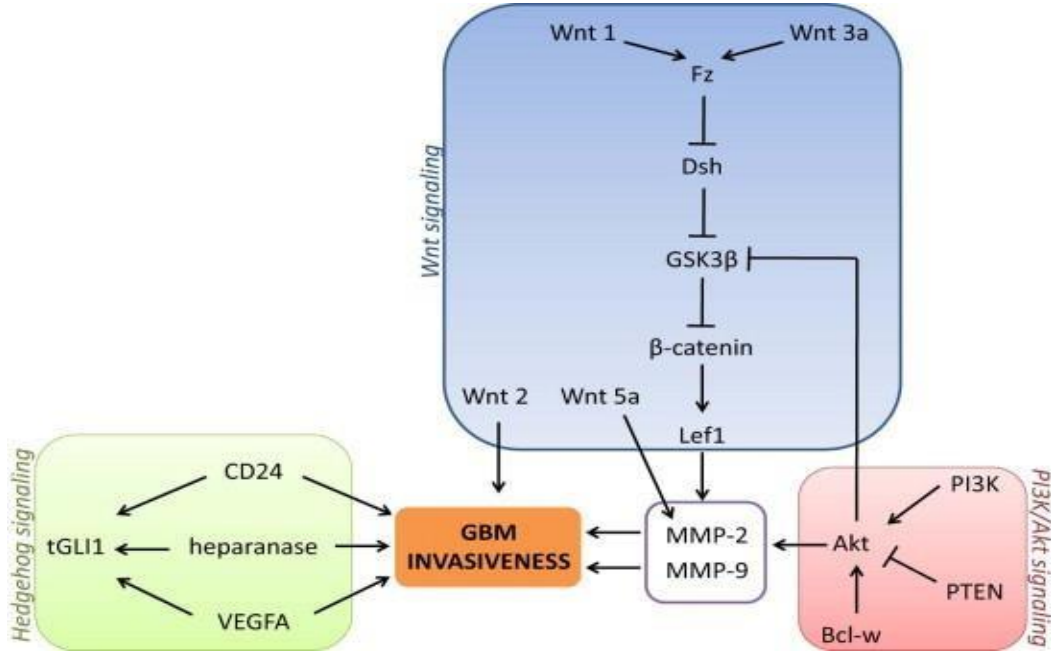
Tümör hücrelerinin metastazı, tümör kaynaklı ölümlerin gelişim göstermesinde etkili bir faktördür. Epitelyal- mezenkimal geçiş (EMT), epitel kaynaklı kanserlerin organlara metastaz yapmasını sağlayan önemli bir süreçtir. Wnt sinyal yolağı ise tümör istilas ve EMT ile güçlü bir etkileşimi olduğu bildirilmiştir. Wnt sinyal yolağının pozitif düzenleyicilerinin ekspresyon seviyelerindeki artış ZEB1, SNAIL, TWIST, SLUG ve N-cadherin gibi genler üzerindeki ekspresyon seviyelerini arttırması Wnt'nin EMT deki rolünü göstermektedir (Lee et al. 2016). Wnt sinyal yolağının önemli bileşenlerinden olan WNT5A, GBM'de hücre göçünü engellemektedir. Gliomalarda ise WNT5A baskılanması, proliferasyon düzeyine etki etmeden hücre göçünü engellemektedir. Ayrıca başka bir çalışmada ise WNT5A proteinin ekspresyonunun sonucunda MMP2 aktivasyonunda artma gözlemlendiği bu durumda GBM hücrelerini uyardığı bildirilmiştir (Kamino et al. 2011).

1.4. GBM'de EGFR Sinyal Yolağı

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), kanser hastalığında sıklıkla araştırma yapılan sinyal yolağıdır. EGFR, dört tirozin kinaz ailesine sahiptir. Bunlar; ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (Her-2, Neu), ErbB3 (Her-3) ve ErbB4'ü (Her-4) şeklinde olup GBM de mutasyona uğrayan tek grup EGFR değildir. GBM vakalarının %8-41'inde ErbB2/HER-2 mutasyonu olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır (Chin 2013; Brennan et al. 2013; Zang et al. 2015). Kanserde EGFR iki farklı sebepten dolayı sıklıkla çalışılmaktadır. İlk olarak, anormal EGFR sinyalinin kanserde önemli rol model olması ve bundan dolayı kanser sinyallerinin etkileşiminde önemli bir geçiş noktası olmasıdır. İkinci durum ise terapotik olarak tedavide dikkat çekici olmasından ve olumlu sonuç verileceği düşüncesinden dolayı üzerinde durulmaktadır (Hatanpaa et al. 2010). GBM ile ilişkili sıklıkla görülen genetik değişiklik EGFR' ün ekspresyon seviyelerindeki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir (Ekstrand et al. 1991). Gbm'de EGFR hücrel proliferasyonu arttırdığı gibi tedaviye direnç noktasında önemli bir sinyal mekanizmasını oluşturmaktadır (Huang et al. 2009).

1.5. GBM'de PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı

Fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K), hücresele düzeyde sağı kalım, çoğalma ve metabolizma gibi fonksiyonel özellikleri yerine getirmede ve bu süreçlerin düzenlenmesinden sorumlu bir lipit kinazdır (Li et al. 2016). PI3K/AKT/mTOR ekspresyon seviyelerindeki artış ve buna bağılı olarak moleküler değışimler tümör oluşumu ile ilişkilendirilmektedir (Li et al. 2016; Radoul et al. 2016; Zhao et al. 2017). PI3K'nın serin- treonin AKT, mTOR ve bununla birlikte hücre bölünmesi gibi alt hedefleri mevcuttur (Nitulescu et al. 2018; Saxton and Sabatini 2017). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağıının önemli bir proteini olan PI3K, hücresele sevide bir uyarı almadığı sürece sitoplazmada inaktif pozisyonudadır (Fruman et al. 2017). Sinyalizasyonun başlaması için HER gibi reseptör-tirozin kinazlar (RTK) ve G protein reseptörleri tarafından, PI3K aktivasyonu ile başlamaktadır (Zhao et al. 2017). RTK' ların uyarılması ile fosfotirozinin AKT'nin alt sınıf üyesi olan p85 te değışikliğe sebebiyet vermesinden dolayı PI3K serbest kalarak membrana tutunur ve PI3K'nın fosforilasyona uğramış türevi olan phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate (PIP2) uyarılmasıyla PIP2 üzerinden fosforilasyon yoluyla fosfatidilinositol 3,4,5- trisfosfat (PIP3) oluşumunu katalize eder. Bu reaksiyonun değıştirilmesi için PI3K'nın zıttı bir gen olan fosfataz ve tensin homologu (PTEN) ile değıştirilebilir (Li et al. 2016). PIP2'nin PIP3' e sinyal geğışi sayesinde bir protein kinaz B grubu olarak bilinen serin/treonin kinaz AKT aktif hal geğer. AKT aktive olmasıyla, hücresele fonksiyonların devamlılığı ve akışın bozulmaması için glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), forkhead box 0 (FOXO) transkripsiyon faktörleri ve BAD gibi sinyal etkileşiminden sorumlu olan proteinleri fosforile etmektedir. Ayrıca AKT, mTOR'u da tümör skleroz kompleksi (TSC) tarafından fosforile eder. mTOR, hüresel olarak büyüme ve metabolimik süreçlerin temel düzenleyicisi olarak önemli görevi bulunmaktadır (Zhao et al. 2017). mTOR aktive olmasıyla birlikte mTORC1 ve mTORC2 da aktif hale geğer. mTORC1, kanserle ilişkili bir gen olmakla birlikte aynı zamanda hücre çoğalmasıyla ilişkisi de bulunmaktadır. Bunun dışında otofaji mekanizmasındaki düzenleyici görevide bulunmaktadır (Paquette et al. 2018). mTORC2 de hayatta kalmadan sorumlu olup metabolizmaya da yardımcı olmaktadır (Huang et al. 2013).



Şekil 4. GBM istilasına dahil olduğu bildirilen üç ana sinyal yolu (PI3K-AKT ve WNT) (Paw et al. 2015)

1.6. Glioma Hücrelerinde Epitel-Mezenkimal Geçiş

Epitelyal-mezenkimal transformasyon (EMT) ilk olarak 1890'larda meme kanserinde gözlenmiş olup kanserli hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve gelişim göstermesi gibi süreçlerde biyolojik bağlantısı olduğundan tümör metastazında önemli bir rolü bulunmaktadır (Lu et al. 2020; Du et al. 2017). EMT, yara iyileşmesi, dokuların yeniden şekillenmesi ve embriyonik gelişim gibi özelliklere canlılarda bir kayıp olmaksızın şekillenmesi için vazgeçilmezdir. EMT süreci, tümör hücrelerinin bazal membrandan ayrılmasını içermesinden dolayı GBM'de üzerinde durulan önemli bir stratejidir (Iwadata 2016). Bu gibi önemli özelliklerinden dolayı EMT, kanser tanı ve tedavisinde potansiyel bir hedef olarak kabul edilmekte ve GBM'de EMT'nin tümör oluşumu ve metastazındaki kritik işlevi yoğun olarak araştırılmaktadır (Du et al. 2017). Tedavi stratejilerinde Hormonal ve kemoterapide önemli aşama kaydedilmiş olsada GBM, alternatif tedavi stratejilerine açık olup nanoparçacık türevi olan C60 fulleren ile önemli bir gelişim göstermesi beklenmektedir (Scherbakov et al. 2016; Semina et al.2018).

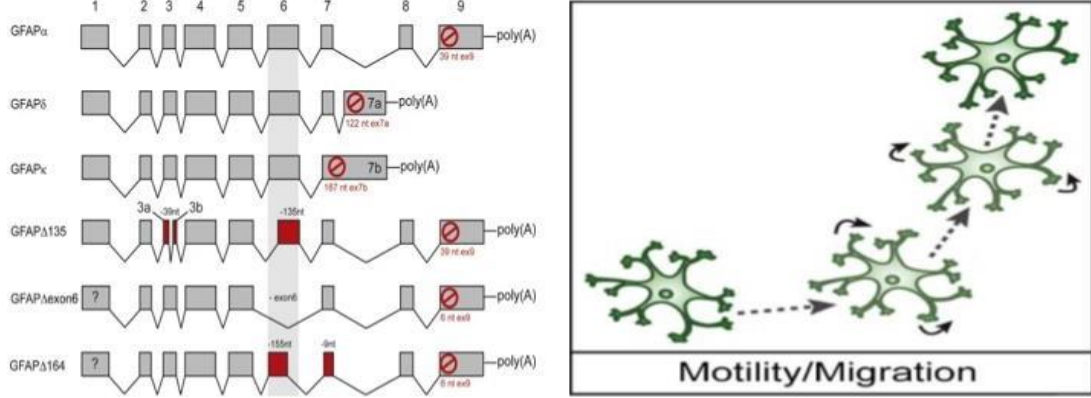
1.7. Hücre İskeletinin Glial Hücrelerdeki Rolü

Hücre iskeleti, her ökaryotik hücrenin önemli bir bileşenidir. Dinamik bir şekilde etkileşime giren ipliksi dizilerden oluşan bir ağda organize edilen protein polimerleri ve ilişkili faktörlerin bir koleksiyonundan oluşur (MacTaggart and Kashina 2021). Hücre iskeleti, bir yandan katı olan ve diğer yandan hücre şeklindeki bir değişikliği ve bazı durumlarda hücre hareketini kolaylaştırmak için yeterince plastik olmasına izin veren bir dizi ipucuna yanıt veren bir yapı sağlar. Hücre iskeleti elemanları ayrıca hücre içi taşıma ve hareketlilik için gerekli olan hem kuvveti hem de yönlenmeyi sağlayan motor proteinlerle etkileşime girer (Tuszynski et al., 2003). Bu nedenle, ara filamentler, mikro tüpler ve mikrofilamentler ile oluşturulan hücre iskeleti orkestrasının dinamik değişiklikleri, normal hücrelerde homeostazı desteklemek ve hayati fonksiyonları sağlamak için kritik öneme sahiptir. Ayrıca hücre iskeleti proteinleri beyin hücrelerinde hem malignite hem de çeşitli patojenik süreçlerde rol oynayabilir.

1.7.1. Glial Fibriller Asidik Proteini (GFAP)

Ara Filament ağı (AF), astrosit hücrelerinin hüceresel düzeyde bir bütünlük göstermesi ve esneklik kazanmasını sağlamaktadır (Middeldorp and Hol 2011). Glial fibriller asidik proteini (GFAP), astrosit hücrelerinden meydana gelen önemli bir ara filament ağıdır (Brenner 2014). GFAP, MSS' de bulunup yaklaşık olarak 12 nm boyutunda olan AF-III tip proteinidir. Yapısal olarak periferin, vimentin ve desmin gibi epitelyal olmayan AF üyeleriyle benzerlik göstermektedir (Yang and Wang 2015). GFAP, ilk olarak Multipl sklerozlu (MS) hastaların MS plakasından saflaştırılarak keşfedilmiştir (Eng et al. 1971). Ayrıca ilk olarak GFAP geni 1989 yılında klonlanmıştır (Middeldorp and Hol 2011). GFAP geni, insan kromozomu 17q21 ile eşlenen tek bir gen tarafından kodlanan ve yaklaşık olarak 10 izoformuna sahiptir. Beyin ve omurilik kısmında baskın olan izoform GFAP-a'dır (Reeves et al. 1989). Tüm tip AF-III' ler hücre iskeletinde destek ve hareket kısmında görev almaktadır (Middeldorp and Hol 2011). GFAP, astrositlerde rejenerasyon, reaktif gliosis ve sinaptik pilastisite gibi önemli fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumludur (Kunchok et al. 2019). Ayrıca Kan Beyin Bariyeri (KBB) ve komşu nöronlar arası etkileşimlerde de önemli görevleri bulunmaktadır (Yang and Wang 2015). Aynı zamanda da GFAP, hücre hareketliliği ve göçünde rol oynar. Ancak farklı

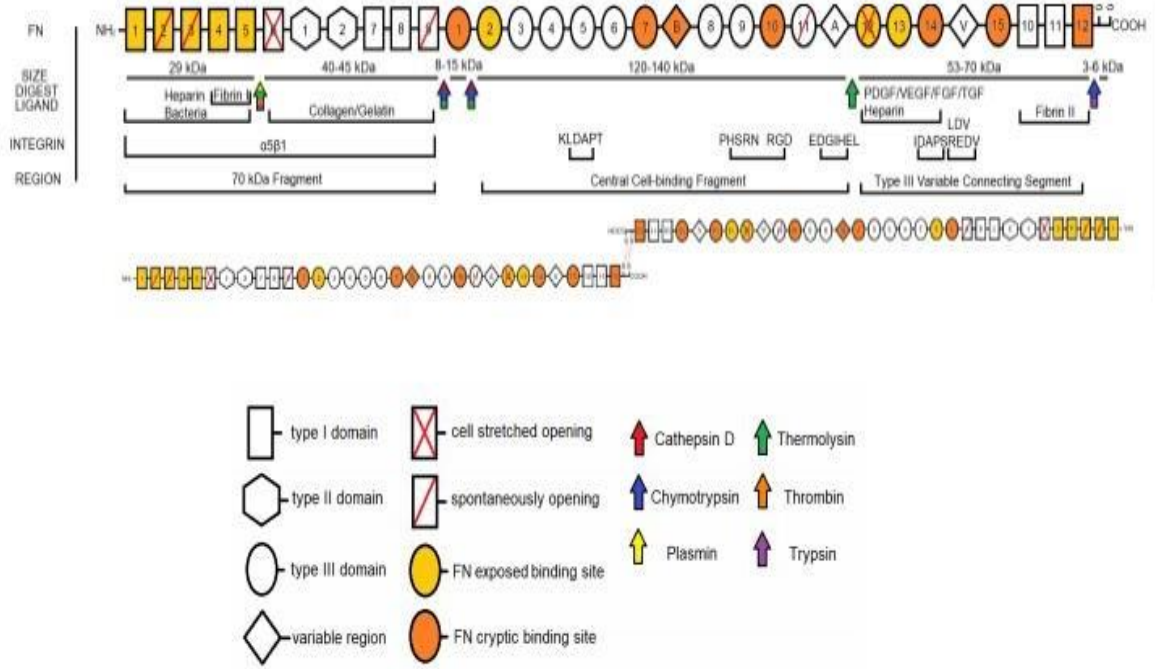
astrosit alt tiplerinde normal fizyolojik veya patolojik fonksiyonlara ne ölçüde katkıda bulunduğu henüz bilinmemektedir (Middeldorp and Hol 2011).



Şekil 5. İnsan GFAP ekleme varyantlarının transkriptleri ve GFAP'nin hücre göçündeki rolü (Middeldorp and Hol 2011)

1.7.2. Fibronektin (FN)

Fibronektin (FN), ECM' ye lokalize halde olan aynı zamanda ECM'nin bütünlüğünü ve moleküler yapısını koruma ile ilişkilendirilen bir çeşit köprü görevi üstlenen protein yapısıdır. Yalnız bununla kalmayıp doku organizasyonun düzenlenmesinden de sorumlu olduğu bilinmektedir (To and Midwood 2011). ECM, yapısal olarak proteoglikanlar, glikoproteinler ve kollejenler olmak üzere 3 ana bileşikten oluşmaktadır. ECM'nin glikoprotein sınıfına ait olan FN bağ doku onarımını sağlamaktadır. Ayrıca %5 oranında karbonhidrat içermektedir (Hynes 1990; Schwarzbauer et al. 1987). Kısaca FN hücre membranında bulunan integrin proteinine bağlanmasıyla hücre içi ve hücre dışı olaylarda meydana gelen değişikliklerin düzenleyicisidir (Pearson et al. 1988). ECM proteini olan fibronektin, hücrel metastaz, hücre farklılaşması, apoptoz ve tümör oluşumu gibi kanserle bağlantılı birçok patolojik olaylarda etkisi bulunmaktadır (Hynes and Zhao 2000; Pankov and Yamada 2002; Sottile and Hocking 2002). Bu nedenle, FN ekspresyonundaki değişiklikler, ECM ve hücrel yüzeyin tüm yapışkan proteinleri etkileşimi yoluyla hücre göçünü düzenleyebilir.



Şekil 6. FN'nin fonksiyonlar şeması (Dalton and Lemmon 2021)

1.8. Nanoteknoloji

Nanoparçacıklar, 1-100 nm boyuntunda olan partikül malzemeler olarak adlandırılır (Huang et al. 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile birlikte tıp ve nanoteknoloji alanındaki gelişmeler doğrultusunda fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak geliştirilen altın, gümüş, demir, bakır, kobalt gibi farklı elementlerden çok fazla nanomalzeme elde edilmiştir. Bu nanomalzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin yanı sıra nanoparçacık özelliklerini manipüle etme yetenekleri ile nanoparçacıkların tanı amaçlı ve ilaç dağıtımlarında görüntü kontrast madde olarak kullanılmasına olanak sağlar (Singh et al. 2018). Ayrıca nanoparçacıkların, hastalık patogenezinin sorumlu olan moleküler değişikliklerin tespitinde ve terapötik maddelerin in-vivo etkinliğini kontrol etme noktasında da yardımcı olur (Alexis et al. 2008).

Nanoparçacıklar, hastalıkların tedavilerinde kullanılan ilaçların toksisitesini azaltarak etkinliklerini artırma potansiyeline sahiptir. Aynı zamanda ilaçların stabilitesini ve çözünürlüklerini iyileştirebilme yetenekleri de vardır. Ayrıca nanoparçacıklar, günümüz araştırmaları kapsamında hedefe yönelik ilaç dağılımı ve kombine tedavilerin

geliştirilmesini de kolaylaştırmaktadır (Alexis et al. 2008). Özellikle kanser tedavilerindeki en büyük engel olan, tümör bölgelerine gönderilen ilaçların istenilen konsantrasyonda ulaşması ve kanserli hücreyi hedef alırken aynı zamanda normal hücrelere verilen zararın en aza indirilmesi hedeflenmektedir (Misra et al. 2010).



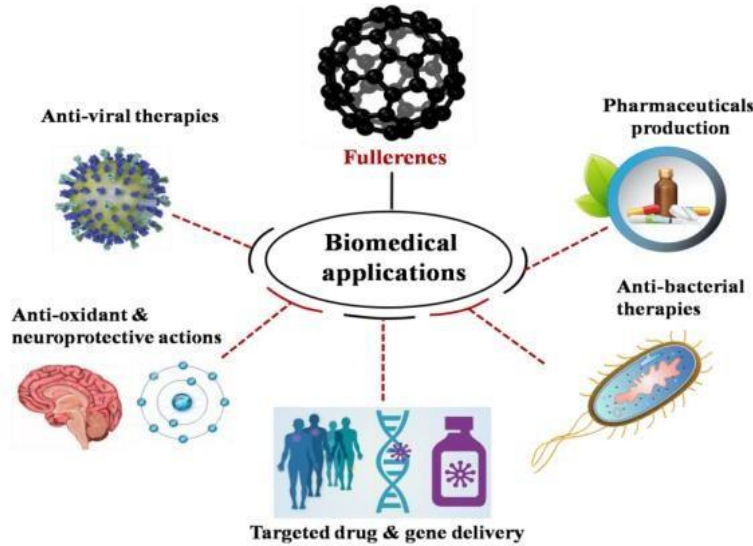
Şekil 7. Nanoteknolojinin kanser tespiti ve teşhisindeki aşamaları (Zhang et al. 2019)

GBM tedavisinin önündeki en büyük engel Kan Beyin Bariyeri (KBB)'dir. KBB'nin ilaç geçişini sınırlandırması GBM tedavisini zorlaştırmaktadır. GBM tedavisinde kullanılan ilaçların neredeyse %98'inden fazlası KBB'den geçememektedir. Bu nedenle GBM'yi tedavi etmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Ancak yapılan tüm çalışmalar hastaların yaşam kalitelerini ve prognostiklerini değiştirmede yetersiz kalmıştır. Bu noktada Nanopartiküller KBB'de ilaçların geçişini kolaylaştırmak için umut verici olmuşlardır. Nanopartiküllerin tümöre özgü hedefleme yetenekleri, biyo-uyumluluk özellikleri, küçük boyutlu, hızlı, basit ve aynı zamanda maliyeti düşük üretimleri ve kolay kapsülleme yetenekleri GBM tedavisinde oldukça etkilidir. Ayrıca nanopartiküllerin hedefe yönelik ilaç dağıtımı ve terapötik ajanları tutma yetenekleri ile ilaç taşıyıcıları olarak ilaçların kademeli bir şekilde salınımlarına olanak sağlar. Böylece GBM tedavisinde kolaylık sağlanabilir (Pourgholi et al. 2016).

1.8.1. C60 Fulleren

C60 Fulleren, küresel yüzeyi 12 beşgen ve 20 altıgen yapı içeren, yüzeyi ise 60 karbon atomundan oluşan küresel bir moleküldür. Altıgen-altıgen arasındaki bağlar çift, beşgen-altıgen arasındaki bağlar tektir. Böylece beşgen ve altıgenler konjuge bir π -elektron sistemi ile bağlanmış olur. C60'ın çapı 0,72 nm'dir. Bu değer, steroid molekülleri ile

polipeptitlerin α -sarmalının çapına yakın bir değerdir. Saf C60, hidrofobik bir moleküldür ve biyolojik zarlara gömülerek hücrelere nüfuz edebilir. C60 aynı zamanda terapötik ajanlar ile işlevsel hale getirilebilir. Bu özelliklerinden dolayı hastalıkların tedavisinde ilaç taşıyıcısı olarak keşfedilmiştir. Ayrıca C60'ın yapısında bulunan çift bağların elektron eksikliği nedeniyle serbest radikaller içeren reaktifleri kolayca bağlama yeteneği de vardır. Böylece C60 biyolojik sistemlerde özellikle hidroksil ve süperoksit gibi serbest radikallerin temizleyicisi olarak görev alabilir. Bu da C60'ın anti-tümör, anti-inflamatuar ve hepatoprotektif özelliklerini ortaya çıkarır. Saf C60, suda çözünürdür ve sulu solüsyonlarda nano boyutlu kümeler oluşturur (Kuznietsova et al. 2019). Aynı zamanda C60'ın suda çözünür olması in-vivo ve in-vitro ortamlarda düşük konsantrasyonlarda toksik olmadığına işarettir (Kuznietsova et al. 2019; Prylutska et al. 2015). Ancak C60 fulleren suda tamamen çözünmez (Hsieh et al. 2017). Bu sorunu çözmek için C60'ın karbon atomlarından oluşan yüzeyinde kimyasal değişiklikler yapılmaktadır. Yapılan bu kimyasal değişimler nedeniyle C60'ın biyolojik etkilerinde azalmalar ortaya çıkar. Bu nedenle de saf C60 kullanmak daha etkili olacaktır (Prylutska et al. 2015).



Şekil 8. Fullerenin biyomedikal uygulamaları (Athira et al., 2020)

Suda çözünen C60 fulleren ve türevlerinin birçok önemli özelliği bulunmaktadır. Bunlar güçlü antikanser aktivite, güçlü antioksidan etki, antimikrobiyal etki, antiviral etki ve radikal süpürücü özellikleridir (Prylutska et al. 2015; Hsieh et al. 2017). Bu nedenle C60

fulleren ve türevleri çok fazla ilgi görmüştür (Hsieh et al. 2017). C60 fullerene ve türevlerinin antioksidan özellikleri hücre içi ROS'u azalttığı ve oksidatif hücre yaralanmaları önlediği gösterilmiştir (Xiao et al. 2010). Son zamanlarda geliştirilen C60 fullerene bileşiklerinden bazıları tanıda görüntüleme ve antikanser ilaç olarak potansiyel uygulama aracı olmuştur. Özellikle beyinde oluşan hastalıkların tedavisinde büyük sorun olan KBB'ye nüfuz edebilme yeteneği ile beyin tümörlerinde ve beyinde oluşan diğer hastalıklarda kullanılabilir olmuştur (Hsieh et al. 2017).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü ve Kültür Kaplarına Hücre Ekimi

GBM hücre hattı (U373), Ukrayna Biyokimya Enstitüsü O. Palladin'den Dr. Artem Tykhomyrov tarafından temin edildi. Daha önceden sıvı azot tankında -196 C'de muhafaza edilmiş olan hücrelerin çözündürülmesi sağlandı. 15 ml'lik falkon tüpe 5 ml RPMI koyularak hücrelerin çok hassas ve yavaş bir şekilde aktarımı gerçekleştirildi. Ortamın (Frezeen medium) uzaklaştırılması için 3000rpm'de 4 dk santrifüj işlemine tabi tutularak işlemin sonlanması ile beraber süpernatant kısım aspire edildi. Daha sonra 10-15 ml RPMI ile homojenizasyonu sağlanan hücreler 75 cm²'lik flaska aktararak ataç olması, yapılması planlanan deney çalışmasına göre ekim gerçekleştirmek ve tedavi uygulayabilmek için yeterli konfluense ulaşması amacıyla %5'lik CO2 inkübatöründe 1-2 gün inkübe edilmiştir. Yeterli konfluense ulaşmış kültüre edilmiş olan hücrelerden besi ortamı aspire edilerek 3 ml PBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. 3 ml tripsin EDTA eklemesinin ardından 4 dk %5'lik CO2 inkübatöründe inkübasyonu ile hücreler kültür kabından kaldırıldı. 5 ml RPMI ile flask yıkanarak (hücrelerin tek tarafta toplanması amacıyla eğimli bir şekilde tutularak yıkama yapıldı) hücreler falkon tüp içerisine alındı. 4 dk 3000 rpm'de santrifüj işleminin uygulanmasının ardından süpernatant kısım aspire edildi ve pellet kısmının 5 ml RPMI ile homojenizasyonu sağlandı. Çalışmaya göre ekim yapabilmek için öncesinde hücre sayısının hesaplanması amacıyla, 20 µl hücre solüsyonu + 20 µl tripan blue homojenize edildi ve thoma lamına lamel yerleştirilerek üzerinde bulunan iki sayım bölgesine lamelin kenarından hassasiyetle karışımdan aktarıldı. İnverted mikroskopta 10X'de en büyük kareye odaklandırılarak iki bölümünde sayımı gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa ekilecek toplam hücre sayısının hücre sayısı (iki bölümden alınan toplam hücre sayısının ortalaması) x 10000 x 2 x dilüsyon oranı (5 ml) formülüyle hesaplanmasının ardından kuyucuk başına deneyler (Canlılık testi, western blot, yara iyileştirme, immünohistokimya) için toplam volüm hesabı yapılacaktır.

2.2. Yara İyileşmesi Testi

C60 Fulleren'in glioblastoma U373 hücre göçü üzerindeki etkilerini araştırmak için yara iyileşmesi (wound-healing) deneyi yapıldı. Hücreler, 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir kuyuda 25×10^4 olacak şekilde ekimi gerçekleştirildi. Hücrelerin yüzeye yapışmasının ardından 200 μ l'lik pipet ucu yardımı ile düz bir hat oluşturacak biçimde hücreler kazındı. Kaldırılan hücrelerin yeniden yüzeye yapışmaması için her bir kuyucuk PBS ile iki kez yıkandı. C60 Fulleren ile tedavi edildi. Ardından hücrelerin hareketleri izlendi ve her bir kuyucuğun 0. ve 72. saatlerde ki görüntüleri kaydedildi.

2.3. Protein İzolasyonu

6 cm²'lik hücre kültür kaplarından kazıyıcı ile toplanmış hücreler santrifüj işlemine tabi tutularak süpernatant kısım aspire edildi. 1X'lik lizis bufferden 15 ml'lik falkon tüpe 5 ml aktarıldı. Buffer içerisine 5 μ l PMSF, DTT ve Deamino benamidine proteinaz inhibitörleri eklendi ve homojenizasyonu sağlandı. Her bir örnek üzerine hücre sayısı ile doğru orantılı olacak şekilde 250 μ l lizis buffer eklenerek karıştırıldı ve buz üzerinde 60 dk'lık inkübasyonun ardından santrifüj işlemine tabi tutuldu. Hassas bir şekilde pelet kısma dokunmadan süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. 1 (Dye reagent concantrate) /4 (dH₂O) oranında Bradford yöntemi için boya hazırlanarak yeni ependorflara her bir örnekten 5 μ l + 1ml boya, blank için 1ml boya + 5 μ l lizis buffer eklendi ve spektrofotometre cihazında 595 nm'de absorbans değerlerinin ölçümü yapıldı. Ölçüm sonrasında en düşük abs sahip örnek için konsantrasyon 30 olarak belirlenerek buna bağlı diğer örneklerin oran orantıdan konsantrasyon hesaplamaları yapıldı. Kalan örneklerden her bir ependorfa 50 μ l + 50 μ l sample buffer eklenerek Dry Blok cihazında 5 dk 95 °C'de ısıya maruz bırakılarak üç boyutlu yapısı degrade edildi. Hazırlanan ve kalan protein örnekleri -20 °C'de muhafaza edildi.

2.4. SDS- PAGE ve Western Blot

Bradford yöntemi ile absorbansları ölçülerek konsantrasyon hesaplamaları yapılan örnekler belirlenen miktarlarda her bir kuyucuğa ayrı ayrı yüklenerek SDS-PAGE'de koşturuldu. Bunun için, %12'lik oranda hazırlanmış Seperating jel ve Stacking jel hazırlandı.

Jeller hazırlanırken polimerleşmeyi sağlayan temel etken madde olan TEMED eklemesi en son yapıldı. Kalın cam arkada ince cam önde olacak şekilde birleştirilerek kasete yerleştirilerek sıkıştırıldı. Hazırlanan jeller polimerleşmenin hemen gerçekleşmesi ihtimali ile iyice homojenizasyonu sağlandıktan sonra hızlı ve hassas bir şekilde iki cam arasına aktarıldı. Üzerine Stacking jel için bırakılmış olan boşluğa propanol koyularak jelin düzgün bir biçimde polimerleşmesi sağlandı. Kurutma kağıdı ile dikkatlice propanol uzaklaştırıldı. Jelde partikül kalması gibi bir durum göz önünde bulundurularak kurutma kağıdının jelle temas etmemesine dikkat edildi. Separating jelin polimerleşmesinin ardından 2 ml hazırlanmış olan stacking jel koyularak iki cam arasına tarak yerleştirildi. Polimerleşmenin gerçekleşmesi ile beraber camlar kasetten alınarak taraklar çıkartıldı ve kuyucuklar iç tarafa dönük şekilde ve karşısına da kalın bir cam ile beraber yürütme tankına yerleştirildi. İki cam arasına yeni hazırlanmış 1X'lik Fresh Running Buffer aktarıldı. Tankta belirlenen hizaya göre önceden kullanılmış Fresh Running Buffer koyuldu. Kuyucuklara sırasıyla sample buffer (5µl), marker (2,5µl) ve hesaplamalar doğrultusunda örnek yüklemeleri gerçekleştirildi. Örneklerin yüklenmesi ile kırmızı ve siyah bölmelere dikkat ederek tankın kapağı kapatıldı. Cihaz açıldıktan sonra 25 mA'de yaklaşık olarak 90 dk bant oluşumu gözlemlenene kadar koşturuldu. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin jelden PVDF membrana transferi için düzenek hazırlandı. Sandviç kasetinin siyah kısmının üzerine transfer buffer ile ıslatılarak sırasıyla sünger iki adet ince bir adet kalın kurutma kağıdı ve üzerine Stacking jel kısmı uzaklaştırılarak jel yerleştirildi. İlk olarak metanol daha sonra transfer buffer ile ıslatılan membranın pürüzsüz kısmı jelle dönük olacak şekilde hassasiyetle yerleştirildi. Rolon kullanılarak membranda oluşan hava boşlukları dikkatlice düzeltildi. Üzerine transfer buffer ile ıslatılan iki ince kurutma kağıdı ve sünger yerleştirilerek sandviç düzeneği kapatıldı. Tanka siyah ve kırmızı kısma dikkat edilerek sandviç yerleştirildi. Isı akımı çok olacağından ötürü tanka buz bırakıldı. Tankta belirtilen 4 gel yazan kısma kadar transfer buffer ile dolduruldu. 210 mA'de 120 dakikalık transfer için cihaz çalıştırıldı. Transfer işlemi sonlandıktan sonra TBS-T ile %5'lik BSA hazırlandı ve membran bu solüsyonun içerisinde 60 dk 25 °C'de bloklamak için inkübasyona bırakıldı. Daha sonra çalışılması planlanan proteinleri işaretlemek için öne primer daha sonra TBS-T ile 5x5' yıkamaların gerçekleştirilmesinin ardından sekonder antikolar ile membran muamele edildi. Primer antikor, bloklamanın hemen ardından gece boyu roler üzerinde döndürülerek sağlandı. Yıkamalar sonrasında sekonder antikora yatırıldı ve oda sıcaklığında (25 °C) 60dk

döndürüldü. Kemilüminesans görüntüleme yöntemi kullanılarak X-Ray cihazında filme aktarımı gerçekleştirildi ve protein ekspresyon seviyeleri gözlemlendi.

2.5. Hücre Canlılık Testi/Tripan Mavisi

Hücre canlılığını saptamak için toplamda 500 uL numune kullanıldı. Her numune 1-2 x 10⁵ hücre/mL hücre sayısına sahip 500 µL eppendorf tüpüne konuldu. Hücre süspansiyonuna 100 µL %0,4 tripan mavisi solüsyonu eklenerek ve 5 dakika beklenildi. Hücreler, bir Thoma lamına yerleştirildi. Tüm hücreler ve canlı (boyanmayan) hücreler sayıldı. Canlı hücrelerin yüzdesi şu şekilde hesaplanır:

$$\text{Canlı hücre oranı (\%)} = \frac{\text{Boya almamış hücrelerin sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

2.6. İmmünohistokimya

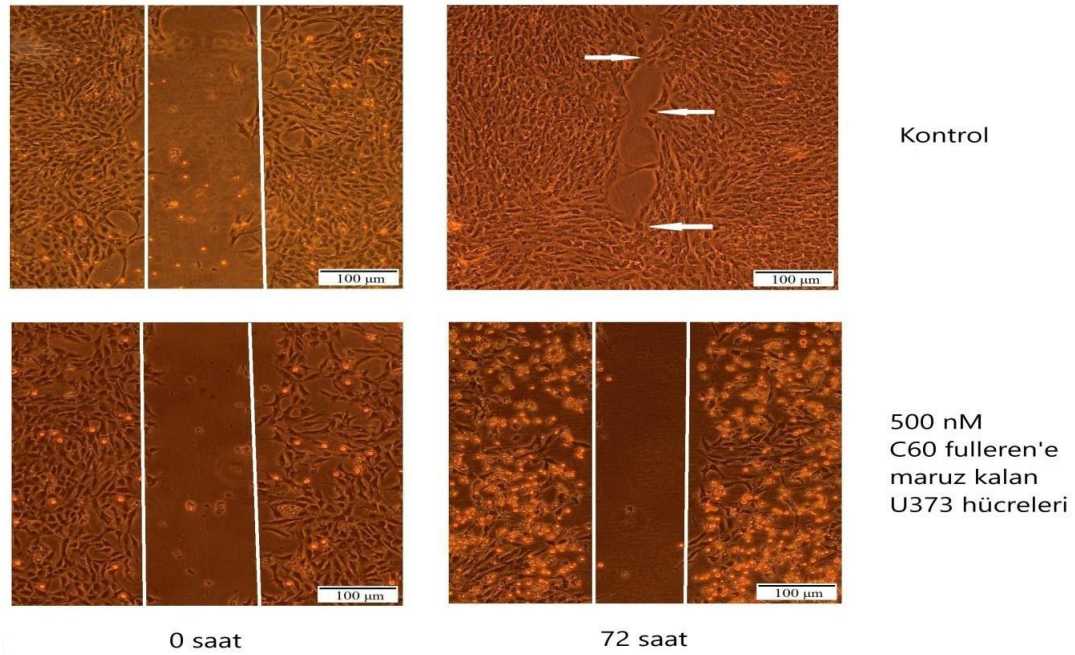
İmmünohistokimya deneyi için, 1. anti-GFAP antikor (Tavşan anti-İnsan Glial fibriller asidik proteini Poliklonal Antikor, MYBIO SOURCE, Katalog № MBS1489669) ve 2. anti-GFAP antikor (Rabbit anti-Rat Glial fibriller asidik protein Poliklonal Antikor, Institute Biochemistry Palladin, Ukrayna'da üretilmiştir.) Nedzvetsky V. ve Tykhomyrov A. yayınlarından alıntılanmıştır. İmmün boyanacak hücreler tripsinlendi ve santrifüjlendi. Thoma lamı üzerinde sayıldı. Well-plate olarak 6'lı veya 24'lü well-plate kullanıldı. Altı kuyucuklu well-plate'in her kuyucuğuna yaklaşık 70.000 hücre ekildi ve 24 kuyucuklu well-plate'in her kuyucuğuna homojen bir dağılımda 30.000 hücre ekildi. Homojen dağılım önemlidir ve well-plate'ler inkübatöre yerleştirilmeden önce ışık mikroskopunda gözlenir ve bir pipet yardımıyla topaklanma giderilir. Hücre aşılınmış well-plate'ler, 37°C'de %5 CO₂ içeren bir inkübatörde gece boyunca (16/24 saat) tutuldu. Bekleme sonunda plak tabanına yapışan hücrelerin üzerindeki besiyeri atıldı ve kuyucuklar 3 kez steril PBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonraki işlemler oda sıcaklığında temiz bir laboratuvar ortamında yapılabilir. Steril kabinde çalışma zorunluluğu yoktur. Yıkama işleminin sonunda soğuk metanol kullanılarak fiksasyon yapılmıştır. Her kuyucuğa 1 ml metanol ilave edilen well-plate oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Bekleme süresinin sonunda hücreler üzerindeki metanol atıldı ve hücreler transfer pipeti yardımıyla 2 kez PBS ile yıkandı. Son yıkamadan sonra, PBS atıldı ve hücreler, 37°C'de 5 dakika boyunca PBS içinde hazırlanan %0.1 Triton-X 100 ile geçirgenleştirildi. Bu süre

sonunda 37°C'den alınan hücreler üzerindeki Triton-X 100 transfer pipeti yardımıyla atıldı ve spesifik olmayan bloklama yapıldı. Bu bloklama işleminde 6 kuyucuklu well-plate'in her bir kuyucuğu için toplam 500 ul ve 24 kuyucuklu well-plate'in her bir kuyucuğu için toplam 250 ul hazırlandı. Antikor blok solüsyonu eklendikten sonra hücreler 1 saat 37°C'de veya oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu bekleme oda sıcaklığında gerçekleşirse levhanın üzeri ışık görmeyecek şekilde alüminyum folyo ile kaplanmalıdır. Bekletme süresinin sonuna doğru FITC etiketli sekonder antikor solüsyonu hazırlandı. Bu ikincil antikor çözeltisi seyreltildi ve kullanım protokolüne göre kullanıldı. Kullandığımız antikor 1/100 oranında seyreltilerek hazırlandı. Bu çözelti, 6 kuyucuklu well-plate'in her bir kuyucuğu için toplam 500 ul ve 24 kuyucuklu well-plate'in her bir kuyucuğu için toplam 250 ul olarak hazırlandı. İkincil solüsyon eklendikten sonra well-plate 1 saat 37°C'de veya oda sıcaklığında inkübe edildi. Bekleme süresinin sonunda kuyucuklardaki antikor karışımı uzaklaştırıldı ve pipetleme yapılmadan 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkama sonunda hazırlanan sekonder antikor solüsyonu hücrelerin üzerine ilave edilerek well-plate inkübatörde 45 dakika veya oda sıcaklığında alüminyum folyoya sarılarak bekletildi. Bekleme süresinin sonunda sekonder antikor alüminyum folyoya sarılarak maksimum 2 kez daha kullanılmak üzere yeni 1,5 ml'lik Eppendorf tüpe konuldu ve -20°C'ye getirildi. Kuyucuklar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra hücreler floresan mikroskop yardımıyla incelendi. Laboratuvarımızda inverted floresan mikroskobu olmaması nedeniyle well-plate kuyularına temiz lamel yerleştirildi ve bu lamellere hücre ekimi yapıldı. Boyama sonunda hücreler, mikroskop lamı üzerindeki lameller bir enjektör iğnesi ile ters çevrilerek incelendi. İnceleme işleminin sonunda lameller tekrar kuyucuklara yerleştirildi ve üzerini kapatacak şekilde PBS ilave edildi ve alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de saklandı. Bir ters floresan mikroskobu incelenecekse, well-plate doğrudan incelendi ve hücrelere PBS ilave edildi ve +4°C'de saklandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

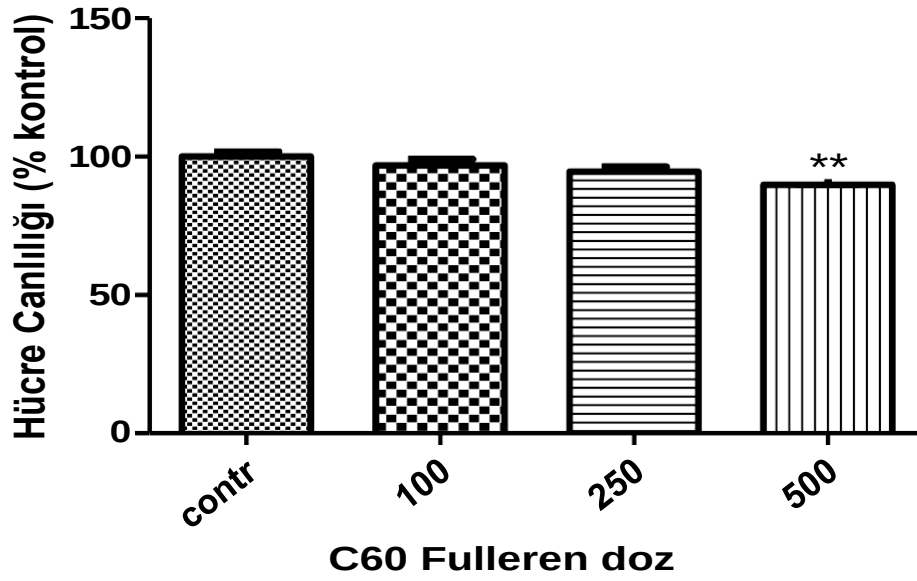
Mevcut çalışmada, düşük nanomolar dozlarda C60 fullerene maruz bırakılan glioblastoma U373 hücrelerinde migrasyon kabiliyeti, hücre canlılığı, yapışkan protein fibronektin ekspresyonu; mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentler dahil ana hücre iskeleti yapılarının protein içeriğindeki değişiklikler ölçüldü.

Yara iyileşmesi analizinin sonuçları, 72 saat boyunca 500 nM C60 fullerene maruz bırakılarak glioblastoma U373 hücrelerinin migrasyon yoğunluğunun baskılandığını göstermiştir (Şekil 9). Bu doz, hem GFAP hem de fibronektin ekspresyonunu uyarmak için en belirgin doz olarak seçildi.



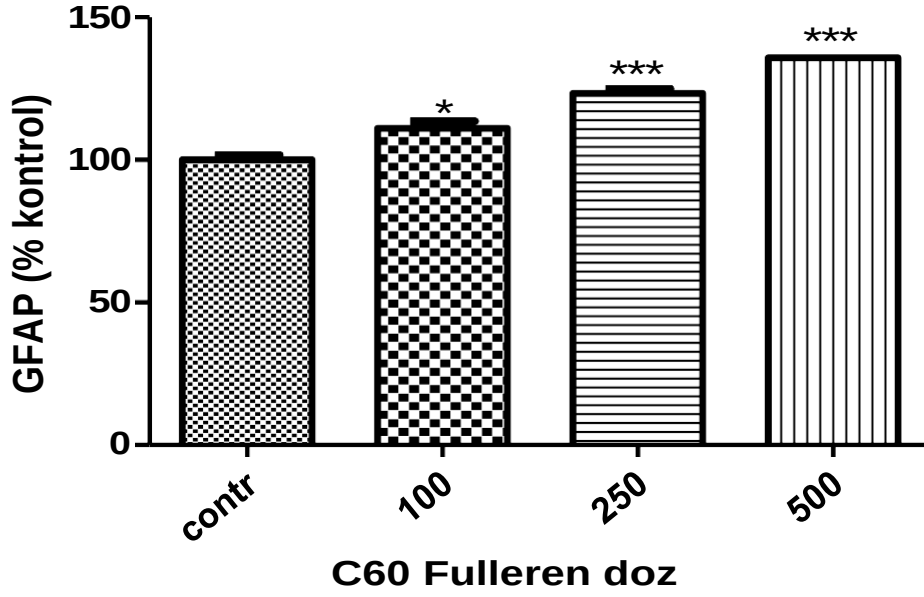
Şekil 9. Kontrol grubu ve C60 fulleren'e maruz bırakılan U373 hücrelerinin migrasyon testinin sonuçları

Tripan mavisi testi ile hücre canlılığının ölçülmesi, 100 – 500 nM C60 fulleren dozlarının glioblastoma U373 hücre canlılığını istatistiksel değişiklikler olmaksızın önemsiz derecede baskıladığını göstermiştir. Bununla birlikte, 500 nM C60 fulleren ile tedavi edilen bir grupta hücre canlılığının aşağı regülasyonu ile ilgili istatistiksel değişiklikler gözlemlendi (Şekil 10).



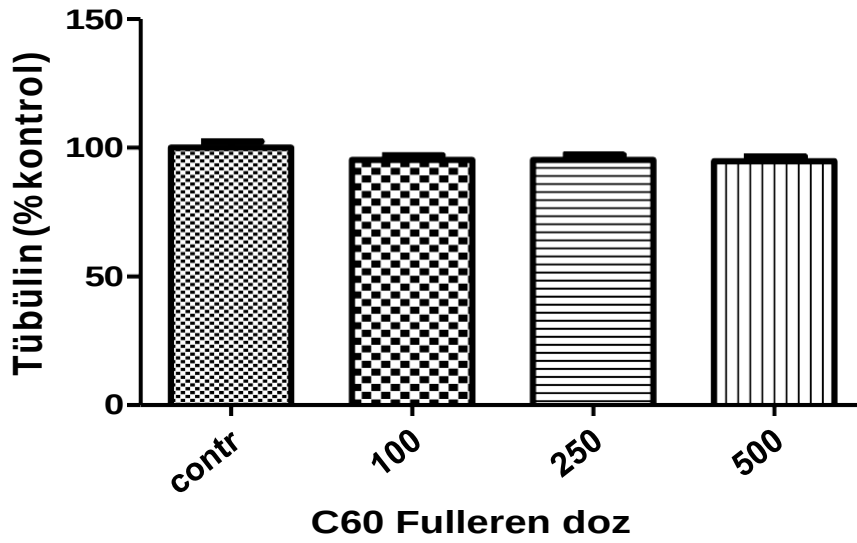
Şekil 10. C60 Fulleren'e maruz bırakılan Glioblastoma U373 hücrelerinde hücre canlılığı kontrolü

Elde edilen sonuçlar, düşük dozlarda C60 fulleren'in, spesifik glial ara filament proteini GFAP'nin ekspresyonunu uyarmak için güçlü olduğunu göstermiştir. Gerçekten de 250 ve 500 nM dozları, çalışmamızda GFAP içeriğinde artışa neden oldu (Şekil 11). Bu nedenle, C60 fulleren, astrosit türevli glioblastoma U373 hücrelerinde glial ara filamentleri etkiler.



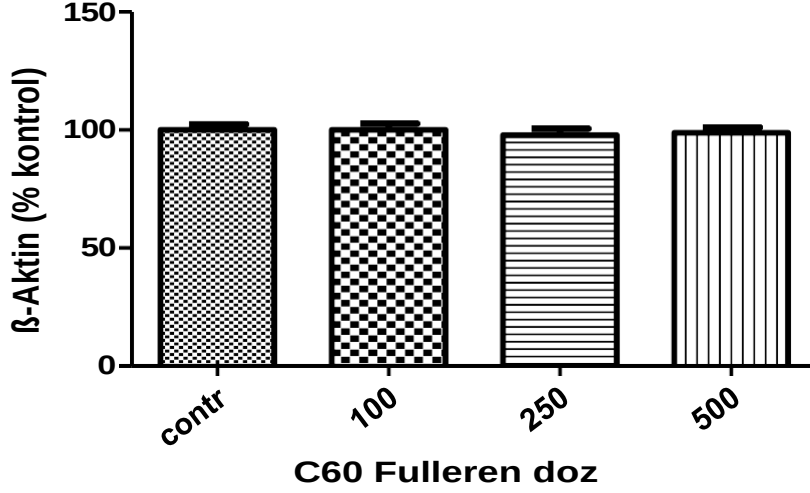
Şekil 11. C60 Fulleren'e maruz bırakılan Glioblastoma U373 hücrelerinde GFAP proteinini kontrolü

Öte yandan, glioblastoma U373 hücrelerinin C60 fulleren ile tedavisi, tübülün içeriğinde hafif bir düşüşe neden oldu (Şekil 12). Bu nedenle, C60 fulleren'in mikrotübüller üzerindeki etkisi, glial hücrelerin ara filamentlerine kıyasla farklıdır.



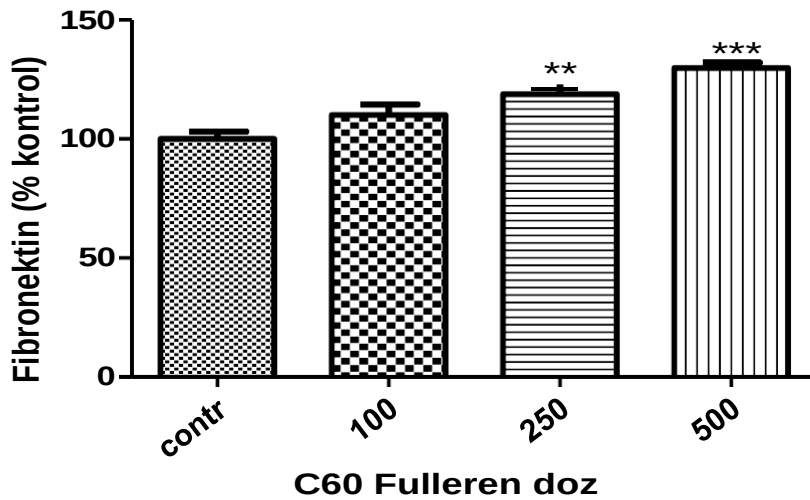
Şekil 12. C60 Fulleren'e maruz bırakılan Glioblastoma U373 hücrelerinde Tübülün proteinini kontrolü

β -Aktin içeriği ölçümünün sonuçları, bu hücre iskeleti proteininde hiçbir değişiklik göstermedi (Şekil 13). Bu nedenle, düşük dozlarda C60 fulleren, mikrofilament proteinleri üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir.



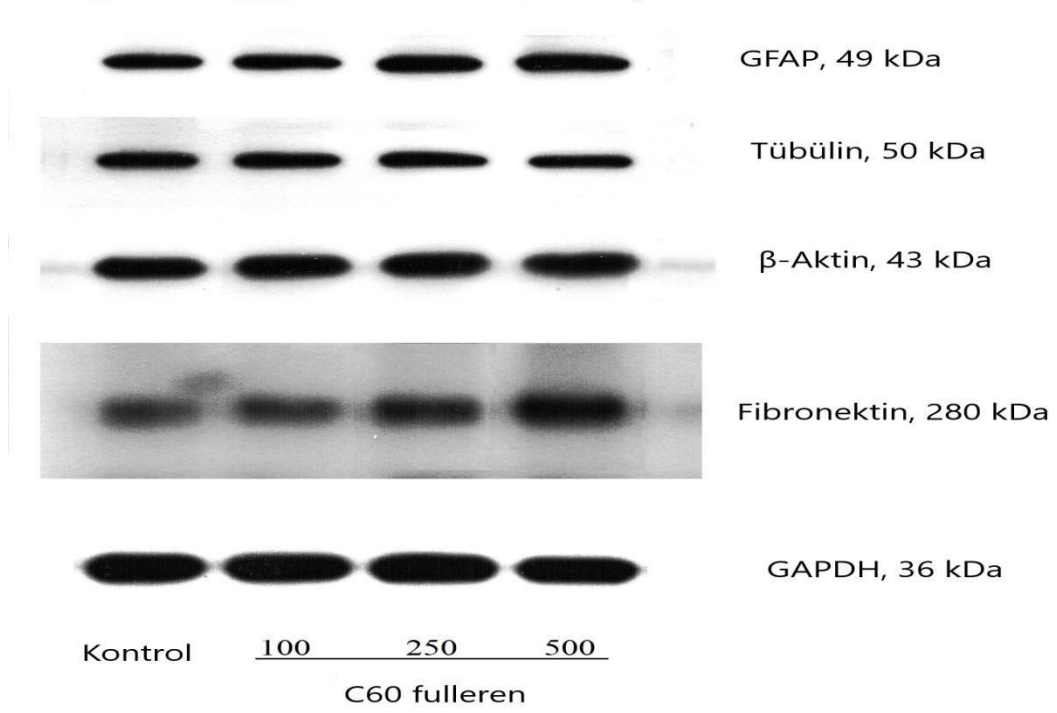
Şekil 13. C60 Fulleren'e maruz bırakılan Glioblastoma U373 hücrelerinde Aktin proteini kontrolü

Fibronektin içeriğinin ölçülmesi, C60 fulleren'in glioblastoma U373 hücrelerinde fibronektin üretimi üzerindeki uyarıcı etkisini göstermiştir (Şekil 14).



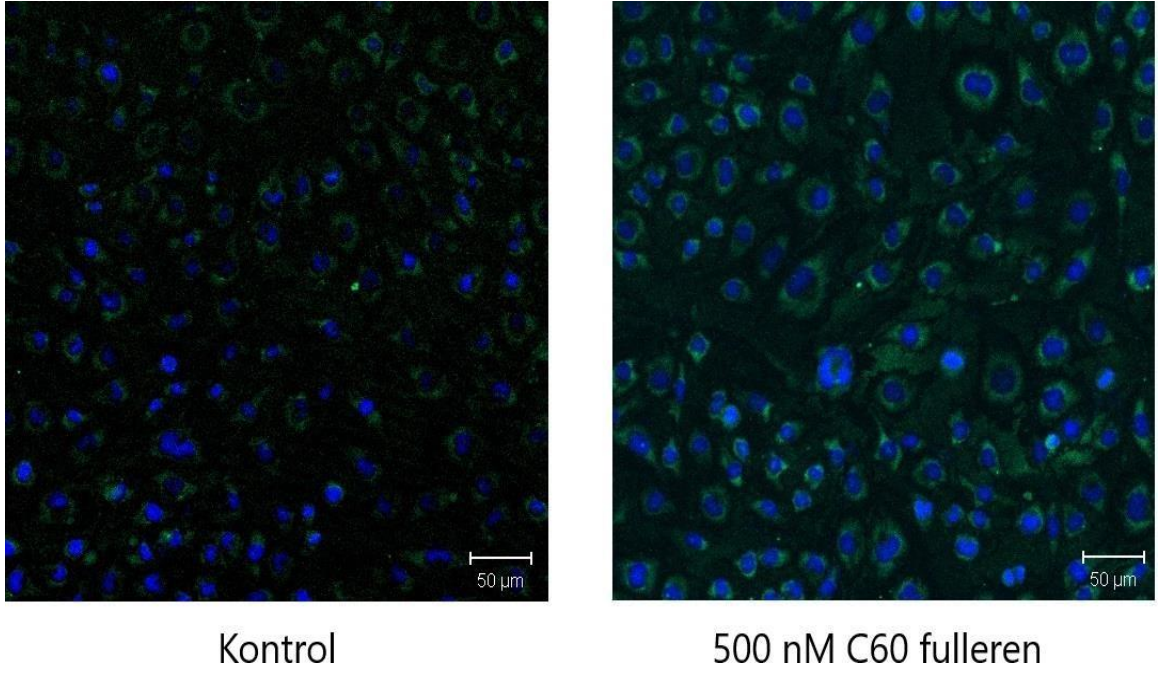
Şekil 14. C60 Fulleren'e maruz bırakılan Glioblastoma U373 hücrelerinde Fibronektin proteini kontrolü

Western blot sonuçları, çalışmamızda GFAP, tübülün ve fibronektinin C60 fullerene maruziyetinden etkilendiğini göstermiştir (Şekil 15). Öte yandan, β -aktin ve GAPDH içerikleri, C60 fulleren tedavisinden etkilenmedi.



Şekil 15. Kontrol grubunda ve C60 fulleren'e maruz bırakılan glioblastoma U373 hücrelerinin GFAP, tübülün, β -Aktin ve fibronektinin Western blot sonuçları

C60 fulleren'in glioblastoma U373 hücrelerinin reaktivitesi üzerindeki etkisi, GFAP immünohistokimya boyama kontrolü ve maruz kalan hücreler ile gösterildi (Şekil 16). C60 fulleren hücrelerine maruz kalan floresans sinyalindeki artış, glioblastoma U373 hücrelerinin reaktivitesini göstermiş ve kanıtlamıştır.



Şekil 16. Glioblastoma U373 hücrelerinin anti-GFAP ile immünohistokimya boyaması

Glioblastoma U373 hücreleri astrositlerden türer ve bu tip beyin kanserinin agresifliğini sağlayan çeşitli mutasyonlar sergiler. Bununla birlikte, Glioblastoma U373 hücreleri, bir astrosit modeli olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Verkhatsky et al. 2017). Bu dönüştürülmüş hücreler, çeşitli uyarılara karşı yanıt verme ve uyumlu astrosit özelliklerinde yüksek metabolik hız uygulama olasılığını korur. Astrositler, bir kural olarak, astrogliosis adı verilen belirgin hücresel yanıtı geliştirme potansiyeline sahiptir (Pekny and Nilsson 2005). Astrogliosis, GFAP yukarı regülasyonu ve glial hücre iskeleti büyümesi ile ilişkilidir. Ayrıca glial proliferasyon olarak görülen bir astrogliosis seyrinde astrosit sayısı çoğaltılır (Cagnolini et al. 2018).

Çeşitli in vitro ve in vivo modeller, çok sayıda dış uyarının astroglial hücre iskeletini etkileyebileceğini göstermiştir (Zamanian et al. 2012). Birkaç sitotoksik faktör, hücresel yanıtın önemli mekanizmalarından biri olarak hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini indükleyebilir. Benzer faktörlerin çoğu, anlamlı astrogliozise yol açan uyarıcı faktörleri içerir. GFAP, glial ara filamentlerin ana bileşenidir. Ayrıca, GFAP'nin ekspresyon seviyesi, glial reaktivitenin en kullanışlı belirteçidir (Vijayan et al. 1990). GFAP ekspresyon seviyesinin astroglial reaktiviteyi yansıttığı dikkate alındığında, sunulan

sonuçlar, C60 fulleren'in glioblastoma U373 hücreleri üzerindeki uyarıcı etkisini göstermiştir. GFAP ekspresyonunun progresif büyümesi, glioblastoma U373 hücrelerinde GFAP içeriğinin doza bağlı değişiklikleri olarak tespit edildi. Bu nedenle, C60 fulleren, ara glial filamentleri etkileyebilir ve dönüştürülmemiş glial hücrelere benzer mekanizmalarla U373 hücrelerindeki değişiklikleri uyarabilir. Ayrıca, GFAP içeriğindeki artış, kullandığımız en yüksek doz olan 500 nM C60 fullerene maruz kalan hücrelerde daha büyüktü.

Öte yandan, C60 fullerene maruz kalan glioblastoma U373 hücrelerinde aktin içeriğinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Aktin mikrofilyamentlerinin tüm ökaryotik hücrelerde hücre iskeletinin temel bir parçası olduğu dikkate alındığında, çalışma sonuçlarımızda elde edilen sonuçlar, C60 fulleren nanopartiküllerinin glioblastoma U373 hücrelerinde aktin içeriği üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını kanıtını göstermiştir. Mevcut çalışmada elde edilen tübülün içeriğindeki hafif azalmaya ilişkin sonuçlar, hücre metabolizma ve hücre reaktivitesi ile ilgili olarak C60 fulleren'in düşük inhibitör etkisi ile ilgili olabilir.

Fibronektin, hücre göçü de dahil olmak üzere birçok hayati süreci düzenleyen hücre dışı matris proteinidir. Çalışmamızda gözlemlenen, glioma hücrelerinde fibronektinin yukarı regülasyonu, hücre dışı matris ve glioblastoma yapışkan proteinleri arasındaki yapışkan temasların artması yoluyla glioblastoma hücre göçünün inhibisyonu ile ilgili olabilir. Bu nedenle, C60 fulleren, hücre dışı matris protein üretiminin modülasyonu yoluyla glioblastoma hücre göçünü inhibe edebilir.

Glioblastoma U373 hücrelerinin göçü üzerindeki etkisi, yakın zamanda bu hücrelerin muramil peptidine maruz bırakılmasıyla gösterilmiştir (Nedzvetsky ve diğerleri, 2020). Muramil peptidin inhibitör etkisi, NADP dahil olmak üzere metabolik enerjiyi tüketebilen PARP ve NF- κ B aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, glioblastoma reaktivitesini ve metabolik enerji üretimini etkileyebilecek ajanlar, glioblastoma göçü ve istilasının inhibisyonunu gerçekleştirmek için ileriye dönük araçlardır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut çalışmanın sonucunda, C60 fulleren'in glioblastoma U373 hücresinin özellikle hücre iskeletini, fibronektin üretimini ve hareketliliğini etkilemek için güçlü olduğunu göstermiştir. Ayrıca mevcut çalışmanın sonuçlarında gözlenen veriler bir bütün halinde değerlendirildiğinde C60 fulleren, hücre iskeleti ana yapıları olan ara filamentleri ve mikrotübülleri zıt yönde etkilemiştir. Bununla birlikte, C60 fulleren'in glioblastoma hücre göçü üzerindeki inhibitör etkisine, GFAP yukarı regülasyonu ve Tübülün aşağı regülasyonu eşlik ettiği tespit edilmiştir. C60 fulleren nanoparçacıkları, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi üzerindeki etkinin yanı sıra glioblastoma hücrelerinin reaktivitesini de düzenler. Bu nedenle C60 fulleren, GBM istilasında rol oynadığı gibi glioblastoma hareketliliğinin baskılanmasında da rol oynayabilir.

KAYNAKLAR

Akhavan D, Alizadeh D, Wang D, Weist MR, Shepphird JK, Brown CE (2019) CAR T cells for brain tumors: Lessons learned and road ahead. *Immunological reviews* 290(1): 60-84

Aldape K, Brindle KM, Chesler L, Chopra R, Gajjar A, Gilbert MR, Gilbertson RJ (2019) Challenges to curing primary brain tumours. *Nature reviews Clinical oncology* 16(8): 509-520

William D, Mokri P, Lamp N, Linnebacher M, Classen CF, Erbersdobler A, Schneider B (2017) Amplification of the EGFR gene can be maintained and modulated by variation of EGF concentrations in in vitro models of glioblastoma multiforme. *PloS one* 12(9): e0185208

So JS, Kim H, Han KS (2021) Mechanisms of Invasion in Glioblastoma: Extracellular Matrix, Ca²⁺ Signaling and Glutamate. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15: 663092

Tilak M, Holborn J, New LA, Lalonde J, Jones N (2021) Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Targeting in Glioblastoma Multiforme. *International journal of molecular sciences* 22(4): 1831

Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee S (2017) Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention APJCP* 18(1): 3–9

Yi F, Ma J, Ni W, Chang R, Liu W, Han X, Pan D, Liu X, Qiu J (2013) The top cited articles on glioma stem cells in Web of Science. *Neural regeneration research* 8(15): 1431–1438

Fatehi M, Hunt C, Ma R, Toyota BD (2018) Persistent disparities in survival for patients with glioblastoma. *World neurosurgery* 120: e511-e516

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Barnholtz SJ (2014) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-oncology* 16: iv1-iv63

Aulakh S, DeDeo MR, Free J, Rosenfeld SS, Quinones HA, Paulus A, Ailawadhi S (2019) Survival trends in glioblastoma and association with treating facility volume. *Journal of Clinical Neuroscience* 68: 271-274

Taylor OG, Brzozowski JS, Skelding KA (2019) Glioblastoma multiforme: an overview of emerging therapeutic targets. *Frontiers in oncology* 9: 963

Taspinar M, Ilgaz S, Ozdemir M, Ozkan T, Oztuna D, Canpinar H, Ugur HC (2013) Effect of lomeguatrib–temozolomide combination on MGMT promoter methylation and expression in primary glioblastoma tumor cells. *Tumor Biology* 34(3): 1935-1947

Vollmann ZA, Leidgens V, Feliciello G, Klein CA, Hau P (2020) Tumor cell invasion in glioblastoma. *International journal of molecular sciences* 21(6): 1932

Quail DF, Joyce JA (2017) The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer cell* 31(3): 326-341

Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW (2015) Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer letters* 362(1): 1-7

Lu YB, Sun TJ, Chen YT, Cai ZY, Zhao JY, Miao F, Yang YN, Wang SX (2020) Targeting the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells for a Better Clinical Outcome of Glioma. *Technology in cancer research & treatment* 19: 1-9

Du L, Tang JH, Huang GH, Xiang Y, Lv SQ (2017) The progression of epithelial-mesenchymal transformation in gliomas. *Chinese Neurosurgical Journal* 3(1): 1-7

Iwadata Y (2016) Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology letters* 11(3): 1615–1620

Scherbakov AM, Sorokin DV, Tatarskiy VV, Prokhorov NS, Semina SE, Bernstein LM, Krasilnikov MA (2016) The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: the interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *International Union of Biochemistry Molecular Biology Life* 68: 281-92

Semina SE, Scherbakov AM, Vnukova AA, Bagrov DV, Evtushenko EG, Safronova VM, Golovina DA, Lyubchenko LN, Gudkova MV, Krasilnikov MA (2018) Exosome-mediated transfer of cancer cell resistance to antiestrogen drugs. *Molecules* 23(4): 829

Zhang H, Zhou Y, Cui B, Liu Z, Shen H (2020) Novel insights into astrocyte-mediated signaling of proliferation, invasion and tumor immune microenvironment in glioblastoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 126: 110086

Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Sugito T, Yoshimi R, Nagasaka T, Ueda M (2010) A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue Engineering Part A* 16(6): 1891-1900

Tysnes BB, Mahesparan R (2001) Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *Journal of neuro-oncology* 53(2): 129-147

Le DM, Besson A, Fogg DK, Choi KS, Waisman DM, Goodyer CG, Yong VW (2003) Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator–plasmin cascade. *Journal of Neuroscience* 23(10): 4034-4043

Proia P, Schiera G, Mineo M, Ingrassia AMR, Santoro G, Savettieri G, Di Liegro I (2008) Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *International journal of molecular medicine* 21(1): 63-67

Shabtay OA, Amit M, Binenbaum Y, Na'Ara S, Gil Z (2015) Paracrine regulation of glioma cells invasion by astrocytes is mediated by glial-derived neurotrophic factor. *International journal of cancer* 137(5): 1012-1020

Oliveira AI, Anjo SI, de Castro JV, Serra SC, Salgado AJ, Manadas B, Costa BM (2017) Crosstalk between glial and glioblastoma cells triggers the “go-or-grow” phenotype of tumor cells. *Cell Communication and Signaling* 15(1): 1-12

Priego N, Zhu L, Monteiro C, Mulders M, Wasilewski D, Bindeman W, Valiente M (2018) STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis. *Nature medicine* 24(7): 1024-1035

Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME (2007) Molecular targets of glioma invasion. *Cellular and molecular life sciences* 64(4): 458-478

Mellai M, Schiffer D (2007) Apoptosis in brain tumors: prognostic and therapeutic considerations. *Anticancer research* 27(1A): 437-448

Jahan N, Lee JM, Shah K, Wakimoto H (2017) Therapeutic targeting of chemoresistant and recurrent glioblastoma stem cells with a proapoptotic variant of oncolytic herpes simplex virus. *International journal of cancer* 141(8): 1671-1681

Yang C, Zheng J, Xue Y, Yu H, Liu X, Ma J, Liu Y (2018) The effect of MCM3AP-AS1/miR-211/KLF5/AGGF1 axis regulating glioblastoma angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience* 10: 437

Agarwal S, Muniyandi P, Maekawa T, Kumar DS (2018) Vesicular systems employing natural substances as promising drug candidates for MMP inhibition in glioblastoma: A nanotechnological approach. *International journal of pharmaceutics* 551(1-2): 339-361

Mahabir R, Tanino M, Elmansuri A, Wang L, Kimura T, Itoh T, Tanaka S (2014) Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-oncology* 16(5): 671-685

Xie Q, Mittal S, Berens ME (2014) Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro-oncology* 16(12): 1575-1584

Nusse R, Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982: 31:99–109

Lee Y, Lee JK, Ahn SH, Lee J, Nam DH (2016) WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Laboratory investigation* 96(2): 137-150

Kamino M, Kishida M, Kibe T, Ikoma K, Lijima M, Hirano H, Tokudome M, Chen L, Koriyoma C, Yamada K, Arita K, Kishida S (2011) Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and Mmp-2. *Cancer Sci* 102: 540–548

Chin L (2013) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways (vol 455, pg 1061, 2008). *Nature* 494(7438): 506-506

Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukheim R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Sloan JB, Zau L, Vegesna R, McLendon R (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155: 462–477

Zhang C, Burger MC, Jennewein L, Genssler S, Schonfeld K, Zeiner P, Hattingen E, Harter PN, Mittelbronn M, Tonn T, Steinbach JP, Wels WS (2016) ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 108, Issue 5

Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA (2010) Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* (New York, N.Y.) 12(9): 675–684

Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP (1991) Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor α , and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 51: 2164–72

Huang PH, Xu AM (2009) White FM Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal* 2: re6

Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang L (2016) PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* 7(22): 33440

Radoul M, Chaumeil MM, Eriksson P, Wang AS, Phillips JJ, Ronen SM (2016) MR studies of glioblastoma models treated with dual PI3K/mTOR inhibitor and temozolomide: metabolic changes are associated with enhanced survival. *Molecular cancer therapeutics* 15(5): 1113-1122

Zhao HF, Wang J, Shao W, Wu CP, Chen ZP, To SST, Li WP (2017) Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. *Molecular cancer* 16(1): 100

Nitulescu GM, Van De Venter M, Nitulescu G, Ungurianu A, Juzenas P, Peng Q, Spandidos DA (2018) The Akt pathway in oncology therapy and beyond. *International journal of oncology* 53(6): 2319-2331

Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 168(6): 960-976

Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT (2017) The PI3K pathway in human disease. *Cell* 170(4): 605-635

Paquette M, El-Houjeiri L, Pause A (2018) mTOR pathways in cancer and autophagy. *Cancers* 10(1): 18

Huang W, Zhu PJ, Zhang S, Zhou H, Stoica L, Galiano M, Costa-Mattioli M (2013) mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature neuroscience* 16(4): 441

MacTaggart B, Kashina A (2021) Posttranslational Modifications of the Cytoskeleton. *Cytoskeleton* 78(4): 142-173

Tuszynski JA, Brown JA, Sept D (2003) Models of the collective behavior of proteins in cells: tubulin, actin and motor proteins. *Journal of biological physics* 29(4): 401-428

Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology* 93(3): 421-443

Brenner M (2014) Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience letters* 565: 7-13

Yang Z, Wang KK (2015) Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in neurosciences* 38(6): 364-374

Eng L, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain research* 28(2): 351-354

Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA (1989) Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(13): 5178-5182

Kunchok A, Zekeridou A, McKeon A (2019) Autoimmune glial fibrillary acidic protein astrocytopathy. *Current opinion in neurology* 32(3): 452

To WS, Midwood KS (2011) Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & tissue repair* 4(1): 1-17

Astrof S, Hynes RO (2009) Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, 12(2): 165-175

Schwarzbauer JE, Patel RS, Fonda D, Hynes RO (1987) Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J* 6 (9): 2573-2580

Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowicz D (1988) Comments on the clinical-application of fibronectin in dentistry. *J Dent Res* 67: 515–517

Hynes RO, Zhao Q (2000) The evolution of cell adhesion, *J. Cell Biol* 150(2): F89-F96

Pankov R, Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance, *J. Cell. Sci* 115(20): 3861-3863

Sottile J, Hocking DC (2002) Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesion, *Mol. Biol.Cell* 13(10): 3546-3559

Dalton CJ, Lemmon CA (2021) Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. *Cellex* 10(9)

Huang YW, Cambre M, Lee HJ (2017) The toxicity of nanoparticles depends on multiple molecular and physicochemical mechanisms. *International journal of molecular sciences* 18(12): 2702

Singh P, Pandit S, Mokkapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I (2018) Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *International journal of molecular sciences* 19(7): 1979

Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC (2008) New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations Elsevier: Vol. 26, No. 1, p.74-85*

Misra R, Acharya S, Sahoo SK (2010) Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug discovery today* 15(19-20): 842-850

Zhang Y, Li M, Gao X, Chen Y, Liu T (2019) Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. *Journal of hematology & oncology* 12(1): 1-13

Pourgholi F, Farhad JN, Kafil HS, Yousefi M (2016) Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 77: 98-107

Kuznietsova H, Lynchak O, Dziubenko N, Herheliuk T, Prylutsky Y, Rybalchenko V, Ritter U (2019) Water-soluble pristine C60 fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury. *BioImpacts: BI* 9(4): 227

Prylutska SV, Skivka LM, Didenko GV, Prylutsky YI, Evstigneev MP, Potebnya GP, Scharff P (2015) Complex of C 60 fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy. *Nanoscale research letters* 10(1): 1-7

Hsieh FY, Zhilenkov AV, Voronov II, Khakina EA, Mischenko DV, Troshin PA, Hsu SH (2017) Water-soluble fullerene derivatives as brain medicine: surface chemistry determines if they are neuroprotective and antitumor. *ACS applied materials & interfaces* 9(13): 11482-11492

Athira SS, Ashtami J, Mohanan PV (2020) Glial cell colony injured on exposure to fullerene soot nanoparticles *Lett. Appl. NanoBioScience* 9: 1637-1643

Xiao L, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N (2010) The effect of squalane-dissolved fullerene-C60 on adipogenesis-accompanied oxidative stress and macrophage activation in a preadipocyte-monocyte co-culture system. *Biomaterials* 31(23): 5976-5985

Verkhatsky A, Zorec R, Parpura V (2017) Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathology* 27(5): 629-644

Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50(4): 427-434

Cragolini AB, Montenegro G, Friedman WJ, Mascó DH (2018) Brain-region specific responses of astrocytes to an in vitro injury and neurotrophins. *Molecular and Cellular Neuroscience* 88: 240-248

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard R, Barres BA (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of neuroscience* 32(18): 6391-6410

Vijayan VK, Lee YL, Eng LF (1990) Increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma. *Molecular and chemical neuropathology* 13(1): 107-118

Nedzvetsky VS, Agca CA, Baydas G (2020) The Peptidoglycan Fraction Enriched With Muramyl Pentapeptide From *Lactobacillus Bulgaricus* Inhibits Glioblastoma U373mg Cell Migration Capability And Upregulates Parp1 And Nf-Kb Levels. *Biotechnologia Acta* 13(2)