



ARAŞTIRMA / RESEARCH

## Glioblastoma hücre hattında (U87) siklopamin ve temozolomid kombine tedavisinin miR-20a ekspresyonu üzerine etkileri

Effects of cyclopamine and temozolomide combined treatment on miR-20a expression in glioblastoma cell line (U87)

Leman Sencar<sup>1</sup>, Derviş Mansuri Yılmaz<sup>2</sup>, Dilek Göktürk<sup>3</sup>, Sema Polat<sup>4</sup>,  
Gülfidan Coşkun<sup>1</sup>, Dilek Şaker<sup>1</sup>, Tuğçe Sapmaz<sup>1</sup>, Samet Kara<sup>1</sup>, Alper Çelenk<sup>1</sup>,  
Sait Polat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı,  
<sup>4</sup>Anatomi Anabilim Dalı, Adana, Turkey  
<sup>3</sup>Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik, Adana, Turkey

*Cukurova Medical Journal 2021;46(4):1426-1432*

### Abstract

**Purpose:** The aim of this study was to investigate miR-20a expression in glioblastoma cell line (U87) after applying cyclopamine and temozolomide (TMZ) treatment separately and in combination and to evaluate the efficiency of miR-20a in glioblastoma treatment.

**Materials and Methods:** U87 MG was placed on a 35 mm culture dish before treatment. Within the scope of the study, 7 groups were formed: Group 1: Control group, Group 2: Sham group (Dimethyl sulfoxide), Group 3: 2 Days TMZ, Group 4: 5 Days TMZ, Group 5: 3 Hours Cyclopamine, Group 6: 2 Days TMZ + 3 Hours Cyclopamine, Group 7: 5 Days TMZ + 3 Hours Cyclopamine Total miRNA isolation and qRT-PCR was performed after treatment.

**Results:** MiR-20a expression in the glioblastoma cell line was found to be significantly decreased in group 3, group 4, group 5, group 6 and group 7. However, it was determined that this decrease was highest in group 7. In addition, it was observed that the number of cells decreased in group 7.

**Conclusion:** MiR-20a is highly expressed in glioblastoma cells; however, it was determined that the expressions decreased after Cyclopamine and TMZ treatments. miR-20a can be used as a new therapeutic target and biomarker for glioblastoma, Cyclopamine and TMZ can be used for treatment in glioblastoma, but further studies are needed on this subject.

**Keywords:** Glioblastoma, cyclopamine, temozolomide, MiR-20a.

### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada, glioblastoma hücre hattında (U87) siklopamin ve temozolomid (TMZ) tedavisinin ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasından sonra miR-20a ekspresyonunun araştırılması ve bu miRNA'nın glioblastoma tedavisindeki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** U87 MG, tedaviden önce 35 mm'lik kültür kabı üzerine yerleştirildi ve çoğaltıldı. Çalışma kapsamında 7 grup oluşturuldu: Grup 1: Kontrol grubu, Grup 2: Sham grubu (Dimetil sülfoksit), Grup 3: 2 Gün TMZ, Grup 4: 5 Gün TMZ, Grup 5: 3 saat siklopamin, Grup 6: 2 Gün TMZ + 3 saat siklopamin, Grup 7: 5 Gün TMZ + 3 saat siklopamin. Tedaviden sonra total miRNA izolasyonu ve qRT-PCR yapıldı.

**Bulgular:** Glioblastoma hücre hattında miR-20a ekspresyonunun grup 3, grup 4, grup 5, grup 6 ve grup 7'de belirgin olarak azaldığı tespit edildi. Ancak bu azalmanın en fazla grup 7 de olduğu saptandı. Ek olarak grup 7'de hücre sayısının azaldığı görüldü.

**Sonuç:** Glioblastoma hücrelerinde miR-20a'nın yüksek oranda eksprese olduğu; ancak siklopamin ve TMZ tedavilerinden sonra ekspresyonun azaldığı tespit edildi. miR-20a'nın glioblastoma için yeni bir terapötik hedef ve biyobelirteç olarak kullanılabilmesi, siklopamin ve TMZ'nin glioblastomada tedavi amaçlı kullanılabilmesi ancak bu konuda daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Glioblastoma, siklopamin, temozolomid, MiR-20a.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Leman Sencar, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana, Turkey E-mail: lsencar@cu.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 02.08.2021 Kabul tarihi/Accepted: 19.09.2021 Çevrimiçi yayın/Published online: 20.09.2021

## GİRİŞ

Glioblastoma, merkezi sinir sisteminde en sık rastlanan primer beyin tümörü olup tüm gliomaların yaklaşık %45-50'sini oluşturur. Glioblastoma tedavisinde cerrahi rezeksiyon, radyasyon ve kemoterapi gibi modern teşhis ve tedavilere rağmen hastaların sağkalımı ortalama 12-15 ay ile sınırlıdır. Bununla birlikte, tümör dokusu cerrahi olarak çıkartıldıktan sonra, çoğunlukla rezeksiyon kavitesinin 1 cm içerisinde tümörün rekürrensi gerçekleşir. Bu durum çoğunlukla cerrahi işlem sırasında hücrelerin tümör dokusundan normal beyin dokusuna göçü ile ilgilidir<sup>1</sup>. Glioblastomalar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, histolojik, prognostik ve sağkalım özelliklerine dayanılarak dört evre (I-IV) şeklinde sınıflandırılmıştır. Glioblastomanın en malign sınıfı olan evre IV glioma, son derece zayıf bir prognoz ile karakterize olup, ortalama sağkalım oranının 2 yılda sadece %3.3 ve 3 yılda % 1.2 olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan, düşük dereceli bazı gliomaların da yeniden progresyonla glioblastomaya dönüşebileceği rapor edilmiştir. Bunlara sekonder glioblastoma denirken, de novo glioblastoma tümörleri primer glioblastoma olarak adlandırılır<sup>2</sup>. Glioblastoma oluşumu, hücrenel neoplastik dönüşüm, apoptoza direnç, hücre döngüsünün kontrol kaybı, anjiyogenezis ve invaziv özelliklerin kazanımı gibi kompleks, çok adımlı bir süreçtir. Nükleer faktör-kappa B (NF- $\kappa$ B), reaktif oksijen ve azot türleri ile spesifik mikroRNA'lar kanser progresyonunun anahtar mediyatörleridir. Bu mediyatörler, hücre çoğalması, hücre ömrü, hücrenel yaşlanma, DNA mutasyon oranları, DNA metilasyonu ve anjiyogenezisdeki değişiklikler yoluyla pro-tümörjenik bir cevap oluşturmaktadır<sup>3</sup>.

Glioblastoma patogenezi düzenleyen moleküler mekanizmaların ortaya konulduğu çalışmalar günümüzde sınırlı sayıdadır. Son yıllarda miRNA'ların beyin tümörlerinin oluşumundaki rolleri rapor edilmiştir. MiRNA'lar enflamasyon ve kanserde yeni düzenleyici moleküller olarak yer almaktadır ve tumorigenez sürecinde anahtar rol oynamaktadırlar. MiRNA'ların ekspresyon seviyesi, kanser tanısında ve prognozunda oldukça önemli bir faktördür. Bu nedenle, miRNA'ların fonksiyonu ile ilgili yapılan birçok çalışmada bu moleküllerin onkogen ya da tümör baskılayıcı etkilerinin olabileceği bildirilmiştir. MiRNA'lar bu etkilerini hedef genlerine bağlı olarak göstermekte ve tümör oluşumunu uyarıcı genleri hedefleyerek potansiyel bir onkogen olabilirken, RAS

ve HMGA2 gibi onkogenleri hedefleyerek de tümör baskılayıcı gibi davranabilmektedir. Yapılan araştırmada, miR-9'un, NF- $\kappa$ B ekspresyonu üzerinden tümör hücre gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir<sup>4</sup>. Bazı miRNA'lardaki ekspresyon değişiklikleri tek bir tümör tipi ile ilişkiliyken, diğer bazılarında meydana gelen değişiklikler ise birden fazla tümör tipinde görülebilmektedir. MiR-155, miR-21, miR-17-92 ve let7 gibi miRNA'ların çeşitli dokularda tümörögenezdeki fonksiyonu kaydedilmiştir. Dolayısıyla miRNA'lar muhtemelen hücre kökenine bakılmaksızın tümör fenotipinin başlatılması ve sürdürülmesi için gerekli olan yolları düzenlemektedir<sup>5</sup>.

Glioblastomanın moleküler fenotiplenmesi, tedavide terapötik bir gen veya miRNA ekspresyonlarının düzenlenmesi yoluyla onkojenik yolların ortaya çıkarılması gibi moleküler mekanizmaların hedeflenmesine sebep olmuştur. Onkojenik ve tümör baskılayıcı özellikler gösteren miRNA'ların, hücre göçü, sitoskeletonin yeniden düzenlenmesi, invazyon ve anjiyogenez ile ilgili hedef genleri etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde, miRNA'ların tümör hücre proliferasyonu ve invazyonunda farklı işlevsel özelliklerini gösteren ileri moleküler araştırmalar ile glioblastoma tedavi sürecinde hedef moleküller olabileceği düşünülmektedir<sup>6</sup>.

Glioblastoma tedavisinde kemoterapötik ilaçlardan alkilleyici ajanlar en çok kullanılanlardır. Temozolomid (TMZ), evre II ve evre III glioblastomaların tedavisinde kullanılan bir DNA-metile edici ajandır. DNA'nın en kritik bölgesindeki guanin'in O6 pozisyonuna metil grubu ekleyerek hasar oluşturmaktadır. Bu hasarlar, kanser hücrelerinin G2/M hücre siklusunda durdurulmasını sağlayarak apoptosize yol açmaktadır<sup>7</sup>. TMZ, rekürrent gliomanın tedavisinde sıklıkla kullanılmakta ve antitümör etki göstermektedir. İnsanda glioblastomada verilen uygun doz, 28 günde bir 5 günde 5 gün boyunca vücut yüzey alanı başına 150 ila 200 mg günlük dozdur. Ancak, GBM hastalarının uygulanan bu TMZ kemoterapisine verdikleri yanıtlarda farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir. DNA hasarına neden olan TMZ, klinikte GBM tedavisinde genellikle ilk başvuru kemoterapötik ilaç olmasına rağmen, miyelotoksisite, ülser, mide bulantısı, kusma, yorgunluk ve baş ağrısı gibi yan etkilere neden olmaktadır. TMZ ile tedavi O-6-methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) upregülasyonuna neden olurken, kanserin direncini

de artırmaktadır. Dolayısıyla TMZ kemoterapötik bir ilaç olarak kullanılırken, tümör rekürrensine de zemin hazırlamaktadır<sup>8,9</sup>. Malign gliomalar genellikle TMZ ile tedavi edilmektedir, fakat tümör hücreleri bu kemoterapiye karşı direnç göstermektedir. Kendilerini yenileyebilen ve immatür fenotipte olan, küçük bir hücre popülasyonu olan “glioma kök hücreleri” kemoterapötik bir ilaç olan TMZ’e oluşturulan direncin ana sebebi olarak kabul edilmekte ve bu direncin, tedaviden sonra sıklıkla görülen tümör rekürrensine de etkin oldukları düşünülmektedir. Tümörün kemoresistansına neden olduğu düşünülen bir popülasyon olan CD133 + kanser kök hücreleri, Notch ve Sonic hedgehog (SHH) sinyal yollarının aktivasyonu üzerinden bu dirençte rol almaktadırlar<sup>10</sup>.

Siklopamin, Veratrum californicum (California cornlily)’den izole edilen SMO’nun heptahelikal demetine bağlanarak Hedgehog sinyal mekanizmasını inhibe eden doğal bir alkaloiddir ve glioma hücre hatlarında antiproliferatif etkiye sahiptir. Yapılan son çalışmalar, SHH yolağının siklopamin tarafından inhibisyonu sonucu, glioblastoma kök hücrelerinin kendilerini yenileyebilme, proliferasyon, nörosfer oluşturma ve tümörojente kapasitelerinin azaldığı bildirilmiştir. Dolayısıyla siklopamin prelinik ve klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlarla birlikte, antitümör aktivite gösteren kemoterapötik bir ilaçtır<sup>11</sup>. Sonic-hedgehog sinyal yolağı, MSS’nin embriyonik gelişiminde önemli rol oynar. GBM dahil çoğu ileri derecede beyin tümörlerinin patofizyolojisinde aşırı SHH ekspresyonu gözlenmektedir. SHH aracılı transdüksiyon, SHH’un Smoothen (Smo) repressörü olan reseptörü Patched (PTCH) 'ye bağlanmasıyla aktive edilir. Smo aktivasyonu, N-myc, siklin D, PTCH, Gli1 ve Gli2’nin de dahil olduğu klasik SHH yolağı ile Gli1’e bağlı transkripsiyon faktörlerinin up- regülasyonuna yol açar. Gli1 ise TMZ ile tedavide artmış MGMT’nin artan ifadesi ile ilişkilidir. Aynı zamanda SHH, CD133+ kanser kök hücrelerinin kendilerini yenileyebilme kapasitelerini de düzenlemektedir. Tüm bu bilgiler dahilinde, SHH sinyal yolağının inhibisyonu ile glioblastoma tedavisinde TMZ’ye direncin azaltılabileceği düşünülmektedir<sup>9</sup>. Yapılan bir çalışmada, miR-21 ve miR-20a’nın glioblastoma dokularında sinerjik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Düşük konsantrasyonlu miR-21 ve miR-20a inhibitörlerinin kombinasyonunun, U87 glioblastoma hücre hattında apoptozu artırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, miR20a’nın

glioblastomada invazyon sürecine olan etkileri tam olarak bilinmemektedir<sup>12</sup>.

Bu çalışmada glioblastoma hücre hattında siklopamin ve TMZ tedavisinin ayrı ayrı ve kombine tedavisinden sonra miR-20a ekspresyonu analiz edildi ve glioblastoma tedavisindeki etkinliği gösterilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular siklopamin ve TMZ tedavisi öncesi ve sonrası glioblastoma hücrelerinde miR-20a’nın olası etkilerini ortaya koymuştur. Glioblastoma hücrelerinde miR-20a ekspresyonunun belirlenmesi, bu miRNA’yı glioblastoma için yeni bir terapötik hedef ve biyobelirteç haline getirebilir. Elde edilen sonuçlar ile bu alandaki bilgi birikimine ve glioblastoma tedavi yaklaşımlarına katkı sağlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada U87 MG (ATCC, USA) glioblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmada ticari hücre hattı kullanıldığından etik kurul onayı gerekmemektedir. U87 MG hücreleri, siklopamin ve TMZ tedavilerinden 2 gün önce 35 mm’lik kültür kabı üzerine yerleştirildi. Hücreler % 370C sıcaklık, % 5 CO2 ve % 95 nem koşullarını sağlayan inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında deneyde kullanıldı. Konflue olmuş 35 mm’lik flasktaki hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. 6 kuyucuklu plaklara 3x10<sup>5</sup> hücre %10 FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 100 µM TMZ içeren DMEM ortamında ekildi. 5 günlük bir inkübasyondan sonra, canlı hücreler hemasiyometre kullanılarak sayıldı. Ayrıca hücreler 5 µM siklopamin içeren DMEM ortamında % 370C sıcaklık, %5 CO2 ve % 95 nem koşullarını sağlayan inkübatörde 3 saatlik bir inkübasyondan sonra, canlı hücreler hemasiyometre kullanılarak sayıldı. siklopamin (5 µM) ve TMZ (100 µM)’in kombine tedavisinde hücreler öncelikle sürekli TMZ içeren ortamda 2 gün ve 5 gün inkübe edildikten sonra sadece 3 saat siklopamin ile inkübe edildi. Çalışma kapsamında 7 grup oluşturuldu:

Grup 1: Kontrol grubu

Grup 2: Sham grup (Dimetil sülfoksit (DMSO))

Grup 3: 2 Gün TMZ (100 µM)

Grup 4: 5 Gün TMZ (100 µM)

Grup 5: 3 saat siklopamin (5 µM)

Grup 6: 2 Gün TMZ (100 µM) + 3 saat siklopamin (5 µM)

Grup 7: 5 Gün TMZ (**100  $\mu$ M**) + 3 saat siklopamin (**5  $\mu$ M**)

### Total miRNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Tedaviden sonra total miRNA izolasyonu miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile yapıldı. Elde edilen RNA'ların, A280 / A260 oranı (oran > 1.5) ve konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen total RNA reverse transkripsiyon kiti (miScript II RT Kit, Qiagen, Almanya) kullanılarak cDNA (complementary DNA)'ya dönüştürüldü.

### Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları (qRT-PCR)

Araştırılan gen ekspresyon düzeyleri real time PCR yöntemiyle Applied Biosystems 7300 (ThermoFisher, USA) cihazı kullanılarak kantitatif edildi ve miR-20a ekspresyon düzeyi belirlendi. Gen ekspresyonunun normalizasyonu için SNORD87 (U87) house keeping geni kullanıldı. Real time PCR döngüsü miR-20a için optimize edildi<sup>13</sup>.

### İstatistiksel analiz

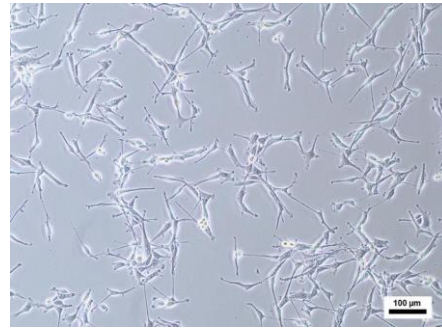
Çalışma verilerinin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanıldı. Gen ekspresyon miktarlarının analizi fold regulation ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) yöntemine göre hesaplandı. Böylelikle ilgili genlerin ekspresyon miktarlarının kaç kat arttığı/azaldığı belirlendi. Gen ekspresyonunda istatistiksel değerlendirme deney, tedavi ve kontrol gruplarının  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerinin Student t-test ile kıyaslanması ile yapıldı. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

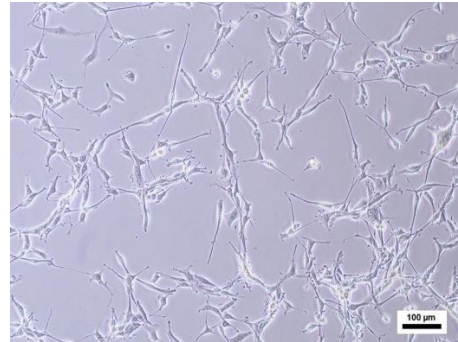
Glioblastoma hücre hattıyla gerçekleştirilen hücre kültürüne ait görüntüler invert mikroskop ile alındı. Kontrol grubunun hücre kültürüne ait mikrograftta glioma hücrelerinin normal fizyolojide olduğu gözlemlendi (Şekil 1). Hücre kültür ortamına DMSO (dimetilsülfoksit) eklenerek inkübasyon gerçekleştirilen sham grubundan elde edilen mikrograftta, kontrol grubuna benzer şekilde glioma hücrelerinin normal fizyolojide çoğalma paternine sahip olduğu izlendi (Şekil 2).

2 gün TMZ tedavisi uygulanan gruptan elde edilen mikrograftta glioma hücrelerinin normal fizyolojide olduğu gözlemlendi (Şekil 3-a). 5 gün TMZ tedavisi uygulanan grubun hücre kültürüne ait mikrograftta

normal canlı glioma hücreleri izlendi (Şekil 3-b). 3 saat siklopamin tedavisi uygulanan grubun hücre kültüründe hücrelerin normal glioma hücre fizyolojisinde olduğu fakat hücrelerin hücre toplulukları oluşturma eğiliminde olduğu dikkati çekti (Şekil 3- c). 2 gün TMZ + 3 saat siklopamin kombine tedavisi uygulanan grubun hücre kültüründe ölü hücre sayısının canlı hücreye göre arttığı (Şekil 3-d) dikkati çekerken özellikle 5 gün TMZ + 3 saat siklopamin kombine tedavisi uygulanan grubun hücre kültüründe canlı hücre sayısında azalma gözlemlendi (Şekil 3-e).



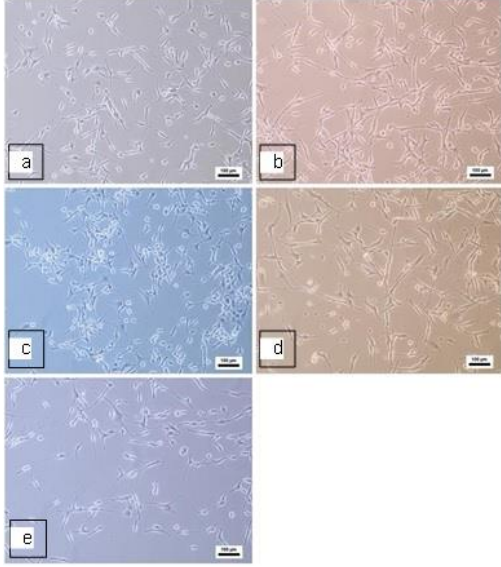
Şekil 1. Kontrol grubunda başlangıç hücre sayısı  $1 \times 10^4$  hücre/ml olan U87 hücrelerine ait 2 günlük tek tabakalı hücre kültürünün invert mikroskop altındaki görüntüsü (100X).



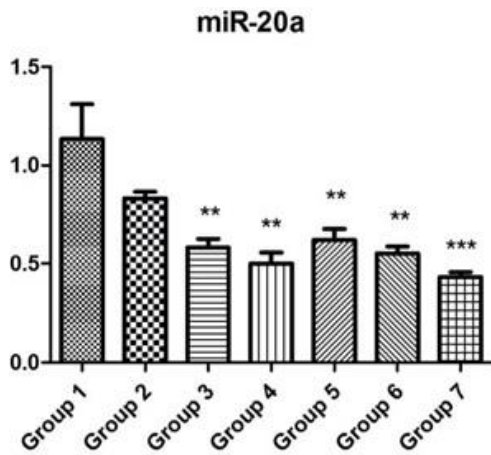
Şekil 2. Sham grubunda başlangıç hücre sayısı  $1 \times 10^4$  hücre/ml olan U87 hücrelerine ait 2 günlük tek tabakalı hücre kültürünün invert mikroskop altındaki görüntüsü (100X).

Tüm gruplarda miR-20a gen ekspresyonu değerlendirildiğinde, kontrol ve sham gruplarına göre 2 gün TMZ, 5 gün TMZ, 3 saat siklopamin ve 2 gün TMZ+3 saat siklopamin kombine tedavi uygulanan gruplarda miR-20a ekspresyonunun anlamlı bir şekilde downregüle olduğu görüldü ( $p < 0.001$ ). Ancak 5 gün TMZ+ 3 saat siklopamin kombine

tedavinin miR- 20a ekspresyonunun en etkili şekilde azalttığı dikkati çektii ( $p<0.0001$ ) (Şekil 4).



Şekil 3. Tedavi grubunda başlangıç hücre sayısı  $1 \times 10^4$  hücre/ml olan U87 hücrelerine ait tek tabakalı hücre kültürünün invert mikroskop altındaki görüntüleri. a-2 gün TMZ tedavisi uygulanan hücre kültürü ortamı b-5 gün TMZ tedavisi uygulanan hücre kültürü ortamı c-3 saat siklopamin tedavisi uygulanan hücre kültürü ortamı d-2 gün TMZ+ 3 saat siklopamin kombine tedavisi uygulanan hücre kültürü ortamı e-5 gün TMZ+ 3 saat Cylopamine kombine tedavisi uygulanan hücre kültürü ortamı (100X).



Şekil 4. U87 glioma hücre hattında siklopamin ve TMZ'in ayrı ayrı ve kombine uygulanmasının miR-20a gen ekspresyonuna etkileri

(\*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.0001$ ).

## TARTIŞMA

Glioblastoma patogenezi uzun yıllardır araştırılmasına rağmen bu süreçte yer alan moleküler mekanizmalar günümüzde hala tam olarak açıklanamamıştır. Bu mekanizmaların ortaya konulması amacıyla literatürde pek çok çalışma yapılmış ve halen de bu çalışmalar yoğun şekilde sürdürülmektedir. Bununla birlikte bugüne kadar glioblastomada kesin olarak etkin bir tedavi protokolü hala tam olarak oluşturulamamıştır. Son yıllarda hücrenin RNA biyolojisi içerisinde yer alan mikroRNA'ların çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçte etkin rol aldıkları ortaya konulmuş, böylece açıklanamayan pek çok sorunun da cevabı aydınlatılmıştır. Yapılan çalışmalarda glioblastoma patolojisinde de mikroRNA'ların rollerine dikkat çekilmiştir. Araştırmalarda, glioblastomada miRNA'ların ekspresyonunun düzenlediği moleküler mekanizmaların, hastalığın seyrinde büyük rol oynadığı gösterilmiştir. miRNA'lar, tümör ilerlemesi, metastaz ve invazyonla ilgili çoklu sinyal yollarını hedefleyebildiklerinden, kanser tedavisi için hedef olarak artan bir ilgi görmüştür. İlaç direncine ilişkin birçok miRNA keşfedilmiş olmakla birlikte ileride bunların biyobelirteç olarak belirlenmesi için ileri analizlerin yapılması gerektiği vurgulanmaktadır. miRNA'lar tarafından düzenlenen bu moleküler yolların açıklanmasıyla beraber, glioblastoma patofizyolojisinde miRNA'ların rollerinin daha net olarak ortaya çıkması beklenmektedir. Glioblastoma hücre hatlarında miRNA ekspresyonlarını analiz eden Chan ve arkadaşları tek bir miRNA tipinin işlevsel özelliklerini araştıran ilk araştırmacılar. Araştırmacılar, miR-21 inhibisyonunun önemli ölçüde artmış apoptoz ile sonuçlandığını ve bu nedenle, miR-21'in bir mikro-onkogen olarak işlev görebileceğini bildirmişlerdir. Günümüzde, literatürde bu konuyla ilgili çalışmaların sayısı gittikçe artmakta ve glioblastoma oluşumunda miRNA aracılı mekanizmalar açıklanmaya devam etmektedir<sup>6</sup>.

Glioblastomada miRNA'ların ekspresyon profilleri ve fonksiyonu hakkında mevcut literatürde, günümüze kadar 253 miRNA'nın ekspresyonlarının artış gösterdiği, 95 miRNA tipinin ekspresyonlarının azaldığı ve 17 tip miRNA'nın ekspresyonlarının ise tartışmalı olduğu tespit edilmiştir. Ekspresyonları değişkenlik gösteren bu miRNA'ların %85'i henüz işlevsel olarak karakterize edilememiştir. Buna karşın, başka bir araştırmada, insan astrositik tümörlerinde, miRNA-21 ve miRNA-221 ekspresyonunda artış görülürken, miRNA-181b ekspresyonunun azaldığı

gösterilmiştir. Glioblastomanın tüm evrelerinde miRNA-21 yüksek düzeyde eksprese olurken, miRNA-221 sadece ileri evredeki malign tümörlerde aşırı ekspresyon göstermektedir<sup>3</sup>.

DeneySEL in vivo ve in vitro çalışmalarda, TMZ'in çok çeşitli tümör tiplerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Malign glioma ve malign melanoma hastalarındaki klinik etkinliği ve yaşam kalitesini artırma özelliğiyle bilinmektedir. TMZ, ilerlemiş yumuşak doku sarkoması, non-Hodgkin lenfoma, prostat kanseri, pankreas kanseri, ilerlemiş nazofaringeal karsinoma ve beyin metastazları dahil, klinik olarak çok çeşitli kanserlerde araştırılmıştır. Malign gliomalar genellikle TMZ ile tedavi edilmektedir fakat tümör hücreleri bu kemoterapiye karşı direnç göstermektedir. Tümörün kemoresistansına neden olduğu düşünülen bir popülasyon olan CD133 + kanser kök hücrelerinin, Notch ve Sonic hedgehog sinyal yollarının aktivasyonu üzerinden bu dirençte rol aldıkları düşünülmektedir. siklopamin ise, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunu düzenleyen temel genleri içeren Hedgehog sinyal yolunun selektif blokeridir<sup>8,10</sup>. Etkin bir SHH antagonisti olan siklopamin, Smo reseptörüne bağlanır ve SHH yolunu inhibe eder. Nitekim yapılan bir çalışmada, siklopamin tedavisinin SHH yolunu inhibe ederek glioblastoma tümör kök hücre morfolojisini bozduğu ve tümör kök hücrelerinin sayılarını azalttığı sonucuna varılmıştır. SHH, glioblastoma kanser kök hücrelerinin aktivasyonunda kritik öneme sahip olup, SHH sinyal yolunun inhibisyonu, glioblastoma tümörejenitesini ortadan kaldırırken aynı zamanda glioblastomalı hastaların radyoterapi ile konkomitant ve adjuvant Temozolomide'e duyarlılığını artırır<sup>9,14</sup>.

MiRNA'ların da glioblastoma hücrelerinde TMZ ile desteklenen tedavi sürecinde inhibitör ya da aktivatör rol oynadığı bildirilmiştir. Nitekim yapılan bir çalışmada glioblastoma hücrelerinde TMZ tedavisinden sonra miR-204 seviyesinin azaldığı ve bunun kanser hücrelerinde azalmaya neden olarak tedaviyi destekleyici nitelikte olduğu gösterilmiştir<sup>15</sup>. Kromozom 13'ten kodlanan, onkojenik ve tümör baskılayıcı rolleri olduğu bildirilen miR-20a, miR-17-92 ailesinin bir üyesidir. Yapılan çalışmalarda, miR-20a'nın da çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyon ve invazyonunda rol oynadığı belirtilmiştir<sup>16</sup>.

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada, miR-20a ekspresyonlarının, hepatit C virüsü ile enfekte olmuş bireylerin serumunda ve uveal melanom, osteosarkom, nöralglioma, farklılaşmamış tiroid

kanseri, servikal, gastrik ve prostat kanserinde arttığını, meme kanserinde ise azaldığını ortaya koymuştur. miR-20a'nın, osteosarkomda hücre çoğalmasını hızlandırdığı ve hücre döngüsünün ilerlemesini indüklediği gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar miR-20a'nın malignanside terapötik bir hedef olma potansiyelini ortaya koymaktadır. Chai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, miR-20a'nın BNIP2'yi hedeflediğini ve kolorektal adenokarsinoma hücre hatlarında kemoterapötik dirence katkıda bulunduğu rapor edilmiştir<sup>12,16,17</sup>. Başka bir çalışmada da miR-20a'nın gastrik tümör hücrelerinin büyümesini, göçünü ve invazyonunu uyararak kemoterapötik direnci arttırdığı gösterilmiştir. Bunun yanında, miR-20a'nın, farklılaşmamış tiroid karsinomasında yüksek oranda eksprese edildiği ve tiroid kanserinde antitümör bir rol oynadığı bulunmuştur<sup>16</sup>. Diğer bir çalışmada ise, miR-20a'nın TGF- $\beta$  sinyalizasyonu ile upregüle olduğu ve bunun da tümör oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>18</sup>.

Glioblastomalı hastaların, kemoterapiden sonra yaşam kalitelerini iyileştirebilmek ve hayatta kalma sürelerini uzatmak adına, tümör hücrelerinde migrasyonun engellenmesi, kemoterapötik ilaçlara direncin üstesinden gelinmesi, rekürrens önlemesi ve yan etkileri azaltması gerekmektedir. Bu ise yalnızca daha etkili ve gerektiğinde kombine tedavi stratejilerinin geliştirilmesine bağlıdır. Literatürde glioblastoma tedavisinde kullanılan siklopamin ve TMZ tedavisinden sonra miR-20a ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Sunulan bu çalışmada ilk defa glioblastoma hücre hattında (U87) Siklopamin ve TMZ'nin ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasından sonra miR-20a ekspresyonları ile bu miR tipinin glioblastoma tedavisindeki etkinliğinin ortaya konulması amaçlandı. Çalışmamızın sonucunda, 5 gün TMZ+3 saat siklopamin kombine tedavi grubunda diğer tedavi (2 gün TMZ, 5 gün TMZ, 3 saat siklopamin, 2 gün TMZ+3 saat siklopamin) gruplarına göre anlamlı seviyede azalan miR-20a seviyesi kombine tedavinin etkinliğini ortaya koymuştur. TMZ ile birlikte uygulanan siklopamin, glioma hücrelerinde ilaç etkinliğini artırmıştır. Öncelikle siklopamin ve TMZ'nin miR-20a üzerindeki etkisinin hangi yollar üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmelidir. Ayrıca glioblastomada miR-20a ekspresyonu in vivo çalışmaları da desteklenerek kanıtlanmalıdır. Sunulan bu çalışmada, glioblastoma hücre hattında (U87) siklopamin ve TMZ kombine tedavisinden sonra miR-20a ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı saptandı.

MiR-20a'nın glioblastoma için yeni bir terapötik hedef ve biyobelirteç olarak kullanılabilceği, ancak bu konuda daha ileri moleküler çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/Tasarımı: LS; Veri toplama: LS, DS,TS; Veri analizi ve yorumlama: LS, SP, DMY; Yazı taslağı: LS, AC, GC; İçeriğin eleştirel incelenmesi: DG, SP; Son onay ve sorumluluk: LS; Teknik ve malzeme desteği: SK; Süpervizyon: SP; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

**Etik Onay:** Çalışmada ticari olarak üretilmiş hücre hattı kullanıldığından etik onay alınmamıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (TSA-2018-11296).

**Author Contributions:** Concept/Design : LS; Data acquisition: LS, DS,TS; Data analysis and interpretation: LS, SP, DMY; Drafting manuscript: LS, AC, GC; Critical revision of manuscript: DG, SP; Final approval and accountability: LS; Technical or material support: SK; Supervision: SP; Securing funding (if available): n/a.

**Ethical Approval:** Ethical approval was not obtained as a commercially produced cell line was used in the study.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** The study was supported by Cukurova University Scientific Research Projects (TSA-2018-11296).

## KAYNAKLAR

- Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol.* 2014;70:217–28.
- Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18:1061-83.
- Conti A, Guli C, La Torre D, Tomasello C, Angileri FF, Aguenouz M. Role of inflammation and oxidative stress mediators in gliomas. *Cancers (Basel).* 2010;26;2:693-712.
- Jiang C, Chen X, Alattar M, Wei J, Liu H. MicroRNAs in tumorigenesis, metastasis, diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Cancer Gene Ther.* 2015;22:291-301.
- Zhang W, Dahlberg JE, TamW. MicroRNAs in tumorigenesis. *Am J Pathol.* 2007;171:728–38.
- Moller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M, Duroux M. A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiol.* 2013;47:131-44.
- Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 Effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2001;61:1957–63.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-96.
- Liu YJ, Ma YC, Zhang WJ, Yang ZZ, Liang DS, Wu ZF, Qi XR1. Combination therapy with micellized cyclopamine and temozolomide attenuate glioblastoma growth through Gli1 down-regulation. *Oncotarget.* 2017;8:42495-509.
- Ulasov IV, Nandi S, Dey M, Sonabend AM, Lesniak MS. Inhibition of sonic hedgehog and notch pathways enhances sensitivity of CD133 glioma stem cells to temozolomide therapy. *Mol Med.* 2011;17:103-12.
- Balbous A, Renoux B, Cortes U, Milin S. Selective release of a siklopamin glucuronide prodrug towards stem-like cancer cell inhibition in glioblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2014;13:2159-69.
- Zhao Y, Cui X, Zhu W, Chen X, Shen C, Liu Z, Yang G, Liu Y, Zhao S. Synergistic regulatory effects of micrRNAs on brain glioma cells. *Mol Med Rep.* 2017;16:1409-16.
- Şaker D, Sencar L, Yılmaz DM, Polat S. Relationships between microRNA-20a and microRNA-125b expression and apoptosis and inflammation in experimental spinal cord injury. *Neurol Res.* 2019;41:991-1000.
- Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells.* 2007;25:2524–33.
- Yang Y, Zhang X, Wang Y, Zhang, Gumi Z. miR-20a reverses temozolomide resistance and inhibits cancer initiating cells phenotypes by degrading FAP- $\alpha$  in glioblastoma. *Oncol Lett.* 2018;15:7563–70.
- Fang L, Wang X, Sun B, Zhang X. Expression, regulation and mechanism of action of miR-17-92 cluster in tumor cells. *Int J Mol Med.* 2017;40:1624–30.
- Zhang GJ, Li Y, Zhou H, Xiao HX, Zhou T. miR-20a is an independent prognostic factor in colorectal cancer and is involved in cell metastasis. *Mol Med Rep.* 2014;10:283-91.
- Cui C, Cui Y, Fu Y, Ma S, Zhang S. Microarray analysis reveals gene and microRNA signatures in diabetic kidney disease. *Mol Med Rep.* 2018;17:61–8.