



**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**GLİOBLASTOMA HÜCRE HATLARINDA UYARILMIŞ PLURİPOTENT
KÖK HÜCRE (UPKH) KAYNAKLI EKSOZOMLARIN TERAPÖTİK
ETKİSİNİN ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Beyza YILMAZ**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ**

**İSTANBUL
Ekim 2022**



**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**GLİOBLASTOMA HÜCRE HATLARINDA UYARILMIŞ PLURİPOTENT
KÖK HÜCRE (UPKH) KAYNAKLI EKSOZOMLARIN TERAPÖTİK
ETKİSİNİN ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Beyza YILMAZ**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ**

**İSTANBUL
Ekim 2022**

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim/Anasanat Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Beyza YILMAZ tarafından hazırlanan “Glioblastoma Hücre Hatlarında Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH) Kaynaklı Eksozomların Terapötik Etkisinin Analizi” konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/10/2022

Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu:

İmzası

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ
Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Gözde KURU TÜRKCAN
Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Altay SAVALAN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tez yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zafer UTLU

Müdür

Glioblastoma Hücre Hatlarında Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Kaynaklı Eksozomların Terapötik Etkisinin Analizi

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 3	% 0	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	edoc.ub.uni-muenchen.de İnternet Kaynağı	<% 1
5	e-dergi.marmara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Mustafa İKİZEK, Ceyhun NURİ, Nimet Emel LÜLECİ. "Complementary and Alternative Medicine in Rheumatoid Arthritis: Yesterday,	<% 1

10/10/2022

TEZ ETİK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Glioblastoma Hücre Hatlarında Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH) Kaynaklı Eksozomların Terapötik Etkisinin Analizi” başlıklı bu çalışmayı başından sonuna kadar danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ’nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Beyza YILMAZ

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destekle gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam boyunca büyük özveriyle çalışmamı destekleyen, göstermiş olduğu sabır ve hoşgörüyle, bilgi, tecrübe ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışma sürecinde kullandığım uyarılmış pluripotent kök hücreleri bana temin eden Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi öğretim üyesi Prof. Dr. Tamer ÖNDER Hocam'a ve Doktora öğrencisi Gülben GÜRHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında, eksozom karakterizasyonu çalışmalarında bana destek olan Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Eczacılık Fakültesi, Dr. Öğr. Üyesi Altay SAVALAN Hocam'a ve yüksek lisans öğrencisi Hülya Serap MOĞUL'a desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde, madden ve manen her zaman yanımda olan sevgili annem, saygıdeğer babam, canım kardeşim, kıymetli ablam ve enişteme akademi yolunda destek ve sevgilerini esirgemedikleri için en derinden şükranlarımı sunarım.

Ekim, 2022

Beyza YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ETİK BEYANI	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
SEMBOLLER	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glial Hücreler.....	4
2.1.1. Oligodendrositler.....	4
2.1.2. Astrositler	5
2.1.3. Mikroglial Hücreler	5
2.1.4. Ependimal Hücreler	5
2.1.5. Schwann Hücreleri.....	6
2.2. Glioma.....	6
2.3. Glioblastoma	7
2.3.1. Glioblastoma Gelişmesinde Rol Alan Moleküler Yolaklar.....	9
2.3.1.1. MAPK	9
2.3.1.2. PI3K/Akt	11
2.3.1.3. Matriks metalloproteinazlar	12
2.3.2. Glioblastoma Tedavi Yaklaşımları	13
2.4. Kök Hücre	14
2.4.1. Embriyonik Kök Hücre	16
2.4.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre	16
2.5. Eksozom.....	18
2.5.1. Eksozom Biyogenezi	19

2.5.2. Eksozom Tedavi Yaklaşımı	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kimyasallar	22
3.1.2. Cihazlar.....	23
3.1.3. Sarf Malzemeler	23
3.1.4. Kitler	24
3.1.5. Primerler	24
3.2. Metot	25
3.2.1. Hücre Kültürü	25
3.2.1.1. Uyarılmış pluripotent kök hücre hattı	25
3.2.1.2. Glioblastoma hücre hattı	27
3.2.2. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu	28
3.2.3. MTT Testi	29
3.2.4. RNA İzolasyonu	30
3.2.5. cDNA Sentezi	32
3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)	33
3.3. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. UPKH ve LN18 Hücre Hatlarının Görüntüleri.....	35
4.2. Eksozom Karakterizasyonu	36
4.3. MTT Analizinin Değerlendirilmesi.....	37
4.4. LN18 Hücrelerinde Gen Ekspresyon Analizleri.....	38
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇLAR.....	43
7. ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	53

KISALTMALAR

A	: Absorbans
BAD	: Bcl-2 Associated Agonist of Cell Death
Bcl-2	: B-cell Lymphoma
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CCND1	: Cyclin D1
DLS	: Dynamic Light Scattering
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ECM	: Extracellular Matrix
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
ERK	: Extracellular Signal-Regulated Kinases
FBS	: Fetal Bovin Serum
GBM	: Glioblastoma
Grb-2	: Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
GZ-PZR	: Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ILV	: İntraluminal Vezikül
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
MAPK	: Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
MMP-2, 9	: Matriks Metalloproteinaz-2, -9
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mTORC1, 2	: Mammalian Target of Rapamycin Complex 1, 2
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum bromid
MVB	: Multivesicular Body
NKH	: Nöral Kök Hücre
NPH	: Nöral Progenitör Hücre
OPH	: Oligodendrosit Progenitör Hücre
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PKD1	: Phosphoinositide-dependent Kinase-1
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinase
PIP₂	: Phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphat

PIP₃	: Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
U	: Ünite
UPKH	: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
UPKH-ekz	: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Eksozomları
WHO	: World Health Organization



SEMBOLLER

μl	: Mikro litre
ng/μl	: Nanogram / mikrolitre
nm	: Nanometre
p/ml	: Partikül / mililitre



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Kimyasallar	22
Tablo 3.2. Cihazlar	23
Tablo 3.3. Sarf Malzemeler	23
Tablo 3.4. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	24
Tablo 3.5. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri.....	24
Tablo 3.6. UPKH Besiyeri İçeriği	25
Tablo 3.7. PBS-EDTA Oranı	26
Tablo 3.8. UPKH Dondurma Besiyeri İçeriği	27
Tablo 3.9. LN18 Tamamlanmış Besiyeri İçeriği.....	27
Tablo 3.10. LN18 Dondurma Besiyeri İçeriği	28
Tablo 3.11. cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri	32
Tablo 3.12. cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları.....	33
Tablo 3.13. GZ-PZR’de Kullanılan Reaktif Miktarları.....	33
Tablo 3.14. GZ-PZR Koşulları.....	33

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. NKH'lerden Farklılaşan Hücrelerin Şematik Özeti.....	3
Şekil 2.2. Gliomaların Köken Aldığı Hücelere Göre Sınıflandırılması	7
Şekil 2.3. GBM ve Tümöral Dokunun Hücrel Popülasyonu.....	9
Şekil 2.4. MAPK Sinyal Yolağı.....	10
Şekil 2.5. PI3K/Akt Sinyal Yolağı.....	11
Şekil 2.6. GBM'de MMP-2 ve MMP-9 Aktivitesinin Düzenlenmesinde Yer Alan Olası Sinyal Yolları.....	13
Şekil 2.7. Elde Edildiği Kaynağa ve Farklılaşma Potansiyeline Göre Kök Hücreler	15
Şekil 2.8. Pluripotent Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli	18
Şekil 2.9. Eksozom Biyogenezi	20
Şekil 3.1. UPKH-ekz'lerin LN18 Hücrelerinde Uygulanması ve GZ-PZR Analizi ..	31
Şekil 4.1. LN18 Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü	35
Şekil 4.2. UPKH'lerin Morfolojik Görüntüsü.....	36
Şekil 4.3. UPKH-ekz'lerin Boyut Analizi Sonucu	36
Şekil 4.4. UPKH-ekz'lerin Konsantrasyon Analizi Sonucu	37
Şekil 4.5. Kontrol ve UPKH-ekz Uygulanan LN18 Hücrelerinin MTT Analiz Sonucu (12+48 saat sonrası).....	37
Şekil 4.6. Kontrol ve UPKH-ekz Uygulanan LN18 Hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 Gen İfadesinin Analizi (12+48 saat sonrası)	38
Şekil 4.7. Kontrol ve UPKH-ekz Uygulanan LN18 Hücrelerinde EGFR, Raf-1 ve Akt Gen İfadesinin Analizi (12+48 saat sonrası)	39
Şekil 4.8. Kontrol ve UPKH-ekz Uygulanan LN18 Hücrelerinde BAD ve CCND1 Gen İfadesinin Analizi (12+48 saat sonrası).....	39

ÖZET

GLİOBLASTOMA HÜCRE HATLARINDA UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE (UPKH) KAYNAKLI EKSOZOMLARIN TERAPÖTİK ETKİSİNİN ANALİZİ

En ölümcül kanser türleri arasında görülen glioblastoma, sağkalımı oldukça düşük olan bir primer beyin tümörüdür. İlaç direnci ve kan beyin bariyerini geçme zorluğundan dolayı mevcut tedavilerle bile glioblastoma vakalarında sağkalım oldukça düşüktür. Mevcut tedavilerin yanı sıra kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen ve toksik etki oluşturmeyen eksozomlar, GBM tedavisi için umut vaat eden biyolojik bir araçtır. Yapılan daha önceki çalışmalar, embriyonik kök hücre kaynaklı eksozomların glioblastomada antitümörjenik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, embriyonik kök hücreler gibi etik problemler teşkil etmeyen uyarılmış pluripotent kök hücrelerden kaynaklanan eksozomların aynı etkiye sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle, yapılan bu tez çalışmasında, embriyonik kök hücrelere yakından benzeyen ve sınırsız çoğalma kapasitesine sahip olan uyarılmış pluripotent kök hücre kaynaklı eksozomlar, bir glioblastoma hücre hattı olan LN18 hücrelerinde uygulanmış ve hücre canlılığıyla birlikte GBM-ilişkili bazı genlerin ifadesi analiz edilmiştir. Bunun yanı sıra sınırsız çoğalan uyarılmış pluripotent kök hücrelerin kullanılmasıyla kaynağa bağlı düşük eksozom verimliliğinin önüne geçilmiştir. Elde edilen verilerle uyarılmış pluripotent kök hücre kaynaklı eksozomların GBM hücre canlılığını azlattığı ve GBM-ilişkili genler üzerinde etki ettiği gözlenmiştir. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destekle gerçekleştirilen bu tez çalışmasının sonuçları, anti-GBM etkisinin olduğu gözlenen uyarılmış pluripotent kök hücre kaynaklı eksozomların, GBM için potansiyel bir terapötik araç olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Eksozom, Glioblastoma, Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE THERAPEUTIC EFFECT OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL (IPSC) DELIVERED EXOSOMES IN GLIOBLASTOMA CELL LINES

Glioblastoma, which is among the deadliest types of cancer, is a primary brain tumor with a very low survival rate. The survival rate of glioblastoma cases is very low even with current treatments due to drug resistance and difficulty crossing the blood-brain barrier. Other than the existing treatments, exosomes that can easily cross the blood-brain barrier and do not have toxic effects are promising biological tools for GBM treatment. Previous studies have shown that embryonic stem cell-derived exosomes have anti-tumorigenic effects in glioblastoma. However, it is unknown whether exosomes originating from induced pluripotent stem cells, which do not pose ethical problems as embryonic stem cells, have the same effect. Therefore, in the thesis study, induced pluripotent stem cell-derived exosomes, which closely resemble embryonic stem cells and have unlimited proliferation capacity, were applied in LN18 cells, a glioblastoma cell line; and the expression of some GBM-related genes were analyzed along with cell viability. In addition, the use of indefinitely proliferating induced pluripotent stem cells has prevented low source-dependent exosome efficiency. With the obtained data, it was observed that induced pluripotent stem cell-derived exosomes reduced GBM cell viability and acted on GBM-related genes. The results of this thesis study, which was carried out with the support of Haliç University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics for scientific research and application studies, show that induced pluripotent stem cell-derived exosomes, which been shown to have anti-GBM effects, can be a potential therapeutic tool for GBM.

Keywords: *Exosome, Glioblastoma, Induced Pluripotent Stem Cell.*

1. GİRİŞ

Gliomalar, türleri hala araştırma konusu olan, çeşitli onkojenik mutasyonlara sahip, sinir sisteminin en yaygın gözlenen tümör hücreleridir. Bir takım histolojik varyasyonlar sonucu meydana gelen glioma hücreleri, 2007 Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) sınıflandırmasında I-IV arasında histolojik özelliklere göre derecelendirilir (Modrek et al., 2014). WHO sıralamasında IV. seviye glioma olarak nitelendirilen glioblastoma (GBM), agresif ve tedaviye direnci oldukça yüksek bir glioma alt tipidir. GBM, tüm beyin tümörleri arasında en yaygın ve prognozu en kötü olan kanser türüdür ve çoğu, kemoterapi ve radyoterapi gibi mevcut tedavilere karşı dirençli olup, nüksler olarak tekrar eder (Campos et al., 2016). Aynı zamanda, GBM tedavilerinde kullanılan ilaçlar önemli derecede toksik etkilere yol açar. Buna ek olarak, hastalığın ileri evrelerinde bu ilaçlara karşı hızlı bir şekilde direnç gelişir ve bu durum prognozun kötü olmasının sebeplerinden biridir. Bununla birlikte, hücrelerden salınan eksozomlar da taşıdığı nükleik asit ve proteinler aracılığıyla kanser hücrelerinin gelişmesinin önüne geçebilir.

Hücrelerin mikro-çevresindeki hücre dışı veziküller, hücreler arası iletişimi sağlayarak hücrelerin kaderini etkiler ve aktivitesine önemli derecede katkıda bulunur. Bu nedenle GBM gibi kanser hücreleri dahil olmak üzere, birçok hastalığın seyri üzerinde rol oynar. Eksozomlar, içerdiği nükleik asit (DNA, mikroRNA, mRNA), protein ve metabolitler gibi moleküller aracılığıyla kanser hücreleri üzerinde tümörijenik özelliklerin baskılanması gibi etkilere sahip olabilir. Özellikle, temeli pluripotent kök hücre olan embriyonik kök hücreler (EKH), mikro-çevreleri aracılığıyla başlıca GBM olmak üzere birçok onkojenik fenotiplerin baskılanmasına aracılık eder ve kanser hücrelerinin agresifliğini azaltır. EKH'lerden elde edilen eksozomlar GBM hücrelerinin canlılığını engelleyip, apoptozu teşvik edebilir (Zhu et al., 2019). EKH eksozomları, bu şekilde anti-tümör etkileri nedeniyle kanserde eksozom tedavisi için ilgi çekici bir yaklaşım olarak görülür. Ancak, EKH'lerle ilgili embriyoların yok edilmesi gibi etik tartışmalar bunların kullanımı sınırlamaktadır. Bununla birlikte, EKH'ler ile birçok yönden benzerlik gösteren uyarılmış pluripotent

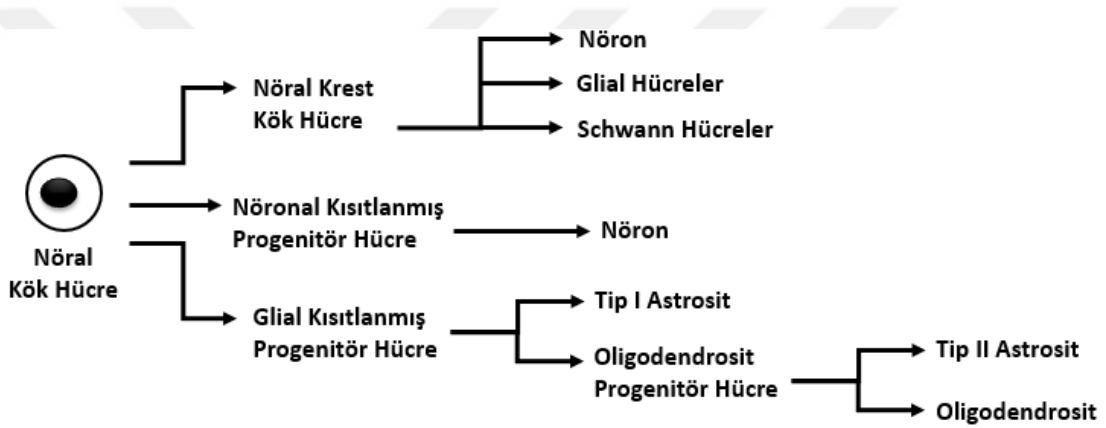
kök hücreler (UPKH) ile bu sınırlamaların önüne geçilebilir. Ayrıca, UPKH'ler de EKH'ler gibi sınırsız çoğalma kapasitesine sahip olduğundan eksozom kaynağı için oldukça uygun bir hücredir.

Eksozom bazlı hücresiz tedaviler, kaynak hücreye bağlı olan düşük eksozom üretkenliği gibi problemle karşı karşıyadır. Bu problemin üstesinden gelmek için kaynak hücre olarak, sınırsız kendini yenileme özelliğine sahip olan UPKH'ler kullanılacaktır. UPKH'ler, *in-vitro* kültür genişletilmesine yatkındır ve sahip oldukları bu sınırsız kendini yenileme özellikleriyle yüksek miktarlarda eksozom sağlar. Bu nedenle, UPKH eksozomları (UPKH-ekz'ler) sınırsız bir kaynak olarak bilinir. Ayrıca, doğası gereği toksik ve immünojenik olmamasının yanı sıra tümör oluşturmaması, UPKH-ekz'lerini eksozom bazlı tedavi için uygun bir araç kılmaktadır.

Bu avantajlarından yola çıkarak, glioblastoma hücrelerinde eksozom tedavisinin etkisini analiz etmek amacıyla, UPKH'lerden eksozom izole edilip, elde edilen eksozomlar (UPKH-ekz), LN18 GBM hücre hatları üzerinde uygulanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Nöral tüp, anatomik, doku ve hücrel olmak üzere 3 farklı düzeyde merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerine farklılaşır (Gilbert, 2000). İşlevsel sinir sisteminin oluşumu, nöroepitel hücrelerin yüksek düzeyde düzenlenmiş süreçler yoluyla çeşitli sinir sistemi hücre tiplerini üretmesini gerektirir (Dennis et al., 2019). Bu şekilde oluşan memeli sinir sistemi oldukça karmaşık bir yapı olmakla birlikte olağanüstü hücrel çeşitliliğe sahiptir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. NKH'lerden Farklılaşan Hücrelerin Şematik Özeti

Sinir sistemi gelişiminin hücrel düzeyinde oluşan bu hücreler, nörogenez ve gliogenez adı verilen süreçler sonucunda meydana gelir. Sinir sisteminin temelini oluşturan bu süreçler ile çeşitli sinir hücreleri (nöron) ve destek hücreleri (glial) hiyerarşik bir şekilde spesifikleşir. Hücrelerin nöronlara veya glial hücrelere farklılaşacağı belirlendikten sonra nöronal ve glial hücrelerin hangi alt tipini oluşacağına karar verilir ve devamında belirlenen özellikler, hücrelere spesifik hedefler verir (Gilbert, 2000). Nöral kök hücre (NKH) ve progenitör hücrelerden oluşan bu nöron ve glial hücreler sinir sisteminin temelini oluşturmakla birlikte insan beyin plastisitesine de önemli katkıda bulunur. Nöral parankimin iki ana hücrelerinden biri olan nöronlar, elektriksel olarak aktif hücrelerdir ve oldukça heterojen bir gruptur (Stogsdill and Eroglu, 2018). Nöronlar beyin fonksiyonunun temel merkezi olan elektrik sinyal iletimini sağlarken bu süreçte nöral parankimin diğer bir temel hücresi olan glial hücrelerden destek alırlar. Nöronları çevreleyerek fonksiyonlarına destek

olan glial hücreler, nöronal ağların korunmasını ve sinir sistemi içerisindeki rejenerasyonu sağlar (Jessen, 2004; Hanani and Verkhratsky, 2021). İnsan beyni bu şekilde 10^{12} 'den fazla glial hücreyle ilişkili nöronlara sahiptir (Gilbert, 2000). Bu nöron-glial hücre ilişkisi sayesinde sinir sistemi işlevselliğini korumuş olur.

2.1. Glial Hücreler

Sinir sisteminin destek hücreleri olarak bilinen glial hücreler, 1846'da Rudolf Virchow tarafından tanımlanmıştır. Nöronal fonksiyonlara destek olan glial hücreler aynı zamanda homeostazın korunmasını sağlar (Ludwig, 2022). Glial hücreler, nöronların aksine aksiyon potansiyeli üretemez, ancak sinyalizasyon, sinaptik yapı oluşumunun ve nöral devre plastisitesinin korunmasında rol oynar (Tan et al., 2017). Glial hücreler, hücreler arası elektriksel iletişime doğrudan katılmasalar da elektrik sinyalinin dağılmasını önlemek için nöronal aksonlar üzerinde yalıtım yapar (Gilbert, 2000). Nöronlara fiziksel ve metabolik destek sağlayan glial hücreler oldukça heterojen bir gruba sahiptir. Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'de, oligodendrosit, astrosit, mikrogliya ve ependimal hücreler dahil olmak üzere 4 farklı hücre grubu merkezi nöroglial hücreleri temsil ederken, periferik sinir sistemi (PSS)'de Schwann hücreleri periferik nöroglial hücreleri temsil eder (Doğanyigit ve Okan, 2021).

2.1.1. Oligodendrositler

Oligodendrositler, MSS'de miyelin kılıf oluşmasından sorumlu glial hücrelerdir. Subventriküler hücreler tarafından oluşan oligodendrosit progenitör hücreleri (OPH)'nden farklılaşan oligodendrositler, miyelin kılıf oluşturarak aksonlar için destek ve yalıtım sağlarlar. Oligodendrositler bu şekilde aksiyon potansiyelinin iletim hızını artırır (Yamazaki, 2019). Oligodendrositler aynı zamanda nöronal aktiviteye cevap verebilir ve uyarlanabilir tepkileriyle hafızaya dahil olabilir (Yamazaki, 2019). MSS nöronlarının soma ve aksonlarıyla yakın etkileşimde olan oligodendrositler, beyindeki birçok patolojik süreçte ölümle sonuçlanabilir, bu durum başta Multiple Skleroz olmak üzere çeşitli dejeneratif hastalıkların ilerlemesine katkıda bulunur (Clemente et al., 2013). Heterojen bir grup olan oligodendrositler; aksonal lif yolları arasında bulunan interfaziküler oligodendrositler, perinöronal oligodendrositler ve perivasküler oligodendrositler olmak üzere 3 farklı gruba ayrılır ve MSS'nin büyük bir çoğunluğunu temsil eder (Hayashi and Suzuki, 2019).

2.1.2. Astrositler

Astrositler beyinde en fazla bulunan glial hücrelerdir. Astrositler beyinde boşluk bağlantıları olarak bilinen ‘Gap Junctions’ ile iletişim kurarlar ve bu şekilde sinaptik kimyasalların salınıp alınmasını sağlarlar (Ludwig, 2022). Astrositlerin MSS’de hücre dışı iyon konsantrasyonu, beyin kan akışının düzenlenmesi ve sinaptik ilettime yardımcı olmak gibi önemli rolleri vardır (Tan et al., 2017). Birçok uzantıya sahip olan astrositler, bu uzantıları sayesinde nöronlarla temas kurar ve böylece komşu nöronlara elektrik sinyallerinin yayılmasına katkıda bulunur (Ludwig, 2022). Astrositler aynı zamanda bu uzantılarıyla kan beyin bariyeri (KBB) yapısı ve işlevinde de rol alır (Dotiwala ve ark., 2022). Homeostatik rolü olan astrositler, KBB’de iltihaplanmaya tepki verir ve beynin beslenmesini sağlar (Hasel and Liddelow, 2021). Buna ek olarak, astrositler sinaps oluşumu ve plastisitesinde başlıca rol alırlar (Freeman, 2010). Beyinde başlıca 3 tipe ayrılan astrositler (protoplazmik astrositler, fibröz astrositler ve radyal astrosit ve yüzey-ilişkili astrositler gibi özelleşmiş astrositler), oldukça heterojendir ve beyin parankiminde en fazla bulunan destek hücreleridir (Khakh and Deneen, 2019).

2.1.3. Mikroglial Hücreler

Mikroglialar MSS’nin immün hücreleridir. MSS hücrelerinin %5-10’luk kısmını temsil eden mikroglial hücreler embriyo yolk kesesinde ilk oluşan doku makrofajlarından biridir ve buradan beyne göç ederek kendini yeniler (Frost and Schafer, 2016). MSS’de seyrek bir şekilde görülen mikroglial hücreler, uzun çekirdeğe sahip monosit kökenli hücrelerdir (Ludwig, 2022). Mikroglialar mezenkimal kök hücrelerden farklılaşır ve MSS makrofajları olarak yabancı madde veya organizmaları fagosite ederek uzaklaştırırlar (Ludwig, 2022). Mikroglialar, immün rollerinin yanı sıra, OPH’lerin çoğalıp oligodendrositler farklılaşma sürecine de katkıda bulunur (Frost and Schafer, 2016). Mikroglialar aynı zamanda astrositlerin farklılaşmasına ve damar sisteminin gelişmesine destek olur (Frost and Schafer, 2016). Özetle, mikroglial hücreler, MSS’nin az bir kısmını temsil etse de MSS gelişiminde kritik roller oynar.

2.1.4. Ependimal Hücreler

Ependimal hücreler, beyin parankiminde yerleşik gösteren ventriküler sistemi temsil eden hücrelerdir (Ludwig, 2022). Embriyonik gelişimde aktif bir şekilde çoğalan ependimal hücreler nöroepitelyal hücreler veya radyal glia hücrelerinden

çoğalır (Tan et al., 2017). Ependimosit olarak da bilinen ependimal hücreler beyin omurilik sıvısı (BOS)'nın içeriğini düzenlenler, salgılanmasını sağlar, BOS ile sinir dokuları arasındaki bağlantıda rol alır ve BOS ile beyin arasında bir bariyer olarak bulunur (Ludwig, 2022). Ependimal hücreler bu şekilde yabancı maddeleri detoksifiye ederek BOS ve beyin arasındaki bağlantının korunmasını sağlar. Ependimal hücreler aynı zamanda bir nöral progenitör hücre (NPH)'dir ve bu şekilde nöronal alt tiplere ve çeşitli glial hücrelere farklılaşabilir, bu nedenle rejeneratif tıpta birçok hastalık için NPH kaynağı olabilir (Moreno-Manzano, 2020).

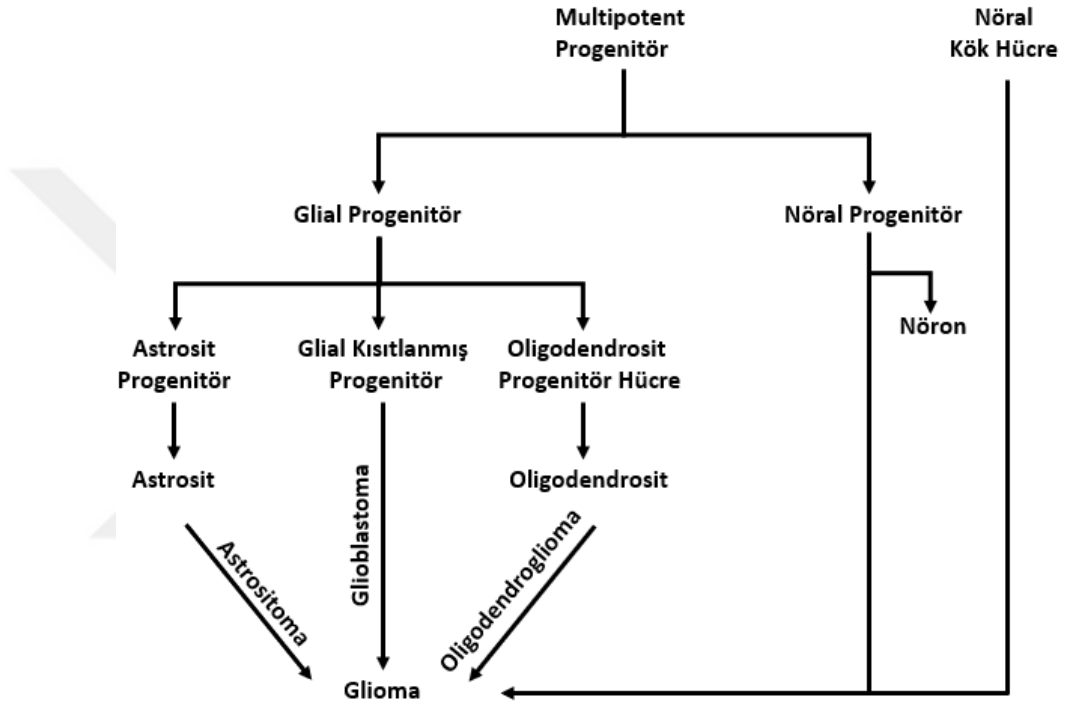
2.1.5. Schwann Hücreleri

Nöronal aksonlara destek sağlayan ilk glial hücrelerden biri de Schwann hücreleridir. Schwann hücreleri, PSS'de oligodendrositleri temsil eden glial hücrelerdir. Oligodendrositler, MSS'de aksonların yalıtımını sağlarken, PSS'de bu görevi Schwann hücreleri üstlenir. Buna ek olarak, tek bir oligodendrosit hücresi birden fazla aksonun yalıtımını sağlarken, Schwann hücresi tek bir aksonun miyelinizasyonunu sağlar (Ludwig, 2022). Ayrıca, oligodendrositler OPH'lerden farklılaşırken Schwann hücreleri nöral krestten göç eden hücrelerin yanı sıra, periferik nöronlar, endokrin hücreler ve melanositler dahil olmak üzere oldukça çeşitli hücrelerden farklılaşır (Kidd et al., 2013). Miyelinasyona ek olarak, PSS'nin korunmasında da görev alan Schwann hücreleri, miyelinli veya miyelinsiz olmak üzere iki türe sahiptir (Bhatheja & Field, 2006). Her iki hücre tipi de PSS nöronlarının aksonlarının yenilenmesini sağlayarak PSS nöronlarının korunmasını sağlar (Bhatheja & Field, 2006).

2.2. Glioma

Glioma, MSS ve PSS'de en yaygın görülen tümörleri temsil eder ve önemli mortalite ve morbiditeye sahiptir (Ostrom et al., 2014). Histolojik olarak glial hücrelere benzeyen gliomalar, glial hücre tipine göre sınıflandırılırlar (Chen et al., 2017). Gliomalar, NKH'ler, NPH'ler, astrosit ve oligodendrositler dahil olmak üzere çeşitli hücrelerden köken alırlar (Şekil 2.2.). Genellikle astrosit ve oligodendrositlerden gelişen gliomalar, malign beyin tümörlerinin %75'ini temsil eder (McNeill, 2016). 2007 WHO sınıflandırmasında, ana glial tümörleri 4 gruba ayrılır: Sınırlı dereceli astrositomlar (I. aşama), oligodendrogliom ve astrositomlar (II. aşama), anaplastik astrositoma ve oligodendrogliomalar (III. aşama) ve malin gliomaların en agresif alt tipi olan IV. aşama glioblastomalar (Chen et al., 2017). Glioma hücrelerinin

yaklaşık olarak yarısını, histopatolojik olarak sınıflandırıldığında en agresif alt tipi olarak tanımlanan glioblastomalar oluşturur (McNeill, 2016). GBM'ler, en ölümcül kanser türleri arasında görülür ve 2007 Dünya Sağlık Örgütü birincil beyin tümörleri sınıflandırmasına göre IV. derece glioma olarak nitelendirilir (Louis et al., 2007). Bir merkezi sinir sistemi neoplazmı olan GBM'ler, MSS tümörleri arasında en yaygın görülen ve en agresif karaktere sahip olan kanser hücreleridir (Wirsching et al., 2016; Wang et al., 2019).



Şekil 2.2. Gliomaların Köken Aldığı Hücelere Göre Sınıflandırılması

Kaynak: Jha M.K. and Suk, K. (2013)'ten uyarlanmıştır

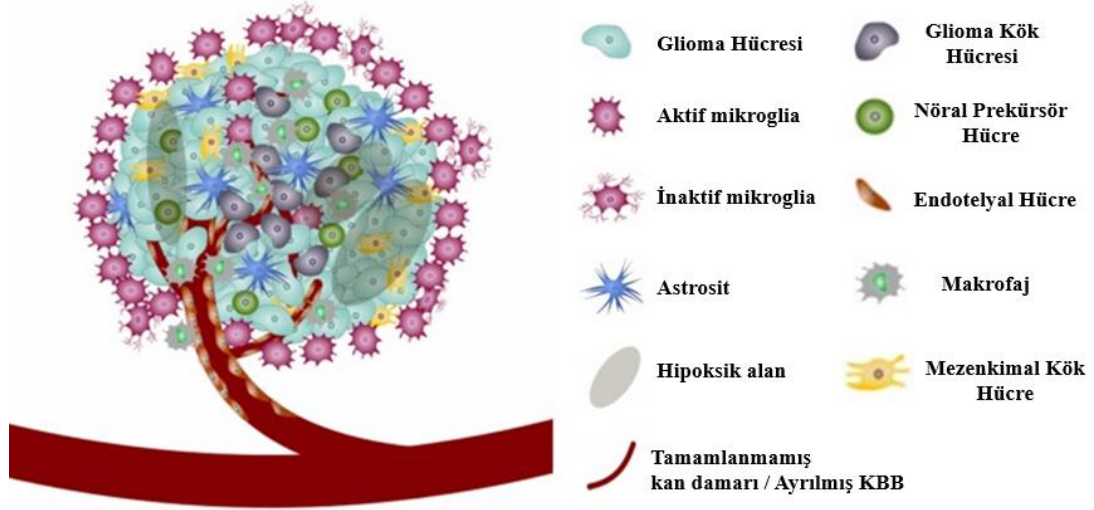
2.3. Glioblastoma

Glioblastoma, histopatolojik özellikleri, yüksek proliferasyon ve mitotik aktivitesi nedeniyle WHO sıralamasında IV. aşama malignite olarak tanımlanmıştır (Louis et al., 2016). Astrosit, oligodendrosit, mikroglia gibi çeşitli glial hücrelerden gelişen GBM, kanser kök hücrelerinin alt popülasyonlarından da gelişir ve oldukça agresif bir primer malign tümördür (D'Alessio et al., 2019). Oldukça düşük bir sağ kalım oranına sahip olan GBM, standart kombinasyon tedavileriyle bile ortalama sadece 15 aylık bir hayatta kalma süresine sahiptir (Caniglia et al., 2021). Yaş arttıkça düşen sağ kalım oranı, 2 yıl için %26-33 ve 5 yıl için %4-5'tir. Tüm insan kanserleri arasında en öldürücü olanlardan biri olan GBM, nöroglial kök/progenitor hücrelerden

kaynaklanan intrinsik beyin tümörüdür. GBM'ler tipik olarak hızlı yayılır ve yüksek infiltratif kapasitesiyle hastalığın yıkıcılığını artırır. GBM'ler aynı zamanda bilişsel işlev üzerindeki kötü yansımaları sebebiyle de yaşam kalitesini düşürür (Soomro et al., 2017). GBM'lerin yüksek göç kapasitesi, uzun mesafelerde yeni kitleler oluşturmaya, hastalığın daha da agresifleşmesine ve tedavinin gittikçe zorlaşmasına sebep olur (Lara-Velazquez et al., 2017). Bu özellikleri, GBM'lerin mevcut tedavilere yüksek direnç göstermesine sebep olur, tamamen yok edilmesini imkânsız bir hale getirir ve nüks oranını artırır (Lara-Velazquez et al., 2017). Ayrıca, KBB'yi aşmak için yüksek dozda verilen anti-GBM ilaçları, önemli derecede yan etkilere yol açar. Bununla birlikte, mevcut tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, GBM'nin hala oldukça kötü prognoza sahip, en yıkıcı tümörlerden biri olması ciddi bir sorun teşkil eder.

Beynin GBM içeren bölgeleri, reaktif astrosit, mikroglia, oligodendrosit ve enflamatuvar hücreler dahil olmak üzere çeşitli neoplastik hücreler içerir (Şekil 2.3.). Bu nedenle, oldukça agresif bir karaktere sahip olan GBM, terapötik ilaçlara direçli olduğu gibi, cerrahi müdahalenin ardından rejeksiyon sınırları içerisinde kendini yenilemeye devam eder (D'Alessio et al., 2019). Bu durum, beynin beyaz maddesinde bulunan nöronları da etkiler ve bunun sonucunda nöronal gelişim ve nöronal migrasyonda bozukluk meydana gelebilir (Buckingham et al., 2011; D'Alessio et al., 2019).

Tümör kütlesi, hızlı bir şekilde çoğalan tümör hücrelerinin yanı sıra, neoanjiyogenez ile de karakterizedir ve bu mikro ortam, endotelial hücreler, perisitler, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler ve reaktif glial hücrelerin yanı sıra GBM kanser kök hücresi ve peritümöral kanser kök hücresi gibi çeşitli kanser kök hücrelerini barındırır. Bu mikro ortam GBM prognozunun kötü olmasına katkıda bulunur (D'Alessio et al., 2019).



Şekil 2.3. GBM ve Tümöral Dokunun Hücresel Popülasyonu

Kaynak: Uyar, R. (2022)

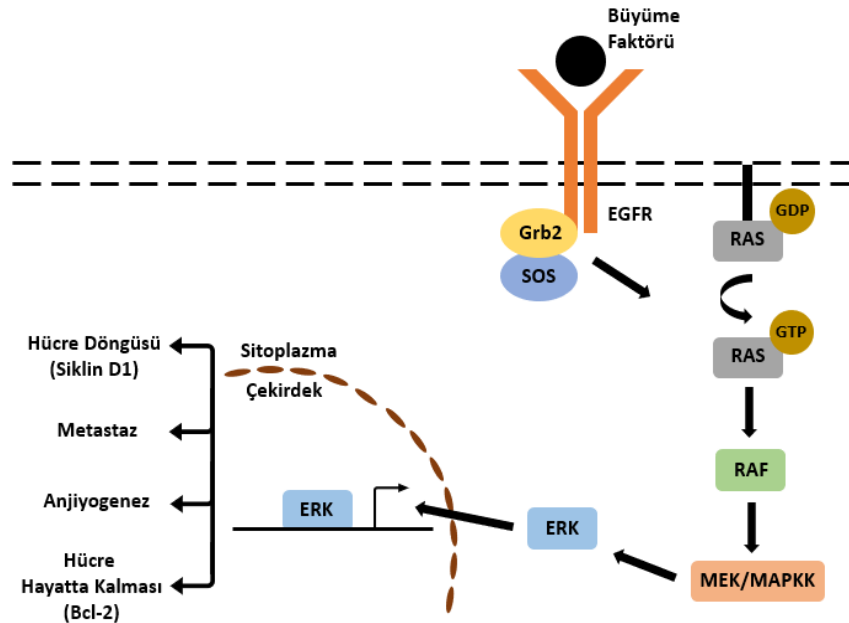
2.3.1. Glioblastoma Gelişmesinde Rol Alan Moleküler Yolaklar

Genomik profillem ve Kanser genom atlas projesi tarafından yapılan gen sekans analiziyle GBM'nin genetik profilinin ortaya çıkarılmasıyla primer ve sekonder GBM'lerin çoğunun p53, retinoblastoma, Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz (MAPK) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Protein Kinaz B (Akt) gibi epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR) yolaklarında rol alıp proliferasyona ve hücre sağ kalımına yol açan genlerde birtakım değişikliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Parsons et al., 2008; Davis, 2016). GBM'de meydana gelen invazyon ve anjiyogenez gibi çeşitli tümörijenik süreçler, bu moleküllerin yanı sıra matriks metalloproteinaz (MMP)'ler gibi proteolitik enzimler aracılığıyla da meydana gelir (Das et al., 2011).

2.3.1.1. MAPK

EGFR, hücre döngüsü, hücresel farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol alan bir eritroblastoz onkogen B reseptör tirozin kinaz (RTK)'dır (Li et al., 2016; Sigismund et al., 2018). GBM vakalarının %57'sinde kontrolsüz EGFR amplifikasyonu, mutasyon ve bunun gibi çeşitli genetik değişiklikler mevcuttur (Wagle et al., 2021). EGFR aktivasyonu, MAPK ve PI3K/Akt dahil olmak üzere birçok yolağın aktivasyonuna yol açar. Yüksek seviyede EGFR ekspresyonu gösteren primer GBM'nin çoğu EGFR'ın alt seviye yolaklarındaki transkripsiyon faktörleriyle ilişkilidir.

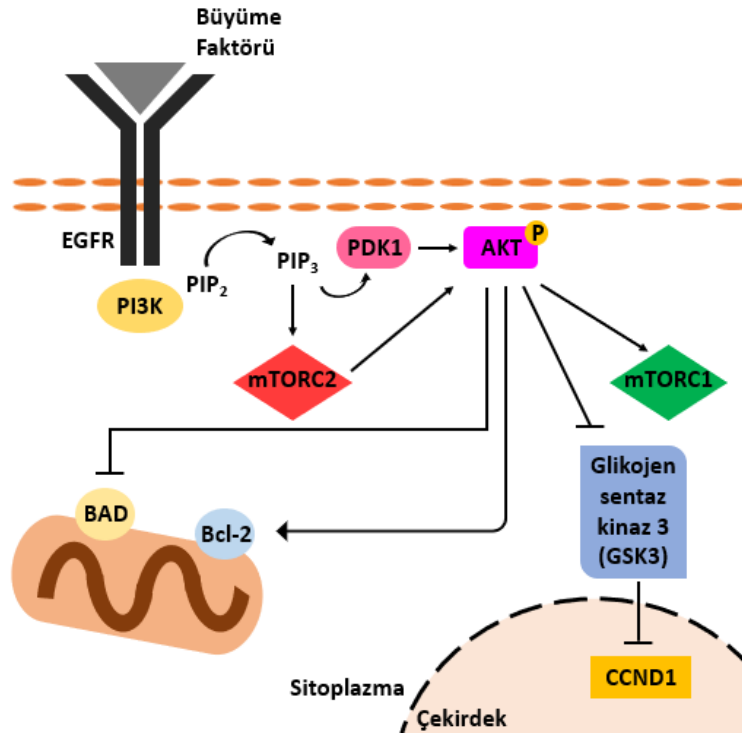
MAPK, başlıca hücre büyümesi ve çoğalmasının düzenlenmesinde rol alan proliferatif bir yoldur. Otofosforilasyon ile kendi serin ve treonin rezidülerini aktive eden MAPK yolağında, RTK, büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (growth factor receptor-bound protein 2- Grb2) ve SOS adaptör proteinleriyle küçük GTPaz ailesine ait olan Ras proteinini aktive eder, böylece aktifleşen Ras proteinini, bir serin treonin kinaz olan Raf proteinini aktifleştirir. Raf proteinini ise hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (extracellular signal-regulated kinases-ERK)'ı aktive eden MAPK Kinaz (MAPKK)'ı aktive eder (Şekil 2.4.). Bu şekilde aktive olan MAPK yolağı, Siklin D1 (Cyclin D1-CCND1) gibi hücre döngüsü bileşenleri ve B hücreli lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2-Bcl-2) gibi çoğu hücrede anti-apoptotik rolü olan bir faktörün aktivasyonuna aracılık eder. Sonuçta, MAPK yolağında yer alan transkripsiyon faktörleri ve hedeflediği genler GBM dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde proliferasyon, göç ve invazyon gibi süreçlere katkıda bulunur. Yapılan çalışmalar, özellikle Raf-1 proteininin GBM gelişmesine katkıda bulunduğunu ve bu serin treonin kinazın inhibe edilmesinin kombine tedavilerin etkisini artırdığını göstermiştir (Sherman et al., 2014). GBM'de yüksek seviyede aktivasyon gösteren Raf-1, aynı zamanda, bir tümör baskılayıcı olan alternatif okuma çerçevesinin aktivasyon kaybıyla iş birliği yapar ve glioma/glioblastomayı indükler (Lyustikman et al., 2008).



Şekil 2.4. MAPK Sinyal Yolağı

2.3.1.2. PI3K/Akt

PI3K/Akt, GBM ile ilişkili bir diğer yolaktır. MAPK ile paralel yollardan biri olan PI3K/Akt yolağı, MAPK gibi, başlıca hücre büyümesi ve çoğalmasıyla ilişkili bir yolaktır. Proliferatif bir yolak olan PI3K/Akt yolağı, kanser vakalarının çoğunda anormal bir şekilde aktive olur ve bu nedenle tümör gelişmesine katkıda bulunur. PI3K, insülin reseptör substratı gibi bir adaptör proteinle hücre membranına taşınır ve RTK ile etkileşime girerek fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-PIP₃) üreten fosfatidilinositol 4,5-bifosfatın (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-PIP₂)'yi aktiveleştirir (Janku et al., 2018). Ardından, hem fosfoinositide bağımlı kinaz-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1-PDK1) hem de AKT membrana transfer edilir ve bu durum PDK1'in aktivasyon döngüsünün Akt'ı aktive etmesine yol açar (Şekil 2.5.). Rapamisin kompleksinin memeli hedefi 1 (mammalian target of rapamycin complex 1-mTORC1)'i aktive eden Akt, aynı zamanda mTORC2 aracılığıyla da aktive edilebilir (Sun et al., 2020). Aktifleşen Akt, bir pro-apoptotik faktör olan Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti (Bcl-2 associated agonist of cell death-BAD) gibi bileşenin baskılanmasına yol açar. Aynı zamanda, fosforillenmiş Akt, Raf-1 aktivasyonu ile iş birliği yaparak GBM oluşumuna katkıda bulunur (Lyustikman et al., 2008).

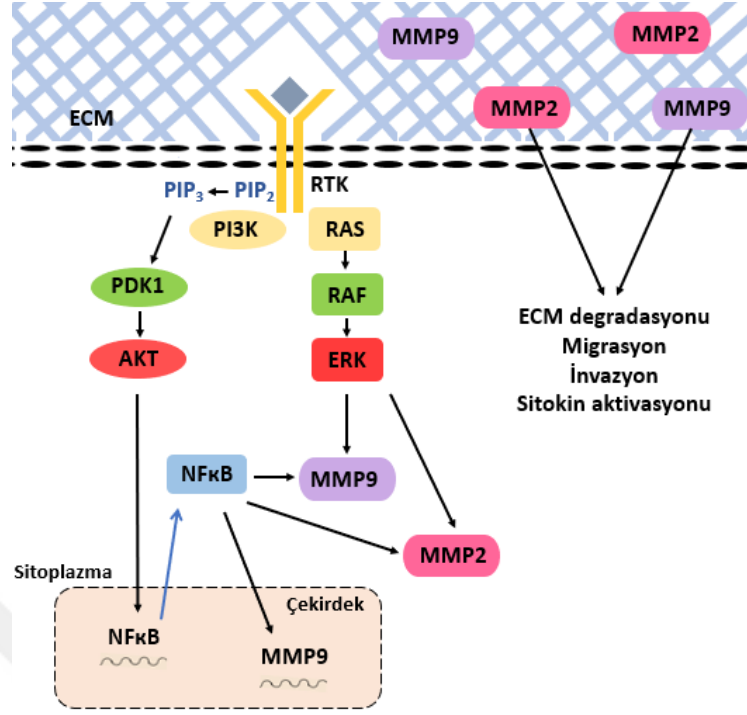


Şekil 2.5. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

2.3.1.3. Matriks metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar, hücre dışı matriks (extracellular matrix-ECM)'i düzenleyen çinko bağımlı endopeptidaz ailesidir (Cui et al., 2018). MMP'ler, hücre yüzeyindeki kolajen ve elastin gibi biyoaktif molekülleri etkileyerek hücre dışı matriksin bozulmasına yol açar (Cui et al., 2018). Aynı zamanda çeşitli sinyal yollarını modüle edebilen MMP'ler, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve immün yanıt gibi birçok hücresel süreçte rol oynar (Cui et al., 2018; Ahir et al., 2020). MMP'lerin ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler, GBM dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi süreçlerin gerçekleşmesinde rol oynar (Chacko, 2011).

En agresif beyin tümörü olan GBM'de çoklu MMP'lerin önemli ölçüde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Pullen et al., 2018). Proteolitik bir enzim alt grubu olan MMP'ler, GBM'de çeşitli istila programlarının aktivasyonuna sebep olur (Bansal et al., 2006). Bu MMP'ler arasında en çok matriks metalloproteinaz-2 ve -9 (MMP-2) ve (MMP-9) GBM ile ilişkilendirilmiştir. Hem tümör hücresinde hem de endotelial hücrelerde eksprese olan MMP-2 ve MMP-9, PI3K/Akt ve MAPK gibi proliferatif yolların aktivasyonu ile indüklenebilir (Ferrer et al., 2018). Böylece, indüklenen MMP-2 ve MMP-9, ECM'nin degradasyonu, sitokin aktivasyonu ve hücre göçü gibi birçok süreci tetikler (Şekil 2.6.). Sonuçta, MMP-2 ve MMP-9, GBM hücrelerinin hücre istilasını kolaylaştırır ve anjiyogenezi tetikleyerek kötü prognoza katkıda bulunur (Du et al., 2008; Xue et al., 2017; Ahir et al., 2020).



Şekil 2.6. GBM'de MMP-2 ve MMP-9 Aktivitesinin Düzenlenmesinde Yer Alan Olası Sinyal Yolları

2.3.2. Glioblastoma Tedavi Yaklaşımları

Beyinde görülen tümörlerin en agresifi olan GBM, tedavisi oldukça zor bir primer beyin tümörüdür ve çoğunlukla ölümlü sonuçlanır. 2005'te yapılan bir tedavi çalışmasıyla, GBM tanısı koyulmuş hastalarda temozolamid ve eşzamanlı kemoradyasyonun GBM üzerindeki rolü belirlendiğinden bu yana, bu yaklaşım üzerinde önemli bir gelişme kat edilmemiştir (Stupp et al., 2005; Ou et al., 2021). Daha sonra yapılan çalışmalarda kullanılan bevacizumab gibi antikorların da standart tedaviyle kombine uygulanmasının genel bir sağkalım yararı göstermediği görülmüştür (Chinot et al., 2014; Ou et al., 2021). Cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyasyon gibi standart tedavilere karşı dirençli olan GBM, nüks ederek gelişmeye devam eder ve 15-20 aylık bir sağkalımla sonuçlanır (Stupp et al., 2005; Ou et al., 2021).

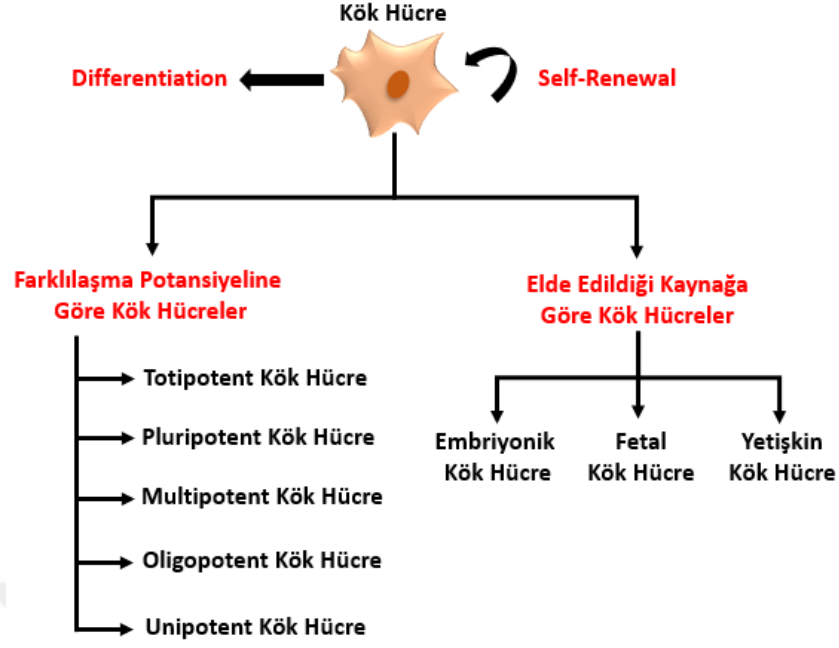
GBM tedavisindeki ana engel kan beyin bariyeridir. Yalnızca küçük (<500 Da ve <400 nm) ve lipofilik moleküllerin geçişine izin veren KBB, bütünlüğünü, damar duvarlarında bulunan ilaç direnci proteinleri gibi ATP bağlayıcı transport proteinleriyle destekler (Ou et al., 2021). Bu nedenle, KBB, GBM tedavisinde alınacak kritik bir hedeftir. Bu amaç doğrultusunda, KBB engelini aşıp, aynı zamanda GBM'yi

tedavi edebilecek, nanoparçacık gibi çeşitli moleküller geliştirilerek GBM tedavisini geliştirmeye yönelik çalışmalar devam etmektedir (Ou et al., 2021). Sentetik nanoparçacıkların yanı sıra, biyolojik kökenli nanoparçacık olan eksozom, lipofilik bir molekül olmakla birlikte, yaklaşık 30-100 nm büyüklüğünde olup KBB'yi geçebilir. Buna ek olarak, eksozomlar GBM patolojisinde yer alan birçok molekülü hedef alıp GBM hücrelerini tedavi edebilecek çeşitli biyomolekül barındırır ve toksisiteden yoksundur (Murphy et al., 2021). Bu nedenle, eksozomlar, GBM tedavisinde yeni ve umut vaat eden bir yaklaşım olarak görülebilir.

2.4. Kök Hücre

Bir organizmada, kök hücreler, somatik hücreler ve germ hücreleri olmak üzere 3 farklı hücre türü bulunmaktadır (Can, 2021). Kök hücreler, farklılaşmamış hücreler olarak, yaşamın embriyonik, fetal ve yetişkin dönemlerinde çeşitli hücrelere farklılaşan hücrelerdir (Kolios and Moodley, 2012). Kök hücreler farklılaşma (differentiation) yeteneklerine ek olarak, kendini yenileme (self-renewal) özelliğine de sahiptir. Yaşamın öncüsü olan kök hücreler, bir canlının hayatı boyunca her döneminde aktif bir şekilde çoğalır ve klon oluşturabilir. Sonuç olarak, kök hücreler kendilerine özdeş hücreler ve aynı zamanda daha sınırlı bir potansiyele sahip hücreler de üretebilir (Lanza ve Atala, 2014). Kendi yedeğini meydana getirmesiyle birlikte yenilenecek dokuya ait hücreler de oluşturabilen kök hücreler, aynı zamanda dokuların yenilenmesi ve onarımını da sağlar (Can, 2021).

Farklı potansiyellere sahip olan kök hücreler, başlıca, elde edildiği kaynak ve farklılaşma potansiyeli olmak üzere iki gruba ayrılır. Kök hücreler, embriyonik, fetal ve yetişkin olmak üzere 3 farklı kaynaktan elde edilebilir. Bunun yanı sıra, kök hücreler, totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent gibi oldukça çeşitli plastisiteye sahip kaynaklara sahiptir (Şekil 2.7.). Bu kaynaklar farklı gen aktivasyon kapasitesine sahip oldukları için farklılaştıkları hücre çeşitliliği bakımından farklılık gösterirler (Bacakova et al., 2018).



Şekil 2.7. Elde Edildiği Kaynağa ve Farklılaşma Potansiyeline Göre Kök Hücreler

Totipotent hücreler, en yüksek gelişim potansiyeline sahip kök hücrelerdir. Memelilerde zigot ve 2-4 hücreli blastomere dönüşebilen totipotent hücreler, organizmada bulunan tüm hücre tiplerine farklılaşabilir ve böylece tüm bir organizmayı oluşturabilir. Pluripotent kök hücreler, totipotent kök hücrelerden farklı olarak, plasentayı oluşturamazlar, ancak plasenta dışında her dokuyu oluşturma kapasitesine sahiptir (Bacakova et al., 2018). Oldukça yüksek bir proliferasyon kabiliyetine sahip olan pluripotent kök hücreler, aynı zamanda 3 farklı germ katmanından türetilen hücrelere de farklılaşma yeteneğine sahiptir (Liu et al., 2020). Pluripotent kök hücrelerin aksine, multipotent kök hücreler sadece belirli bir soya özel hücreleri oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Sobhani et al., 2017). Mezenkimal kök hücreler, NKH'ler ve hematopoetik kök hücreler multipotent kök hücreye örnek verilebilir. Multipotent kök hücreler, doku onarımında kritik bir role sahip olduğundan, omurilik yaralanması ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere birçok dejenerasyonda tedavi amaçlı kullanılabilir (Sobhani et al., 2017). Oligopotent kök hücreler, farklılaşma potansiyeli açısından multipotent kök hücrelere benzerdir ve belirli bir dokuya ait hücrelere farklılaşabilir. Ancak, multipotent kök hücrelerin aksine, oligopotent kök hücreler belirli bir doku içerisinde yalnızca 2 veya daha fazla soya farklılaşabilir (Kolios & Moodley, 2012). Unipotent kök hücreler, temel kök hücrelere sahip, ancak yalnızca 1 spesifik hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir.

Epidermal kök hücreler ve yalnızca olgun kas hücrelerini oluşturan kas kök hücreleri unipotent kök hücrelere örnek verilebilir.

2.4.1. Embriyonik Kök Hücre

Embriyonun döllenmesinden yaklaşık 72 saat sonra morula evresi, bu evreden yaklaşık 12-15 saat sonra 32 hücreli embriyo ve hemen ardından blastosist evresi gelir (Can, 2021). Embriyonik kök hücreler, 5-6 günlük bir blastosistin iç hücre kütlelerinde yer alan, pluripotent kök hücrelerdir (Young, 2011). Sonsuz çoğalma kabiliyetine sahip olan EKH'ler, aynı zamanda embriyo gövdesine ait tüm doku ve organ sistemlerini oluşturabilme kapasitesine sahiptir. EKH'ler, kendiliğinden farklılaşmaya başlayarak embriyonumsu cisim oluşturur ve ardından endodermal farklılaşma başlar. Endodermal farklılaşma sonucunda bazal laminada bulunan hücreler yaşamını sürdürürken iç kısımdaki hücreler apoptoza gider ve bu durum kistik bir yapının oluşumuna sebep olur. Bu evreden sonra 3 germ tabakası hücreleri meydana gelir. *In vitro* koşullarda EKH'nin kendiliğinden farklılaşma yolu engellenmediği takdirde, kültürde embriyonumsu cisimde bulunan hücreler farklılaşmaya başlar ve hücreler apoptoza gider (Can, 2021). Bu nedenle EKH kültür koşullarında hücre kaybını ve farklılaşmayı minimize etmek için Y-27632 gibi küçük moleküllerle Rho-ilişkili kinaz yolağını inhibe etmek gerekmektedir (Watanabe et al., 2007).

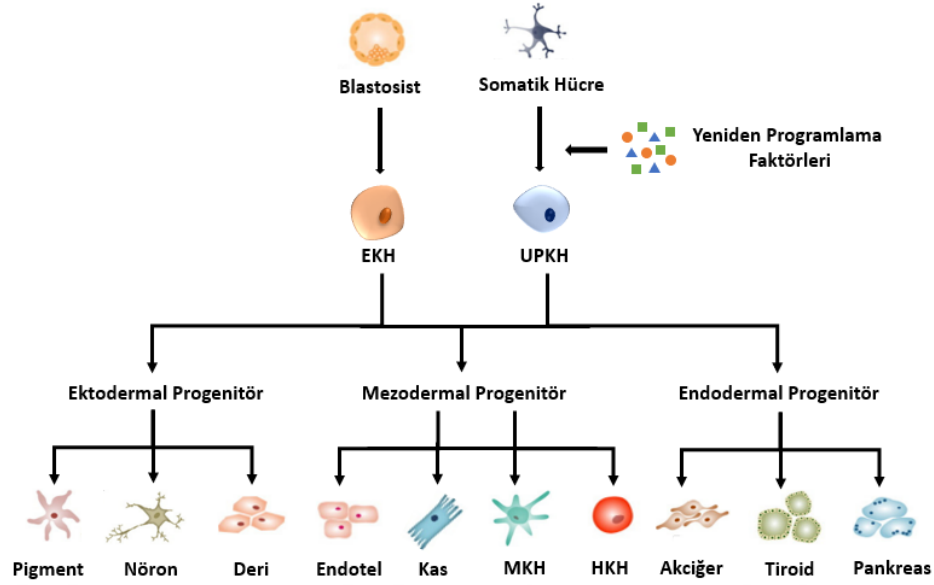
Pluripotensi kapasitesini sonsuza kadar koruyabilen EKH'ler, ilaç keşfi ve çeşitli insan hastalıklarında kullanım potansiyeline sahiptir. Bu nedenle birçok hastalığın tedavisinde oldukça umut verici bir yaklaşım olarak görülür. Ancak, tedavide doku reddi gibi problemler ve embriyoların kullanımının teşkil ettiği etik sorunlar EKH'lerin kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, araştırmacılar herhangi bir etik problemler taşımayacak şekilde, hastaya ait somatik hücrelerden pluripotent hücre elde etme çalışmalarına başladılar. Bu şekilde ilk uyarılmış pluripotent kök hücreler 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka tarafından üretilmiştir (Takahashi and Yamanaka, 2006). Sonuçta hem EKH'lerin yerine geçebilecek hem de etik problem teşkil etmeyen bir pluripotent hücre kaynağı üretilmiş ve çeşitli tedavi çalışmalarında kullanılmıştır.

2.4.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

2006 yılında, Yamanaka ve Takahashi tarafından, sonuna kadar farklılaşmış fibroblastların pluripotent kök hücrelere yeniden programlanabileceği gösterilmiştir

(Takahashi and Yamanaka, 2006). Retrovirüs aracılığıyla Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 faktörlerinin fibroblast hücrelerinde zorlu ifadesiyle bu hücreler UPKH'lere yeniden programlanmıştır. Daha sonraki yıllarda aynı süreç farklı transkripsiyon faktörlerince geliştirilmiş ve insan hücrelerinde başarıyla uygulanmıştır (Yu et al., 2007). Sonuçta, somatik bir hücre, pluripotent düzeye getirilerek farklılaşmada geriye gidilmiştir (Can, 2021). UPKH'ler, EKH'lere benzer bir şekilde vücuttaki her çeşit hücreye farklılaşabilir ve sınırsız çoğalma kapasitesine sahiptir. UPKH'ler aynı zamanda, morfolojik ve büyüme şekli olarak da EKH'lere yakından benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, UPKH'ler, büyüme faktörlerine ve sinyal moleküllerine karşı EKH'lerle aynı derecede hassastırlar. UPKH'lerin üretim teknolojisi hızla geliştiğinden, adiposit ve kan hücreleri dahil olmak üzere birçok somatik hücreden yeniden programlanabilir. Ayrıca, birçok alanda etik olarak çalışılmasında sorunlar yaşanan EKH'lerin yanı sıra, UPKH üretiminde ve kullanılmasında herhangi bir etik sorun bulunmamaktadır. Bu nedenle, UPKH'ler, EKH'lerin yerine geçebilecek tek kaynaktır.

EKH'lerle benzer işlevselliğe sahip olan UPKH'ler, *in vitro* çalışmalarda ölümsüzdür ve üç germ tabakasına farklılaşabilirler (Şekil 2.8.). UPKH'ler aynı zamanda salgıladığı modülatör faktörlerle komşu hücrelerin de düzenlenmesini sağlar (Wang, 2021). UPKH'ler salgıladıkları hücre dışı veziküller aracılığıyla bu faktörleri komşu hücrelere ileterek birçok dejeneratif hücrenin rejenerasyonunu destekleyebilir. Bu da UPKH'leri hücresiz tedavi için uygun bir araç kılmaktadır. UPKH'ler tüm bu özellikleriyle birçok hastalığın tedavisi için umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir.



Şekil 2.8. Pluripotent Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli

Kaynak: Kaebisch, C. et al., (2015)'ten uyarlanmıştır

2.5. Eksozom

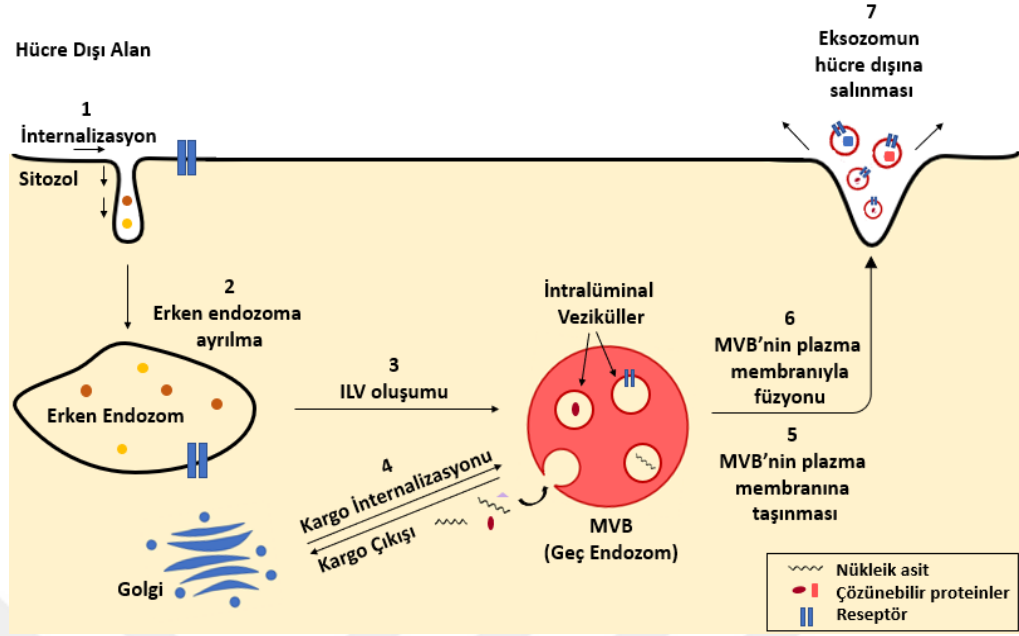
Hücre dışı veziküller, hücreler arası iletişimde oldukça önemli rol oynayan biyomoleküllerdir. Hedef hücrelere nükleik asit, protein ve lipid gibi makromoleküller taşıyabilen hücre dışı veziküller apoptozom, eksozom ve çeşitli mikroveziküller içerir. Özellikle eksozom olmak üzere, bu veziküller çeşitli hastalıkların tedavisinde de rol oynayabilirler.

Eksozomlar hem sağlıklı hem de hastalıklı hücreler arası iletişimi sağlayan nanometre boyutlu hücre dışı veziküllerdir (Mrowczynski et al., 2019). Bu veziküller, ayrıca sinyal mekanizmaları ve hücre veya doku metabolizması üzerinde rol oynar ve yaralanma ve hastalığa verilen doku tepkilerini de etkileyebilir (Phinney & Pittenger, 2017). Eksozomlar oldukça heterojendir ve kaynağı olan hücrenin içeriğini yansıtır (Kalluri, 2016). Bir lipid çift tabakadan oluşan eksozomlar, genetik bileşenler (DNA, RNA ve kaynaklandığı hücreye özgü spesifik proteinler) dahil olmak üzere, onu oluşturan hücrenin bilinen tüm moleküler bileşenlerini içerebilir (Kalluri, 2016). Eksozomlar, içerdikleri bu moleküller aracılığıyla genetik ve genetik olmayan bilgileri hücreler arasında ileterek kanser dahil olmak üzere birçok hastalık üzerinde tedavi edici rol üstlenebilir (Kobayashi et al., 2018). Özellikle kanser biyolojisinde değişken rollere sahip olan eksozomlar, hücrelerin tedaviye duyarlılığını ve onkojenik özelliklerin baskılanmasını sağlayabilir ve alıcı hücrelerin fenotipini önemli ölçüde

değiştirebilir (Mrowczynski et al., 2019). Aynı zamanda, eksozomlar toksik olmamaları ve immünojenik bir etki oluşturmadıkları için kanser tedavisinde uygun bir araç olarak görülür (Mashouri et al., 2019). Bu nedenle eksozomlar, GBM dahil olmak üzere birçok kanser türü için terapötik hedefler haline gelebilir ve hücrelere anti-kanser ajanlarıyla birlikte verilerek kombine terapötik stratejinin bir parçası olabilir (Mrowczynski et al., 2019).

2.5.1. Eksozom Biyogenezi

Hücre dışı veziküller ilk olarak plazmada gösterildikten sonra yapılan çalışmalar, her biyolojik sınıfının vezikül ürettiğini göstermiştir (Raposo and Stoorvogel, 2013; Hessvik and Llorente, 2018). Bu veziküller, eksozom dahil olmak üzere çeşitli mikroveziküller içerir. Eksozom, multiveziküler gövdenin plazma zarı ile füzyonu sonucunda hücrelerden salınan bir membran vezikülüdür (Hessvik and Llorente, 2018). Nano boyutta olan eksozomlar endozomal ağ içinde oluşur (Yáñez-Mó et al., 2015). Eksozom biyogenezinin birinci aşaması, primer endositik veziküllerin füzyonudur (Mashouri et al., 2019). Bu aşama aynı zamanda erken endozom oluşumunun ilk aşamasıdır. Endositik kargolar erken endozomları birleştirir ve daha sonra erken endozomlar, multiveziküler cisim (body)'lere (MVB) dönüşür ya da bu kargoları plazma zarına geri döndürür (Mashouri et al., 2019). Erken endozomların birleşmesiyle oluşan ve geç endozom olarak bilinen MVB, spesifik lipid, protein ve sitozolik bileşenleri taşıyan intraluminal vezikül (ILV) içerir (Alenquer and Amorim, 2015; Gurung et al., 2021). MVB'ler, plazma zarına taşınır ve bu zarla kaynaşarak, endozomal membranların içe doğru tomurcuklanmasıyla oluşan ILV'yi Şekil 2.9'da gösterildiği gibi hücre dışına salar ve hücre membranından salınan ILV'ler artık eksozom olarak adlandırılır (Alenquer & Amorim, 2015; Gurung et al., 2021).



Şekil 2.9. Eksozom Biyogenezi

Kaynak: Gurung S. et al., (2021)'dan uyarlanmıştır

2.5.2. Eksozom Tedavi Yaklaşımı

Yaklaşık 30-100 nm çapında olan eksozomlar, lipit çift tabakalı veziküllerdir. Çeşitli hücreler tarafından salınan eksozomlar, 5'-nükleotid enzim aktivitesine sahip membran vezikülleridir. Eksozomlar, taşıdıkları nükleik asit ve diğer biyoaktif moleküller aracılığıyla birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alırlar (Zhang et al., 2020). Sentetik partiküllerle karşılaştırıldığında eksozomların endojen ve heterojen olması onlara tedavi açısından büyük avantaj sağlar (Zhang et al., 2020).

Eksozomlar, kan beyin bariyerini aşabilmesi, ilaç direncini azaltabilmesi ve taşıdığı moleküller, özellikle miRNA'lar aracılığıyla gen tedavisinde bir araç olmasıyla GBM için oldukça umut vaat eden bir terapötik hedeftir. Özellikle temeli pluripotent kök hücre olan ve embriyonik kök hücrelerden salınan eksozomlar, hücre canlılığını inhibe ederek GBM'lerde hücre büyümesini etkiler (Zhu et al., 2019). Bunun yanı sıra, EKH eksozomları apoptozu teşvik ederek GBM hücrelerinde anti-tümörijenik etkiler sergiler (Zhu et al., 2019). Öncü raporlara bağlı olarak, EKH eksozomlarının bu anti-GBM etkilerinin, GBM'leri iyi huylu fenotipe dönüştürebilen EKH'lere özgü yeniden programlama faktörleri içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Zhu et al., 2019). Bu durum, yeniden programlama faktörlerinin kombinasyonları kullanılarak üretilen UPKH'nin de GBM hücreleri üzerinde anti-

tümörjenik etkiler sergileyebileceğini düşündürmektedir. UPKH'ler, EKH'lere yakından benzemektedir. Ayrıca, birçok alanda etik olarak çalışılmasında sorunlar yaşanan EKH'lerin yanı sıra, UPKH'lerin kullanılmasında herhangi bir etik sorun bulunmamaktadır. Bu nedenle, UPKH'ler, EKH'lerin yerine geçebilecek tek kaynaktır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kimyasallar

Kimyasal	Firma	İşlem
mTeSR1 Basal Medium	STEMCELL Technology (85850)	Hücre kültürü
mTeSR1 5X Supplement	STEMCELL Technology (85850)	Hücre kültürü
Matrigel	Corning (CLS354277)	Hücre kültürü
Sodyum-EDTA tuzu	Kimsan (207015090)	Hücre kültürü
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO (11965092)	Hücre kültürü
4.5g/L Glucose		
RPMI-1640 Besiyeri	Capricorn (RPMI-A)	Hücre Kültürü
Fetal Sığır (Bovin) Serum (FBS)	Thermo Fisher (16000044)	Hücre kültürü
Trypsin-EDTA (0.05%)	Thermo Fisher (25300062)	Hücre kültürü
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich (D2650-100ML)	Hücre kültürü
Penisilin/Streptomisin	Thermo Fisher (15140122)	Hücre kültürü
Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline-PBS)	Thermo Fisher (70013065)	Hücre kültürü
Y-27632 (Rho kinaz inhibitörü)	Tocris (1254)	Hücre kültürü
MTT	Thermo Fisher (M6494)	Canlılık testi
Absolut Etanol	Sigma Aldrich (51976)	RNA izolasyonu
Oligonükleotit	Sentromer DNA Teknolojileri	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Nükleaz içermeyen su	Sigma Aldrich (W4502)	RNA izolasyonu

3.1.2. Cihazlar

Çalışma sürecinde kullanılan cihazların listesi Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Cihazlar

Cihaz	Firma	İşlem
Class II Steril Kabin	FASTER Biosafety cabinet	Hücre Kültürü
SafeVac Vacuum Aspirator	SCIOGEX	Hücre Kültürü
CO ₂ inkübatörü	Memmert INCO153	Hücre Kültürü
Su banyosu	Memmert	Hücre Kültürü
AXIO Invert (Ters) mikroskop	Olympus	Hücre Kültürü
Konfokal Mikroskop	Zeiss, Axio, A1	Hücre Kültürü
4°C Buzdolabı	Arçelik 3061 Plus	Genel
-80°C Derin dondurucu	Hoover	Genel
Termal Döngü Cihazı	Biorad T100	cDNA sentezi
GZ-PZR cihazı	Biorad CFX Connect	Gen ifadesinin analizi
Mikro plate okuyucu	MultiskanGo, ThermoScientific	RNA izolasyonu
Soğutmalı santrifuj	Hittech Universal 320R	Hücre kültürü
MiniSpin Plus	Thermo scientific	RNA izolasyonu
Otoklav	Dik Tip Otoklav (BES)	Sterilizasyon
Su Arıtma Sistemi	Millipore Milli Q Synthesis A10	Genel
Vorteks	Heidolph Reax top	RNA izolasyonu
Çalkalayıcı	DLAB, SK-O180-Pro	Eksozom izolasyonu
Dinamik Işık Saçılım (DLS) cihazı	Malvern	Eksozom karakterizasyonu

3.1.3. Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Sarf Malzemeler

Sarf Malzeme	Firma	İşlem
100 mm petri kabı	Corning (430167)	Hücre kültürü
96-kuyulu kültür kabı	Corning (3596)	Hücre kültürü
6-kuyulu kültür kabı	Corning (3516)	Hücre kültürü
Thoma Lamı	Marienfeld (0640011)	Hücre Kültürü
Serolojik pipet (10 ml)	Corning (4488)	Hücre kültürü
Serolojik pipet (5 ml)	Corning (4487)	Hücre kültürü
Serolojik pipet (25 ml)	Corning (4489)	Hücre kültürü
Serolojik pipet (50 ml)	Corning (4490)	Hücre kültürü
Stericup vakum filtrasyon sistemi	Millipore (S2HVVU02RE)	Hücre kültürü

Tablo 3.3. (devam) Sarf Malzemeler

Mikropipet	Finnpipette™ F2 GLP	Genel
Pipet ucu	Corning, Axygen (TXL-10-R-S)	Genel
Pipet ucu	Corning, Axygen (T-200-Y-R-S)	Genel
Pipet ucu	Corning, Axygen (T-1000-B-R-S)	Genel
Eppendorf tüp	Axygen	RNA izolasyonu
Falkon tüp	Falcon	Hücre kültürü
Kriyotüp	Corning (430659)	Hücre kültürü
GZ-PZR plate	Thermo Fisher	Gen ifadesinin analizi
PZR Adhesive seal	Thermo Fisher	Gen ifadesinin analizi
Ultra-15 Santrifüj filtresi	Sigma Aldrich (UFC901024)	Eksozom izolasyonu
0,45 µm şırınga filtresi	Corning (431231)	Eksozom izolasyonu

3.1.4. Kitler

Deney sürecinde kullanılan kitlerin listesi Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4. Çalışmada Kullanılan Kitler

Kit	Firma	İşlem
Eksozom izolasyon kiti	CUSABIO (EI0110)	Eksozom izolasyonu
Quick RNA Miniprep	ZYMO (R1055)	RNA izolasyonu
cDNA sentez kiti	SENSIFEST (BIO-65054)	cDNA sentezi
SYBR No-Rox kit	SENSIFEST (BIO-98020)	Gen ifadesinin analizi

3.1.5. Primerler

Çalışmada kullanılan primerlerin listesi Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.5. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri

Gen	İleri Primer	Geri Primer
β-Aktin	TGAAGTGTGACGTGGACATC	GGAGGAGCAATGATCTTGAT
MMP-2	ACCACAGCCAACTACGATGA	GCTCCTGAATGCCCTTGATG
MMP-9	GCGTCTTCCCCTTCACTTTC	ATAGGGTACATGAGCGCCTC
EGFR	AGGTGAAAACAGCTGCAAGG	AGGTGATGTTTCATGGCCTGA
AKT	CGACGTGGCTATTGTGAAGG	GATGATGAAGGTGTTGGGCC
BAD	GAAGACTCCAGCTCTGCAGA	CATCCCTTCGTCGTCCTCC
Raf-1	AAGGGTAAATGGCACGGAGA	AGGTGTTTGTAGAGGCTGCT
CCND1	GCATGTTTCGTGGCCTCTAAG	CGTGTTTGCGGATGATCTGT

3.2. Metot

Yapılan tez çalışması Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. 13.04.2022 tarihinde başlatılan çalışma, 11.09.2022 tarihinde tamamlanmış olup, veriler deney süreciyle eş zamanlı olarak toplanmıştır.

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışma sürecinde gerçekleştirilen hücre kültürü deneyleri laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirilmiş ve her aşamada steril, tek kullanımlık malzemeler kullanılmıştır.

3.2.1.1. Uyarılmış pluripotent kök hücre hattı

Uyarılmış pluripotent kök hücre hattı, bazal membran (matrigel) ile destekli bir ortamda, daha önceden tanımlanmış olan ve hücrelerin iyi çoğaldığı mTesR1 besiyeriyle 37°C'ye ayarlı, nemli ve %5 CO₂'li inkübatörde kültürlendi.

UPKH'lerin kültürlendiği besin ortamı, Tablo 3.6'da verilen oranlarda kimyasal kullanılarak hazırlanmış olup, hücrelerle muamele edilmeden önce 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiştir.

Tablo 3.6. UPKH Besiyeri İçeriği

Kimyasal	Oran
MTesR1 bazal besiyeri	%79
MTesR1 5X destek ortamı	5X
Penisilin-Streptomisin	%1
Toplam	100 ml

Bölümümüz stoklarında, -80°C soğutucuda bulunan matrigel, RPMI-1640 bazal besiyeriyle seyreltildi ve 6 kuyulu kültür kabına 1 ml eklenip 2 saat +4°C buzdolabında bekletildi. Ardından, Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi, Kök Hücre Laboratuvarından temin edilen UPKH'ler -80°C soğutucudan alınıp 37°C'deki su banyosunda çözündürüldü. Çözündürülen hücreler Tablo 3.6'da verilen oranlarda hazırlanmış ve önceden 37°C'de ısıtılmış besiyerine hızlı bir şekilde aktarılıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 1 ml taze besiyeriyle çözündürüldü. Ardından, matrigel ile kaplı 6 kuyulu kültür kabından RPMI-1640 bazal besiyeri uzaklaştırıldı ve UPKH'ler

toplam 2 ml olacak şekilde tamamlanmış UPKH besiyeriyle 6 kuyulu kültür kabına ekildi.

Her gün besiyeri değiştirildi ve hücreler kültür kabının tabanını yaklaşık %80 doluluk oranında kapladığında pasajlama işlemi yapıldı. UPKH'lerin pasajlanması için Tablo 3.7'de belirtilen şekilde 500 µl steril su ile 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlandı ve hazırlanan 0,5 M EDTA çözeltisi, 1:1000 oranda kullanılarak PBS-EDTA solüsyonu hazırlanıp 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Pasajlama için öncelikle, besiyeri uzaklaştırılan hücreler PBS ile yıkandı. Ardından, 6-kuyulu kültür kabı için her bir kuyucukta 500 µl olacak şekilde, 0,05 M PBS/EDTA hücrelerle muamele edildi. Hücreler, kültür kabından kaldırılmaları için 8 dk inkübatörde bekletildi ve ardından PBS/EDTA uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelere 2 ml tamamlanmış besiyeri eklendi ve kültür kabı yıkanarak hücreler toplanıp matrigel ile kaplı yeni bir 6 kuyulu kültür kabına 1:2 oranda ekildi. Pasajlanma işlemi tamamlanan hücreler %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde kültürlendi. Hücreler açıldıktan ve her pasajlandıktan sonra hücre ölümü ve farklılaşmayı kısıtlamak amacıyla hacimce 1:1000 oranda Y-27632 (Rho kinaz inhibitörü) ile muamele edildi. Hücreler bu süreçte %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde kültürlendi.

Tablo 3.7. PBS-EDTA Oranı

Kimyasal	Miktar
Sodyum-EDTA Tuzu (Molekül Ağırlığı: 380,17)	95 mg
Steril su	500 µl
PBS	500 ml

Pasajlama sonrasında UPKH'lerin bir kısmı kültüre devam ettirilirken kalan kısmı bir sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere Tablo 3.8'de verilen oranlarda hazırlanan dondurma besiyeriyle donduruldu. Dondurma işlemi için, PBS/EDTA ile kaldırılan hücreler, tamamlanmış besiyeriyle toplanıp, 1/2'si 6-kuyulu kültür kabına ekildikten sonra kalan kısım 1500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendi ve hücrelerin çökmeleri sağlandı. Santrifüjün ardından pellete zarar vermeden süpernatant aspire edildi ve pellette bulunan hücreler, hücre yoğunluğuna uygun hacimde dondurma besiyeriyle çözündürülerek kriyo tüplere alınıp -80°C'deki derin dondurucuya kaldırıldı.

Tablo 3.8. UPKH Dondurma Besiyeri İçeriği

Kimyasal	Oran
DMEM	%40
FBS	%50
DMSO	%10
Toplam	10 ml

3.2.1.2. Glioblastoma hücre hattı

Çalışmada, glioblastoma hücre hattı olarak bölümümüz stoklarından LN18 hücreleri kullanılmıştır. LN18 hücrelerinin kültürlendiği besin ortamı, Tablo 3.9'da verilen oranlarda kimyasallar kullanılarak hazırlanmış olup, hücrelerle muamele edilmeden önce 0.22 μm 'lik filtreden geirilmifitir.

Tablo 3.9. LN18 Tamamlanmış Besiyeri İçeriği

Kimyasal	Oran
DMEM bazal besiyeri	%89
FBS	%10
Penisilin-Streptomisin	%1
Toplam	100 ml

Bölümümüz stoklarında bulunan LN18 hücreleri, Tablo 3.9'da verilen oranlarda hazırlanmış ve önceden 37°C'de ısıtılmış besiyerine hızlı bir şekilde aktarılıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 3 ml taze besiyeriyle zndrld. Ardından, zndrlen hücreler toplam hacim 10 ml olacak şekilde tamamlanmış besiyeriyle 100 mm petri kabına ekildi.

3 günde bir besiyeri değiştirildi ve hücreler kültür kabının tabanını yaklaşık %80 doluluk oranında kapladığında pasajlama işlemi yapıldı. LN18 hücrelerinin pasajlanma sürecinde, besiyeri uzaklaştırılan hücreler PBS ile yıkandı. Ardından, 100 mm'lik kültür kabı için 2 ml olacak şekilde tripsin eklendi ve 3 dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin kalkması sağlandı. Hücreler, kültür kabından kaldırıldıktan sonra, tripsini inhibe eden FBS'i içeren tamamlanmış besiyeriyle 1:1 oranda muamele edildi. Kültür kabının tamamlanmış besiyeriyle yıkanıp hücrelerin toplanmasının ardından, LN18 hücreleri 1:4 oranda yeni bir 100 mm'lik petri kabına ekildi ve %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde kültürlendi.

Pasajlama işlemi ile LN18 hücrelerinin 1/4'inin kültürü devam ettirilirken, kalan 3/4'lük kısmı Tablo 3.10'da verilen oranlarda hazırlanan dondurma besiyeriyle donduruldu. Bu işlem için, kültür kabından yıkanıp toplanan LN18 hücreleri 1500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendi ve çökmeleri sağlandı. Santrifüjün ardından pellete zarar vermeden süpernatant aspire edildi ve pellette bulunan hücreler, hücre yoğunluğuna uygun hacimde dondurma besiyeriyle çözündürülerek kriyo tüplere alındı ve -80°C'deki derin dondurucuya kaldırıldı.

Tablo 3.10. LN18 Dondurma Besiyeri İçeriği

Kimyasal	Oran
DMEM ile destekli tamamlanmış besiyeri	%50
FBS	%40
DMSO	%10
Toplam	10 ml

3.2.2. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

UPKH'ler kültür kabının tabanını yaklaşık %80 doluluk oranında kapladıktan sonra, 7 gün boyunca her gün hücrelerin bulunduğu besiyeri toplandı ve bu süreçte toplanan besiyeri +4°C'de muhafaza edildi. UPKH'lerden eksozom izolasyonu için eksozom izolasyon kiti (CUSABIO, EI0110) protokolüne uygun bir şekilde kullanılarak UPKH kültüründen toplanan besiyerinden eksozom izole edildi;

1. 1 ml E reaktifi ve 150 µl A reaktifi steril bir eppendorf tüpte karıştırıldı ve karışım 850 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi, ardından süpernatant uzaklaştırıldı.
2. B reaktifine 2 ml steril su eklendi ve tamamen çözünene kadar karıştırılıp 1 ml'si 1. aşamada elde edilen pellete eklendi.
NOT: 1ml B reaktifi bir sonraki izolasyon için -20°C'de muhafaza edildi.
3. Hazırlanan karışım çalkalayıcıda 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında karışım 850 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
5. 2 saatlik inkübasyon sürecinde, UPKH kültüründen toplanan 15 ml besiyeri filtrelili falkona alındı ve 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonunda filtrede kalan kısım steril bir eppendorf tüpe alındı ve 0,45 µm'lik filtreden geçirildi.

7. Filtrasyon sonunda elde edilen **ekstrakt:C reaktifi:D reaktifi** oranı **125:1:125** olacak şekilde bir karışım hazırlandı (600 µl ekstrakt : 4,8 µl C reaktifi : 600 µl D reaktifi) ve hazırlanan karışım 4. aşamada elde edilen pellete eklenip çalkalayıcıda gece boyu +4°C’de inkübasyona bırakıldı.
8. Gece boyu inkübasyonun ardından karışım 850 rpm’de 1 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
9. 3 ml E reaktifi ve 12 µl C reaktifi bir falkon tüpte karıştırıldı.
10. Hazırlanan karışımdan 1 ml alınıp 8. aşamada elde edilen pellete eklendi ve 850 rpm’de 1 dk santrifüj yapıp süpernatant uzaklaştırıldı. Bu aşama 2 kere daha tekrarlandı.
11. Elde edilen pellete 200 µl F reaktifi eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi.
12. İnkübasyon sonunda, karışım 850 rpm’de 1 dk santrifüjlendi ve elde edilen süpernatant (eksozom) steril bir eppendorf tüpe alındı.
13. Elde edilen eksozom kısa süreli kullanım için +4°C’de muhafaza edildi.

İzolasyonun ardından, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında bulunan Dinamik Işık Saçılımı (DLS-Malvern) cihazı kullanılarak eksozom karakterizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda, yapılan karakterizasyon sürecinde, UPKH-ekz’lerin boyut ve konsantrasyon ölçümü yapıldı.

3.2.3. MTT Testi

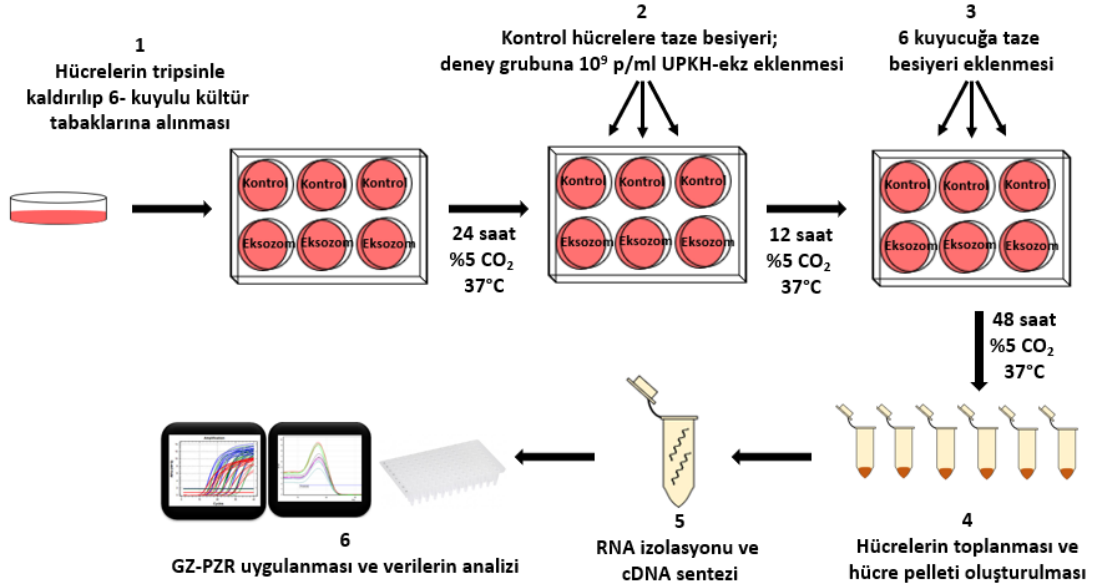
Kültür çalışması sırasında LN18 hücrelerinin eksozomla muamele edilmesinin ardından canlılık tayini yapılması amacıyla MTT analizi gerçekleştirildi. MTT testi, canlı hücrelerin MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid) kimyasalıyla reaksiyon vererek, formazan kristali oluşumunu sağlayan mitokondriyal aktivite ölçümü esasına dayanmaktadır.

LN18 hücreleri kültür kabının tabanını yaklaşık %80 doluluk oranında kapladıktan sonra tripsin muamelesiyle kaldırılıp, Thoma Lamında hücre sayımı yapıldı. Pasajlama sırasında toplanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Thoma Lamı üzerine aktarıldı. Sayım sırasında çeper yapısı bozulan, ölmüş hücreler sayıma dahil edilmedi. Elde edilen hücre sayısı, Thoma Lamı formülasyonuna göre 10^4 ile çarpılarak ml’deki toplam hücre sayısı bulundu.

Hücre sayımının ardından, LN18 hücreleri 96-kuyulu kültür kabına her kuyuda 10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde 1 gün boyunca kültürlendi. Hücreler kültür kabına yapıştıktan sonra, LN18 hücreleri, 10^9 partikül/ml (p/ml), konsantrasyonda UPKH-ekz ile muamele edildi (Zhu et al., 2019). Kontrol olarak, LN18 hücre hatları yalnızca taze tamamlanmış besiyeriyle muamele edildi. Hücreler 12 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde UPKH-ekz'lerle inkübe edildi. 12 saatlik eksozom muamelesinin ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve taze tamamlanmış besiyeri eklendi. Daha sonra, hücreler MTT testi için 48 saat boyunca inkübatörde bekletildi ve bu süreç sonunda hücrelere 0,5 mg/ml MTT solüsyonu eklendi. LN18 hücrelerinin formazan kristalleri oluşturması için hücreler 4 saat boyunca MTT solüsyonuyla inkübe edildi. 4 saat sonunda hücreler 2 kere PBS ile yıkandı ve karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında, 10 dk boyunca 100 µl DMSO ile muamele edildi. Ardından, Multiskan Go mikro-plate okuyucuda 570 nm'de ölçüm yapıldı.

3.2.4. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için, LN18 hücreleri %80 doluluk oranına ulaştığında tripsin muamelesiyle kaldırılıp, Thoma Lamında hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımının ardından, LN18 hücreleri 6-kuyulu kültür kabına her kuyuda 10^5 hücre olacak şekilde ekildi ve %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde 1 gün boyunca kültürlendi. Hücreler kültür kabına yapıştıktan sonra, LN18 hücreleri, 10^9 partikül/ml (p/ml), konsantrasyonda UPKH-ekz ile muamele edildi (Zhu et al., 2019). Kontrol olarak, LN18 hücre hatları yalnızca taze tamamlanmış besiyeriyle muamele edildi. Hücreler 12 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde UPKH-ekz'lerle inkübe edildi. 12 saatlik eksozom muamelesinin ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve taze tamamlanmış besiyeri eklendi. Daha sonra, hücreler 48 saat boyunca 37°C'ye ayarlı inkübatörde bekletildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. UPKH-ekz'lerin LN18 Hücrelerinde Uygulanması ve GZ-PZR Analizi

Hücreler 48 saat inkübasyonun ardından tripsin muamelesiyle kaldırıldı ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Ardından pellete zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı ve Quick RNA Miniprep (ZYMO) kiti kullanılarak kontrol ve UPKH-ekz uygulanmış hücrelerden RNA izole edildi;

1. Pellete 300 µl RNA Lysis Tamponu eklendi ve karışım toplama tüpüne yerleştirilmiş Spin Away Filtreye aktarılıp 14.000 rpm'de 30 sn santrifüjlendi.
2. Santrifüj ardından toplama tüpünde kalan süpernatant üzerine aynı hacimde %99'luk etanol eklendi ve karışım, toplama tüpüne yerleştirilmiş yeşil renkli Zymo-Spin™ IIICG kolona aktarılıp 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrasında kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve kolonu yıkamak için 400 µl RNA Wash Tamponu eklendi ve 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sonunda nükleaz içermeyen bir tüpte 75 µl DNA Digestion Tamponu ve 5 µl DNaz I (1U/µl) karışımı hazırlandı ve karışım direkt yeni bir toplama tüpüne alınan kolonun membranına eklendi.
5. Kolon oda sıcaklığında 15 dk boyunca inkübe edildi.
6. İnkübasyonun ardından kolona 400 µl RNA Prep Tamponu eklendi ve 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj yapıldı.
7. İlk yıkamada 700 µl RNA Wash Tamponu kolona eklendi ve 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj yapıldı.

8. İkinci yıkama için kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 400 µl RNA Wash Tamponu eklenip 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj yapıldı.
9. Son olarak kolon nükleaz içermeyen bir eppendorf tüpe yerleştirildi ve doğrudan kolonun membranına gelecek şekilde 60 µl DNaz/RNaz içermeyen su eklenip 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj yapıldı.
10. Eppendorf tüpte toplanan 60 µl RNA örneğinden spektrofotometrik ölçüm için 2 µl alındı ve Multiskan Go mikro-plate okuyucuda 230, 260 ve 280 nm’de absorbans ölçümü yapıldı.
11. RNA konsantrasyonu $A_{260} \times 40 \times 10/0,52$ formülü ile; saflığı ise A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranı ile hesaplandı.
12. Kalan RNA örneği kısa süreli kullanım için -20°C soğutucuda muhafaza edildi.

3.2.5. cDNA Sentezi

-20°C soğutucuda bulunan RNA örneklerinden 1 µg kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi, üretici firmanın talimatına göre cDNA sentez kiti (Bioline, BIO-65054) ile yapılmıştır. Sentezde kullanılan reaksiyon bileşenleri Tablo 3.11’de gösterilmiştir.

Tablo 3.11. cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri

Reaktifler	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Çalışma Konsantrasyonu
RNA	82,23 ng/µl (Kontrol) 316,8 ng/µl (Eksozom)	12,16 µl (Kontrol) 3,15 µl (Eksozom)	1 µg
Oligo d(T) VN	50 µM	2 µl	5 µM
M-MuLV enzim karışımı	10X	2 µl	1X
M-MuLV reaksiyon karışımı	2X	10 µl	1X
Nükleaz içermeyen su	-	Değişken (20 µl’ye tamamlandı)	-
Son Hacim	-	20 µl	-

Tablo 3.11’de verilen kimyasallarla hazırlanan karışım termal döngü cihazına (Thermo Cycler, BIO-RAD) yerleştirildi ve Tablo 3.12’de verilen reaksiyon koşulunda cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentez sonunda elde edilen cDNA örnekleri -20°C soğutucuda muhafaza edildi.

Tablo 3.12. cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları

Aşama	Sentez Reaksiyon Koşulları
İlk Denatürasyon	94°C, 5 dk
İnkübasyon	42°C, 60 dk
Enzim İnaktivasyonu	80°C, 5 dk

3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)

UPKH-ekz'lerin LN18 glioblastoma hücreleri üzerinde tedavi etkisinin analizi için UPKH-ekz uygulaması sonrası glioblastoma ile ilişkilendirilen bazı genlerin, kontrol grubuyla gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması amacıyla GZ-PZR uygulandı. GZ-PZR reaksiyonları SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit kullanılarak üreticinin protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi. GZ-PZR, kontrol grubu ve UPKH-ekz uygulanan LN18 hücre hatlarından sentezlenen cDNA ile gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda, hedef genlerin ekspresyon seviyeleri referans gen ile karşılaştırmalı olacak şekilde belirlendi. Ekspresyon analizi yapılacak genlere spesifik primerler üretici firmanın önerdiği şekilde önceden standardize edilmiştir. Tablo 3.13'de verilen oranlarda PZR karışımı hazırlandı ve karışım 96-kuyulu PZR plakasına aktarılıp Tablo 3.14'de verilen reaksiyon koşullarında GZ-PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3.13. GZ-PZR'de Kullanılan Reaktif Miktarları

Reaktifler	Kullanılan Miktar (µl)	Çalışma Konsantrasyonu
cDNA	1,5	-
SensiFAST SYBR No-Rox karışımı (2X)	10	1X
İleri Primer	1	2,5 µM
Geri Primer	1	2,5 µM
dH ₂ O	6,5	-
Son Hacim	20	-

Tablo 3.14. GZ-PZR Koşulları

Aşama	Sentez Reaksiyon Koşulları
Polimeraz Enzim Aktivasyonu	95°C, 4 dk
Denatürasyon	95°C, 10 sn
Bağlanma	55°C, 10 sn
Uzama	72°C, 30 sn
Erime Eğrisi Analizi	55°C - 95°C, 5 sn

3.3. İstatistiksel Analiz

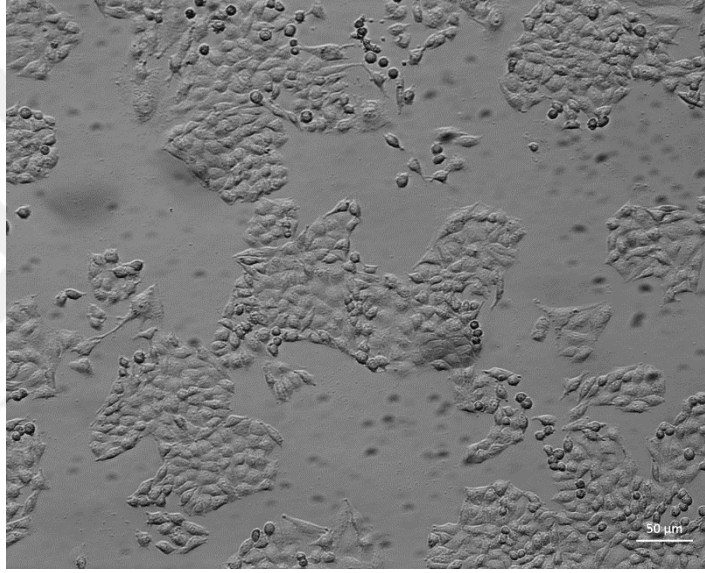
Her deney için en az 2 biyolojik tekrar yapıldı ve elde edilen veriler standart sapma göz önünde bulundurularak analiz edildi. Yapılan MTT ve GZ-PZR uygulamaları sonucunda veriler, Multiskan Go mikro-plate okuyucu ve BIO-RAD CFX Connect™ GZ-PZR cihazlarının analiz programlarından elde edilip iki kuyruklu Öğrenci t-testi (Two-tailed Student's t-test) ile değerlendirildi. Kontrol grubu ve deney grubu arasındaki farklar için istatistiksel anlamlılık sınırı $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

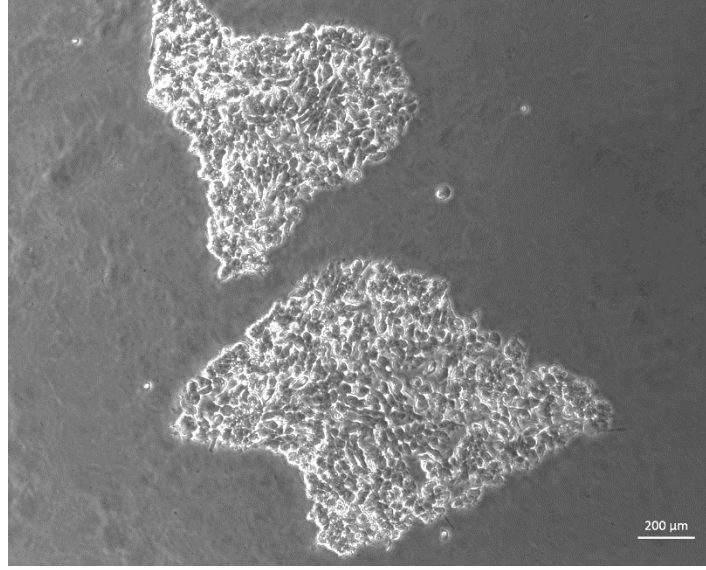
4.1. UPKH ve LN18 Hücre Hatlarının Görüntüleri

Kültür kabının yüzeyine yapışarak büyüyen LN18 hücreleri uygun şartlarda kültürlenerek morfolojik görüntülerinin takipleri ters faz-kontrast mikroskop ile yapıldı. Kültür ortamında LN18 glioblastoma hücrelerinin morfolojik olarak nöronlara benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. LN18 Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü

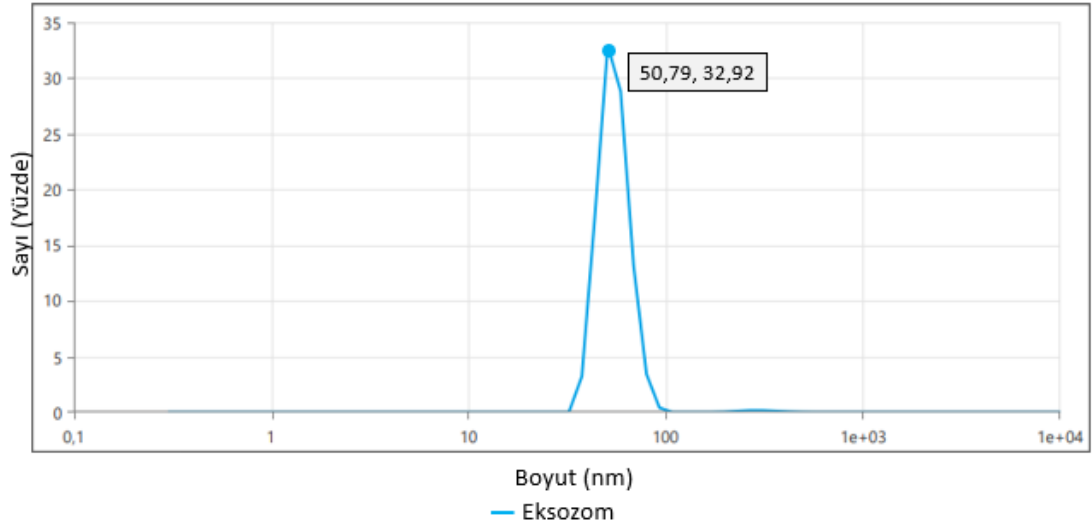
Farklılaşmamış hücrelerin kültüre edilmesi, uzun süre boyunca korunması ve çoğaltılması, getirdiği zorluklar sebebiyle kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, farklılaşmamış hücre olan UPKH'lerin farklılaşma durumu ve morfolojileri, her gün ters faz-kontrast mikroskop ile takip edildi. UPKH kültürü, LN18 hücreleri gibi diğer yapışarak büyüyen hücrelere kıyasla birtakım zorluklar sunar. Büyüyeceği ortamda matriks desteğine ihtiyacı olan UPKH'ler, bir bazal membran olan matrigelde uygun şartlarda kültüre edildi. LN18 hücrelerinin aksine, UPKH'lerin, koloni oluşturarak çoğaldığı gözlemlendi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. UPKH'lerin Morfolojik Görüntüsü

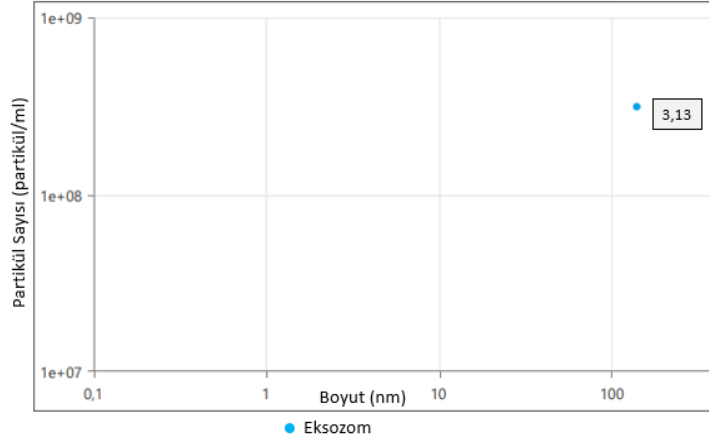
4.2. Eksozom Karakterizasyonu

Malvern Zetasizer Ultra-DLS cihazı ile yapılan eksozomal karakterizasyon sonucuna göre UPKH-ekz'lerin boyutu ortalama 50,79 nm bulundu (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. UPKH-ekz'lerin Boyut Analizi Sonucu

Eksozom karakterizasyonu için, ölçümü alınacak eksozom örneği 100 kat seyreltilerek konsantrasyon ölçümü yapıldı. Konsantrasyon ölçüm sonucunda dilüsyonlu eksozom konsantrasyonu $3,13 \times 10^8$ p/ml bulundu (Şekil 4.4.).

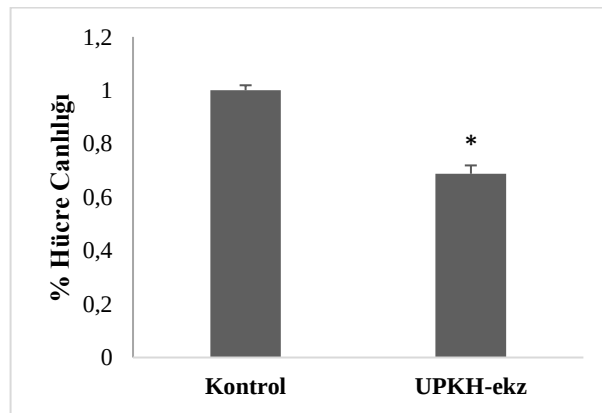


Şekil 4.4. UPKH-ekz'lerin Konsantrasyon Analizi Sonucu

4.3. MTT Analizinin Değerlendirilmesi

Eksozomların hücre içine alımı için 12 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'de UPKH-ekz ile kültürlenmiş LN18 hücreleri, hücreler tarafından alınmayan eksozomların kültür ortamından uzaklaştırılmasının ardından, UPKH-ekz'lerin LN18 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin analizi için 48 saat kültüre edildi. Bu süre sonunda LN18 hücrelerinin canlılık oranı MTT testiyle analiz edildi.

Eksozom alımının ardından 48 saat sonra yapılan ölçümde 10⁹ p/ml konsantrasyonunda UPKH-ekz uygulanmış LN18 hücrelerinin canlılığı, kontrol grubuna göre kıyaslandı. Bunun sonucunda, UPKH-ekz uygulanmış LN18 hücrelerinin canlılığının, yalnızca besiyeriyle muamele edilen kontrol hücrelerine kıyasla yaklaşık olarak %31,2 oranında anlamlı bir şekilde (p değeri ≤ 0.05) azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Kontrol ve UPKH-ekz Uygulanan LN18 Hücrelerinin MTT Analiz Sonucu (12+48 saat sonrası)

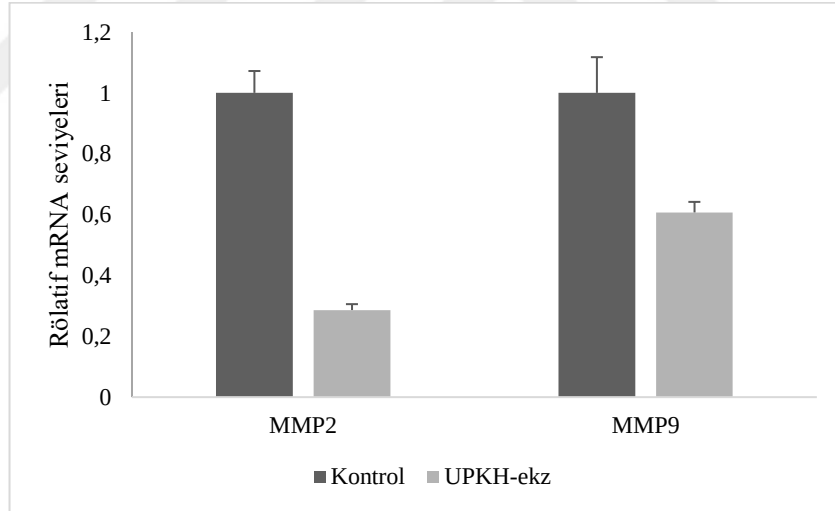
*: P değeri ≤ 0.05

4.4. LN18 Hücrelerinde Gen Ekspresyon Analizleri

Eksozomların hücre içine alımı için 12 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'de UPKH-ekz ile kültürlenmiş LN18 hücreleri, hücreler tarafından alınmayan eksozomların kültür ortamından uzaklaştırılmasının ardından, UPKH-ekz'lerin LN18 hücrelerinin patolojisinde rol oynayan genler üzerindeki etkisinin analizi için 48 saat kültüre edildi. Bu süre sonunda bu genlerin ifadesi GZ-PZR ile analiz edildi.

Eksozom alımının ardından 48 saat sonra yapılan GZ-PZR analizinde 10⁹ p/ml konsantrasyonunda UPKH-ekz uygulanmış LN18 hücrelerindeki GBM ile ilişkili genlerin anlatımı, kontrol grubuna göre kıyaslandı. Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri referans gen (β -aktin) ile karşılaştırmalı olacak şekilde belirlendi.

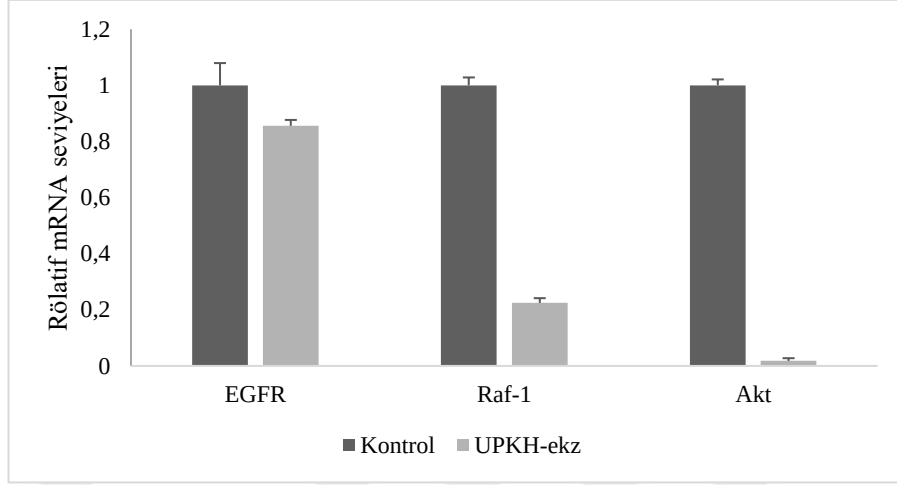
Yapılan kantitatif analiz sonucunda, ECM yapısının bozulmasını, GBM hücrelerinin istilasını ve anjiyogenezini tetikleyen MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ifadesinde UPKH-ekz uygulanmış LN18 hücrelerinde kontrol grubuna göre, sırasıyla %71,4 ve %39,3 oranda azalma gözlemlendi (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Kontrol ve UPKH-ekz Uygulanan LN18 Hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 Gen İfadesinin Analizi (12+48 saat sonrası)

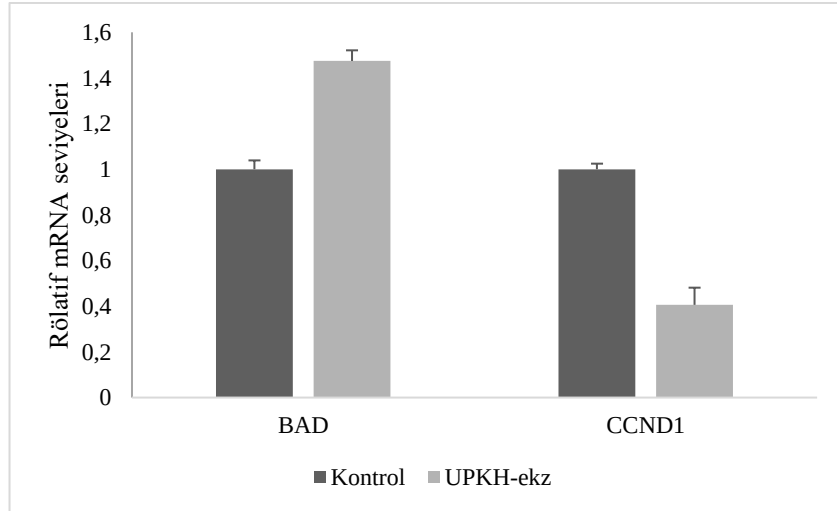
Eksozom alımının ardından 48 saat sonra yapılan GZ-PZR analiziyle elde edilen gen ifadesi sonucunda, apoptotik genlerin baskılanmasında rol oynayan Akt; anti-apoptotik faktörlerin aktivasyonunu sağlayan Raf-1 ve bu iki faktörün rol oynadığı yolları kontrol eden, aynı zamanda GBM'de kontrolsüz bir şekilde aktive olan EGFR genlerinin ifadesinde, UPKH-ekz uygulanmış LN18 hücrelerinde kontrol

grubuna göre, sırasıyla yaklaşık olarak %98,2, %77,6 ve %14,5 oranda azalma gözlemlendi (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Kontrol ve UPKH-ekz Uygulanan LN18 Hücrelerinde EGFR, Raf-1 ve Akt Gen İfadesinin Analizi (12+48 saat sonrası)

Eksozom alımının ardından 48 saat sonra yapılan GZ-PZR analizi sonucunda, bir apoptotik faktör olan BAD ve bir hücre döngüsü bileşeni olan, aynı zamanda proliferatif yollar tarafından aktive edilen CCND1 genlerinin ifadesinde, UPKH-ekz uygulanmış LN18 hücrelerinde kontrol grubuna göre, sırasıyla yaklaşık olarak %47,4 oranında artış ve %59,4 oranda azalma gözlemlendi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Kontrol ve UPKH-ekz uygulanan LN18 Hücrelerinde BAD ve CCND1 Gen İfadesinin Analizi (12+48 saat sonrası)

5. TARTIŞMA

Glioblastoma, dünya çapında en sık rastlanan primer beyin tümörüdür. Sistematik olarak nüksler ve kötü prognozla ilerleyen GBM, karmaşık patolojiye sahip, tedavisi oldukça zor bir neoplazmdır (Lyustikman et al., 2008). Radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi müdahale gibi mevcut tedavilere karşı dirençli olan GBM vakaları çoğunlukla 15-20 aylık bir sağkalımla sonuçlanır (Stupp et al., 2005; Ou et al., 2021). Tedavi sürecinde kullanılan ilaçların GBM’de toksik etkiyle sonuçlanması GBM tedavisini güç kılar. Bunun yanı sıra, bu ilaçların, KBB gibi olağanüstü bir bariyeri aşmak için yüksek dozda verilmesiyle artan toksik doz GBM’nin direnç geliştirmesine yol açar ve bu durum tedaviyi neredeyse imkânsız hale getirir.

GBM tedavisindeki bu zorluklar, toksik etkiyle sonuçlanmayan, KBB’yi aşabilen, aynı zamanda immünojenik reaksiyona sebep olmayan bir tedavi yöntemi uygulanmasına yönlendirir. Alternatif olarak, lipofilik yapıda olup, KBB’yi geçebilecek boyutta olan ve toksisiteden yoksun olup immünojenik reaksiyon oluşturmeyen eksozomlar düşünülebilir (Murphy et al., 2021). Artan kanıtlar, nükleik asit ve protein gibi aktif biyolojik molekülleri hücreler arasında ileten eksozomların, çeşitli hastalıkların tedavisinde rol oynayabileceğini ileri sürmektedir. Eksozomlar bu şekilde GBM dahil olmak üzere birçok hastalığın gelişimine uygun olmayan bir ortam yaratabilir (Bälasa et al., 2020). Bu doğrultuda, yapılan tez çalışmasında eksozomlar kullanılarak GBM’de hücresiz tedavi uygulamak amaçlanmıştır.

30-100 nm boyutlarında olan eksozomların biyogenezi, eksozomal tedavi yaklaşımı için oldukça önemli bir faktördür. Çünkü, eksozom bazlı hücresiz tedaviler, kaynak hücreye bağlı olan düşük eksozom üretkenliği gibi bir problem teşkil eder. Uyarılmış pluripotent kök hücre, sahip olduğu sınırsız kendini yenileme özelliğiyle yüksek miktarda eksozom sağlayarak bu problemin üstesinden gelebilir. Bu doğrultuda, yapılan *in vitro* UPKH kültürü sonucunda hücrelerin oldukça verimli bir

şekilde çoğaldığı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, UPKH'lerden eksozom izolasyonu sonrasında yapılan eksozom karakterizasyonu işlemleriyle elde edilen konsantrasyon analizi sonucu, UPKH'lerin *in vitro* kültür süreci boyunca bulunduğu besi ortamına aktif ve yoğun bir şekilde eksozom salgıladığını göstermektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, embriyonik kök hücre kaynaklı hücre dışı veziküllerin kanser hücrelerinde malign hücre fenotipini baskıladığı gösterilmiştir (Kulesa et al., 2006; Hendrix et al., 2007; Costa et al., 2009; Díez-Torre et al., 2009). Buna ek olarak, EKH kaynaklı eksozomların GBM hücrelerinde apoptozu arttırdığı ve hücre canlılığını inhibe ederek GBM'lerin büyümesini etkilediği doğrulanmıştır (Zhu et al., 2019). Bu avantajlarının yanı sıra, EKH'lerin uygulamasını sınırlayan etik problemler, GBM tedavisi için EKH'lere oldukça benzeyen ve stabil özellikte yoğun bir şekilde eksozom üretebilen UPKH kullanımına yönlendirmektedir. Bunun yanı sıra, EKH'ler tarafından salgılanan eksozomların anti-tümörijenik etkilere sahip olduğu önceki çalışmadan bilinse de UPKH-ekz'lerin GBM'ler üzerinde aynı etkiye sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Bu doğrultuda, yapılan tez çalışmasında, UPKH'lerden verimli bir şekilde elde edilen eksozomların, en ölümcül kanser türleri olan GBM'lerde uygulanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışma sonucunda, GBM hücrelerinde uygulanan UPKH kaynaklı eksozomların, GBM hücrelerinin canlılığını %31,2 oranda azalttığı gözlenmiştir.

İncelenen GBM vakalarının çoğunun patogenezinde RTK sinyal yolağındaki değişiklikler yer almaktadır (Brennan et al., 2014). GBM ile ilişkili RTK yolağındaki alterasyonların başta geleni EGFR'nin kontrolsüzce aktivasyonu ile meydana gelen değişikliklerdir (Furnari et al., 2015; Eskilsson et al., 2018). EGFR'nin bu şekilde aktif ettiği moleküler yollar (PI3K/Akt ve MAPK), invazyon, apoptoza direnç ve anjiyogenez gibi çeşitli onkojenik özelliklere yol açar (Eskilsson et al., 2018). Bu nedenle, GBM vakalarının çoğunda EGFR hedef alınır. Ancak, klinik çalışmalarda kullanılan mevcut ilaçların KBB penetrasyonundaki problemi, anti-EGFR tedavilerinin önüne geçmektedir (Eskilsson et al., 2018). Yapılan tez çalışmasında KBB penetrasyonunda problem teşkil etmeyen eksozomların *in vitro* GBM tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, UPKH'lerin içeriğini yansıtan UPKH-ekz'lerin LN18 hücreleri tarafından alındıktan sonra, PI3K/Akt ve MAPK gibi EGFR yolları, hücre döngüsü ve apoptozla ilişkili birtakım genler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Yapılan GZ-PZR analiziyle UPKH-ekz'lerin, EGFR ve aktive ettiği yolaklardaki bileşenler olan Raf-1 ve Akt'ın gen ifadesindeki değişiklikler incelenmiştir. Elde edilen veriler, GBM'de kontrolsüzce aktive olan EGFR'ın; çeşitli apoptotik genleri baskılayarak apoptoza direnç geliştiren Akt'ın; ve anti-apoptotik faktörleri aktive ederek hücrede Akt gibi apoptotik direnç geliştiren Raf-1'in gen ifadesinin UPKH-ekz'lerle azaldığı gözlenmiştir. Eksozomlarla muamele edilmeyen LN18 hücreleri (kontrol grubu)'ne göre yapılan kıyaslama sonucunda, UPKH-ekz'lerin LN18 hücrelerinde Akt'ın ekspresyonunu %98,2 ve Raf-1'in ekspresyonunu %77,6 oranda düşürürken, GBM'de yüksek seviyelerde aktive olan EGFR'ın ekspresyonunu %14,5 oranda düşürdüğü gözlenmiştir.

EGFR ve aktive ettiği yolların yanı sıra, MMP'ler gibi proteolitik enzimler de GBM'de onkojenik rol oynayabilir. MMP-2 ve MMP-9, GBM ile en çok ilişkilendirilen ve onkojenik fenotipe destek olan MMP'lerdir. Bu doğrultuda yapılan tez çalışmasında, UPKH-ekz'lerin, GBM'de yüksek seviyelerde gözlenen MMP-2 ve MMP-9 gen ifadesi üzerindeki etkisini incelemek amaçlanmıştır. Elde edilen veriler, UPKH-ekz'lerin, kontrol grubuna göre kıyaslandığında LN18 hücrelerinde EGFR, Akt ve Raf-1 gibi, MMP-2 ve MMP-9'un da gen ifadesini azalttığını göstermektedir. Sonuçta, hücresiz tedavi olarak adlandırdığımız eksozom tedavisinin LN18 hücrelerinde MMP-2 gen ifadesini %71,4 oranda, MMP-9 gen ifadesini ise %39,3 oranda azalttığını görülmüştür.

MTT testi ile elde edilen sonuçlarla UPKH-ekz'lerin GBM hücrelerinin canlılığını azalttığını ve hücre ölümüne yol açtığını doğruladıktan sonra, LN18-GBM hücrelerinde bir hücre döngüsü ve bir de apoptotik gen ekspresyonunu analiz ettik. Yapılan GZ-PZR analizinde, LN18 hücrelerinde, EGFR, Akt, Raf-1, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin yanı sıra BAD ve CCND1 genlerinin ekspresyonuna da bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar, UPKH-ekz'nin LN18 hücrelerinde bir apoptotik gen olan BAD'ın ekspresyonunu kontrol grubuna göre %47,4 oranda attırdığını göstermiştir. Buna ek olarak, GZ-PZR sonuçlarına göre, UPKH-ekz uygulanan LN18 hücrelerinde, GBM hayatta kalmasında rol oynayan, bir hücre döngüsü bileşeni olan CCND1'in ekspresyonunun kontrol grubuna göre %59,4 oranda azaldığı gözlenmiştir.

6. SONUÇLAR

Tez boyunca, asıl amaç, UPKH'lerden eksozom elde ederek, bu eksozomların GBM'deki terapötik rolünü belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda ilk hedef yüksek konsantrasyonda eksozom elde etmektir. Literatürde bulunan bir rapor, EKH'lerin eksozom kaynağı için uygun bir hücre olduğunu, bu hücrelerden verimli bir şekilde eksozom elde edilebileceğini ve elde edilen eksozomların GBM'de tedavi etkisi olduğunu göstermektedir (Zhu et al., 2019). Bu rapor doğrultusunda, tez kapsamında, EKH'lerle benzer morfoloji ve büyüme şekline sahip olan, aynı zamanda büyüme faktörlerine ve sinyal moleküllerine karşı aynı derecede hassas olan UPKH'ler kullanılarak düşük eksozom verimliliğinin önüne geçilmiştir.

Sınırsız çoğalma kapasitesi olan UPKH'lerle düşük eksozom verimliliği gibi bir problemin önüne geçtikten sonra, ikinci hedef, yeniden programlama faktörlerinin kombinasyonu ile oluşturulan UPKH kaynaklı eksozomların, LN18 hücreleri üzerinde uygulanarak GBM hücrelerinde canlılığı azaltmaktır. Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan EKH kaynaklı eksozom çalışmasından elde edilen veriler ışığında, tez çalışmasında 10^9 p/ml konsantrasyonda eksozom kullanılarak GBM hücrelerinin %31,2'lik bir kısmında ölüme yol açılmıştır.

GBM hücre canlılığının azaltılmasının ardından, UPKH-ekz'lerin GBM'deki terapötik rolünü belirlemek amaçlı yapılan tez çalışmasındaki üçüncü ve son hedef, UPKH-ekz'lerin GBM hücrelerinde hücre döngüsü, apoptoz ve GBM ile ilişki bazı genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisini analiz etmektir. Yapılan tez çalışmasında, 10^9 p/ml konsantrasyonda UPKH-ekz ile muamele edilmiş GBM hücrelerinde uygulanan GZ-PZR analiziyle, bu eksozomların hücre hayatta kalmasını teşvik eden CCND1, GBM hücrelerini proliferasyona yönlendiren EGFR, Akt, Raf-1, ve GBM'de invazyona sebep olan MMP-2 ve MMP-9 gibi genlerin ekspresyonunu düşürdüğü, buna ek olarak, apoptotik bir gen olan BAD'ın ekspresyonunu artırarak GBM'leri apoptoza yönlendirebileceği ve proliferatif özelliğini azaltabileceği görülmüştür. UPKH-ekz uygulanmasıyla, GBM hücrelerindeki bu genlerde meydana gelen değişiklikler, MTT testiyle elde edilen sonucu desteklemektedir.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, UPKH-ekz'lerin, GBM hücrelerinin proliferatif özelliklerini azaltabileceğini, invazyonun önüne geçebileceğini ve son olarak GBM hücrelerini apoptoza yönlendirebileceğini göstermekte ve literatürde bulunan raporu desteklemekle birlikte, UPKH-ekz'lerin GBM tedavisinde uygun bir terapötik araç olacağını düşündürmektedir.



7. ÖNERİLER

Tez çalışmasıyla elde edilen verilere dayanarak, UPKH-ekz'lerin çeşitli kimyasal moleküller veya miRNA gibi kodlanmayan RNA'larla kombine edilmesiyle GBM dahil olmak üzere birçok hastalık üzerinde uygulanabilir ve tedavide verimi arttırılabilir. Bu şekilde, çok işlevli UPKH'lerin tedavilerde terapötik potansiyeli yükselecektir.

Yapılan tez çalışması sonucunda elde edilen veriler, yenileme ve onarım özelliği olan UPKH'lerin salgıladığı ve mikro çevrelerinde bulunan, ekzozomların etkisinin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasının yanı sıra, kök hücre, sinir bilim, moleküler biyoloji ve hücresiz tedavi temelli alanlarda birden fazla proje için temel oluşturacaktır. Bu tez çalışması ve devamında yapılacak projeler, kök hücre tedavi alanında, yeni patent ve tedavi yöntemlerini oluşturacaktır. Bu projeler sayesinde GBM gibi beyin kanseri olan hastaların iyileşmeleri ve tekrardan hayata dönmeleri daha hızlı olabilir.

KAYNAKLAR

- Ahir, B. K., Engelhard, H. H., & Lakka, S. S.** (2020). Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Molecular Neurobiology*, 57(5), 2461–2478. doi: 10.1007/s12035-020-01892-8.
- Alenquer, M., & Amorim, M. J.** (2015). Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection. *Viruses*, 7(9), 5066–5083. doi: 10.3390/v7092862.
- Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H., & Molitor, M.** (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1111–1126. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.
- Bălăsa, A., Șerban, G., Chinezu, R., Hurghis, C., Tămaș, F., & Manu, D.** (2020). The Involvement of Exosomes in Glioblastoma Development, Diagnosis, Prognosis, and Treatment Adrian. *Brain Sciences*, 10(8), 553 doi: 10.3390/brainsci10080553.
- Bansal, K., Liang, M. L., & Rutka, J. T.** (2006). Molecular biology of human gliomas. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 5(3), 185–194. doi: 10.1177/153303460600500302.
- Bhatheja, K., & Field, J.** (2006). Schwann cells: Origins and role in axonal maintenance and regeneration. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(12), 1995–1999. doi: 10.1016/j.biocel.2006.05.007.
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S. A., ... & Chin, L.** (2014). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma *Cell*, 155(2), 462–477. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034.
- Buckingham, S. C., Campbell, S. L., Haas, B. R., Montana, V., Robel, S., Ogunrinu, T., & Sontheimer, H.** (2011). Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nature Medicine*, 17(10), 1269–1274. doi: 10.1038/nm.2453.
- Campos, B., Olsen, L. R., Urup, T., & Poulsen, H. S.** (2016). A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene*, 35(45), 5819–5825. doi: 10.1038/onc.2016.85.
- Caniglia, J. L., Jalsutram, A., Asuthkar, S., Sahagun, J., Park, S., Ravindra, A., Tsung, A. J., Guda, M. R., & Velpula, K. K.** (2021). Beyond glucose: Alternative sources of energy in glioblastoma. *Theranostics*, 11(5), 2048–2057. doi: 10.7150/thno.53506.
- Chacko, G.** (2011). Matrix metalloproteinases. *Neurology India*, 59(2), 224–225. doi: 10.4103/0028-3886.79123.
- Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., & Colman, H.** (2017). Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*, 14(2), 284–297. doi: 10.1007/s13311-017-0519-x.

- Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A. F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A. A., Hilton, M., Abrey, L., & Cloughesy, T.** (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 370(8), 709–722. doi: 10.1056/NEJMoa1308345.
- Clemente, D., Ortega, M. C., Melero-Jerez, C., & de Castro, F.** (2013). The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 1–15. doi: 10.3389/fncel.2013.00268.
- Costa, F. F., Seftor, E. A., Bischof, J. M., Kirschmann, D. A., Strizzi, L., Arndt, K., De Fatima Bonaldo, M., Soares, M. B., & Hendrix, M. J. C.** (2009). Epigenetically reprogramming metastatic tumor cells with an embryonic microenvironment. *Epigenomics*, 1(2), 387–398. doi: 10.2217/epi.09.25.
- Cui, N., Hu, M., & Khalil, R. A.** (2018). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl. Sci*, 147, 1–73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
- D'Alessio, A., Proietti, G., Sica, G., & Scicchitano, B. M.** (2019). Pathological and molecular features of glioblastoma and its peritumoral tissue. *Cancers*, 11(4), 469. doi: 10.3390/cancers11040469.
- Das, G., Shiras, A., Shanmuganandam, K., & Shastry, P.** (2011). Rictor regulates MMP-9 activity and invasion through Raf-1-MEK-ERK signaling pathway in glioma cells. *Molecular Carcinogenesis*, 50(6), 412–423. doi: 10.1002/mc.20723.
- Davis, M. E.** (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing*, 20(5), 2–8. doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8.
- Dennis, D. J., Han, S., & Schuurmans, C.** (2019). bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming. *Brain Research*, 1705, 48–65. doi: 10.1016/j.brainres.2018.03.013.
- Díez-Torre, A., Andrade, R., Eguizábal, C., López, E., Arluzea, J., Silió, M., & Aréchaga, J.** (2009). Reprogramming of melanoma cells by embryonic microenvironments. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), 1563–1568. doi: 10.1387/ijdb.093021ad.
- Doğanyığıt, Z., & Okan, A.** (2021). Glial Markers Used in Immunohistochemistry. In Evreklioğlu, C. (ed.), *Research & Reviews in Health Sciences - I* (ss. 7-20). Gece Publishing, İstanbul.
- Dotiwala, A. K., McCausland, C., & Samra, N. S.** (2022). Anatomy, Head and Neck, Blood Brain Barrier. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Du, R., Petritsch, C., Lu, K., Liu, P., Haller, A., Ganss, R., Song, H., Vandenberg, S., & Bergers, G.** (2008). Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro-Oncology*, 10(3), 254–264. doi: 10.1215/15228517-2008-001.
- Eskilsson, E., Røslund, G. V., Solecki, G., Wang, Q., Harter, P. N., Graziani, G., Verhaak, R. G. W., Winkler, F., Bjerkvig, R., & Miletic, H.** (2018). EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro-*

- Oncology*, 20(6), 743–752. doi: 10.1093/neuonc/nox191.
- Ferrer, V. P., Moura Neto, V., & Mentlein, R.** (2018). Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. *Glia*, 66(8), 1542–1565. doi: 10.1002/glia.23309.
- Freeman, M. R.** (2010). Specification and Morphogenesis of Astrocytes. *Science*, 330(6005), 774–778. doi: 10.1126/science.1190928.
- Frost, J. L., & Schafer, D. P.** (2016). Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends in Cell Biology*, 26(8), 587–597. doi: 10.1016/j.tcb.2016.02.006.
- Furnari, F. B., Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K., & Mischel, P. S.** (2015). Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat Rev Cancer*, 15(5), 302–310. doi: 10.1038/nrc3918.
- Gilbert, S. F.** (2000). *Developmental Biology*. 6th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J.** (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 1–19. doi: 10.1186/s12964-021-00730-1.
- Hanani, M., & Verkhratsky, A.** (2021). Satellite Glial Cells and Astrocytes, a Comparative Review. *Neurochemical Research*, 46(10), 2525–2537. doi: 10.1007/s11064-021-03255-8.
- Hasel, P., & Liddel, S. A.** (2021). Astrocytes. *Current Biology*, 31(7), 326–327. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.056.
- Hayashi, C., & Suzuki, N.** (2019). Heterogeneity of Oligodendrocytes and Their Precursor Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1190, 53–62. doi: 10.1007/978-981-32-9636-7_5.
- Hendrix, M. J. C., Seftor, E. A., Seftor, R. E. B., Kasemeier-Kulesa, J., Kulesa, P. M., & Postovit, L. M.** (2007). Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 246–255. doi: 10.1038/nrc2108.
- Hessvik, N. P., & Llorente, A.** (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193–208. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9.
- Janku, F., Yap, T. A., & Meric-Bernstam, F.** (2018). Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(5), 273–291. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.28.
- Jessen, K. R.** (2004). Glial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(10), 1861–1867. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.023.
- Jha, M. K., & Suk, K.** (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Frontiers in Oncology*, 3, 38. doi: 10.3389/fonc.2013.00038.
- Kaebisch, C., Schipper, D., Babczyk, P., & Tobiasch, E.** (2015). The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 75–84. doi: 10.1016/j.csbj.2014.11.003.
- Kalluri, R.** (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1208–1215. doi: 10.1172/JCI81135.

- Khakh, B. S., & Deneen, B.** (2019). The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annual Review of Neuroscience*, 42, 187–207. doi: 10.1146/annurev-neuro-070918-050443.
- Kidd, G. J., Ohno, N., & Trapp, B. D.** (2013). Biology of Schwann cells. In *Handbook of Clinical Neurology*. 1st ed. Elsevier B.V.
- Kobayashi, H., Ebisawa, K., Kambe, M., Kasai, T., Suga, H., Nakamura, K., Narita, Y., Ogata, A., & Kamei, Y.** (2018). Effects of exosomes derived from the induced pluripotent stem cells on skin wound healing. *Nagoya Journal of Medical Science*, 80(2), 141–153. doi: 10.18999/nagjms.80.2.141.
- Kolios, G., & Moodley, Y.** (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1), 3–10. doi: 10.1159/000345615.
- Kulesa, P. M., Kasemeier-Kulesa, J. C., Teddy, J. M., Margaryan, N. V., Seftor, E. A., Seftor, R. E. B., & Hendrix, M. J. C.** (2006). Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3752–3757. doi: 10.1073/pnas.0506977103.
- Lara-Velazquez, M., Al-Kharboosh, R., Jeanneret, S., Vazquez-Ramos, C., Mahato, D., Tavanaiepour, D., Rahmathulla, G., & Quinone-Hinojosa, A.** (2017). Advances in brain tumor surgery for glioblastoma in adults. *Brain Sciences*, 7(12), 1–16. doi: 10.3390/brainsci7120166.
- Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., Wang, E., & Wang, L.** (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22), 33440–33450. doi: 10.18632/oncotarget.7961.
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G.** (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), 3–32. doi: 10.1007/s12015-019-09935-x.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P.** (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W.** (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Ludwig, P. E., & Das, J. M.** (2022). Histology, Glial Cells. In: StatPearls. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.
- Lyustikman, Y., Momota, H., Pao, W., & Holland, E. C.** (2008). Constitutive activation of raf-1 induces glioma formation in mice. *Neoplasia*, 10(5), 501–510. doi: 10.1593/neo.08206.
- Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A. R., Ahadi, A. M., Molaei, F., & Alahari, S. K.** (2019). Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular Cancer*, 18(1), 75. doi: 10.1186/s12943-019-0991-5.

- McNeill, K. A.** (2016). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*, 34(4), 981–998. doi: 10.1016/j.ncl.2016.06.014.
- Modrek, A. S., Sumru Bayin, N., & Placantonakis, D. G.** (2014). Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World Journal of Stem Cells*, 6(1), 43-52. doi: 10.4252/wjsc.v6.i1.43.
- Moreno-Manzano, V.** (2020). Ependymal cells in the spinal cord as neuronal progenitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 50, 82–87. doi: 10.1016/j.coph.2019.11.008.
- Mrowczynski, O. D., Zacharia, B. E., & Connor, J. R.** (2019). Exosomes and their implications in central nervous system tumor biology. *Progress in Neurobiology*, 172, 71–83. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.06.006.
- Murphy, D. E., de Jong, O. G., Evers, M. J. W., Nurazizah, M., Schiffelers, R. M., & Vader, P.** (2021). Natural or synthetic RNA delivery: A stoichiometric comparison of extracellular vesicles and synthetic nanoparticles. *Nano Letters*, 21(4), 1888–1895. doi: 10.1021/acs.nanolett.1c00094.
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S.** (2014). The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro-Oncology*, 16(7), 896–913. doi: 10.1093/neuonc/nou087.
- Ou, A., Alfred Yung, W. K., & Majd, N.** (2021). Molecular mechanisms of treatment resistance in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–24. doi: 10.3390/ijms22010351.
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Hartigan, J., Smith, D. R., ... Kinzler, K. W.** (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*, 321(5897). doi: 10.1126/science.1164382.
- Phinney, D. G., & Pittenger, M. F.** (2017). Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells Express*, 35(4), 851–858. doi: 10.1002/stem.2575.
- Pullen, N., Pickford, A., Perry, M., Jaworski, D., Loveson, K., Arthur, D., Holliday, J., Van Meter, T., Peckham, R., Younas, W., Briggs, S., MacDonald, S., Butterfield, T., Constantinou, M., & Fillmore, H.** (2018). Current insights into matrix metalloproteinases and glioma progression: transcending the degradation boundary. *Metalloproteinases In Medicine*, 5, 13–30. doi:10.2147/MNM.S105123.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W.** (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138.
- Sherman, J. H., Kirzner, J., Siu, A., Amos, S., & Hussaini, I. M.** (2014). Sorafenib tosylate as a radiosensitizer in malignant astrocytoma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(1), 131–136. doi: 10.1016/j.jocn.2013.04.010.
- Sigismund, S., Avanzato, D., & Lanzetti, L.** (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology*, 12(1), 3–20. doi: 10.1002/1878-0261.12155.
- Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadi, S., & Aval, F. S.** (2017). Multipotent stem cell and current

- application. *Acta Medica Iranica*, 55(1), 6–23.
- Soomro, S. H., Ting, L. R., Qing, Y. Y., & Ren, M.** (2017). Molecular Classification of Glioblastoma. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(9), 1410–1414.
- Stogsdill, J. A., & Eroglu, C.** (2018). The interplay between neurons and glia in synapse development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 4(3), 1–8. doi:10.1016/j.conb.2016.09.016.
- Stupp, R., Mason, W. P., ... & Mirimanoff, R. O.** (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients. *The New England Journal of Medicine*, 352, 987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330.
- Sun, K., Luo, J., Guo, J., Yao, X., Jing, X., & Guo, F.** (2020). The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 28(4), 400–409. doi: 10.1016/j.joca.2020.02.027.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S.** (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tan, Z. J., Ju, S. H., Huang, X., Gu, Y. K., & Su, Z. Da.** (2017). Glial cells function as neural stem cells and progenitor cells. *Sheng Li Xue Bao : [Acta Physiologica Sinica]*, 69(2), 207–217.
- Uyar R.** (2022). Glioblastoma microenvironment: The stromal interactions. *Pathology, Research and Practice*, 232, 153813. doi: 10.1016/j.prp.2022.153813.
- Wagle, N., Nguyen, M., Carrillo, J., Truong, J., Dobrawa, L., & Kesari, S.** (2021). Characterization of molecular pathways for targeting therapy in glioblastoma. *Chinese Clinical Oncology*, 9(6), 1–8. doi: 10.21037/cco-20-124.
- Wang, A. Y. L.** (2021). Human induced pluripotent stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for various diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–17. doi: 10.3390/ijms22041769.
- Wang, J., Liu, J., Sun, G., Meng, H., Wang, J., Guan, Y., Yin, Y., Zhao, Z., Dong, X., Yin, S., Li, H., Cheng, Y., Wu, H., Wu, A., Yu, X., & Chen, L.** (2019). Glioblastoma extracellular vesicles induce the tumour-promoting transformation of neural stem cells. *Cancer Letters*, 466, 1-12. doi: 10.1016/j.canlet.2019.09.004.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S. I., Muguruma, K., & Sasai, Y.** (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(6), 681–686. doi: 10.1038/nbt1310.
- Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M.** (2016). Glioblastoma. In *Handbook of Clinical Neurology* 134, 381–397. doi: 10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2.
- Xue, Q., Li, C., Chen, X. Y., Zhao, J., Gao, L., Li, S. Z., & Fei, Z.** (2017). High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is associated with patient survival rates. *Oncology Letters*, 13(3), 1325–1330. doi: 10.3892/ol.2017.5567.
- Yamazaki, Y.** (2019). Oligodendrocyte Physiology Modulating Axonal Excitability and Nerve Conduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1190, 123–144. doi: 10.1007/978-981-32-9636-7_9.

- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O.** (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(2015), 1–60. doi: 10.3402/jev.v4.27066.
- Young, R. A.** (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, 144(6), 940–954. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.032.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A.** (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. doi: 10.1126/science.1151526.
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P.** (2020). Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6917–6934. doi: 10.2147/IJN.S264498.
- Zhu, Q., Ling, X., Yang, Y., Zhang, J., Li, Q., Niu, X., Hu, G., Chen, B., Li, H., Wang, Y., & Deng, Z.** (2019). Embryonic stem cells-derived exosomes endowed with targeting properties as chemotherapeutics delivery vehicles for glioblastoma therapy. *Advanced Science*, 6(6), 1801899. doi: 10.1002/advs.201801899.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Beyza Yılmaz

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2019, Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2022, Haliç Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı

DiĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Yılmaz, B., Ebrahimi-Kalan, A., Ebrahimi, A. (2021). Neuronal Differentiation and Related Factors. In Evereklioglu, C. (ed.), Research & Reviews in Health Sciences–I, 12, 177-211, Gece Publishing, İstanbul.