T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

DİRENÇLİ AKCİĞER KANSER KÖK HÜCRELERİNE MOLEKÜLER MÜHENDİSLİK İLE HEDEFLENDİRİLMİŞ EKSOZOM-ENKAPSÜLE SİRNA'LARLA HÜCRELERDEKİ İLAÇ DİRENCİNİN ÖNLENMESİ

BAHAR DEMİR CEVİZLİDERE

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. AYLA EKER SARIBOYACI

Eskişehir

2023

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

DİRENÇLİ AKCİĞER KANSER KÖK HÜCRELERİNE MOLEKÜLER MÜHENDİSLİK İLE HEDEFLENDİRİLMİŞ EKSOZOM-ENKAPSÜLE SİRNA'LARLA HÜCRELERDEKİ İLAÇ DİRENCİNİN ÖNLENMESİ

BAHAR DEMİR CEVİZLİDERE

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. AYLA EKER SARIBOYACI

Eskişehir

2023

Proje No: TÜBİTAK 1002 221S319

TÜBİTAK 1004 20AG031

TEŞEKKÜR

Sadece doktora sürecimde değil hayatımın birçok noktasında büyük emeği olan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, benimle her türlü bilgi ve tecrübesini paylaşan, benim için bir hocadan daha fazlası olabilen ve öğrencisi olduğum her anın gururunu ömür boyu taşıyacağım sevgili danışman hocam Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI'ya, benden bilimsel desteklerini bir gün bile esirgemeyen ve her zaman güçlü kimlikleriyle beni güvende hissettiren sevgili hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Onur UYSAL ve Doç. Dr. Hüseyin AVCI'ya,

Tüm doktora sürecimdeki paha biçilemez bilimsel desteklerini esirgemeyen canım hocam Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen ESTEM ekibindeki kendini bilime adamış tüm bilim dostlarıma ve ESTEM personellerine çok teşekkür ederim.

Doktora sürecim ESOGÜ, SBE, Kök Hücre Anabilim Dalı, YÖK 100/2000 bursu (2017/2018-Bahar) kapsamında ve "Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği" öncelikli alanında ve TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB), Eğitim Burs ve Etkinlik Destekleri Grubu, 2211/A Yurt İçi Doktora Programı çerçevesinde desteklenmiştir. Bu tez, TÜBİTAK 1004 20AG031 ve 1002 221S319 No'lu projeleri ve ESOGÜ, Tıp Fakültesi Hücresel Tedavi ve Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin (ESTEM'in) tüm araştırma altyapısı kapsamında desteklenmiştir. Aynı zamanda ESOGÜ-ESTEM, YÖK ve TÜBİTAK'a desteklerinden dolayı şükranlarımı sunarım.

Doğduğum günden beri maddi manevi desteklerini bir an olsun esirgemeyen, her zaman elimden tutarak beni daha ileriye taşıyan sevgili annem Birsen DEMİR, babam Güven DEMİR ve kardeşim Ceydanur DEMİR'e ve tanıştığımız günden beri beni öz kızlarından ayırmayan sevgili babam Hüseyin CEVİZLİDERE ve annem Leyla CEVİZLİDERE'ye

Tüm hayatım boyunca elimi bir an olsun bırakmayan ve hayatımda olduğu her ana şükrettiğim sevgili eşim Hakan CEVİZLİDERE ve hayatıma girdiği günden beri beni ben yapan ve yaşamayı anlamlı kılan canım kızım Güneş CEVİZLİDERE'ye sabır ve desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bahar DEMİR CEVİZLİDERE

ÖZET

Başlık: Dirençli akciğer kanser kök hücrelerine moleküler mühendislik ile hedeflendirilmiş eksozom-enkapsüle siRNA'larla hücrelerdeki ilaç direncinin önlenmesi

Amaç: Bu tez çalışmasında Gemsitabin ile dirençli hale getirilen A549'lardan izole edilen kanser kök hücreleri (dKKH; $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$) ile ko-kültüre edilen siRNA (KKH'de yüksek düzeyde eksprese olan çoklu ilaç direnç genlerinden ABCB1 genine özgü) transfekte ve Hyaluronik asitle(HA) enkapsüle edilmiş insan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücre eksozomlarının dKKH'lerdeki MDR1 susturulması-aracılı etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Gemsitabin dirençli A549 hücrelerinden $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ Hücre izolasyonları gerçekleştirildikten sonra CFU analizi, 3 Boyutlu sfer oluşturabilme yetenekleri, MTT yöntemiyle sitotoksisite analizi, büyüme eğrisi, immunofloresan işaretleme ve flow sitometri yöntemleriyle pozitiflikleri karakterize edildi. MKH'lerden eksozom izolasyonlarından sonra flow sitometri ve TEM analizleriyle karakterizasyon analizleri gerçekleştirildi. MDR1-siRNA'lar eksozomlara transfekte edilerek yüklenme kapasiteleri araştırıldı. HA-kaplanmış-siRNA-transfekte-eksozomların KKH'lerdeki başarısı flow sitometri ve PCR analizleriyle gösterildikten sonra IF işaretlemeyle Aktif Kaspaz-3 boyaması, flow sitometri ile Annexin V/PI ve bazı apoptoz genleri için qPCR ile apoptotik analizler gerçekleştirildi. Ayrıca flow sitometriyle hücre döngüsü analizi ile tedavi stratejilerinin etkileri araştırılmıştır.

Bulgular: A549 hücrelerine Gemsitabin direnci kazandırılarak sitotoksisite analizi ile IC_{50} değerlerinin yükseldiği ve hücrelerin belirgin, canlılık oranı yüksek ve iki boyutlu koloni oluşturma yetenekleri gösterildi. d-A549'lardan $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ izolasyonları gerçekleştirildi ve izolasyonların verimliliğinin yüksek saflık ve canlılıkta olduğu belirlendi. siRNA transfekte eksozomların A549, KKH ve dKKH gruplarındaki MDR1 seviyelerindeki azalmalar belirlendi. Apoptotik ve hücre döngüsü analizlerinde KKH'lerdeki Gemsitabin direncinin kırıldığı ve hücrelerin apoptoza yönlendirilebildiği belirlendi.

Sonuç: Bu tez çalışmasından elde edilen verilere göre d-KKH'lerde eksozom aracılı siRNA'ların hedef genleri başarıyla sessizleştirebileceği ve ABCB1 gen ekspresyonunun azalması ile KKH'lerde kemodirencin azalarak kemoterapötiklerin yeniden kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çoklu ilaç direnci, Kanser Kök Hücre, Eksozom, Gemsitabin, RNAi, MDR

ABSTRACT

Title: Prevention of resistance by targeting exosome-encapsulated siRNAs to Resistant lung cancer stem cells by molecular engineering

Objective: In this thesis study, it was aimed to investigate the MDR1 silencing-mediated effect on lung resistant CSC (rt-CSC;D326+CD133+CD44+), which is isolated from Gemsitabine-resistant A549 cells. For this purpose, MDR1 spesific siRNA (specific to ABCB1 gene, one of the multidrug resistance genes highly expressed in CSC) were transfected to exosomes and were coated with Hyaluronic acid(HA) and this combinations were co-cultured with rt-CSC.

Methods: After isolation of CD326+CD133+CD44+cells from Gemsitabine-resistant-A549 their positivity was characterized by CFU analysis, ability to form 3D (3D) spheres, cytotoxicity analysis, growth curve, immunofluorescence labeling and flow cytometry methods. After MSC-derived-exosome isolations, characterization analyzes were performed with flow cytometry and TEM analyzes. MDR1 siRNAs were transfected into exosomes and their loading capacity was investigated. After the success of HA-coated-siRNA-transfected-exosomes in CSCs was demonstrated by flow cytometry and PCR analysis, Active Caspase-3 staining with IF labeling, Annexin V/PI with flow cytometry, and apoptotic analyzes with qPCR were performed. In addition, the effects of cell cycle analysis and treatment strategies were investigated.

Results: Gemcitabine resistance was proven in A549 cells, with cytotoxicity analysis were increased and the cells were prominent, viable, and had the ability to form two-dimensional colonies. CD326+CD133+CD44+ isolations from resistant-A549 were performed and it was determined that the efficiency of the isolations was of high purity and viability. Decreases in MDR1 levels in A549, CSC and rt-CSC groups of siRNA-transfected exosomes were determined. In apoptotic and cell cycle analyzes, it was determined that Gemcitabine tolerance was re-established in rt-CSCs and cells could be directed to apoptosis.

Conclusions: According to the data obtained from this thesis study, it was concluded that exosome-mediated siRNAs can successfully silence target genes in rt-CSCs and that chemotherapeutics can be reused by decreasing chemoresistance in rt-CSCs with decreased ABCB1 gene expression.

Keywords: Multi Drug Resistance, Cancer Stem Cell, Exosome, Gemcitabin, MDR1 siRNA

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL ONAYI.....
ETİK BEYAN.....
TEŞEKKÜR .....
ÖZET i
ABSTRACT..... iii
SİMGE VE KISALTMALAR..... xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
TABLOLAR DİZİNİ..... xxvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER..... 7
2.1. Kanserin Tarihçesi ve Kanser Tanımı..... 7
2.2. Kök Hücreler ve Özellikleri 7
2.3. Kanser Kök Hücreler ve Kanser Kök Hücre Teorisi 10
2.4. Kanser Kök Hücrelerin Kökeni 14
2.5. Kanser Kök Hücrelerin Kimliklendirilmesi 15
2.6. Kanser Kök Hücrelerinin Direnç Mekanizmaları.....16
2.6.1. ABC taşıyıcılar ile ilaç eflaks mekanizması 17
2.6.1.1. P-glikoprotein.....19
2.7. Kanser Kök Hücrelerde Etkili Sinyal Yolakları 21
2.8. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi 23
2.8.1. Akciğer kanser kök hücre özellikleri.....23
2.9. Akciğer Kanser Kök Hücreleri ve Belirteçleri 25
2.9.1. CD326 Yüzey Belirtecinin Yapısı ve Özellikleri.....25
2.9.2. CD133 Yüzey Belirtecinin Yapısı ve Özellikleri.....26
2.9.3. CD44 Yüzey Belirtecinin Yapısı ve Özellikleri 27
2.10.Gemsitabin.....28
2.10.1. Akciğer kanserinde Gemcitabin direnci 29
2.11.Kanser Tedavisinde Taşıyıcı Sistem Olarak Eksozomlar 30
2.11.1. Eksozomların Hyaluronik Asit ile enkapsülasyonu 35
2.11.2. Apoptoz.....36
2.11.3. Apoptozda görev alan moleküller ve moleküler düzenleyiciler 37
2.11.3.1. Bcl-2 ailesi 37

2.11.3.2. p53 38
2.11.3.3. Kaspazlar 39
2.12.Apoptoz Mekanizmaları 39
2.13.İntirinsik (Mitokondriyal aracılı/iç) yolak, ... 39
2.14.Ekstrinsik (Reseptör aracılı/Dış) Yolak 41
2.15.Hücre Döngüsü 43
2.15.1. G1/S 44
2.15.2. G2/M 45
3. GEREÇ ve YÖNTEM 46
3.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler ve Temini 46
3.1.1. İnsan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi (A549) 46
3.1.2. CD44+CD326+CD133+akciğer kanser kök hücreleri 46
3.1.3. İnsan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücreleri (iSS-MKH'ler) 47
3.2. A549 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi 47
3.2.1. Hücrelerin çözdürülmesi, kültürü ve stoklanması 47
3.3. Gemsitabin Dirençli A549 (d-A549) Akciğer Hatlarının Oluşturulması 48
3.3.1. Gemsitabinin hazırlanması 48
3.3.2. A549 hücrelerine Gemsitabin direnci kazandırmak gerekli Gemsitabin dozunun Koloni oluşturma potansiyeli (CFU) analizi ile belirlenmesi 48
3.3.3. A549 hücrelerine Gemcitabin direnci oluşturma 49
3.3.4. Gemsitabin direnci geliştirilen dA549 hücrelerinde CFU analizi 50
3.3.5. Dirençli A549 Akciğer kanser hücrelerinin saflaştırılması için single cell analizi 50
3.4. Dirençli ve Dirençsiz A549 Hücrelerinden CD326+CD133+CD44+ Akciğer Kanser Kök Hücrelerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tümörsferik Kültürü 51
3.4.1. Kanser kök hücrelerin immunselektif olarak izolasyonu 51
3.4.2. CD326+ CD133+ ve CD44+ akciğer kanser kök hücrelerin izolasyon verimliliğinin immunofenotipik olarak karakterizasyonu 52

3.4.2.1. CD326+ CD133+ ve CD44+kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu 53
3.4.2.2. CD326+ CD133+ ve CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin immunfloresan işaretleme ile immunositokimyasal karakterizasyonu 53
3.4.2.3. CD326+CD133+ ve CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin büyüme eğrisi 54
3.4.2.4. A549, Dirençli ve Dirençsiz CD326+ CD133+CD44+ hücrelerinde sitotoksisite analizi 54
3.4.3. CD326+ CD133+ ve CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin üç boyutlu kültürü ve çoğaltılması 55
3.5. iSS-MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü 56
3.6. iSS-MKH'lerin Karakterizasyonu ve Kültürü 57
3.6.1. iSS-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu 57
3.6.2. iSS-MKH'lerin Karakterizasyonu için in vitro farklılaşma analizleri 58
3.6.2.1. Adipojenik Farklılaşma 58
3.6.2.2. Osteojenik farklılaşma 58
3.6.2.3. Kondrojenik farklılaşma 58
3.6.3. iSS-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu 59
3.7. iSS-MKH'lerden Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu 59
3.7.1. iSS-MKH'lerden eksozom izolasyonu 59
3.7.2. iSS-MKH-Exo'ların total protein analizi 60
3.7.3. iSS-MKH-Exo'ların immunfenotiplemesi 60
3.7.4. iSS-MKH-Exo'ların TEM ile karakterizasyonu 61
3.7.5. iSS-MKH-Exo'ların zeta potansiyellerinin ölçülmesi 61
3.8. MDR1 siRNA'ların Eksozomlarla Enkapsüle Edilmesi ve Karakterizasyonu 62
3.8.1. MDR1 siRNA'ların eksozomlarla enkapsülasyonu 62
3.8.2. iSS-MKH-Exo ve -iSS-MKH-MDR1-Exo'ların uptake analizi 62
3.8.3. HA-iSS-MKH-Exo'ların HA ile kaplanması 63
3.8.3.1. HA-iSS-MKH-Exo'ların TEM ile karakterizasyonu 63

3.8.4. MDR1 hedefli siRNA'ların iSS-MKH-Exo'lara transfeksiyonunu belirlemek için iSS-MKH-Exo'larından total RNA izolasyonu 63
3.8.5. iSS-MKH-Exo'lara siRNA transfeksiyonunun kapasitesinin agaroz jel ile gösterilmesi 64
3.8.6. iSS-MKH-Exo'larının HA ile enkapsülasyonunun ve siRNA transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler üzerindeki MTT yöntemi ile sitotoksisitesinin analizi.....65
3.9. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler üzerindeki apoptotik etkisinin aktif kaspaz 3 ile IF yöntemle analizi.....65
3.10. MDR1 Hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonu Sonrası A549, KKH ve dKKH'lerdeki MDR1 Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi 66
3.11.MDR1 Hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'lerdeki Apoptotik Etkisinin Annexin V/PI İle Flow Sitometrik Analizi.....67
3.12.MDR1 Hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'lerdeki Apoptotik Etkisinin Flow sitometri ile Hücre Döngüsü Analizi 67
3.13.MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'lerin Real Time (qPCR) İle Genotipik Analizi.....68
3.13.1. A549, KKH ve dKKH'lerden Total RNA izolasyonu.....68
3.13.2. RNA konsantrasyonunun ölçümü 69
3.13.3. cDNA eldesi.....70
3.13.4. Real Time (qPCR) gen ekspresyon analizi ile A549, KKH ve dKKH'lerde apoptozun belirlenmesi.....70
3.14.İstatistiksel analiz.....72
4. BULGULAR 73
4.1. A549 Hücrelerinin Kültürü 73
4.2. Gemsitabin Dirençli A549 (d-A549) Akciğer Hatlarının Oluşturulması.....73
4.2.1. Koloni oluşturma potansiyeli (CFU) analizi.....74
4.2.2. A549 hücrelerine Gemsitabin direnci oluşturulması.....75
4.2.3. Gemsitabin direnci geliştirilen hücrelerde CFU Analizi 77

4.3. Dirençli ve dirençsiz A549 hücrelerinden CD326+CD133+CD44+ Akciğer Kanser Kök Hücrelerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tümörsferik kültürü 79
4.3.1. Dirençsiz CD326+CD133+CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin izolasyon verimliliğinin immunofenotipik olarak karakterizasyonu.....79
4.3.1.1. CD326+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu.....79
4.3.1.2. CD133+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu.....80
4.3.1.3. CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu.....82
4.3.2. Dirençli A549 Akciğer kanser hücrelerinin saflaştırılması için single cell analizi 84
4.3.3. Dirençli CD326+CD133+CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin izolasyon verimliliğinin immunofenotipik karakterizasyonu 85
4.3.3.1. CD326+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu.....85
4.3.3.2. CD133+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu.....87
karakterizasyonu 88
4.3.4. İzole edilen dirençli ve dirençsiz $CD326^{+}$ $CD133^{+}$ $CD44^{+}$ hücrelerinin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonları.....90
4.3.5. Dirençsiz ve dirençli CD326+CD133+CD44+ hücrelerinde MDR1'in flow sitometri ile immunofenotipik analizi.....94
4.3.6. Dirençsiz ve dirençli CD326+CD133+CD44+kanser kök hücrelerin karakterizasyonu….....95
4.3.7. CD326+CD133+CD44+Akciğer kanser kök hücrelerin büyüme eğrisi…….....……105
4.3.8. A549, Dirençli ve Dirençsiz CD326+CD133+CD44+ hücrelerinde sitotoksisite analizi 107
4.3.9. Dirençli ve dirençsiz CD326+CD133+CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin üç boyutlu kültürü ve çoğaltılması.....109

4.4. iSS-MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü.....111
4.5. iSS-MKH'lerin İmmunofenotipik Olarak Karakterize Edilmesi.....112
4.5.1. iSS-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu.....112
4.5.2. iSS-MKH'lerin immunofluoresan işaretleme ile immunofenotiplemesi.....114
4.5.3. iSS-MKH'lerin karakterizasyonu için in vitro farklılaşma analizleri.....115
4.6. iSS-MKH'lerden Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....117
4.6.1. iSS-MKH-Exo'ların total protein analizi.....117
4.6.2. iSS-MKH-Exo'ların immunfenotiplemesi.....118
4.6.3. iSS-MKH-Exo'ların TEM ile karakterizasyonu.....118
4.6.4. iSS-MKH-Exo'ların zeta potansiyellerinin ölçülmesi.....119
4.7. MDR1 siRNA'ların Eksozomlarla Enkapsüle Edilmesi ve Karakterizasyonu.....120
4.7.1. MDR1 siRNA'ların eksozomlarla enkapsülasyonunun TEM ile gösterilmesi.....120
4.7.2. iSS-MKH-Exo'lara MDR-1 siRNA'ların transfeksiyonu ve transfeksiyonun kontrolü.....121
4.7.3. iSS-MKH-eksozomların uptake analizi.....121
4.7.4. MDR1 hedefli siRNA'ların iSS-MKH-Ekso'lara transfeksiyonunu belirlemek için iSS-MKH-Ekso'larının RNA analizi.....124
4.7.5. iSS-MKH-Eksolara siRNA transfeksiyonunun belirlenmesi için MDR1 proteininin jel elektroforez ile belirlenmesi.....125
4.7.6. iSS-MKH-Eksolara siRNA transfeksiyonunun belirlenmesi için flow sitometri analizi.....126
4.7.7. iSS-MKH-Eksozomlara siRNA transfeksiyonunun belirlenmesi için RT-qPCR ile analizi.....132
4.8. iSS-MKH-Eksozomlarının HA ile Enkapsülasyonunun ve siRNA Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler Üzerindeki Sitotoksisitesinin Analizi.....133

4.9. MDR1 Hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Aktif Kaspaz 3 ile IF Yöntemle Analizi 137
4.10. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Annexin V/PI ile Flow Sitometrik Analizi 139
4.11. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Flow Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi 148
4.12. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'lerin MDR1 Geni ve Apoptozunun Üzerindeki Etkisinin Real Time (qPCR) ile Genotipik Analizi 157
5. TARTIŞMA 160
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 174
7. KAYNAKLAR DİZİNİ 176
8. EKLER DİZİNİ ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 8.1 Etik Kurul Kararı .....
EK 8.2. İntihal Raporu ..... .
9. ÖZGEÇMİŞ ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGE VE KISALTMALAR

KKH	:	Kanser Kök Hücre
dKKH	:	Dirençli Kanser Kök Hücre
RNAi	:	RNA interferans
G	:	Gemsitabin
Exo	:	Eksozom
HA	:	Hyaluronik asit
MKH	:	Mezenkimal Kök Hücre
2B:	:	İki Boyutlu
3B:	:	Üç Boyutlu
ECM	:	Ekstraselüler Matriks
Askorbik Asit:	:	2-Phospho-L-ascorbic Acid
DAPI:	:	4’,6-Diamidino-2-Fenilindol
dk:	:	Dakika
DMEM/F12:	:	Dulbecco’s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMEM:	:	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO:	:	Dimetil Sülfoksit
EDTA:	:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
FBS:	:	Fetal Sığır Serumu
FGF:	:	Fibroblast Büyüme Faktörü-I

FN:	:	Fibronektin
IGF-I:	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-Like Growth Factor-I)
ITS:	:	İnsulin/Transferin/Serin Solüsyonu
İF	:	İmmunofloresan
µM	:	Mikromolar
ml veya mL:	:	Mililitre
mm:	:	Milimetre
mM:	:	Milimolar
PBS:	:	Fosfat Tamponu
PCR:	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDMS:	:	Polidimetilsiloksan
Sn	:	Saniye
µm:	:	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kök hücrelerin self-renewal ve farklı dokulara farklılaşabilme özelliklerinin şematik görüntüsü..... 8

Şekil 2. 2. Kök hücrelerde yaşam döngüsü 9

Şekil 2. 3. Kanser oluşumunda öne sürülen teoremlerin şematik gösterimi 12

Şekil 2. 4. Kanser kök hücrelerin tümör gelişimindeki rolünün şematik gösterimi 13

Şekil 2. 5. Kanser kök hücrelerin tedaviye olan dirençlerine aracılık eden mekanizmaların şematik gösterimi 19

Şekil 2. 6. P-glikoprotein substrat transportunun modellenmesi. 21

Şekil 2. 7. Hyaluronik asit ve CD44 reseptörlerinin etkileşiminin gösterilmesi (Akim vd., 2021).....28

Şekil 2. 8. Gemcitabinin kimyasal yapısı (National Center for Biotechnology Information).....29

Şekil 2. 9. Apoptozda intirinsik ve ekstirinsik yolaklarının şematik gösterimi (BD Editors 2017).....42

Şekil 2. 10. Hücre döngüsünün şematik gösterimi (Matthews vd., 2022) 43

Şekil 4. 1. A549 hücrelerinin 25.pasajın 2.gününde (P25) faz kontrast invert mikroskobik görüntüsü. (ölçü çubuğu = 200 µm). 73

Şekil 4. 2. A549 hücrelerinde farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında oluşan kolonilerin CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile gösterimi. 1600 µM doz (I) görüntüsünde koloni oluşumu gözlenmez iken IC_{50} dozuna göre oldukça yüksek olan 12,5 µM (B) dozunda sağlıklı ve belirgin koloniler izlendi. 74

Şekil 4. 3. A549 hücrelerinde farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile elde edilen kolonilerin istatiksel analizi ($p<0.0001$****) 75

Şekil 4. 4. A549 hücrelerinde her bir Gemsitabin dozu uygulaması sonrasında direnç geliştiren kolonilerinin faz kontrast invert mikroskobik görüntüsü A:12,5 µM, B: 25 µM, C: 50 µM, D: 100 µM, E: 200 µM,

F: 400 µM, G: 800 µM, H: 1600 µM dozlarında hücre koloni görüntüleri. H: 1600 µM dozlarında izlenen belirgin ve sağlıklı koloniler (ölçü çubuğu 100 µm). 76

Şekil 4. 5. Gemsitabin dirençli A549 hücrelerinde farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında oluşan kolonilerin CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile gösterimi. F: 1600 µM dozun uygulandığı kuyucukta genel olarak koloni oluşumu net olarak gözlenmezken az sayıda kuyucukta 1adet sağlıklı ve belirgin koloni izlendi. 77

Şekil 4. 6. Dirençli A549 hücrelerinin maksimum dayanabildikleri Gemsitabin konsantrasyonu belirlemek için gerçekleştirdiğimiz koloni oluşturma potansiyeli (CFU) analizinde CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile elde edilen koloni sayılarının istatiksel analizi ($p<0.0001$****). Farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında 100 µM dozda 50 µM ile karşılaştırıldığında daha az sayıda koloni izlendi ($p<0.0002$***). 100, 200, 400, 800, 1600 µM dozları 50 µM ile karşılaştırıldığında daha az sayıda koloni izlendi ($p<0.0001$****). Sonuç olarak bu analizde A549 hücrelerinin maksimum dayanabildikleri Gemsitabin konsantrasyonu 1600 µM olarak belirlendi. 78

Şekil 4. 7. İzolasyonun birinci aşamasında; A549 hücrelerinden $CD326^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. A: $CD326^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %17.24 oranında canlılık belirlendi. C: İzolasyon sonrası $CD326^+$ pozitifliği %52.59 olarak izlendi.....79

Şekil 4. 8. A549 hücrelerinden elde edilen $CD326^+$ hücre izolasyonunun birinci aşaması sonrası hücrelerin faz kontrast invert mikroskobik görüntüsü (ölçü çubuğu = 200 µm).....80

Şekil 4. 9. $CD326^+$ hücrelerinden $CD133^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. A: $CD326^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %35.56 oranında canlılık belirlendi. C: İzolasyon sonrası $CD326^+$ pozitifliği (%45.99); D: $CD133^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre

%37.91 oranında canlılık belirlendi. F: İzolasyon sonrası CD133$^+$ pozitifliği (%42.71) olarak izlendi. 81

Şekil 4. 10. CD326$^+$ hücrelerinden elde edilen CD133$^+$ hücre izolasyonu sonrası CD326$^+$ ve CD133$^+$hücrelerinin faz kontrast invert mikroskobik görüntülenmesi. (ölçü çubuğu = 200 µm). 82

Şekil 4. 11. CD326$^+$ CD133$^+$ hücrelerinden CD44$^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. A: CD326$^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %89.15 oranında canlılık belirlendi. C: İzolasyon sonrası CD326$^+$ pozitifliği. (%63.42); D: CD133$^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %89.73 oranında canlılık belirlendi. F: İzolasyon sonrası CD133$^+$ pozitifliği (%50.96); G: CD44$^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %86.80 pozitiflik belirlendi. I: İzolasyon sonrası CD44$^+$ pozitifliği (%99.99) 83

Şekil 4. 12. CD326$^+$ CD133$^+$ hücrelerinden elde edilen CD44$^+$ hücre izolasyonu sonrası CD326$^+$ CD133$^+$CD44$^+$ hücrelerinin faz kontrast invert mikroskobik görüntülenmesi. (ölçü çubuğu = 200 µm). 84

Şekil 4. 13. Dirençli A549 hücreleri için yapılan single cell izolasyonunda faz kontrast ışık mikroskop altındaki görüntüleri. A, B ve C: 1-10 adet hücre düşen hücrelerin ekim yapıldıktan sonraki sıfırıncı gündeki görüntüsü. D: 7-8. Günlerde oluşan ilk koloni görüntüleri. E-F: 15. Gündeki dirençli hücre kolonileri daha belirgin olarak izlendi (ölçü çubuğu = 200 µm). 85

Şekil 4. 14. İzolasyonun birinci aşamasında; d-A549 hücrelerinden CD326$^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. A: CD326$^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %36.21 oranında canlılık belirlendi. C: İzolasyon sonrası CD326$^+$ pozitifliği %38.73 olarak izlendi. 86

Şekil 4. 15. dA549 hücrelerinden elde edilen CD326$^+$ hücre izolasyonunun birinci aşaması sonrası hücrelerin faz kontrast invert mikroskobik görüntüsü (ölçü çubuğu = 200 µm). 86

Şekil 4. 16. CD326$^+$ hücrelerinden CD133$^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. A: CD326$^+$ ilk kapılaması

yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %17.24 oranında canlılık belirlendi. C: İzolasyon sonrası $CD326^+$ pozitifliği (%57.40); D: $CD133^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre. %36.85 oranında canlılık belirlendi. F: İzolasyon sonrası $CD133^+$ pozitifliği (%41.82) olarak izlendi. 87

Şekil 4. 17. Dirençli $CD326^+$ hücrelerinden elde edilen $CD133^+$ hücre izolasyonu sonrası $CD326^+$ ve $CD133^+$hücrelerinin faz kontrast invert mikroskobik görüntülenmesi. (ölçü çubuğu = 200 µm). 88

Şekil 4. 18. Dirençli $CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinden $CD44^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. A: $CD326^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %88.33 oranında canlılık belirlendi. C: İzolasyon sonrası $CD326^+$ pozitifliği (%60.54); D: $CD133^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %89.58 oranında canlılık belirlendi. F: İzolasyon sonrası $CD133^+$ pozitifliği (%79.37); G: $CD44^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %86.28 pozitiflik belirlendi. I: İzolasyon sonrası $CD44^+$ pozitifliği (%100.00) olarak izlendi.....89

Şekil 4. 19. Dirençli $CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinden $CD44^+$ hücre izolasyonu sonrası faz kontrast ışık mikroskobu altındaki direnç koloni görüntüsü. (ölçü çubuğu = 200 µm). İzolasyondan sonraki dördüncü (B) ve yedinci (A) gününde oluşan koloni görüntüleri.....90

Şekil 4. 20. Dirençsiz $CD326^+CD133^+CD44^+$ hücrelerinin (KKH) flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu. Kanser kök hücrelere özgü immunofenotipik yüzey belirteçleri bakımından ABCG2, CD90 ve $CD326^+/CD44^+$ ve $CD133^+/CD44^+$ beraber pozitiflikleri flow sitometri ile gösterilmiştir. A: ABCG2 pozitifliği %52.86 olarak B: CD90 pozitifliği %88.99 olarak, C: $CD326^+CD44^+$ beraber pozitifliği %99.96 olarak ve D: $CD133^+$ $CD44^+$ beraber pozitifliği %99.57 olarak belirlendi 91

Şekil 4. 21. Dirençsiz $CD326^+CD133^+CD44^+$ hücrelerinin (KKH) flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu verilerinin gösterimi ve istatiksel analizi gerçekleştirildi. Tüm flow sitometrik sonuçlar anlamlı olarak bulundu ($p<0.0001$****). 92

Şekil 4. 22. dirençli $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinin (dKKH) flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu. Kanser kök hücrelere özgü immunofenotipik yüzey belirteçleri bakımından ABCG2, CD90 ve $CD326^{+}/CD44^{+}$ ve $CD133^{+}/CD44^{+}$ beraber pozitiflikleri flow sitometri ile gösterilmiştir. A: ABCG2 pozitifliği %56.57 olarak B: CD90 pozitifliği %86.54 olarak, C: $CD326^{+}CD44^{+}$ beraber pozitifliği %99.99 olarak ve D: $CD133^{+}$ $CD44^{+}$ beraber pozitifliği %99.93 olarak belirlendi. 93

Şekil 4. 23. Dirençli $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinin (KKH) flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu verilerinin gösterimi ve istatiksel analizi gerçekleştirildi. Tüm flow sitometrik sonuçlar anlamlı olarak bulundu ($p<0.0001$****) 94

Şekil 4. 24. KKH ve dKKH'lerin MDR1 ekspresyonlarının flow sitometri ile karşılaştırılması. A: KKH'lerde MDR1 ekspresyonu %26.41 olarak B: dKKH'lerde MDR1 ekspresyonu %49.65 olarak bulundu 95

Şekil 4. 25. KKH ve dKKH'lerin flow sitometri ile elde edilen MDR1 ekspresyonları. dKKH'lerin KKH'lere göre daha yüksek MDR1 eksprese ettiği belirlendi ($p<0.0002$***). 95

Şekil 4. 26. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. ALDH1 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü A: DAPİ (mavi) B: ALDH1 (kırmızı) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm). 96

Şekil 4. 27. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. ABCG2 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. A: DAPİ (mavi) B: ABCG2 (yeşil) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm). 97

Şekil 4. 28. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD44 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. A: DAPİ (mavi) B: CD44 (yeşil) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm). 98

Şekil 4. 29. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD90 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. A: DAPİ (mavi) B: CD90 (yeşil) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm). 99

Şekil 4. 30. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. MDR1 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. A: DAPİ (mavi) B: MDR1 (yeşil) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm). 100

Şekil 4. 31. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. ALDH1 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. A: DAPİ (mavi) B: ALDH1 (kırmızı) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm). 101

Şekil 4. 32. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. ABCG2 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. A: DAPİ (mavi) B: ABCG2 (yeşil) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm). 102

Şekil 4. 33. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD44 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. A: DAPİ (mavi) B: CD44 (yeşil) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm) 103

Şekil 4. 34. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD90 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. A: DAPİ (mavi) B: CD90 (yeşil) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm). 104

Şekil 4. 35. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. MDR1 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü.

A: DAPİ (mavi) B: MDR1 (yeşil) C: Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu 100 µm). 105
Şekil 4. 36. A549, KKH ve dKKH hücrelerine ait 10 günlük büyüme eğrisi. grafiği ve istatiksel analizi ($p<0.0001$****, $p<0.1234^{ns}$). dKKH'ler, A549 ve KKH'lere göre daha yüksek mitotik. aktivasyon ile yüksek oranda büyüme eğrisi gösterdi. KKH'ler ise A549 hücrelerine göre daha yüksek mitotik aktivasyon ile yüksek oranda büyüme eğrisi gösterdiği belirlendi. 106
Şekil 4. 37. Gemsitabin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan % canlılık verileri. A: 24 saatlik analiz sonuçları B: 48 saatlik analiz sonuçları C: 72 saatlik analiz sonuçları ($p<0.0001$****)(n=6). 107
Şekil 4. 38. Gemsitabin konsantrasyonlarının dirençsiz KKH'lerde MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri A: 24 saatlik analiz sonuçları B: 48 saatlik analiz sonuçları C: 72 saatlik analiz sonuçları ($p<0.0001$****)(n=6) 108
Şekil 4. 39. Gemsitabin konsantrasyonlarının dirençli KKH'lerde MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri A: 24 saatlik analiz sonuçları B: 48 saatlik analiz sonuçları C: 72 saatlik analiz. sonuçları ($p<0.1234^{ns}$, $p<0.0002$***, $p<0.0001$****)(n=6).....109
Şekil 4. 40. Dirençli ve dirençsiz KKH'lerde Agaroz jel üzerinde oluşan sferoid oluşumlarının faz kontrast ışık mikroskop altında 3. gündeki görüntüleri A: Dirençli KKH. B: Dirençsiz KKH (ölçü çubuğu = 200 µm) 110
Şekil 4. 41. Dirençli ve dirençsiz KKH'lerde PDMS ve asılı damla tekniği ile oluşturulan sferoid oluşumlarının faz kontrast ışık mikroskop altındaki 24-48 saatlik görüntüleri A: Dirençli KKH B: Dirençsiz KKH (ölçü çubuğu = 200 µm).....110
Şekil 4. 42. Dirençli ve dirençsiz KKH'lerde Poly-D-HEMA polimeri ile oluşturulan sferoid oluşumlarının faz kontrast ışık mikroskop altındaki 24-48 saatlik görüntüleri A: Dirençsiz KKH sferlerinin görünümü (ölçü çubuğu = 200 µm). B: Dirençsiz KKH sferlerin büyük ölçek ile görünümü (ölçü çubuğu = 500 µm).C: Dirençli.

KKH sferlerinin görünümü (ölçü çubuğu = 200). D: Dirençli KKH sferlerin büyük ölçek ile görünümü (ölçü çubuğu = 100 µm).....111

Şekil 4. 43. İzolasyon sonrasında kültüre edilen iSS-MKH'lerin faz kontrast ışık mikroskobu altındaki görüntüleri A: İzolasyon sonrasında besi yeri değiştirildikten sonra kültür kabına tutunan iSS-MKH'lerin (Pasaj 0) faz kontrast ışık mikroskop altında görüntüleri B-C: izolasyon sonrası iSS-MKH'lerin (P3) koloni oluşturma potansiyellerinin görüntüsü. C: iSS-MKH'lerin P9'da iken sürdürdükleri fibroblastik morfolojilerinin gösterimi (ölçü çubuğu = 200 µm). 112

Şekil 4. 44. İnsan sinoviyal sıvıdan izole edilmiş hücrelerin flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu. MKH'lere özgü immunofenotipik yüzey belirteçleri bakımından CD34, CD25, MHC-II (HLA-DR) negatifliği ve CD73, CD90, CD105, CD44 ve MHC-I (HLA-ABC) pozitifliği flow sitometri ile gösterilmiştir.....113

Şekil 4. 45. İnsan sinoviyal sıvıdan izole edilmiş hücrelerin flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonunun veri grafiği ($p<0.0001$****).....114

Şekil 4. 46. iSS-MKH'lerin İmmunofloresan işaretleme (İF/IHC). karakterizasyon deneyleri. Farklılaşmamış hücrelerin (a) Nestin (yeşil) ve (b) Vimentin (kırmızı) İF işaretlenmesi (Ölçü çubuğu =50 µm). Hücre çekirdekleri İF analizlerde DAPI boyası (mavi) ile işaretlenmiştir.....114

Şekil 4. 47. iSS-MKH'lerin immunhistokimyasal boyamalar ile karakterizasyon deneyleri. Farklılaşmış hücrelerin A: Osteojenik indüksiyondan 22 gün sonra oluşan mineral nodüllerin zıt-faz mikroskobik görüntüleri (Ölçü çubuğu =200 µm) B: Osteojenik farklılaşmış hücrelerde mineral nodüllerin Alizarin Red S boyası ile gösterilmesi (kırmızı) (Ölçek çubuğu =500 µm) C: Adipojenik indüksiyondan 20 gün sonra yağ hücrelerine dönüşmüş MKH'lerin zıt-faz mikroskobik görünümü (Ölçek çubuğu =100 µm) D: Adipojenik farklılaşmış hücrelerde nötral yağ damlacıkları Oil Red O boyası (kırmızı) ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu =50 µm) E: Kondrojenik farklılaşma sonrası Alcian

mavisi (ölçü çubuğu = 200 μm) F: Safranin O ile boyanmış. hücreler (ölçü çubuğu = 100 μm)..... 116
Şekil 4. 48. iSS-MKH'lerin İmmunofloresan işaretleme (İF) karakterizasyon deneyleri. A, B, C: Osteojenik indüklenmiş hücrelerde İF işaretleme ile Osteokalsinin floresan mikroskop görüntüsü DAPI (mavi), Osteokalsin (yeşil) (ölçü çubuğu=100 μm) D, E, F: Adipositlere farklılaşmış hücrelerde İF işaretleme ile Adiponektinin floresan mikroskop görüntüsü DAPI (mavi), Adiponektin (kırmızı) (ölçü çubuğu=100 μm) G, H, I: Kondrojenik farklılaşmış hücrelerde Kollajen 1'in İF işaretleme ile floresan mikroskoptaki görüntüsü DAPI (mavi) Kollajen 1 (yeşil) J, K, L: Kondrojenik farklılaşmış hücrelerde Kollajen II'in İF işaretleme ile floresan mikroskoptaki görüntüsü DAPI (mavi) Kollajen 1 (yeşil).....117
Şekil 4. 49. iSS-MKH'lerden izole edilmiş eksozomların flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu. Eksozomlara özgü immunofenotipik yüzey belirteçleri bakımından A, B, C: CD9. D ,E, F: CD81 pozitiflikleri flow sitometri ile gösterilmiştir. 118
Şekil 4. 50. iSS-MKH'den izole edilen eksozomların TEM ile görüntülenmesi ve boyut analizi (Ölçü Çubuğu = 50 nm).....119
Şekil 4. 51. iSS-MKH-eksozomlarının zeta potansiyellerinin ölçülmesi.....120
Şekil 4. 52. Hyaluronik asit ile kaplanan iSS-MKH-eksozom numunelerinin. TEM ile görüntülenmesi A: Hyaluronik asit ile kaplanmamış kontrol iSS-MKH-eksozom görüntüsü (Ölçü Çubuğu = 50 nm). B: Hyaluronik asit ile kaplanmış iSS-MKH-eksozomların görüntüsü (Ölçü Çubuğu = 200 nm). C: Hyaluronik asit ile kaplanmış iSS-MKH-eksozomların büyük ölçekli görüntüsü (Ölçü Çubuğu = 50 nm).....121
Şekil 4. 53. A549 hücreleri için iSS-MKH-Exo-MDR-1'lerin uptake analizinin floresan mikroskop altında gösterimi A: Dapi ile boyanan A549 hücreleri (mavi) B: PKH26 işaretli eksozomların görüntüsü (kırmızı) C: FITC-işaretli MDR-1 siRNA'ların görüntüsü (yeşil). D: A549 hücre (mavi) ve eksozom (kırmızı) uptakelerin birlikte gösterimi E: A549 hücre (mavi) ve MDR-1 siRNA (yeşil)

uptakelerin birlikte gösterimi F: A549 hücre (mavi), eksozom (kırmızı) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi (ölçü çubuğu = 100 μm) 122

Şekil 4. 54. KKH'ler için iSS-MKH-Exo-MDR-1'lerin uptake analizinin floresan mikroskop altında gösterimi A: Dapi ile boyanan A549 hücreleri (mavi) B: PKH26 işaretli eksozomların görüntüsü (kırmızı) C: FITC-işaretli MDR-1 siRNA'ların görüntüsü (yeşil) D: A549 hücre (mavi) ve eksozom (kırmızı) uptakelerin birlikte gösterimi E: A549 hücre (mavi) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi F: A549 hücre (mavi), eksozom (kırmızı) ve MDR-1 siRNA (Yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi (ölçü çubuğu = 100 μm) 123

Şekil 4. 55. dKKH'ler için iSS-MKH-Exo-MDR-1'lerin uptake analizinin floresan mikroskop altında gösterimi A: Dapi ile boyanan A549 hücreleri (mavi) B: PKH26 işaretli eksozomların görüntüsü (kırmızı) C: FITC-işaretli MDR-1 siRNA'ların görüntüsü (yeşil) D: A549 hücre (mavi) ve eksozom (kırmızı) uptakelerin birlikte gösterimi E: A549 hücre (mavi) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi F: A549 hücre (mavi), eksozom (kırmızı) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi (ölçü çubuğu = 100 μm) 124

Şekil 4. 56. FITC işaretli negatif MDR-1 siRNA transfekte iSS-MKH-Eksozom ve HA-iSS-MKH-Eksozom'ların agaroz jelde alınan floresan görüntülerinin gösterimi A: Negatif MDR-1 siRNA B: Exo-MDR. C: HA-Exo-MDR 125

Şekil 4. 57. A549 hücrelerindeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları (%Hücre) 127

Şekil 4. 58. A549 hücrelerindeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları ve istatiksel değerlendirmelerinin gösterimi ($p<0.0001$****) 128

Şekil 4. 59. KKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları(%Hücre) 129
Şekil 4. 60. KKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları ve istatiksel değerlendirmelerinin gösterimi (p<0.0001****).....130
Şekil 4. 61. dKKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları %Hücre.....131
Şekil 4. 62. dKKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları ve istatiksel değerlendirmelerinin gösterimi (p<0.0001****).....132
Şekil 4. 63. MDR siRNA içeren eksozomların A549, KKH ve dKKH'lerdeki transfeksiyonun qPCR analizi ile kontrolü (p<0.0001****, p<0.0002***).....133
Şekil 4. 64. HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR'nin A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri A: 24 saatlik analiz sonuçları B: 48 saatlik analiz sonuçları C: 72 saatlik analiz sonuçları (p<0.0001****, p<0.0002***, p<0.332*, p<1234^{ns})(n=6).....134
Şekil 4. 65. HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR'nin KKH'lerde MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri A: 24 saatlik analiz sonuçları B: 48 saatlik analiz sonuçları C: 72 saatlik analiz sonuçları (p<0.0001****, p<0.0002***, p<0.332*, p<1234^{ns})(n=6).....135
Şekil 4. 66. HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR'nin KKH'lerde MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri A: 24 saatlik analiz sonuçları B: 48 saatlik analiz sonuçları C: 72 saatlik analiz sonuçları (p<0.0001****, p<0.0002***, p<0.0021**, p<0.332*, p<1234^{ns})(n=6).....136
Şekil 4. 67. KKH'lerde İF işaretleme ile aktif Kaspaz 3'ün floresan mikroskop altında gösterimi. A: Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) B: 1600 µM

Gemsitabin Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) C: Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) D: 3 µm G-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) E: HA-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) F:3 µm G-HA-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) 137

Şekil 4. 68. KKH'lerde İF işaretleme ile aktif Kaspaz 3'ün floresan mikroskop altında gösterimi. A: Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) B: 1600 µM Gemsitabin Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) C: Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) D: 3 µm G-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) E: HA-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) F:3 µm G-HA-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) 138

Şekil 4. 69. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin A549 hücrelerindeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçları (%Hücre). 140

Şekil 4. 70. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin A549 hücrelerindeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçlarının ve istatiksel değerlerinin gösterimi (%Hücre) (P<0.0001****).....141

Şekil 4. 71. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin KKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçları (%Hücre).....143

Şekil 4. 72. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin KKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçlarının ve istatiksel değerlerinin gösterimi (%Hücre).(P<0.0001****) 144

Şekil 4. 73. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin dKKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçları (%Hücre).....146

Şekil 4. 74. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin dKKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçlarının ve istatiksel değerlerinin gösterimi (%Hücre) (p<0.0001****) 147

Şekil 4. 75. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında A549 hücrelerindeki DNA Histogramı 149

Şekil 4. 76. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında A549 hücrelerindeki DNA Histogramının ve istatiksel analizinin gösterimi 150
Şekil 4. 77. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında KKH'lerdeki DNA Histogramı.....152
Şekil 4. 78. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında KKH'lerdeki DNA Histogramının ve istatiksel analizinin gösterimi 153
Şekil 4. 79. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında dirençli KKH'lerdeki DNA Histogramı 155
Şekil 4. 80. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında dKKH'lerdeki DNA Histogramının ve istatiksel analizinin gösterimi 156
Şekil 4. 81. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR sonrası Gemsitabin uygulanmış. A549 hücrelerinde BCL-2 ve CYCS genlerinin ifadeleri ($p<0.0021$**, $p<0.0332$*).....157
Şekil 4. 82. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR sonrası Gemsitabin uygulanmış KKH'lerde BCL-2 ve CYCS genlerinin ifadeleri ($p<0.0021$**, $p<0.0332$*).....158
Şekil 4. 83. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR sonrası Gemsitabin uygulanmış dKKH'lerde BCL-2 ve CYCS genlerinin ifadeleri ($p<0.0002$***, $p<0.0021$**).....159
Şekil 4. 84. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR sonrası Gemsitabin uygulanmış A549, KKH ve dKKH'lerde ABCB1 (MDR1), geninin ($p<0.0002$***, $p<0.0021$**, $p<0.0332$*) 159

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. Bazı kanser tiplerine spesifik olarak belirlenen kanser kök hücre yüzey belirteçlerinin listesi (Ayla vd., 2013).....16

Tablo 3. 1. Gen ekspresyonu cDNA sentezi için hazırlanan karışım içeriği 70

Tablo 3. 2. qPCR master-mix bileşen ve hacimleri.....71

Tablo 3. 3. Analizlerde kullanılan primer dizileri.....71

Tablo 3. 4. qPCR'da kurulan PCR reaksiyon koşulları.....72

Tablo 4. 1. A549 hücrelerinde farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile elde edilen koloni sayıları. 75

Tablo 4. 2. Gemsitabin dirençli A549 hücrelerinde CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile elde edilen koloni sayıları. 78

Tablo 4. 3. A549, KKH ve dKKH hücrelerinin 10 günlük kültür boyunca her gün sayılmasıyla elde edilen hücre sayıları. 106

Tablo 4. 4. iSS-MKH-Eksozomlar ve HA-iSS-MKH-Eksozomlar için siRNA yüklenme konsantrasyonlarının belirlenmesi 125

Tablo 4. 5. A549 hücrelerindeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzey verileri.....128

Tablo 4. 6. KKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzey verileri 130

Tablo 4. 7. dKKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzey verileri 132

Tablo 4. 8. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin A549 hücrelerindeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin gösterimi 142

Tablo 4. 9. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin KKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin gösterimi.....145

Tablo 4. 10. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin dKKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin gösterimi 148

Tablo 4. 11. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında A549 hücrelerindeki G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimlerin gösterimi 150

Tablo 4. 12. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında KKH'lerdeki G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimlerin gösterimi 153

Tablo 4. 13. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında dKKH'lerdeki G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimlerin gösterimi 156

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kanser alt tiplerinden bağımsız olarak diğer hastalıklar arasında en yüksek mortalite oranına sahiptir. Üstelik tüm dünya çapında insidansı ve mortalitesi hızla artmaktadır. Globacan'ın verilerinde 2018 yılında 18.1 milyon yeni vaka ve 9.6 milyon ölüm oranları 2020'de yeni vaka sayısı 19.3 milyon ve ölüm sayısı ise 10 milyon şeklinde belirtilmiştir (Ferlay vd., 2020, Bray vd., 2018). Bu oranlara bakıldığında kanserin tüm dünyayı maddi ve manevi olarak yüksek düzeyde etkileyen bir hastalık olduğu gerçeği kaçınılmazdır. Dünya sağlık örgütünün tahminleri ise bu oranların küresel düzeyde artmaya devam edeceği yönündedir.

Kanser, farklı fenotip hiyerarşisine sahip heterojen hücre topluluğu ile kendini gösteren bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Heterojenik bir doku olan tümör kitlesindeki sadece bazı alt grup hücre popülasyonu tümörün başlaması, büyümesi, invazyon ve metastazında sorumlu olmaktadır. Son yıllarda bu özellişmiş hücreler kanser kök hücresi (KKH) olarak kabul edilmekte ve yapılan onkolojik araştırmalar bu alan üzerinde yoğunlaşmaktadır. Geçtiğimiz son on yılda hızla önem kazanan KKH hipotezi, tümör dokusundaki bazı alt grup popülasyonlarının mezenkimal kök hücreler (MKH) ile benzerliği ile ortaya çıkmıştır. KKH'lerin mezenkimal kök hücrelerin sahip olduğu "kendini yenileyebilme" ve "farklılaşabilme" potansiyeli gibi temel özelliklere sahip olması bu hücre grubunu özel kılmaktadır (Reya vd., 2001).

Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) verilerine göre 2020 yılında 1.80 milyonluk bir mortalite oranı ile tüm dünya çapında en çok ölüme sebep olan kanser tipinin akciğer kanseri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca 2020 yılında Akciğer kanserinden 2.21 milyon kişi tanı alarak meme kanserinden sonra (2.26 milyon tanılı hasta) ikinci en yüksek insidansa sahip kanser türü olduğu belirtilmiştir. Erkeklerde en sık tanı alan kanser tipi iken kadınlarda üçüncü sırada yer almaktadır (Ferlay vd., 2020; Bade vd., 2020).

Akciğer kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzerere iki ana tipi bulunmaktadır. KHDAK tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %80-85'ini oluşturmaktadır (Chen vd., 2014). Tüm kanser tiplerinde olduğu gibi akciğer kanserinde de KKH'ler ana rolü üstlenmektedir. Akciğer tümör dokusundaki heterojenik hücre popülasyonu

içerisinde yer alan alt hücre popülasyonunda bazı belirteçlere sahip olanların yeniden tümör oluşturabilme, sessizleşme, nüks ve kanser büyümesi gibi agresif özelliklerde daha etkili oldukları öne sürülmüştür. John Dick ve arkadaşlarının 1994 yılında yayınladıkları çalışma, miyeloid lösemi hücrelerinin alt popülasyonu olan CD34+, CD38- hücre grubunun SCID farelerde yüksek oranda tümör hücre kolonisi oluşturduğu gösterilen ilk çalışma olmuştur (Lapidot vd., 1994). Böylece kanser çalışmaları hızlı bir şekilde KKH'lerin keşfine doğru yönelmiştir. Akciğer kanserinin alt popülasyonlarıyla yapılan çalışmalarda akciğer kanser kök hücrelerinin yüzeylerinde CD326 (EpCAM), CD133 (prominin-1), CD44 (Hücre yüzey adezyon molekülü) moleküllerini eksprese ettiği ve ALDH1 (Aldehit dehidrojenaz 1) aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Kim vd., 2021). Bunlar gibi kanser kök hücre özelliği sergileyen hücre belirteçlerine sahip hücre gruplarının hedeflendirilerek tedavi edilme protokollerinin geliştirilmesiyle kanser tedavisinde daha başarılı sonuçlar elde edilebileceğine inanılmaktadır.

Günümüzde solid tümörlerin kanser tedavisinde sıklıkla; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi olmak üzere üç ana tedavi yöntemi ve bu tedavi yöntemlerinin kombinasyonları kullanılmaktadır. Ancak bu tedavi yöntemlerinin hiçbiri kanser kök hücreler üzerinde etkili değildir. Bu nedenle tedavi sonrası dirençli olan KKH'ler yok olmamakta ve kanser tedavisi için sürekli olarak kemoterapi ilaçları değiştirilmekte ancak buna rağmen kemoterapötik yanıtı iyi olan hastalarda bile nüks izlenmektedir.

Günümüzdeki kemoterapötik yöntemler için farklı kanser türlerine karşı her gün yeni bir ilaç modeli üzerinde çalışılmaktadır. Bu yeni ilaç keşfinin altında yatan ana sebelerden biri etkili kemoterapötiklerin hücrelerin direnç geliştirme mekanizmalarından dolayı artık etkisini kaybetmesidir. Doğal olarak bu direnç mekanizmasına sahip olan KKH'lerde klasik kemoterapötikler işe yaramamaktadır. Hücrelerin geliştirdikleri bu özel ilaç direnç mekanizmaları nedeniyle kullanım dışı olan etkili ilaçlar yerini yeni ilaç keşiflerine bırakmaktadır. Ancak yeni bir ilacın keşif süreci zannedildiği kadar ucuz ve kolay değildir. Üstelik bazı durumlarda klinik kullanıma geçen bir ilaç belirli bir süre sonra ortaya çıkan yan etkilerinden dolayı piyasadan çekilebilmektedir. Bu nedenlerle ortalama 13-14 yıl gibi bir süre sonucunda 500-2000 milyon dolar gibi bir maliyetle üretilen kemoterapötik ilaçların kullanılamaması tüm dünya için ciddi bir problemdir (Adams ve Brantner., 2006).

Multi ilaç direnci (MDR) hücre membranında ilaçların girişine karşı bulunan savunma hattıdır. Kanser hücrelerinde yaygın olan MDR mekanizması, özellikle karaciğer hücrelerinde olmak üzere vücudumuzda kan beyin bariyeri hücreleri gibi özellikli hücrelerde sıklıkla eksprese olmaktadır (Cojoc vd., 2015) MDR'ler Adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları adı verilen enerji bağımlı pompa sınıfına ait proteinlerdir. Bu protein ailesi, lipidlerin, sterollerin, peptidlerin, toksinlerin ve iyonların taşınması gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara katılan üyelere sahiptir. Bu üyeler arasında yer alan; P-glikoprotein (P-gp; MDR1, ABCB1 olarak da adlandırılır), MDR1 ilişkili protein (MRP1), meme kanseri direnç proteinleri (BCRP1) MDR proteinleri olarak karakterize edilmiştir. Bu üç taşıyıcı sistem ilaç özgüllüğüne sahiptir ve hücrelerin içinde azalan ilaç birikimine ve dolayısıyla ilaç etkinliğinin azalmasına neden olan bir dizi yapısal bileşikler taşımaktadırlar (Deepali vd., 2018, Gündüz vd., 2012).

P-gp, ilk tanımlanmış ve en çok karakterize edilen MDR1 taşıyıcı proteinidir ve kanser tedavisinde önemli bir hedef protein olarak kabul edilmektedir. Kanser hücrelerinde yüksek P-gp ekspresyonu, kemoterapötik etkinin azalmasına ve pozitif klinik sonuçlarında azalma ile bağlantılı olarak bulunmuştur. Özellikle başlangıçta düşük seviyede eksprese olan P-gp'ler de tedavi ilerledikçe artış gözlenmiştir. Günümüzde rutin olarak kullanılan birçok kemoterapötik ajan P-gp'lere karşı dirençlidir. Bu nedenle son yıllarda bu önemli ilaç keşiflerine ek olarak tüm dünya gen terapi yöntemlerine odaklanmış durumdadır (Deepali vd., 2018, Gündüz vd., 2012)

Son zamanlarda dirençli kanser türlerine karşı yeni tedavi stratejileri KKH hedefli nanoteknolojik ürünlerin geliştirilmesi ve gen tedavi yöntemleri üzerine yoğunlaşmaktadır. Gen tedavi metodları arasında transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması en çok dikkat çekenler arasındadır. Anti-sens RNA molekülü veya bir başka deyişle RNAi; çift sarmal RNA'nın çekirdekten sitoplazmaya iletilmesine ve mRNA'nın endojenik komplementer mRNA dizisinin parçalanmasına yol açan, transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. Bu mekanizma ile ABCB1, ABCC1 (MRP1) gibi direnç genleri hedeflenerek sessizleştirilmeye çalışılmaktadır. (Chalbatani vd., 2019). Ancak siRNA'ların çıplak bir şekilde hücre membranından penetrasyonu oldukça düşüktür, endonükleazlar tarafından hızlıca yıkılırlar. Bu nedenle hücrelere siRNA'lar çeşitli doğal veya yapay vektörler ile

enkapsüle edilerek hücrelere verilirler. Bu amaçla adenovirüs, retrovirüs gibi viral ya da katyonik lipit, lipozom, polimer gibi viral olmayan vektörler *in vivo* / *in vitro* aktarım için kullanılmaktadır. Viral vektörler en yüksek verimliliğe sahiplerdir ve günümüzde hala gen transfeksiyonu için en güçlü araçlardır ancak çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bazı viral vektörlerin sınırlı yükleme kapasitesine sahip olması, büyük ölçekte üretilmesinin zorluğu ve en önemlisi oldukları onkojenik potansiyel, enflamatuvar ve immunojenik etkileri nedeniyle ciddi güvenlik riskleri taşımaları viral vektörlerin başlıca dezavantajları olarak sayılabilir. Non-viral vektörler verimliliği viral vektörler kadar yüksek olmamasına rağmen viral vektörlerin sahip oldukları problemlerin üstesinden gelebilen alternatif bir yöntemdir. En çok araştırılan non-viral vektörler katyonik lipozomlar ve nanopartiküler sistemlerdir (Büyükköroğlu vd., 2016; Duan vd., 2021). Günümüzde sıklıkla kullanılan sentetik polimer ve lipid bazlı non-viral yöntemlerin güvenilirlikleri viral yöntemlere göre daha yüksek olmasına rağmen az da olsa toksik etkiye sahiptirler. Önemli avantajlarından birisi non-viral yöntemler ile dokulara kesin olarak hedeflendirme yapılabilmesidir. Eksozomlar da bu sentetik ve doğala yakın lipid bazlı non-viral vektörlere arasındadır (Duan vd., 2021).

Eksozomlar tüm vücut hücrelerinde doğal olarak oluştuklarından ve birçok biyolojik ve patolojik proseste yer aldığından toksik değildirler. Bu nedenle doku veya organda uzun süreli birikim gösterebilir ve hücresel uptake/içeri alımları doğal olarak ve kolay gerçekleşmektedir. Eksozomlar yüzeylerinde eksprese ettikleri CD47 gibi protein profilleri nedeniyle dolaşımdaki monositlerin fagositoz özelliklerinden kaçınabilmektedirler (Kim vd., 2012, Kaur vd., 2014, Kamerkar vd., 2017).

Eksozomlar; fibroblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri, nöronal hücreler, bağışıklık hücreleri ve ayrıca kanser hücreleri de dahil olmak üzere hemen hemen bütün hücre tipleri tarafından aktif olarak salgılanan nanoveziküllerdir. Boyutları 20-150 nanometre arasında değişmekle birlikte, nükleik asitler ve proteinler gibi birçok biyoaktif molekülle zenginleştirilmiş, lipitler ve metabolitleri, hücreler arası transfer ederek hücre-hücre iletişiminde aktif rol oynamaktadırlar. Eksozomlar salgılandıkları hücrenin tipine göre salgı materyalleri ve yüzey ekspresyon modelleri değişebilmektedir (Działo vd., 2019). Ayrıca eksozomlar içeriklerinde barındırdıkları protein ve karbonhidrat molekülleri ile kanserlerle doğal olarak savaşmaktadırlar. Mikroveziküllerin aksine bütün işlevlerini; ayrıca sahip oldukları organotropizm

özellikleri sayesinde sadece lokal hücre-hücre iletişiminde değil, bazı durumlarda, daha uzakta bulunan hücreler ile iletişimi sağlayarak gerçekleştirebilmektedir. Sahip oldukları bu muazzam özellikleri sebebi ile ilaç taşıma sistemlerinin de ana hedefi haline gelmiştir (Sophia vd., 2018, Faruqu vd., 2018, Alvarez-Erviti vd., 2011).

Eksozomların, yaygın olarak kullanılan nanopartiküller ile karşılaştırıldığında daha yüksek ilaç dağıtım etkinliği gösterdiği gösterilmiştir. Bu da onları ilaç ve genleri sunmak için uygun bir aday olarak ön plana çıkarmıştır (Sophia vd., 2018, Faruqu vd., 2018, Kim vd., 2016). Üstün hedefleme kabiliyeti ve güvenlik profili dahil olmak üzere elverişli özellikleri nedeniyle, halihazırda faz II testine giren iki çalışma ile bazı klinik çalışmalarda yeni ortaya çıkan bir kanser terapötik sınıfı olarak araştırılmaktadırlar (NCT01854866) (Besse vd., 2016). Hedeflendirme için seçilen ligandlar moleküler mühendislik ile istenildiği gibi zenginleştirilebilmektedir. Kısaca eksozomlar, hücresel terapilerinde ister gen ürünleri ister ilaç ürünleri iletmek için kullanılsın hem taşıma hem de hedefe özgü kullanılması için çok uygun sistemlerdir.

Hyaluronik asit (HA), doğal olarak hücreler tarafından sentezlenen bir moleküldür ve tümör bölgesinde sıklıkla gördüğümüz CD44 ile etkileşime geçen ekstrasellüler matriks (ECM) glikozaminglikan komponentidir. Hyaluronik asitin tümör ortamında yarattığı hidrasyonla ECM'in gevşemesine sebep olarak migrasyonda önemli rol oynamaktadır. HA, adezyon molekülleriyle etkileşimiyle hücre migrasyonları stimüle olmaktadır. CD44 ise hücreler arasında ve hücre ile ECM arasında sıkı bir ilişki sağlayan transmembran glikoproteinleridir. CD44'ün artmış ekspresyonu tümör hücrelerin Hyaluronik asite daha iyi bağlanmasını sağlayarak, tümör implantasyonunda önemli bir görev yapmaktadırlar. Yapılan araştırmalarda akciğer, kolon, meme, karaciğer gibi kanser türlerinde CD44 ekspresyonunun artması tümör ilerlemesi ve metastazında önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Sneath vd., 1998, Khoursheed vd., 2002, Visca vd., 2002, Castella vd., 1998). Ayrıca sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücreler diğer hücrelere nazaran doğal olarak daha fazla hyaluronik asit sentezleyen hücrelerdir. Sinoviyal sıvı kök hücrelerinden elde edilen eksozomlar ise çevresinde daha fazla hyaluronik asit ile kaplı olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücreleri bu doktora tez kapsamında eksozom eldesi için kullanılmıştır (Jung vd., 2011, Chijimatsu vd., 2019). Hyaluronik asit CD44 ile olan bu etkileşimlerinden dolayı

biyoteknolojik ürünlerin kansere hedeflendirilmesinde sıklıklıkla kullanılan bir molekül haline gelmiştir. Ancak eksozomların HA ile kaplanması henüz çok yeni bir konu olduğundan üzerinde araştırılma yapılması gerekmektedir (Kim vd., 2019).

Bu doktora tez çalışmasının temel amacı;

Gemsitabin ile dirençli hale getirilen küçük hücreli dışı akciğer kanser (A549) ve dirençsiz A549 hücrelerinden izole edilen CD326+CD133+CD44+ kanser kök hücrelerinin çoklu ilaç direnç genlerinden ABCB1'e özgü siRNA'ların insan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücrelerden (iSS-MKH) elde edilen eksozomlar ile enkapsüle edilerek susturulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Gemcitabin direnci kazandırılan ve dirençsiz A549 hücrelerinden CD326+CD133+CD44+ KKH izolasyonu ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve in vivo ortamı daha iyi taklit edebilmeleri için tümörsferik olarak 3 Boyutlu(3B) kültüre edilmişlerdir. ABCB1 (MDR1) geni hedefli siRNA yüklenmiş MKH eksozomlar Hyaluronik asit (HA) ile kaplanarak CD44+ hücrelere hedeflendirilmiştir. HA kaplı siRNA enkapsüle eksozomların A549 ve CD326+CD133+CD44+ kanser kök hücreleri tarafından uptake etmeleri sağlanmıştır. ABCB1 geni sessizleşen kanser kök hücrelerin ilaç dirençleri kırılarak kemoterapötik tedaviye açık hale gelmeleri sağlanmıştır. Dirençli ve dirençsiz kanser ve kanser kök hücrelerin ilaç dirençlerinin kırılması ile dirençli oldukları ilaca olan apoptotik yanıtları da moleküler düzeyde araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tarihçesi ve Kanser Tanımı

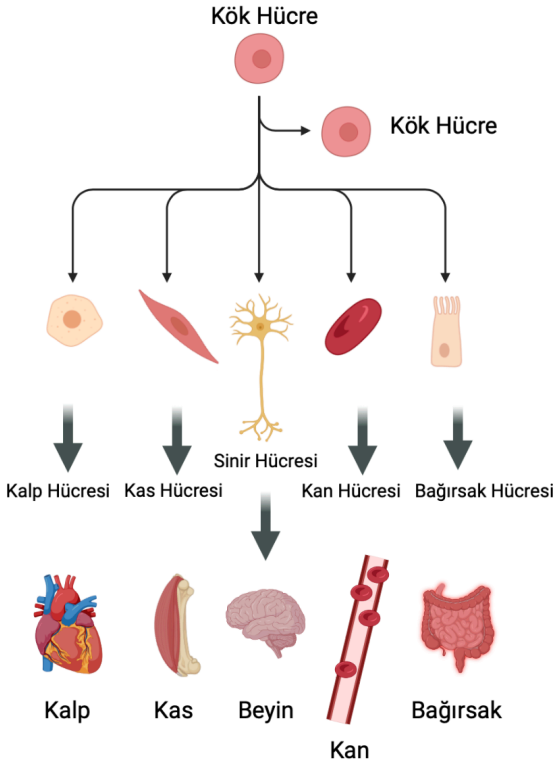
Tıp tarihinde kanserin ilk kez M.Ö. 3000'de bir erkek hastanın meme tümörüne sahip olduğundan bahseden Edwin Smith papirüsünde geçtiği düşünülmektedir. Bu papirüste bu hastalığın ölümcül olduğundan ve tedavisinin mümkün olmadığından bahsedilmiştir. Mısır papirüsleri dışında Babil çivi yazısı tabletleri ve eski Hint yazmalarında da malign tümörlerle ilgili tanımlamalara rastlanmaktadır ancak kanser terimi ilk kez Hipokrat tarafından M.Ö. 460-375 yy. da kullandığı görülmektedir. Kanserli dokuların yayılış şekilleri Hipokrat'a hareket eden bir yengeci hatırlattığından "karkinoma" "crab (cangrejo)" terimlerinde ilham alarak "karsinoma" ve "kanser" kalıplarını ilk kez kullanan kişi olmuştur. Kanser dendiğinde akla gelen onkoloji terimi ise "oncos" kelimesinden türemiş ve hem benign hem de malign tümör kavramlarını kapsayan bir terim haline gelmiştir (Hajdu vd., 2011; Hanahan vd., 2000).

Kanser basit bir tanımla hücrelerin bölünme olgusundaki çeşitli dış veya genetik faktörler sonucu gelişen bir kontrol kaybıdır. Bu kontrol kaybı neticesinde gelişen "kontrolsüz bölünme" kanserin öncül özelliklerinden biri olmakla birlikte kanser; eşsiz salgı materyalleri ve genetik özellikleriyle kontakt inhibisyondan kaçabilme, sessiz forma geçerek yıllarca immun sistemden kaçabilme, telomer stabilitesi sağlayarak senesensi (yaşlanmayı) engelleyebilme, kemoterapi ve radyoterapiye direnç geliştirebilme, çoğalmayı inhibe eden iç ve dış sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozis gibi önemli ölüm yolaklarından kaçabilme, anjiyogenezi uyararak invazyon ve metastaz yapabilme özelliklerine sahip multifonksiyonel bir hastalıktır (Croce vd., 2008; Alberts vd., 2015; Hanahan vd., 2000).

2.2. Kök Hücreler ve Özellikleri

Mezenkimal kök hücreler tarihte ilk kez 1924 yılında Alexander Maximow tarafından kanda farklılaşabilen öncü hücreler olarak keşfedilmiş ve tanımlanmıştır. Daha sonrasında 1961 yılında Till ve McCulloch, normal kök hücrelerin varlığını gösteren ilk deneysel model üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Bu deneysel modelde hematopoietik sistemden gelen multipotent kök hücrelerin varlığının belirlenmesi üzerine bir sistem geliştirilmiştir. Farelerde iyonlaştırıcı radyasyon ile kemik iliği sistemi baskılanarak kan üretimini durdurulmuştur. Daha sonrasında

yeniden kan üretimini sağlamak için farklı bir vericinin kemik iliği hücrelerini farklı sayılarda damar içine enjekte etmişler ve üretilen hücre kümelerini incelemişlerdir. Yapılan incelemelerde bu kümelerin sadece tek bir hücreden türediğini ve bu klonların farklı bir alıcıya nakledildiğinde farklı olgun kan hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre grubunu da meydana getirebilme özelliğine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Böylece ilk kez hematopoetik kök hücrelerinin (HKH) varlığı deneysel olarak kanıtlanmıştır. Ayrıca bu çalışma ile beraber kök hücre hiyerarşisi de kanıtlanmış bulunmaktadır. Kök hücre hiyerarşisinin keşfi kanser kök hücre hiyerarşisini anlamak için önemli bir adımdır (Till ve Mcculloch., 1961).



Şekil 2. 1. Kök hücrelerin self-renewal ve farklı dokulara farklılaşabilme özelliklerinin şematik görüntüsü

Bir organizmanın oluşumu zigot dahil olmak üzere tüm doku ve organların gelişimini sağlayan hücre topluluğunun sahip olduğu genetik özellikler sayesindedir. Bu hücreler DNA'larında gizli olan genetik şifreler sayesinde bölünme, çoğalma, farklılaşabilme ve hatta ölüm gibi hayati fonksiyonlar için programlanabilmektedirler. Tüm doku ve organlarda yer alan bu hücrelerden bazıları kendilerini yenileyebilme (self renewal), gerektiğinde farklılaşabilme ve klon oluşturabilme gibi temel yeteneklere sahiptir. Bu eşsiz özellikleriyle dikkat çeken

kök hücreler olgun, dokuya spesifik hücreleri üreten ve diğer bir yandan da sınırsız kendini yenileyebilme özelliği olan hücre olarak tanımlanmaktadırlar (Şekil 2.1.). Kök hücreler simetrik ve asimetrik bölünme özellikleriyle doku ve organların ihtiyacına göre yanıt vermektedir. Asimetrik bölünebilme yetenekleri sayesinde dokudaki kök hücre havuzu korunmaktadır. Asimetrik bölünmenin bir diğer avantajı da olası mutasyonlara karşı DNA'nın koruma altına alınmış olmasıdır (Şekil 2.2.). Sınırlı bölünme kapasitesine sahip somatik hücrelere nazaran kök hücreler ve progenitör hücreler üstün telomerik aktiviteleri sayesinde daha fazla bölünme yeteneğine sahiptirler. Doku hasarı sırasında sayıları hızla artarak hücresel onarımda görev almaktadırlar (Zakrzewski vd., 2019; Tang vd., 2012; Liv d., 2005; Shahriyari vd., 2013; Knoblich vd., 2008) Kök hücrelerin klon oluşturma yetenekleri yani klonalite, bir hücreden çok sayıda yeni hücre kümesinin oluşturulması anlamına gelmektedir.

Kök hücreler hem yetişkin hem de embriyolarda bulunmaktadır. Embriyonik kök hücreler bir organizmanın oluşumunun ana sorumlu hücre grubu olan ve sadece zigot iç hücre kitlesinden elde edilebilen pluripotensi özelliğine sahip eşsiz hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelerin farklılaşmaları sonucu multipotensi özelliğine sahip olgun kök hücreler meydana gelir. Bu olgun kök hücreler ise yetişkin doku ve organlarda bulunan ve bu organların yenilenmesi ve onarılmasında görev alan hücreler olarak karşımıza çıkmaktadır (Poulsom vd., 2002).



Şekil 2. 2. Kök hücrelerde yaşam döngüsü

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society of Cellular Therapy, ISCT) tarafından 2006 yılında MKH sınıflandırması belirli koşullara bağlanmıştır. Bu koşullardan birincisi fibroblastik morfolojiye sahip olmaları ve plastik yüzeylere yapışabilmeleridir. Bir diğer ön koşula göre; MKH'ler CD90, CD105, CD73 yüzey belirteçlerini pozitif eksprese ederken; CD34, CD45, CD14, CD79α, CD11b, CD19 ve HLA DR yüzey belirteçlerini negatif eksprese etmelilerdir. Ayrıca adiposit, osteoblast ve kondblast hücrelerine *in vitro* farklılaşma yapabilmesidir. MKH çalışmalarında asgari olarak bu koşulları sağlayan hücrelerin MKH özelliğinde olduğu kabul görmektedir (Thomson vd., 1998; Özen vd., 2014; Karaöz vd., 2014).

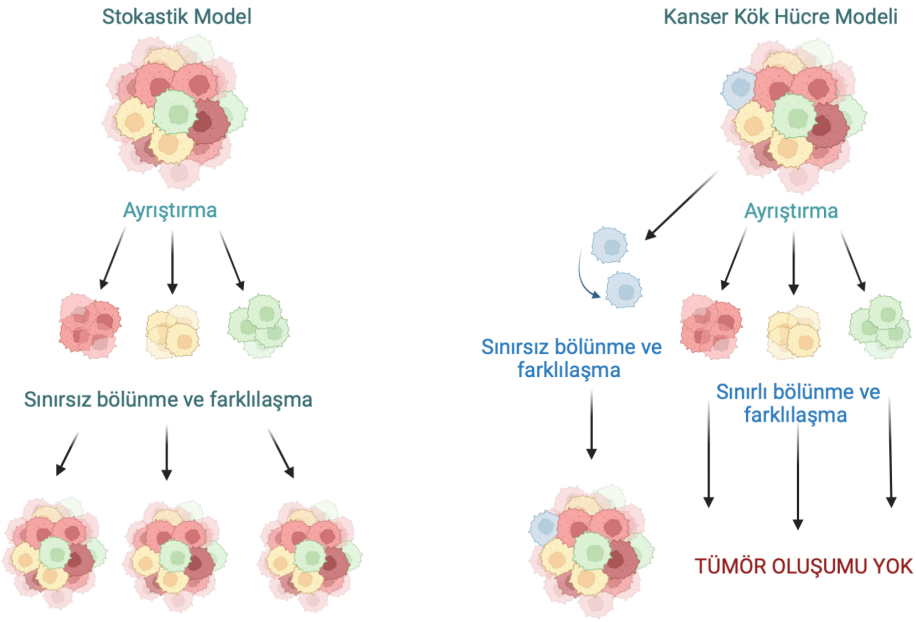
2.3. Kanser Kök Hücreler ve Kanser Kök Hücre Teorisi

1977 yılında Hamburger ve Salmon tarafından yapılan çalışmada tümör hücrelerinin sadece belirli bir kısmının *in vitro* koloni oluşturma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının Till ve McCulloch'un kök hücrelerle yaptığı çalışmadaki sonuçlarla benzerlikleri nedeniyle bu klonojenik hücrelerin kanser kök hücre (tümör kök hücre) olabilecekleri yönünde önerilerde bulunmuşlardır. 1970 yılında ise Pierce ve Wallace tümörlerde de kök hücre hiyerarşisinin var olduğunu deneysel kanıtlarla göstermişlerdir (Hamburger ve Salmon., 1977; Pierce ve Wallace 1971).

40 yılı aşkın bir süredir kanserlerin normal dokularla aynı hücre popülasyonlarını içerdiği varsayılmıştır. Kanserin kök hücrelerden ortaya çıktığı fikri, kanserin embriyonal dinlenme teorisi olarak 1800'lerin ortalarına kadar uzanır. Germinal hücre kanserleri (teratokarsinomalar) hakkında yaklaşık 50 yıl önce başlayan çalışmalar, kanserlerin kök hücrelerden kaynaklandığını ve kanserlerin kök hücre içerdiğini ortaya koymuştur. Bir süredir teratokarsinomların, kök hücrelerden köken almaları bakımından diğer kanserlerden farklı olduğuna inanılıyordu. Ancak olgun hepatositlerin dediferansiyasyonundan kaynaklandığına inanılan karaciğer kanseri üzerine yapılan araştırmalar karaciğer kanserlerinin de kök hücrelerden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Daha yakın zamanlarda kan hücresi kanserlerinin (lösemiler) çoğalmaya devam etmesinin ve ölmemesinin (olgunlaşmanın durması) nedeni olarak spesifik farklılaşma sağlayan genetik faktörlerden kaynaklandığı gösterilmiştir (Sell., 2009).

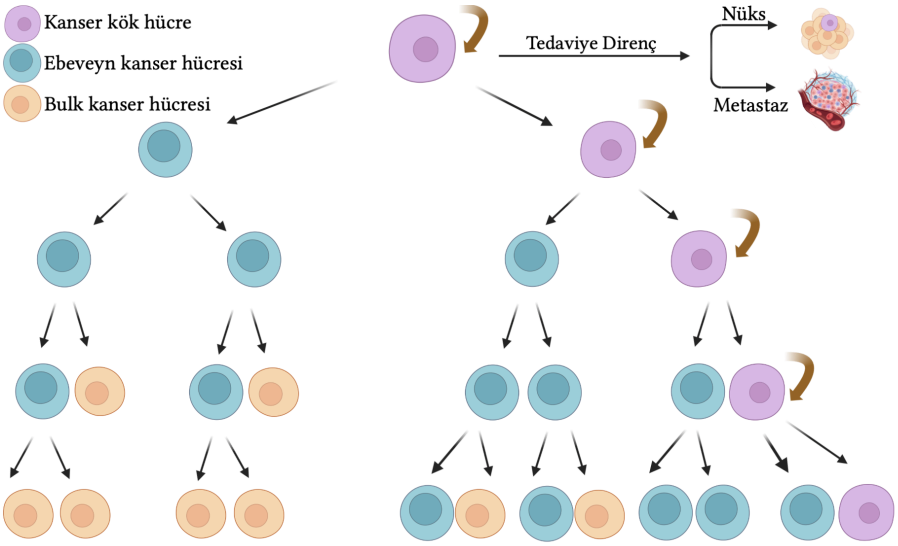
Kanser kök hücreler heterojen tümör dokusu içerisinde kök hücre özelliği taşıyan alt soy hücre popülayonu olarak tanımlandırılmaktadırlar. Tümör dokuları farklı alt grup hücrelere sahip heterojenik bir dokudan oluşur ve bu dokunun içinde somatik kanser hücrelerine ek olarak kendilerine de ait immun hücrelere, fibroblastlar gibi stroma hücrelerine ve invaziv, metastatik görev alan kanser kök hücrelere (KKH) sahiptirler. Tümör dokusu etrafında kanser ve kanser kök hücrelerinin gelişimi ve dirençliliğinden sorumlu olan kanserle ilgili fibroblastlar (CAF; Cancer associated fibroblasts) ve kanser immünolojisinden sorumlu olan tümör ile ilgili makrofajlar (TAM; tumor associated macrophages) yer almaktadır. (Win Sen Heng vd., 2019). Tümör dokusundaki tüm bu hücreler çeşitli salgı mekanizmalarıyla tümörün devamlılığı için KKH'lerin gelişimini desteklemektedirler.

Tümör numunelerindeki küçük bir hücre alt popülasyonunun geçmişte araştırmacıları şaşırtan bir şekilde *in vitro* kültürlerde veya *in vivo* transplant modellerinde klonal büyümeyi başlatma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu paradoksun nasıl olduğunu açıklamak için stokastik ve hiyerarşik olmak üzere iki teori öne sürülmüştür (Şekil 2.3.). Bunlardan birincisi olan stokastik teori, tüm kanser hücrelerinin eşit derecede kötü huylu olduğunu, ancak yalnızca uygun biyolojik özelliklere rastgele sahip olan klonların nakil sırasında büyüyeceğini öne sürmüştür. Yani kısaca her hücre çoğalma potansiyeline sahip ve kök hücre gibi davranmakta olduğu öne sürülmektedir. İkinci teori olan hiyerarşik teori ise (kanser kök hücre teorisi), hücre grubunda yer alan yalnızca alt popülasyonunun tümör oluşturma yeteneğine ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahip olduğu önerilmiştir. Bu alt popülasyon kanser kök hücre olarak adlandırılmaktadır (Odoux vd., 2008; Wilson vd., 1992).



Şekil 2. 3. Kanser oluşumunda öne sürülen teoremlerin şematik gösterimi

Kanser kök hücreler temel olarak kendini yenileyebilme, radyoterapi ve kemoterapiye üstün direnç mekanizmalarını aktifleştirebilme hem kendi hem de başka dokularda koloni oluşturabilme, tümör oluşturabilme, üstün telomerik stabilite, invazyon ve metastaz yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Bütün bu özelliklerine bakıldığında normal kök hücreler ile olan benzerlikleri sebebiyle "kanser kök hücre" ismini almışlardır. Kök hücrelerin sahip olduğu temel özelliklerin bazı kanser hücrelerinde görülmesi KKH'lerin oluşumu ile ilgili hipotezlerin öne sürülmesine neden olmuştur. Bu hipotezler temelde KKH'lerin normal kök veya progenitör hücrelerden ya da olgun dokulardaki farklılaşmış kök hücre kaynaklı olabileceği yönünde olmak üzere üç farklı varsayım öne sürülmüştür (Soltanian vd., 2011).



Şekil 2. 4. Kanser kök hücrelerin tümör gelişimindeki rolünün şematik gösterimi

Son yirmi yılda KKH hipotezi, hem tümör konsepti hem de terapötik açıdan oldukça ilgi çekici bir hale gelmiştir. KKH'lerin köken aldıkları kanser tipine göre yüzeylerinde eksprese ettikleri belirteçler bulunmaktadır. Ancak bu belirteçler her kanser tipi için henüz tamamen keşfedilmiş değildir. Yüksek tümörjenik bir alt popülasyonu temsil eden KKH'ler; tümör büyümesine, tedaviye dirence (ilaç direnci) ve muhtemelen epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) yeniden programlama yoluyla metastaz oluşumuna ve hatta nüksetmeye neden olmaktan sorumlu olarak kabul edilmektedir. Kök hücre karakterinde olan bu hücreler; tümörün başlaması ve devamını sağladıkları gibi sessiz olmaları, etkin DNA onarımı yapabilmeleri, yüksek oranda çoklu ilaç direnç/MDR transporterlarına sahip olmaları ve hipoksik niş ortamında korunuyor olmaları nedeniyle kemoterapi ve radyoterapiye de dirençlidirler. Ayrıca günümüzde kullanılan kemoterapötik ilaçlar genellikle bölünmekte olan hücreleri hedef almaktadırlar ancak KKH'ler genellikle sessiz durumda olduklarından bu ilaçlardan etkilenmemektedirler. Bu durumlar günümüzde kanser tedavi yöntemlerinin neden tümörü tamamen yok edemediğini açıklamaktadır. Bu nedenle, KKH'lerin dolayısıyla tümörlerin tamamen yok edilmesi için KKH'lerin korunmasında kritik rol oynayan moleküllere hedefli çalışma fikirleri nüks ve metastazın önlenebilmesi için öncelikli stratejilerdendir (Win Sen Heng vd., 2019; Takahiko vd., 2016; Chakraborty vd., 2016; Won-Tae K vd., 2017).

Yapılan çalışmalar neticesinde bu hücrelerin ürettikleri büyüme faktörleri, interlökin gibi sitokinler ve kodlanmayan RNA'lar aracılığıyla kanserlerin

köklülüğünü korumada etkili oldukları gösterilmiştir Aynı şekilde TAM'lardan M2 makrofajlar aracılığı ile üretilen sitokinlerin KKH'lerin köklülüğünü sağladığı ve EMT'de (Epitelyal Mezenkimal Geçiş) önemli rol oynadığı gözlenmiştir. (Zhou vd., 2015).

2.4. Kanser Kök Hücrelerin Kökeni

Kanser kök hücreler daha öncede bahsedildiği gibi kendini yenileme ve birçok soya farklılaşabilme gibi temel özellikleri nedeniyle kök hücrelere benzer özellikler göstermektedirler. KKH'ler bir tümör hücre grubunda alt popülasyon olarak kabul edilmelerinden dolayı kök hücrelerden ayrılmaktadırlar (Ayob vd., 2018). KKH'lerin kökeni ile ilgili üç farklı hipotez ortaya atılmıştır. Bunlar başlıca; i) KKH'ler kök hücrelerden kaynaklanmaktadır, ii) KKH'ler progenitör hücrelerden kaynaklanmaktadır, iii) KKH'ler farklılaşmış hücrelerden (somatik) kaynaklanmaktadır.

Birinci hipotezde; KKH kaynağının normal kök hücreler olduğu ileri sürülmektedir. Kök hücrelerin her dokuda yer alması bu ihtimali desteklemekle birlikte kanser kök hücrelerde de kendini yenileyebilme özelliklerinin olması, sınırsız bölünebilme kapastilerinin olması, Oct4 (oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4), ALDH1 (Aldehit dehidrojenaz 1) gibi kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunun olması, anjiyogenez indüksiyonu yapabilmeleri, farklılaşabilme ve tümör başlatabilme (doku oluşturabilme) gibi temel kök hücre özelliklerini sergilemesi bu görüşü destekleyen kanıtlarıdır. Reya vd., 2001 (Li vd., 2011; Wang vd., 2013).

İkinci hipotezde; KKH kaynağının progenitör hücreler olduğu ileri sürülmektedir. Progenitör hücreler her dokuya özgü kısmen farklılaşmış kök hücrelerdir. Bulundukları dokunun gelişimini desteklemek amacı ile somatik hücreleri oluşturmak üzere bölünürler. Her dokuya özgü bulunması, farklılaşabilme ve kısmen çoğalabilme yeteneklerinin olması KKH kaynağı olabileceğini düşündürmüştür (Reya vd., 2001; Li vd., 2011; Wang vd., 2013).

Üçüncü hipotez ise; KKH'lerin farklılaşmış ve sınırlı ömrü olan somatik hücrelerden köken aldığı yönündedir. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin keşfi ile somatik hücrelere genetik müdahaleler sonucu pluripotensi özelliği kazandırılabildiği görülmüştür. Bu önemli keşif sonucunda somatik hücrelerin geriye farklılaşarak kök hücre özelliği taşıyabileceği ileri sürülmüş ve kanıtlanmıştır

(Takahashi vd., 2007). KKH teorisine göre, *İn vivo* ortamda geriye farklılaşma sırasında meydana gelen genetik mutasyonlar sebebiyle bu kanser hücre grubunun oluştuğu ileri sürülmektedir. Bu hipotezi destekleyecek bir mekanizma henüz gösterilememiştir (Li vd., 2011; Wang vd., 2013).

2.5. Kanser Kök Hücrelerin Kimliklendirilmesi

Tümör hücrelerinin aksine tümörgenezi başlatabilen, kendini yenileyebilen ve farklılaşabilen kanser kök hücrelerin identifikasyonu için kök hücrelerde olduğu gibi bir standardizasyon bulunmamaktadır. Yıllar içerisinde yapılan çalışmalar neticesinde kanser kök hücre özellikleri daha iyi anlaşılmaktadır. Yapılan KKH çalışmalarında temel olarak multiselüler sferoid oluşturma yetenekleri önem taşımaktadır. Sferoid tümörlerin 2B (iki boyutlu) kültüre edilen kanser hücrelerine göre daha fazla kemoterapiye direnç geliştirdiklerine dair veriler bulunmaktadır (Shehzad vd., 2019). Hücre yüzey belirteçlerine göre floresan aktif hücre ayırımı (FACS) gibi yöntemler ile izole edilen hücrelerin tümörjenik kapasiteleri *in vivo* ortamda araştırılmaktadır. Bu araştırmalar neticesinde sadece bazı spesifik hücre yüzey belirteçlerini eksprese eden hücrelerin tümör başlatabilme, geliştirebilme gibi özelliğe sahip oldukları gösterilmektedir. Lösemi (Bonnet vd., 1997), melanoma (Schatton vd., 2008), prostat kanseri (Patrawala vd., 2007), over kanseri (Szotek vd., 2006), akciğer kanseri (Kim vd., 2005), meme kanseri (Ponti vd., 2005), beyin tümörü (Galli vd., 2004) gibi birçok farklı kanser türünde kök hücreler ile ortak belirteçleri eksprese edilen KKH'leri izole ederek tümörjenik kapasitelerini gösterilmiştir.

KKH'lerin varlığına dair ilk kanıtlar Bonnet ve Dick'in 1997 yılında akut miyeloid lösemi (AML) hücreleri tarafından yapılan çalışmada sunulmuştur. Yayınlanan çalışmada AML hücrelerinin alt popülasyon hücreleri izole edilmiş ancak sadece $CD34^{+}/CD38^{-}$ ekspresyonuna sahip hücre grubunun tümörjenik aktivite sergilediği gösterilmiştir. Aynı grup $CD34^{-}/CD38^{+}$ ve $CD34^{-}$ alt popülasyonlarının NOD/SCID farelerde lösemi başlatamadığı ama $CD34^{+}/CD38^{+}$ hücre popülasyonlarının da lösemi başlatabildiği tespit edilmiştir. (Bonnet vd., 1997).

Hematopoietik tümörlere göre solid tümörlerdeki KKH'lerin keşfi daha zor olduğundan solid tömörlere spesifik KKH çalışmaları halen güncel bir konudur. Solid tümör KKH'leri ilk kez 2003 yılında Al-Hajj ve çalışma arkadaşları tarafından

multiple meme tümöründen elde edilmiştir. Bu araştırma sonucunda $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ eksprese eden alt popülasyon hücrelerinin KKH niteliğinde olduğu vurgulanmıştır (Dontu vd., 2003). Bu keşifin üzerine meme kanser kök hücreleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmış ve ALDH1, CD133 (Prominin-1) gibi ekspresyon profilleri eklenerek meme KKH çerçevesi zenginleştirilmiştir (Shipitsin vd., 2007; Ginestier vd., 2007; Pece vd., 2010). Solid tümörlerdeki KKH keşfi ile çalışmalar diğer solid dokular üzerine yoğunlaşmıştır. Beyin tümörlerinde kök hücre ekspresyon profiline ortak olarak CD133, SSEA-1(Stage spesifik embriyonik antijen-1), EGFR (Epitelyal büyüme faktörü reseptörü) ve CD44 gibi belirteçler tanımlanmıştır (Son vd., 2009; S Steelman vd., 2016). Tüm bu çalışmalar neticesinde farklı dokulara ait KKH'ler için ortak belirteçlerde tanımlanmıştır. CD133, CD44, ALDH1 eksprese eden hücrelerin meme, prostat ve over kanserlerinde ortak olduğu bulunmuştur (Croker vd., 2009). Tablo 2.1'de dokuya özgü olarak belirlenmiş bazı KKH belirteçleri yer almaktadır (Ayla vd., 2013).

Tablo 2. 1. Bazı kanser tiplerine spesifik olarak belirlenen kanser kök hücre yüzey belirteçlerinin listesi (Ayla vd., 2013)

TÜMÖR ÇEŞİDİ	TÜMÖR TİPİNE ÖZGÜ HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ
Akut Miyeloid Lösemi (AML)	CD34, CD38, CD96, CD90
Multiple Myeloma	CD138
Akciğer	CD45, CD31, CD34
Hepatosellüler	CD133
Meme	CD44/CD24
Prostat	CD44/CD133, β integrin
Pankreas	CD44, CD24, ESA

2.6. Kanser Kök Hücrelerinin Direnç Mekanizmaları

Kanser tedavisinde sıklıkla hormonal terapi, radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler tek başına ve/veya bu tedavilerin kombinasyonları kullanılmaktadır. Son yıllarda, hastalar başlangıçta tedaviye olumlu yanıt verirken tümörün invaziv ve metastatik durum kazandığı aşamalarda terapiye yüksek direnç geliştirmektedirler.

Bu aşamada kanserli hastalarda geri döndürülemeyen nüks sıklıkla izlenmektedir. Bu durum hem genetik hem de epigenetik mekanizmalardan kaynaklanabilmekte ve gitgide daha karmaşık bir hal almaktadır (Donnenberg ve Donnenberg., 2005)

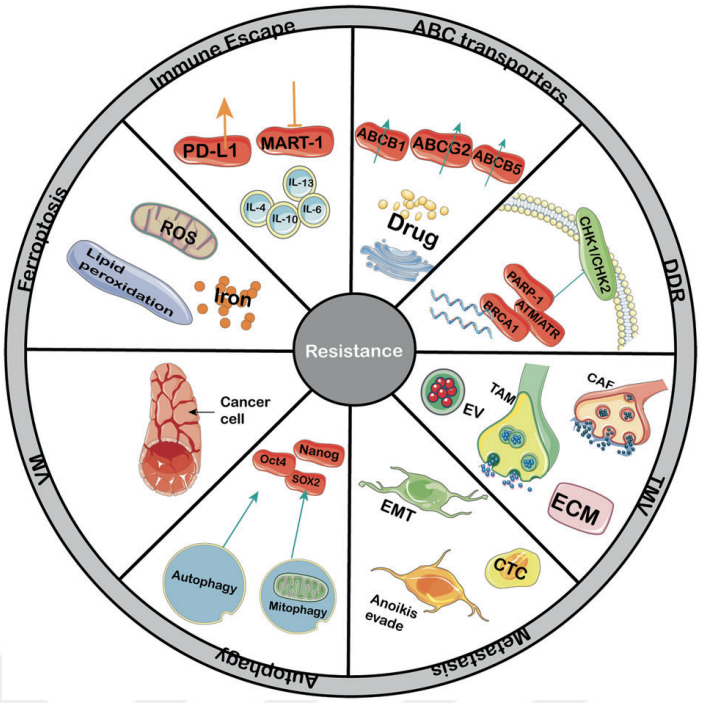
Kanserde tedaviye direnç mekanizmaları ana olarak ikiye ayrılabilir; içsel ve edinilmiş. İçsel mekanizmalar ana olarak genetik kodlamalar tarafından kanser olmadan önce var olan faktörlerden kaynaklanmaktadır. Edinilmiş mekanizmalar ise; tedavi sırasında gelişen direnç anlamını taşımaktadır. Kök hücre belirteçlerini eksprese eden hücre gruplarının tedaviye direnç göstermekte aracılık ettiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Tümör dokusundaki dirençli bir KKH'nin gelişimi çoğu durumda tümör nüksü, sferoid oluşumu, kendini yenileme ve invazyon metastaz ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle tümör dokusundaki KKH oranındaki artış kötü prognoz ile ilişkilidir. (Zhou vd., 2021; Najafi vd., 2019; Cojoc vd., 2015)

Kanser kök hücreler doğal olarak kemoterapiye ve radyoterapiye dirençlidirler ve tedavi sonrasında yeni bir tümör geliştirerek ortaya çıkmaktadırlar. KKH'ler DNA hasar yanıt (DDR), ABC taşıyıcı ailesi kaynaklı gelişen çoklu ilaç direnç (MDR), hücre içi sinyal yolak mekanizmaları ve sessizleşme (quiescence) gibi özelliklere sahiptir. Tedaviye karşı gelişen bu direnç, kanser kök hücrelerin sahip oldukları bu eşsiz mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle kanser tedavi stratejilerinde KKH'lerin hedeflenmesi tedavi başarısını artıracak en önemli etmenlerden biridir. Bunun için kanser kök hücrelerin temel mekanizmalarının dafa fazla aydınlatılmasına ihtiyaç vardır (Zhou vd., 2021; Najafi vd., 2019; Cojoc vd., 2015).

2.6.1. ABC taşıyıcılar ile ilaç eflaks mekanizması

Tümör dokusundaki kanser kök hücreler CD133, CD44, CD24, α2β1 integrin gibi KKH-spesifik hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile dedekte edilebilmektedirler (Peitzsch vd., 2018). Ek olarak ALDH1 gibi proteinlerin biyokimyasal aktivitelerinden yararlanılarak KKH'ler belirlenebilirler. KKH'lerde ALDH1'in yüksek enzimatik aktivitesi sayesinde lipofilik floresan boyası olan Hoechst 33342 boyasını hızla dışarı eflaks edebilmişlerdir. Hoechst boyamasında negatif olan hücreler kuyruk (tail) benzeri bir yapı sergilemişlerdir. Bunun nedeni sahip oldukları ABCG2 taşıyıcı sistemlerinin etkili bir Hoechst 33342 eflaks pompasına sahip olmasıdır (Scharenberg vd., 2002). Bu negatif hücre popülasyonu yan popülasyon (SP; Side popülasyon) olarak adlandırılmaktadır (Golebiewska vd.,

2011). SP hücreleri 1996 yılında hematopoietik kök hücrelerde keşfedilmiştir (Goodell vd., 1996). Bu SP fenotipi, ATP-Bağlayıcı Kaset (ABC) taşıyıcı üst ailesinin proteinlerine bağlıdır ve bunlar, gastrointestinal sistemdeki epitel hücreleri, kan-beyin bariyerini oluşturan kapiller endotel hücreleri, plasenta ve normal kök hücre popülasyonları gibi birçok farklı dokuda kimyasal homeostazın korunmasına ve çevresel zararlara karşı savunmaya katkıda bulunurlar (DeGorter vd., 2012; Mo vd., 2012). Esas olarak ABC taşıyıcı proteinler birçok kanser türünde çoklu ilaç direncindeki (MDR: Multi Drug Resistance) fizyolojik fonksiyonları ile katkı sağlamaktadırlar. ABC taşıyıcı protein ailesi (ATP bağlayıcı kaset transporterları) 49 proteinden oluşur ve bunlardan üçü tümörlerde çoklu ilaç direncinin düzenleyicileri olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bunlar; p-glikoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1), çoklu ilaç direnç protein 1 (MRP1, ABCC1) ve meme kanseri direnç proteini (BCRP, ABCG2)'dir. Bu üç taşıyıcı sistem ilaç özgüllüğüne sahip olup, taksanlar, antimetabolitler, topoizomeraz inhibitörleri de dahil olmak üzere başlıca kemoterapötik ilaç sınıflarına ve ayrıca Sorafenib, Imatinib, Nilotinib, Gefitinib, Erlotinib gibi moleküler olarak hedeflenmiş tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanıldığı tedavilere karşı tümör direnci sağlar. Farklı tümör türlerinin KKH popülasyonlarının ilaç direnci sağlayan ABC taşıyıcıları yüksek düzeyde eksprese ettikleri gösterilmiştir. (Cojoc vd., 2015). Özellikle primitif hücrelerin daha yüksek eflaks mekanizmasına sahip olduğu gösterilmiştir (Zhou vd., 2021)



Şekil 2. 5. Kanser kök hücrelerin tedaviye olan dirençlerine aracılık eden mekanizmaların şematik gösterimi

KKH'lerde tedaviye direncine aracılık eden mekanizmalar, hücre sağkalımında etkili olan birçok içsel ve dışsal etkenlerden kaynaklanmaktadır. Bu direnç mekanizları tedavi sürecinde ya da tedaviden sonra KKH'lerde çeşitli özellikler göstermektedir. Bunlar başlıca; daha yüksek derecede ilaç eflaks aktivitesi, aktif DNA onarımı, yüksek ROS seviyeleri, VM (Vasculogenic mimicry) eğilimidir. EMT süreci desteklenerek, mikroçevre, otofaji ve EMT'deki rolü, mikroçevre, otofaji ve hücre dışı veziküller yoluyla KKH özelliklerini yeniden kazanabilir (Şekil 2.5.) (Zhou vd., 2021).

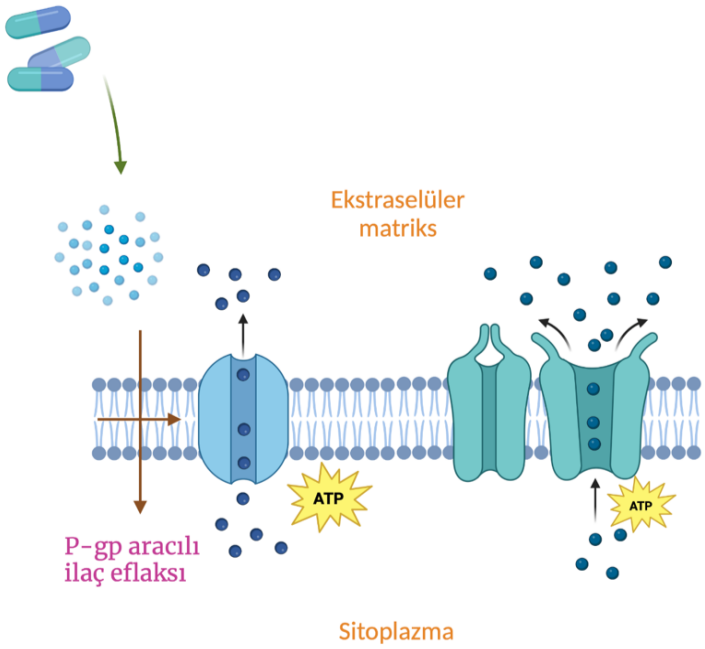
2.6.1.1. P-glikoprotein

P-glikoprotein (P-gp) ilk tanımlanan ve en çok karakterize edilen MDR taşıyıcı proteinidir ve substratların zar boyunca taşınmasından sorumludur. P-gp'ler ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışırlar. P-gp'lerin ilaç eflaks mekanizmasına ek olarak antiapoptotik molekül olarak işlevlere sahip olduğu da birçok çalışmada gösterilmiştir (Şekil 2.6). Bu çalışmalarda P-gp'nin tümör hücresinin hayatta kalmasını teşvik etmede ilaçtan bağımsız bir rolü olduğu belirtilmiştir. P-gp'nin Fas-indüklemiş apoptoz yolağını inhibe eden prosurvival molekülü gibi görev yaptığı belirlenmiştir (Smyth vd., 1998; Johnstone vd., 1999; Gollapudi vd., 2001).

P-gp'lerin ekspresyon düzeylerinin kanser hücrelerinde artması kanser tedavisinde önemli bir hedef protein olarak kabul edilmektedir. Pgp'nin hücre sağkalımını teşvik ettiği öne sürülen mekanizmalar, iyon pompası aktivitesinin ve endojen substrat translokasyonunun modülasyonunu içerir. Bu mekanizmalar, P-gp-lipid etkileşimleriyle meydana geldiği öne sürülmektedir. Kanser hücresi zarlarının lipid bileşimi, sağlıklı hücre muadillerinden farklı olma eğilimindedir. Özellikle, MDR ekspresyonu yüksek olan tümör hücrelerinde kolesterol ve sfingolipid konsantrasyonları yükselmektedir (Pallis vd., 2004). Kanser hücrelerinde yüksek P-gp ekspresyonu, kemoterapötik etkinin azalmasına ve pozitif klinik sonuçlarında azalma ile bağlantılı olarak bulunmuştur. Özellikle başlangıçta düşük seviyede eksprese olan P-gp'ler de tedavi ilerledikçe artış gözlenmiştir. Günümüzde rutin olarak kullanılan birçok kemoterapötik ajan P-gp'lere karşı dirençlidir. Bu ajanlardan bazıları; mikrotübül hedefleyen vinka alkaloitleri (vinblastin ve vinkristin gibi), taksanlar (paklitaksel ve doketaksel gibi), antrasiklinler (doksorubisin ve daunorubisin gibi), deoksisidin analoğu (gemcitabin) ve tirozin kinaz inhibitörleridir (dasatinib ve gefitinib gibi). Bunların dışında yıllardır birçok inhibitör özellikte ilaçlar P-gp'yi inhibe etmek için klinik olarak denenmiş ancak yine de istenilen verimlilikte başarı elde edilememiştir. (Deepali vd., 2018; Gündüz vd., 2012; Onsun vd., 2016).

P-gp inhibitörleri geçmişten günümüze gelişerek ve iyileştirilerek keşfedilmiş ve klinik olarak da kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılan inhibitor 1. Kuşak Analoglarından Siklosporin A'dır. Ancak Siklosporin A gibi inhibitörlerin birçok yan etkisi bulunmaktadır. Bu yan etkilerinin başında toksisitesi gelmektedir. Terapötik dozlarında inhibisyon sağlayamamakta inhibisyon dozları ise oldukça toksiktir. Siklosporin esasında bir immunosupresördür. Bu nedenle de en önemli yan etkileri nefrotoksisite, hipertansiyon ve immunsupresyondur. Bunlara ek olarak hiperlipidemi, gingival hiperplazi, hipertrikoz, bulantı, kusma, karın ağrısı, baş ağrısı, enfeksiyon ve malinite gelişimi görülmektedir. Siklosporin, böbreklerde afferent arteriollerde vazokonstriksiyona neden olarak glomerül filtrasyon oranını azaltır ve serum üre, kreatinin düzeyleri yükselir. Sebep olduğu hipertansiyon tedavisinde anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri gibi bazı ilaçlar ile Siklosporin beraber kullanılamamakta ve bu nedenle de tedavi kısıtlanmaktadır. Siklosporin bazen kalsiyum kanallarını da etkilemektedir bu nedenle Siklosporin

tedavisi sırasında Mg^{+2} ve K^{+} düzeyleri izlenmelidir. Immunosupresif etki gösteren Siklosporin enfeksiyon ve malignite riskini de bir yandan arttırabilimektedir. Genellikle siklosporin kullanılan hastalar cilt kanserleri ve lenfoproliferatif hastalıklar açısından takip edilmesi önerilmektedir. Yeni inhibitor ilaç ve kemoterapötik ilaç keşfi sıklıkla denenmektedir ancak daha önce de bahsettiğimiz üzere yeni bir ilaç keşfi ve sentezi ve daha sonrasında klinik olarak güvenli bir şekilde kullanımı çok uzun yıllar alan ve yüksek maliyetli süreçlerdir. Bu nedenle son yıllarda bu önemli ilaç keşiflerine ek olarak tüm dünya gen terapi yöntemlerine odaklanmış durumdadır (Deepali vd., 2018; Gündüz vd., 2012; Onsun vd., 2016).



Şekil 2. 6. P-glikoprotein substrat transportunun modellenmesi.

2.7. Kanser Kök Hücrelerde Etkili Sinyal Yolakları

Kanser kök hücrelerin kendini yenileme, farklılaşabilme, klon oluşturabilme gibi temel hayati özellikleri sinyal yolakları tarafından da kontrol edilmektedir. Tümör mikroçevresinde kanser kök hücre devamlılığında etkili olan sinyal yolaklarının Notch, Wnt/ /β-katenin, Hedgehog (Hh), JAK/STAT, NF-κB, PI3K/Akt/mTOR olduğu bilinmektedir (Zhou vd., 2021).

Kök hücre homeastazında rol alan sinyal yolakları KKH'de de yüksek oranda görev almaktadır. WNT geni ilk kez 1980'lerde tanımlanmış ve β-katenin aracılığı ile gen aktivasyon süreçlerini kontrol ettiği bildirilmiştir. Ortamda β-kateninin olmadığı durumda APC (Adenomatöz polipoz koli), GSK-3 β (Glikojen sentaz Kinaz

3 β), Axin ve CK1 (Kazein Kinaz 1) moleküllerinin oluşturduğu bir kaskat sistemi tarafından susturulur. Frizzled gibi antijenler WNT reseptörlerine bağlandığında kaskat aktifleşerek KKH'lerde kendini yenileme, farklılaşma, doku gelişimi ve korunmasında etkili olurlar. WNT/β-katenin sinyal yolağı embriyonik gelişim süreçlerinde, hücre göçünde, hematopoez, yara onarımında etkili sinyal yolaklarından biridir. Hayati görevlerde yer alan bu sinyal yolağında meydana gelebilecek bir disregülasyon kanser gibi patolojilerle sonuçlanabilir. WNT/β-katenin yolağı normal dokudadaki etkinliğine oranla onkogonez süreçlerinde daha aktif olduğu belirlenmiştir. KKH'lerde WNT β-katenin yolağı PI3K/mTOR ile etkileşime geçerek farklılaşma veya tümör kararlılığında önemli olduğu gösterilmiştir (Matsui vd., 2016; Gajos vd., 2020; Lindvall vd., 2007; Polakis vd., 2012; Benoit vd., 2014).

Fosfatidilinositol3-kinazların (PI3K) aktivasyonu reseptör tirozin kinazlar (RTK) tarafından fosforlanarak gerçekleşmektedir. Intraseslüler PI3K fosforilatları lipid fosfatidilinozitol (3,4)-bis-fosfat (PIP2) fosfatidilinozitol (3,4,5)-tris-fosfata (PIP3) dönüşür. Böylece bir dizi kaskat aktifleşerek hücre yaşamında önemli proseslerde görev alır. Bu prosesler başlıca hücre döngü süreçleri, hücre büyümesi, sağkalımının düzenlenmesi ile ilgilidir (Matsui vd., 2016).

Yapılan çalışmalarla kanser ile ilişkisi kesin olarak tanımlanan sinyal yolaklarının başında Notch sinyal yolağı gelmektedir. Notch sinyal yolağı birçok doku ve organ gelişiminde rol almaktadır. DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 ve JAG2 ligandları Notch reseptörüne bağlandığında sinyal yolağı aktive olarak Notch proteolitik bir yıkıma uğrar. Bu yıkım sonucunda aktif hale gelen NICD (Notch İntraselüler Domain) ile sinya yolağı kaskat süreci başlar. Notch sinyal yolağı kanser metastazında, anjiyogenezinde, KKH'lerin kendini yenilemesinde önemli rol oynamaktadır (Christensson vd., 1993; Matsui vd., 2016). Notch sinyal yolağı normal kök hücre havuzunun korunmasında da oldukça etkili olduğu gibi tümör oluşumunda da karşımıza çıkmaktadır. Öyle ki Notch sinyal yolağı hedefli pre-klinik ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Glioblastoma hücrelerinde siRNA'lar aracılığı ile Notch1 geninin sessizleştirilmesinin tümör tümör oluşturma yeteneklerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2012). Ayrıca Notch'un blokasyonu ilaç direnci ve metastazında önemli bir tedavi stratejisi olarak karşımıza çıkmaktadır (Matsui vd., 2016).

Son yıllarda kanser gelişiminde Hedgehog (Hh) sinyal yolağının önemi oldukça dikkat çekmektedir. Hh proteinleri hücre membranında yer alan Patched1 (Ptch) reseptörlerine bağlandığında aktifleşerek bir dizi prosesi başlatmaktadır. Sonik Hedgehog sinyal yolağı multiple miyelema, glioma ve kronik miyeloid lösemi, kolon kanseri gibi birçok kanserin hayatta kalım, metastazında görev aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. (Matsui vd., 2016; Scales ve ark., 2009).

2.8. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

2.8.1. Akciğer kanser kök hücre özellikleri

Akciğer kanseri, 2020 yılında 2.2 milyon yeni vaka ile en sık teşhis edilen ikinci kanserken 1.8 milyon ölüm oranı ile en çok ölüme sebep olan kanser türü olmuştur. Erkeklerde kadınlara göre insidans ve mortalite oranları açısından daha yüksektir. Kadınlarda meme ve kolorektal kanserinden sonra üçüncü sırada teşhis edilirken, mortalite açısından meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. (Sung vd., 2021).

Akciğer kanseri geç evrelere kadar semptom vermemekle birlikte erken teşhis edilmesi zordur. Hastalarda devam eden öksürük, kanlı balgam, göğüs ve sırt ağrısı, seste değişiklik, nefes düzensizliği ve kronik pnömoni (zatürre) başlıca semptomlar arasındadır (Erbaycu vd., 2020).

Tütün kullanımı, alkol tüketimi, obezite, mutajenik ajanlar, hava kirliliği kontrolsüz diyet, radyason ve güneş ışın maruziyeti gibi birçok etmenin akciğer kanserinde etkili olduğu vurgulanmıştır. Tütün kullanımının kanser oluşumundaki etkisi uzun zamandır bilinmektedir. Sadece ABD'de akciğer kanseri ölümlerinin %80'i tütün kaynaklıdır. Özellikle akciğer kanserinde özellikle tütün kullanımının etkisi oldukça yüksek orandadır. Tütün grubunda en çok tüketilen sigaraya içenlerin %24'ünün %11'inde kanser gelişmektedir. Sigara akciğer başta olmak üzere oral kavite, nazofarenks, larenks, nazal kavite, özefagus, mide, böbrek, pankreas, kolorektal, karaciğer, mesane, over kanseri ve akut myeloid lösemi gibi kanser türlerine neden olmaktadırAyrıca kalıtımsal olarak akciğer rahatsızlığı olan hastaların daha fazla kanser olma riski taşıdıkları belirlenmiştir (Freedman vd., 2020; Erbaycu vd., 2020).

1981 yılında DSÖ tarafından oluşturulan "Akciğer Tümörleri sınıflandırması" 2020 yılında günümüzdeki son haline getirilmiştir (Travis vd., 2015; Nicholson vd.,

2021). Son güncel halinde yeni tümör tipleri eklenmiştir. Son güncel halini de baz alarak akciğer kanserini temelde Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir.

KHAK, akciğer bronşlarında bulunan, sigara ile yüksek korelasyon gösteren akciğer kanser tipidir. Mikroskop altındaki görünümlerinden dolayı bu ismi almışlardır. Çok hızlı invaziv metastatik etki yaparak vücudun diğer bölgelerine yayılırlar. En agresif akciğer kanser türüdür. Genellikle geç teşhislerinden dolayı tespit edildiklerinde metastaz yapmış olduğu görülür. Genellikle beyine metastaz yaparlar. (Pietanza ve ark., 2015; Travis ve ark., 2015; Nicholson vd., 2021; Ergelen vd., 2013).

KHDAK, toplam akciğer kanserlerinin %85'ini oluşturmaktadır ve adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom en sık görülen tiplerindendir.

Adenokarsinom en sık görülen akciğer kanseridir öyle ki tüm akciğer kanserlerinin %50'sini oluşturmaktadır (Detterbeck ve ark., 2015). Tütün kullanımının en az korele olduğu kanser tipi olmakla beraber kadınlarda daha sık görülmektedir. Adenokarsinom türevleri genellikle akciğerin periferik ve subplevral bölgelerinde bulunurlar. Akciğerde daha önceden gelişmiş olan skar dokusundan gelişebilirler ve radyolojik bulgularda keskin sınırlı ve lezyonlar şeklinde görünürler (Sundarraj vd., 2014). Bunlara ek olarak adenokarsinomlar çeşitli histolojik patternlerde kendilerini gösterebilirler. Bunlar başlıca asiner, papiller, mikropapiller, solid veya lepidik patternlerdir ve hastalığın prognozunda önemlidirler (Dela Cruz vd., 2011; Travis vd, 2015).

Skuamoz hücreli karsinom, KHDAK tümörlerinde ikince en sık görülen tipidir. Sıklıkla akciğerde sentral yerleşim gösterir ve histolojik kaviteleşme yaparlar. Keratinizasyon gösteren, keratinizasyon göstermeyen ve bazoloid olmak üzere üç farklı alt tipi vardır. (Dela Cruz vd., 2011; Travis vd, 2015).

Büyük hücreli karsinom, en az görülen akciğer kanseri olmasına rağmen kötü prognozludur. Akciğerde periferik yerleşim gösteren büyük hücreli karsinomlar sigara kullanımı ile korelasyon gösterirler. (Dela Cruz vd., 2011; Travis vd, 2015; Deniz vd., 2017).

2.9. Akciğer Kanser Kök Hücreleri ve Belirteçleri

Bu tez kapsamında daha önceden de bahsedildiği gibi KKH ve mezenkimal kök hücrelerin kendini yenileme kapasitesi, çoğalma yetenekleri, köklülüklerini sürdürebilme gibi özellikleriyle oldukça benzemektedirler. Akciğer kanser kök hücrelerin sahip olduğu özellikler diğer doku kök hücrelerine göre farklılık göstermesine rağmen akciğer KKH'lerinin kanser kök hücre açısından bir farklılığı olmadığı öne sürülmüştür (Maiuthed vd., 2018).

Akciğer KKH biyolojisi hakkındaki mevcut bilgiler sınırlı olsa da bir dizi kanser kök hücre belirteci tanımlanmış ve çalışılmıştır. Bu KKH belirteçleri genel olarak tedavilere direnç ile ilişkilidir. Bunlardan birkaçı; CD326 (epCAM) ALDH1, CD133, SP'ler, CD44, CD87 ve CD117'yi içermektedir. Eşsiz akciğer KKH belirteçlerinin tanımlanması, esas olarak intratümöral heterojenite ve KKH fenotipinin kararsızlığına ve hücre yüzeyi belirteçlerinin tersine dönmesine neden olabilen yüksek derecede plastisite nedeniyle hala zor olmaya devam etmektedir (Prabavathy vd., 2018; Zheng vd., 2022).

2.9.1. CD326 yüzey belirtecinin yapısı ve özellikleri

CD326 olarak da bilinen EpCAM, bir tip I transmembran polipeptittir ve yaklaşık 40 kDa ağırlığındadır. EpCAM, uzun bir hücre dışı N-terminali, tek yayılan bir transmembran alanı ve kısa bir hücre içi C-terminali olan 314 amino asitten oluşur. İnsan EpCAM geni yaklaşık 14 kb'dir ve kromozom 2'de (2p21) bulunur (Szala vd., 1990). EpCAM, epitel kökenli neoplazmalar ve homotipik kalsiyumdan bağımsız hücre adezyon molekülü için potansiyel bir biyobelirteçtir. Akciğer kanserinde, EpCAM'ın metastazla ilişkili protein 1'in (MTA1) aşağı akış hedefi olduğu bulunmuştur ve MTA1'in aşırı ekspresyonu, EpCAM seviyelerini artırabilir ve tümör metastazını artırarak kötü prognoza yol açabilmektedir (Zhou vd., 2015). EpCAM ekspresyonu aynı zamanda CD44 ve CD166 hücre yüzey belirteçleri ile de ilişkilidir ve KHDAK'daki üçlü pozitif (EpCAM+/CD44+/CD166+) belirteçe sahip hücrelerin daha yüksek kendini yenileme yeteneği, klonal heterojenite ve sapla ilişkili gen ekspresyonunu gösterdiği belirtilmiştir (Satar vd., 2018; Zheng vd., 2022).

2.9.2. CD133 yüzey belirtecinin yapısı ve özellikleri

CD133 (prominin-1), ilk olarak 1997'de fare nöral ve $CD34^+$ insan progenitör ve hematopoietik kök hücrelerden izole edilmişlerdir ve kolesterol bağlayıcı beş katlı bir transmembran glikoproteindir (Weigmann vd., 1997). CD133'ün kök veya progenitör hücrelerde rejenerasyon, farklılaşma ve metabolizma ile ilişkili olduğu belirlenmiş ancak daha sonrasında CD133'ün tümörjenik etkisinin keşfiyle potansiyel bir KKH belirteci olarak tanımlanmıştır. Bunun üzerine CD133 ile ilgili araştırmalar akciğer, meme, kolon ve karaciğer kanserleri üzerine de odaklanmıştır. CD133'ün yapısı, bir hücre dışı N-terminali, sistein açısından zengin iki hücre içi döngü, dokuz adet N-bağlı glikosilasyon parçasına sahip iki hücre dışı döngü ve bir sitoplazmik C-terminali içermektedir. İnsan CD133 geni, uzunluğu 150 kb'den fazla olan en az 37 ekson içerir ve 865 amino asitten oluşan 97-120 kDa'lık bir glikoproteini kodlayan beş promotör tarafından kontrol edilmektedir (Wen vd., 2019;. Zheng vd., 2022).

Akciğer kanserindeki işlevi açısından CD133, yalnızca akciğer KKH'sinin potansiyel bir biyolojik belirteci değil, aynı zamanda potansiyel bir terapötik hedef ve prognostik faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. CD133, metastaz, terapi direnci ve kötü prognoz ile yakından ilişkilidir. $CD133^+$ hücreleri kendini yenileyebilir, çoğalabilir, invazyon ve metastazda görev alabilirken; $CD133^-$ hücreleri akciğer kanserinde farklılaşırlar (Roy vd., 2017). Bu nedenle, $CD133^+$ akciğer KKH'lerini hedeflemek ve yok etmek, tümör hücresi çoğalmasını, göçünü ve metastazını önemli ölçüde önleyebileceği düşünülmektedir.

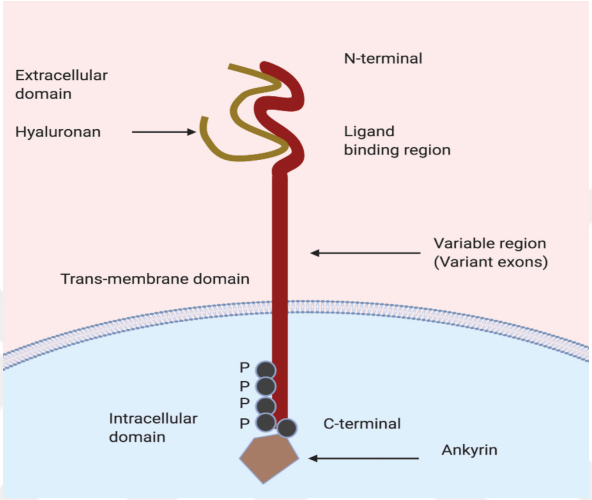
Bugüne kadar kanıtlar, CD133'ün Wnt sinyalini, PI3K-AKT sinyalini, SRCFAK sinyalini, EGFR ile etkileşimi, vasküler endotelyal büyüme faktörü otofajisini, lipid metabolizmasını ve düşük reaktif oksijen türü seviyelerini aktive ederek KKH'lerin büyümesini ve kemo-direncini düzenleyebileceğini göstermiştir (Zheng vd., 2022). CXCR4 (Tu vd., 2017) ve BMI1 (Korean vd., 2016) gibi diğer KKH biyobelirteçleri ile kombinasyon halinde, CD133 ayrıca EMT ile pozitif olarak ilişkilidir. Ek olarak hipoksik ortamda, OCT4 ve SOX2'nin up-regülasyonu, akciğer kanseri hücrelerinde CD133 ekspresyonunu indükleyebilmektedir (Lida vd., 2012; Zheng vd., 2022).

2.9.3. CD44 yüzey belirtecinin yapısı ve özellikleri

Bir tip I transmembran glikoprotein olan CD44 (P-glikoprotein 1), hücre adezyon molekülleri ailesine aittir ve geni insan kromozomu 11'de (11p13) bulunmaktadır. İnsan CD44'ü 85–200 kDa ağırlığındadır ve 742 amino asitten oluşmaktadır (Goldstein vd., 1989). Seçici kesme ve translasyon sonrası modifikasyon yoluyla, CD44, hücre yüzeyinde bir dizi ligandla birleşebilen ve hücrelerin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde yer alan çeşitli izoformlar oluşturabilir. CD44 bir hyaluronik asit reseptörüdür ve CD44 ile hyaluronik asit arasındaki iletişimin hücre dökülmesini, metastazı ve invazyonu indüklediği tahmin edilmektedir (Şekil 2.7.) (Caon vd., 2020). CD44 hemen hemen tüm tümör tiplerinde eksprese edilen ve potansiyeli kanıtlanmış bir belirteçtir (Ouhtit vd., 2020; Zheng vd., 2022).

$CD44^{high}/CD24^{low}$ hücrelerinde epitel hücre belirteçlerinin ekspresyonları azalırken MKH belirteç ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur. Bu hücreler, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) normal ve tümör hücrelerinin kök kazanmasına yardımcı olabileceğini göstererek, kendini yenileme ve heterojen farklılaşma yeteneğini elde ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Mani vd., 2008). Akciğer kanserinde yapılan çalışmalarda CD44 ekspresyonunun KHDAK'da KHAK'a göre daha yüksek olduğu ve en yüksek ekspresyon seviyesinin akciğer skuamöz hücreli karsinomda gözlendiği gösterilmiştir (Roudi vd., 2014). KHDAK hücre hatlarından türetilen hücrelerin, 1p36'da bulunan tümör baskılayıcı gen miR-34a'nın ekspresyonunu önemli ölçüde azaltan kromozomal sapmalara ve 1p36 delesyonuna sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, miR-34a'nın aşırı ekspresyonu, $CD44^{+}$ hücrelerinin kök fenotipini zayıflatmakta olduğu da vurgulanmış ve bu gen hedefli çalışmalar da başlatılmıştır (Sun vd., 2021). CD44, Notch, Hedgehog, Wnt, STAT3, Hippo, JNK ve RhoGTPase ve reseptör tirozin kinazlar tarafından sinyal yollarına aracılık eden bir koreseptördür (Zheng vd., 2022). Ayrıca CD44, endotel hücreleri arasındaki adezyonun anahtar aracısıdır ve bu nedenle patolojik anjiyogenezde önemli bir rol oynar (Ludwig vd., 2019). CD44 reseptörü, ezrin, radixin ve moesin proteinlerine bağlanarak, hücre zarı ile hücre iskeletine bağlanabilir, bu da kanser hücresi büyümesini ve metastazını kolaylaştırmaktadır. CD44 ayrıca, tümör hücresi yüzeyinde PD-L1 ekspresyonunu teşvik ederek tümör proliferasyonuna ve immün kaçışa aracılık edebilir (Kong vd., 2020). CD44 ekspresyonu, epidermal büyüme

faktörü reseptörü (EGFR)-mutant neoplazmalarda, özellikle erken KHDAK'da önemli bir rol oynamaktadır (Akamine vd., 2019; Yin vd., 2020) ve CD44, akciğer kanserli hastalarda EGFR-TKI monoterapisi üzerine EMT'yi teşhisinde önemli olduğu da vurgulanmıştır (Suda vd., 2018). Akciğer skuamöz hücreli karsinomunda daha yüksek olan CD44 ve ALDH'yi birlikte eksprese eden hücreler, her zaman artan kendini yenileme kapasitesi, gelişmiş migrasyon yeteneği ve tümörijenisite göstermektedirler. (Masciale vd., 2020; Zheng vd., 2022).



Şekil 2. 7. Hyaluronik Asit ve CD44 reseptörlerinin etkileşiminin gösterilmesi (Akim vd., 2021)

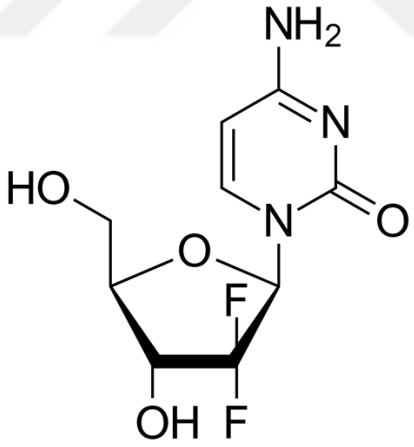
2.10. Gemsitabin

Gemsitabin kemoterapötik olarak günümüzde ticari olarak tek başına ya da diğer kemoterapötikler ile kombine olarak over kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri (KHDAK), pankreas kanseri vb. gibi türlerinde kullanılan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış bir moleküldür. Gemsitabin, C9H11F2N3O4 kimyasal formülüne ve 263.2 g/mol moleküler ağırlığa sahip bir antimetabolit ilaçtır. (Şekil 2.8). Gemsitabin, benzer yapılara sahip olmasından dolayı bir sitidin analoğu olarak kabul edilmektedir. Bu benzerliğin avantajı Gemsitabin'in DNA replikasyonu sırasında nükleosid sitidin yerine geçmesini sağlar, dolayısıyla DNA replikasyon sürecini engeller (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi 2021).

Gemcitabin bir primidin antimetabolitidir ve hücre içerisinde nükleozid kinazlar ile aktif difosfat ve trifosfat nükleozitlere metabolize olmaktadır. Gemcitabin iki ayrı mekanizma ile DNA sentezini inhibe ederek sitotoksik etki

yaratmaktadır. Bunlardan biri, DNA sentezi için deoksinükleosid trifosfat oluşturan reaksiyonları katalizleyen ribonükleotid redüktaz, aktif difosfat tarafından inhibe edilir. Aktif difosfat ribonükleotid redüktazı inhibe etmesi sonucunda deoksinükleozid konsantrasyonlarında azalmaya neden olur. İkincisi ise trifosfat nükleozitler DNA'da yer almak için deoksinükleosid trifosfat ile yarış içine girer. Böylece Gemsitabin hücre içersinde kalır ve uzaklaştırılamaz. Gemcitabinin DNA yapısına katılmasıyla beraber, DNA zincirine bir nükleotid eklenir ve DNA sentezi inhibe olur. Bu inhibisyonla beraber hücreler apoptotik sürece girerler (Capella vd., 2001; Toschi vd., 2009).

Gemsitabinin yapılan birçok çalışmada insan tümör hücrelerine sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Solid tümörlerin çoğuna karşı pozitif etkilidir. Gemsitabinin etki mekanizması faz spesifiktir ve DNA sentez döneminde (S fazı) olan hücreleri öldürür ve belirli koşullarda hücre siklusunda G1/S fazı geçişini bloke eder. Yapılan çalışmalarda gemsitabinin *in vitro* sitotoksik etkisinin konsantrasyona ve zamana bağımlı olduğu belirlenmiştir (Sandoval vd., 2012; Csako vd., 1995; Capella vd., 2001).



Şekil 2. 8. Gemcitabinin kimyasal yapısı (National Center for Biotechnology Information)

2.10.1. Akciğer kanserinde Gemcitabin direnci

KHDAK hücreleri, Gemsitabin'e 3 ana mekanizma nedeniyle direnç kazanmaktadır. Bunlardan biri, Gemsitabin metabolik yolaklarında hENT1 eksikliği, hız sınırlayıcı enzimin (dCK) aşağı regülasyonu ve RRM1/RRM2'nin yukarı regülasyonu gibi proteinlerdeki disregülasyon sebebiyle direnç meydana

gelebilmektedir. Post-transkripsiyonel olarak dCK'yi düzenleyen bir RNA bağlayıcı protein olan Hu antijeni R (HuR) de Gemsitabin etkinliği ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek HuR seviyeleri, Gemsitabin ile tedavi edilen hastalarda daha iyi bir genel sağkalım ile sonuçlanmıştır (Jia vd., 2015).

Diğer bir Gemsitabin direnç mekanizması, (ABC) taşıyıcı aile proteinleri gibi ilaç akış pompalarının yüksek ekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Bu proteinler, kanser kök hücrelerde yüksek oranda eksprese edilerek KKH'leri kemoterapötik ajanlara karşı koruduğu gösterilmiştir. Son kanıtlar, Gemsitabin direnci ve EMT ile kök hücre fenotipi arasındaki bağlantıyı da oldukça destekler niteliktedir (Jia vd., 2015).

Üçüncü direnç mekanizması ise, Gemsitabin direnci ayrıca çoklu genetik ve epigenetik anormallikler ile yakın korelasyon göstermektedir. Bir veya birkaç gendeki değişiklikler, ilaç dirençli hücre sağkalımını ve malign fenotipi sürdürmek için önemli olduğu gösterilmiştir. NF-κB, AKT, MAPK, HIF-la27 yolaklarının *in vitro* ve bazı *in vivo* modellerde Gemsitabin direncine neden olduğunu gösteren kanıtlar birçok çalışmada sunulmuştur (Jia vd., 2015).

2.11. Kanser Tedavisinde Taşıyıcı Sistem Olarak Eksozomlar

Özellikle son yirmi yıldır nanoteknolojik ilaç dağıtım sistemleri üzerindeki çalışmalar önem kazanmıştır. Gen ve ilaç ürünlerin nano bazlı sistemler ile enkapsüle edilerek tedavi protokolünde uygulanması özellikle hedeflendirme için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Nanoteknolojik sistemler boyutları 1-100 nm boyutundaki parçacıkları içeren sistemlerdir ve bu sistemler ilk kez 1957 yılında Amerikalı Nobel fizik ödüllü Richard Feynman tarafından gösterilmiştir (Strambeanu vd., 2015; Junk vd., 2006).

Nanopartiküller (Np) üretilebilecekleri malzemelerden, hedeflenecek organizmanın yapısına, istenilen boyutlarda modifiye edilebilmesi sebebiyle eşsiz ürünlerdir. Bu avantajlarıyla sadece medikal ve tedavi süreçlerinde değil, günlük hayatımızda gıda, kozmetik, tekstil, elektronik ve uzay endüstirisinde de kullanılmasıyla karşımıza çıkmaktadır (Behzad vd., 2020; Strambeanu vd., 2015).

Nanopartiküllerin modifiye edilerek farklı şekillerde üretilebilme avantajıyla oldukça dikkat çekmektedir. Nanopartiküller genellikle 1-100 nm boyutlarına sahip oldukça küçük parçacıklardır. Yüzey alanları, kimyasal yapıları, yüzey reaktiviteleri,

yüzeye bağlı grup ve yüzey kapamaları, kristallik ve elektronik özellikleri, çözünebilirliği, şekilleri ve kümelenme yeteneklerine göre nanopartikül özellikleri değişebilmektedir. Bu özellikleri baz alındığında Np'ler farklı katagorilerde incelenmektedir. Bu kategorilerde genel olarak en sık karşımıza çıkan Np'ler; metal nanopartiküller, metal oksit nanopartiküller, karbon temelli nanopartiküller, yarı iletken nanopartiküller, polimer temelli nanopartikül ve lipid bazlı nanopartiküllerdir (Hulkoti vd., 2014; Mauter vd., 2018; Kolahalam vd., 2019; Naseem vd., 2021).

Tüm bu nanopartiküller arasında klinik olarak kullanım için onay alan ilk Np lipid pazlı olan lipozomlardır (Antimisiaris vd., 2018). Genel olarak emülsiyon ortamında kendi kendine bir araya gelerek fosfolipid membranlı sentetik veziküllere lipozom denmektedir. Lipozomlar; ilaç ve gen ürünlerin taşınmasını sağlayabilen, toksik olmayan ve biyouyumlu yapıya sahip, ilaç stabilitesini uzun süre korunmasını sağlayabilen ve birkaç ilaç yüklenmesine müsait olan nanopartiküler sistemlerdir. Doxil^{TM} gibi şu an klinik çalışma aşamasında olan kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaç içeren lipozomal nanopartiküller bulunmaktadır (Strambeanu vd., 2015). Lipozomların sahip olduğu avantajların yanında uzun dolaşım kabiliyeti, stabiliteleri ve az da olsa toksisiteleriyle konakçı immun sisteminden kaçma yetenekleri konusu hala araştırılması ve geliştirilmesi gereken özellikleridir. Taşıyıcı sistemlerin sahip olması beklenilen çoğu özelliğe sahip olan eksozomlar gelecekte Np sistemler yerine kullanılabilecek bir seçenek olarak dikkat çekmektedir (Ha vd., 2016).

Hücreler hem yakında hem de uzaktaki diğer hücrelerle protein, lipid, genomik DNA, RNA gibi çeşitli organik bileşikleri taşıyan hücre dışı veziküller (EV) aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu veziküller boyut ve biyogenezlerine göre sınıflandırılırlar. EV'ler boyutları 1-1000 nm arasında değişen, hücreler tarafından hücre zarından koparak oluşan veziküllerdir ve 3 alt gruba ayrılmaktadırlar. (Yamashita vd., 2018; Chung vd., 2019; Fang ve Vangsness, 2020). Bunlar; apoptotik veziküller, mikroveziküller/ektozomlar ve eksozomlardır. (Sciences, 2020).

Eksozomlar, heterojen vezikül koleksiyonları olarak bilinir ve üretildiği hücrenin fenotipik durumunu taşır. Eksozomlar organizmadaki immun sistem hücreleri, kanser gibi patolojik hücreler de dahil olmak üzere tüm hücreler tarafından sentezlenirler ve lenf, amniyotik sıvı, meme bezi, kan, anne sütü, gözyaşı, beyin

omurilik sıvısı, tükürük, burun mukusu ve idrar gibi gibi tüm vücut sıvılarında bulunmaktadırlar. Spesifik yüzey belirteçleri, boyutları ve kusuruz yapıları sayesinde dolaşım sisteminde serbestçe dolaşabilmektedirler (Faruqu vd., 2018; Sharma vd., 2020; Baig vd., 2020; Wang vd., 2020).

İlk başlarda eksozomların sadece hücre atıklarını taşıyan mekanizması olduğu düşünülmekteydi ancak araştırmalar sonucunda eksozomların hücreler arası kargo molekülü görevi görerek hücreler arasında molekül transfer yapabildiği gösterilmiştir. (Zhao vd., 2020). Hatta uzak hücreler arasındaki temel iletişimin eksozomlar aracılığıyla gerçekleştiği birçok çalışma nihayetinde kanıtlanmış durumdadır (Harris vd., 2015).

Eksozomlar bir lipit çift tabakasından oluşurlar ve köken aldıkları hücreye benzerler (Kalluri, 2016; Yin vd., 2019). Boyutları 20-150 nm arasında değişmektedir. Eksozomların plazma zarları, seramidler, fosfatidilserin, doymuş yağ asitleri, kolesterol ve sfingomyelin gibi çeşitli lipitlerden oluşur (Logozzi vd., 2018; Xunian ve Kalluri, 2020). Eksozomun etrafındaki lipit çift tabakası, eksozom içeriğini RNAz ve proteazlara karşı koruyarak tedavide uygun bir taşıyıcı haline getirmektedir (Zheng vd., 2019). Eksozomlar (mRNA, rRNA, tRNA, vaka RNA, Y-RNA, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), mikroRNA (miRNA) ve proteinler (Kim vd., 2018; McAndrews ve Kalluri, 2019) gibi çeşitli RNA'lar içerirlerler. Eksozomdaki proteinler, eksozom biyogenezi (ESCRT kompleksi, ALIX, TSG101 ve sintenin), zardan taşınma ve füzyonu (anneksinler, flotillinler ve Rab GTPazlar), tetraspaninler (örneğin, CD9, CD63, CD81 ve CD82) integrinler, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II proteinleri ve ısı şoku proteinleri (HSP70, HSP90) gibi çeşitli işlevlere sahiptir (Olejarz vd., 2020).

Eksozom biyogenezi, taşıma için gerekli olan endozomal sıralama kompleksi (ESCRT) tarafından düzenlenmektedir. ESCRT, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III olmak üzere 4 kompleksten oluşurlar. Bu kompleksler, ALIX, VPS4 ve VTA1 gibi eksozoma yönelik hedefleme proteinlerinin tanınmasına ve MVB veziküllerinin oluşumuna katkıda bulunur. Bazı çalışmalar ESCRT bağımsızlığının, kargo yükleme ve eksozom içine sıralamadan sorumlu tetraspanin proteinleri (CD81, CD9, vb.) için önemli olduğunu göstermiştir. Tetraspaninler, çeşitli reseptörlerle etkileşime girebilen eksozom yüzey belirteçleri ve transmembran proteinlerdir. ESCRT'ye bağımlı ve ESCRT'den bağımsız yollar, farklı eksozom biyogenezinde

farklı yollar oluşturarak sinerjik olarak çalışmaktadırlar (Mashouri vd., 2019; Xunian ve Kalluri., 2020).

Eksozomlar taşıdıkları biyomoleküller aracılığıyla birçok biyolojik olayı tetikler. Çalışmalar, eksozomların kanser, Alzheimer ve diyabet gibi birçok hastalıkta hücreler arası bilgi transferinde önemli roller oynadığını göstermiştir. Bu özelliklerinden baz alınarak hasta tanılarında kullanımlarının yanında terapötik ajan olarakta kullanılabilmeleri dikkat çekicidir (Yamashita vd., 2018). Eksozomlar, dolaşımdaki stabiliteleri, hücre hedefleme yetenekleri ve nano taşıyıcılardan daha az toksisite göstererek bağışıklık sistemine adaptasyonları nedeniyle çeşitli farmasötik molekülleri ve ilaçları taşımak için doğal nano taşıyıcılar olarak kullanılmıştır (Naseri vd., 2020). Eksozomların yüksek biyouyumluluğu, organizmada ve kültür ortamındaki yüksek stabilitesi, non toksik olması sentetik Np'lerden ayıran en temel özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Doğal eksozomlar diğer Np'lere kıyasla düşük immunojeniteye sahiptir (Jiang ve Gao, 2017; Pullan vd., 2019).

Doğal taşıyıcı sistemlerle ilgili olan çalışmaların son yıllarda bu alan üzerine yoğunlaştığını görmekteyiz. Bugüne kadar epitel hücrelerinden, lenfosit makrofajlarından, kanser ve MKH'lerden izole edilen eksozomlar ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmıştır. Doksurobisin, kurkumin ve paklitaksel gibi bazı kemoterapötik ilaçlar eksozomlara yüklenerek, hedef hücre grubuna iletiminde pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Johnsen vd., 2014; Liu vd., 2019). Eksozomların doğal olarak DNA, RNA gibi gen ürünlerini taşımaları ve ilaç taşıma yeteneklerinden dolayı gen ürünlerini de taşıyabileceği öne sürülmüş ve bu konu üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Eksozomların RNA transferinde çok önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Özellikle gen susturmak veya gen susturmayı indüklemek üstüne küçük düzenleyici mikro RNA (miRNA) veya küçük interferans RNA (siRNA) taşımak ve hedef hücreye iletmek konusunda yetenekleri bildirilmiştir (Ratajczak vd., 2006; Baj-Krzyworzeka vd., 2006; Collino vd., 2010; Deregibus vd., 2007; Skog vd., 2008; Pegtel vd., 2010; Yuan vd., 2009).

Gen terapisi tedavisi zor olan hastalıkların kesin tedavisi için umut vaat eden terapötik bir platformdur. Çünkü hastalığa özgü diziyi hedef almasıyla kesin ve kişiselleştirilmiş tedavi imkanı sunmaktadır. Hastanın belirlenen nükleik asit dizine müdahale ederek gen ekspresyonları azaltılabilmekte, artırılabilmekte veya düzeltilebilmektedir. siRNA, miRNA veya inhibitör antisens oligonükleoitdler

(ASO) genellikle hedef gen inhibisyonu için kullanılırken; plazmit DNA, haberci RNA (mRNA), küçük aktive edici RNA (saRNA) ve CRISPR (kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar)/Cas (CRISPR ile ilişkili protein) sistemleri genellikle hedef gen ekspresyonunu artırmak veya düzeltmek için kullanılmaktadır (Anguela vd., 2019; Weng vd., 2019; Weng vd., 2020; Li vd., 2020).

RNAi yani RNA interferans (fonskiyonel genomiks) bilim dünyasında oldukça heyecan uyandıran ve hatta Science dergisi tarafından 2001 yılında "yılın molekülü" ve 2002'de "yılın en önemli bilimsel hamlesi" seçilen gen fonksiyonudur (Karagüzel vd., 2007). Kanser hücrelerindeki sinyalizasyon ve gen ürünlerinin transkripsiyon sonrasında RNAi teknolojisiyle susturulması umut vaat eden bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. RNAi'de rol oynayan üç gen inhibitörlerinden birisi siRNA'lardır. (Jinek ve Doudna, 2009). İlk kez 1999 yılında keşfedilmiş olan 70-80 baz çiftinden oluşan dsRNA'lar (ekzojen kaynaklı çift iplikli RNA) siRNA'ların öncüsü olarak kabul edilmektedir. dsRNA'lar RNAaz III ailesinden "dicer" enzimi tarafından kesilerek 20-25 baz çiftindne oluşan siRNA'ları meydana getirirler. siRNA'lar organizmada gen transkripsiyonundan sonra mRNA'yı parçalayarak siRNA'ya özgü spesifik genlerin ekspresyonunu inhibe ederler (Jain, Pathak ve Vaidya, 2018). Organizmada gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerin regülasyonunda rol almaktadırlar.

Sitoplazmada bulunan Dicer enzimi RNA'ya ATP'ye bağımlı olarak bağlanır ve RNA'nın ucundaki kıvrımlı bölgeyi keser (Hammond vd., 2000). Daha sonrasında çift sarmallı RNA molekülünü helikaz ile açarak 21-23 nükleotit kadar kısa RNA parçaları haline gelmek üzere keser. Parçalanmış küçük RNA'lar RISC'e (RNA-induced silencing complex: RNA ile indüklenen susturma kompleksi) bağlanır. Olgun siRNA ve miRNA'lar RISC kompleksi içerisinde spesifik olarak hedef mRNA dizisiyle eşleşir ve eşleştiği bölgelerden endonükleazlar ile kesilirler. Böylece hedef gen transkripsiyondan sonra protein üretilemeden susturulmuş olur (Kumar vd., 2022; Weng vd., 2015; Das ve Sherif, 2020).

siRNA'lar ile spesifik gen susturmanın özellikle dirençli kanser hücrelerinde kemoterapötiklere karşı duyarlılığı artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Gün geçtikçe özellikle siRNA ve kemoterapötiklerin kombinasyonlarının ABCB1 geni üzerindeki olası pozitif etkileri önem kazanmaktadır. (Hua, Mutch ve Herzog, 2005; Navarro vd., 2012; Susa vd., 2010; Yhee vd., 2015).

Birçok kanser türümde siRNA'ların tek veya kombine olarak kullanılmasıyla hücre proliferasyonunu engellendiği, apoptozun indüklendiği ve MDR'nin ortadan kaldırıldığı, anjiyogenezin baskılanabildiği ve hatta metastazın engellenebildiği yönünde umut vadeden çalışmalar bulunmaktadır (J. Liu ve Guo, 2020; Yin vd., 2010).

2.11.1. Eksozomların Hyaluronik Asit ile enkapsülasyonu

Karl Meyer ve John Palmer tarafından yaklaşık 80 yıl önce keşfedilmiş olan HA, glikozaminglikan sınıfına ait bir polimerdir ve kozmetik, kimya, biyoloji ve tıp alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Hyaluronik asit (HA), ECM'in büyük bir bölümünü oluşturan, D-glukronik asid ve N-asetil D-glukozaminin 1-3 ve 1-4 glikozit bağlarının bağlanması ile oluşan bir mukopolisakkarittir. HA, Hyaluronan olarakta bilinmektedir (Kim, Moon, Kim, Heo, & Jeong, 2018; Necas vd., 2008).

HA, hidroksil ve karboksil gruplarına ek olarak N-asetil grubuna da sahiptir ve bu sayede farklı kimyasal modifikasyonlar için elverişlidir. HA, hücreler tarafından HAS1, HAS2 ve HAS3 genleri tarafından plazma membranında sentezlenmektedir. Bu üç farklı izozimi farklı boyutlarda HA polimeri üretimini sağlarlar (Kogan, Soltes, Stern, & Gemeiner, 2007). Vücutta cilt, akciğer, böbrek, göbek kordonu, sinoviyal sıvı, birçok yumuşak bağ dokusunda, beyin ve kas dokularında olmak üzere birçok dokuda bulunurlar (Necas vd., 2008). HA fragmanları CD44 ile van der Waals bağları ile etkileşime geçerek hücrelerin proliferasyon, farklılaşma, göçü ve adezyonunda görev almaktadır (Mattheolabakis vd., 2015; Huang vd., 2016). Ökaryotik hücreler dışında bazı bakterilerde HA sentezi gerçekleştirmektedirler.

HA nonimmunojenik, biyoçözünür ve biyouyumlu yapıya sahiptir ve hücrelerin diğer ECM bileşenleriyle etkileşim kurmasını sağlar. Ayrıca hücreler için ortamı hidratize ederek visköz bir ortam sağlar ve böylece su dengesi ve filtrasyon gibi fizyolojik etkilerde bulunur (Harris & Kerr, 2017). HA yarılanma ömrü ortalama olarak birkaç gündür. HA diğer hücrelerin CD44 reseptörleri ile etkileşime geçer. Böylece moleküler ve hücresel mekanizmalar üzerinden biyolojik yanıtların oluşmasını sağlarlar. CD44 aracılı haberleşme ile apoptoz ve hücre sağkalım sinyal yolakları aktif olarak etkilenmektedir. HA tümör hücrelerinde aşırı eksprese olan RHAMM (Hiyaluronan aracılı hareketlilik için reseptör) ve CD44 reseptörüne bağlanır. Bu sayede kanser tedavi stratejilerinde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. HA

ailesi birçok kanser tipi için prognostik belirteç olarak kullanılmaktadır (Lokeshwar, Mirza, & Jordan, 2014).

HA'nın enfeksiyon önleyici, non-immunojenik ve biyouyumlu olmaları ilaç taşıyıcı sistemlerle konjugasyon fikrini beraberinde getirmiştir (Lokeshwar vd., 2014). CD44 ekspresyonu fazla olan hücrelerde HA ile konjuge edilen nanoteknolojik sistemler birçok kemoterapötik ilaçlarla kombine edilerek formülasyonlar hazırlanmış ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Misra vd., 2011).

Paklitaksel (PTX) (Lee, Lee, & Park, 2008) ve sisplatin (CT) (Fan, Zhao, Qu, & Fang, 2015) gibi kemoterapötiklerle oluşturulan HA konjugatlarının kanser tedavisinde daha etkin tedavi sundukları ve ilaçların stabilitesinin arttığı ve böylece dolaşımda daha uzun süre kalması sağlandığı belirtilmiştir. (Huang & Huang, 2018). Başka bir çalışmada ise CD44+ karaciğer hücrelerine hedeflendirilmek amacıyla telomeraz hedefli siRNA içeren lipozomal formülasyonlar HA asitle konjuge edilmiş ve siRNA'ların endonükleazlarca yıkılmaları engellenmiştir (Taetz vd., 2009). Birçok klinik ve preklinik çalışmada farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere formüle edilen nanoteknolojik ürünlerin HA ile konjuge edilerek uygulanmasının pozitif sonuçlarını görmekteyiz. (Alamgeer vd., 2018; Doherty, Tempero, & Corrie, 2018). Bu nedenle HA kanser tedavi protokolleri için yüksek potansiyele sahiptir.

2.11.2. Apoptoz

Kelime anlamı olarak "ayrı" "düşmek" anlamına gelen "apo" "ptosis" kelimelerinden türeyen apoptoz terimi 1972 yılında ilk kez Avustralyalı bir patalog olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmıştır. Apoptoz süreci bir dizi genler tarafından kontrol edilen, protein sentezi ve enerji bağımlı süreçleri olan programlanmış hücre ölümüdür. Apoptoz organizmanın homeostazında en önemli rolü üstlenmektedir. Apoptotik süreçler organizmada embriyonik dönemden başlayarak ölüme kadar birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynarlar. Doku homeostazinin devamlılığı fizyolojik olarak doku gelişimi süreçlerinde meydana gelen immun regülasyon, yeni hücre yapımı (remodelling), normal hücre sirkülasyonu (turnover) ve hücre ölümünün dengesi ile ilişkilidir. Bu dengede meydana gelebilecek bozulma kanser gibi birçok patolojiye neden olabilmektedir.

Tümörgenez süreci hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile başlamaktadır (Pore vd., 2013).

Apoptotik mekanizmalar DNA hasarı, sitotoksik moleküller, çeşitli iç ve dış sinyallar aracılığı ile aktive olabilirler. Apoptoz süresince proteinler programlı olarak proteolitik aktiviteye maruz bırakılırlar. Parçalanan proteinler tüm hücre boyunca yayılarak apoptotik sinyal oluştururlar ve hücresel yıkıma sebep olurlar. Apoptoz uyarısı alan hücre kontakt inhibisyon ile bağlantısını keser. Apoptoz nekrozun aksine tek bir hücrede meydana gelmektedir ve hücreler büzüşürler. Büzüşmenin temel nedenleri Na^+, K^+, Cl^- iyon kanallarının kapanarak hücre içi ve dışı arasındaki molekül geçişlerinin durdurulması ve aktin ve lamininlerin ayrılması kaynaklı hücrenin iskelet yapısının bozulmasıdır (Vercammen vd., 2001). Apoptoz sonucu büzüşen hücrelerde kromatin yoğunlaşması meydana gelerek piknotik bir görünüm oluşur. Hücre membran bütünlüğü genel kapsamda korunurken, hücre membranında yer alan fosfotidil serinler hücre zarı iç kısmından dış kısma doğru taşınır ve membranda porlar oluşur. Tüm hücre organalleri küçülür ve parçalanarak hücre membranıyla birleşirler. Tomurcuklanarak koparak apoptotik body (apoptotik vezikül) meydana getirirler. Makrofajlar tarafından tanınan apoptotik veziküller enflamasyon oluşmadan fagosite edilerek ortadan kaldırılarlar (Dağdeviren vd., 2021).

Apoptozun düzenlenmesinde kaspaz ailesi, p53, sitokrom C gibi proteinler, Bcl-2 kalsiyum, seramid gibi moleküller ve mitokondriler görev almaktadır. Bu moleküller anti-apoptotik olabildiği gibi pro-apoptotik özelliklerde sergilemektedir. Örneğin Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri (Bax, Bid, Bad, Bcl-xs vb.) pro-apoptozda rol alırken bazı üyeleri (Bcl-2, Bcl-xL) ise anti-apoptotik olaylarda rol alılar. Kaspazlar proteolitik kaskat sistemi halinde çalışırlar. Kaspaz ailesinden Kaspaz 2,8,9 ve 10 başlatıcı olarak görev alırlar ve efektör kaspazları aktifleştiriler. Kaspaz 3,6,7 ise efektör kaspaz olarak görev alarak birçok apoptotik proteini gen düzeyinde aktifleştirerek apoptozu başlatır (Dağdeviren vd., 2021; Arisan vd., 2010).

2.11.3. Apoptozda görev alan moleküller ve moleküler düzenleyiciler

2.11.3.1. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 geni memeli genlerinde ilk keşfedilenlerden birisidir. Ağırlığı nispeten küçük olmakla birlikte 25-26 kDa'dır. Mitokondride, sitozolde ve Endoplazmik

retikulum zarında yerleşim göstermektedirler (Taneja vd., 2001). Apoptozda temel görev alan moleküllerin başında Bcl-2 süper protein ailesi gelmektedir. Bu süper ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesi, apoptozu başlatan ve devam etmesini sağlayan pro-apoptotikler ve apoptozu inhibe eden anti-apoptotikler olmak üzere iki ana gruptan oluşmaktadır. Apoptoz tetikleyici olarak görev yapan Pro-apoptotikler; Bax, Bad, Bid, Bak, Bim, Bcl-xs Puma ve Noxa'dır. Apoptoz baskılayıcı olarak görev yapan anti-apoptotikler ise, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-w, BHRL–1 ve Brag-1'dir (Kelly vd., 2007; Burlacu vd., 2003; Brunelle vd., 2009).

Hücre ölüm sinyali aldığı zaman farklı bölgelerde yer alan Bcl-2 ailesi homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere birleşirler. Değişime uğrayan Bcl-2 protein ailesi kompleksi mitokondrinin dış membran entegrasyonu ile membran potansiyelini bozarlar. Sitokrom C, AIF gibi apoptoz medyatörlerin salınımını arttırarak apoptozu başlatırlar. Anti-apoptotik proteinler Ca^{2+} iyonların transportunu ayarlayarak apoptoz regülasyonu sağlarlar (Kelly vd., 2007; Burlacu vd., 2003; Brunelle vd., 2009).

2.11.3.2. p53

Tümör süpresör bir protein olan p53 proteinleri DNA'da bir hasar meydana geldiğinde aktifleşerek hücre döngüsü regülasyonu, apoptozis, DNA tamiri ve senesensi kapsayan antiproliferatif etki göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı "genomun gardiyanı" olarak görülmektedirler. p53 de meydana gelecek bir mutasyon hücre ömrünü uzatmaktadır. DNA'da gerçekleşen bir hasar eğer tamir edilemeyecek düzeyde ise p53 tarafından Bax, Apaf-1 ve Fas yapımı artırılarak apoptozu indüklenmektedir. p53'ün BCL-2 süper protein ailesinde pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin düzenlenmesi üzerinde de rolü olduğu bilinmektedir. Genotoksik bir olay sonucu meydana gelen DNA hasarında p53'ler doğduran DNA'ya bağlandıktan sonra ya hücre döngüsünün G1'de durmasını sağlayarak tamir mekanizmalarının devreye girmesi için zemin hazırlar ya da tamir edilemeyecek bir hasar tespit edildiyse hücreyi apoptoza gönderir. p53 aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olarak fonskiyonunu sürdürmektedir. DNA hasarı, hipoksi, viral transformasyon, onkogen aktivasyonları, nükleotid düzensizliği gibi etmenler ile meydana gelen hasarlı hücrenin proliferasyonunu engellemek üzere bir dizi gen ekspresyonlarını aktifleştirmektedir. Böylece tümörgenez sürecinin başlamasını engelleyebilmektedir (Erster vd., 2005; Yogasawa vd., 2018; Jan vd., 2019).

2.11.3.3.Kaspazlar

Apoptoz mekanizmasında kilit enzimleri olan kaspazlar aspartik asit-sistein kompleksi içeren proteazlardır. Apartik asitten sonraki peptit bağını kırarak etkinlik gösterirler. Şu ana kadar 14 farklı kaspaz izoformu tanımlanmıştır ve hücre içinde inaktif (prokaspaz) halde bulunurlar. Kaspazlar, bir N-terminalden "prodomain", geniş bir altbirimden ve küçük bir altbirimden oluşmaktadırlar ve 100 farklı proteini keserek apoptozda etkin rol alırlar. Kaspaz ailesi apoptotik sinyal ile kaspaz kaskatı oluşturur ve birbirlerini proteolitik yıkım ile aktif forma dönüştürürler. Kaspazların yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre üç alt gruba ayrılır. Bunlar:

Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10),

Efektör kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7),

İnflamatuar kaspazlardır. (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14).

Apoptotik sinyallere yanıt veren başlatıcı kaspaz ailesi adaptör proteinle kompleks oluşturarak efektör kaspazları aktifleştirirler. Başlatıcı kaspazlar hücrenin ölümünden sorumlu değillerdir, hücrenin ölümü effektör kaspazlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Efektör kaspazlar aktifleştiktikten sonra hücre iskeleti proteinlerini imha ederek hücre morfolojisini değiştirirler. İnflamatuar kaspazlar ise uzun prodomain içerir ve apoptoz dışı da dahil olmak üzere inflamatuar süreçlerde görev almaktadırlar (Pop vd., 2009; Seydel vd., 2012; Liv d., 2008; Papaliagkas vd., 2007; Dağdeviren vd., 2021).

2.12. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz süreci beş farklı yolak üzerinden programlanabilmektedir ancak bu yolaklar temelde iki aba başlık altında ifade edilmektedir. Bunlar;

I. İntirinsik (Mitokondriyal aracılı/İç) yolak,

II. Ekstrinsik (Reseptör aracılı/Dış) yolaktır.

2.13. İntirinsik (Mitokondriyal aracılı/iç) yolak,

Hücre içi sinyaller, DNA hasarı, hipoksi sonucu oluşan gen hasarları, endoplazmik retikulum (ER) stresi, sitozoldeki Ca^{+2}'nin konsantrasyonundaki artış, toksinler, büyüme faktörlerinin ve hormonların yokluğu, viral enfeksiyonlar ve mitokondriyal hasarlar intirinsik apoptoz yolağını aktifleştiren etmenlerdir. Ayrıca

dış yolak üzerinden aktifleşen ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC: Death Inducing Complex) aracılığıyla iç yolakta aktifleşmektedir. Buradan da anlaşıldığı üzere iç ve dış yolaklar birbirlerini tetikleyebilmektedir. (Şekil 2.9) (Gerschenson vd., 1992; Dağdeviren vd., 2021; Wong VD., 2011).

Mitokondriyal aracılı olan bu yolağın ana düzenleyicileri Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) protein ailesidir. Bcl-2 ailesi hem pro-apoptotik (Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) hem de anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) etki gösterirler. Bu pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki denge hücrenin apoptoz kararında etkilidirler. Bcl-2 proteinleri Sitokrom C salınımı üzerine etki ederek apoptotik düzenlemede görev alırlar (Gerschenson vd., 1992; Dağdeviren vd., 2021; Wong VD., 2011).

Bax ve Bad'lar mitokondri membranında bulunan pro-apoptotik etki gösteren proteinlerdir. Sağlıklı hücrelerde monomer haliyle serbest halde bulunur ancak ölüm sinyali durumunda pro-apoptotik etki göstermek üzere mitkondri dış membranına yerleşirler. Mitokondri dış membranda yer alan Bak'lar oligomerize olarak mitokondri membranının iyon geçirgenliği bozar ve birçok apoptotik moleküllerin dışarı salınmasını sağlar (Cory vd., 2002). Mitokondriden salınan proteinler başlıca; sitokrom C, İkincil mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü (Smac) bağlanma proteini (DIABLO), apoptoz indükleyici protein (IAP), doğrudan apoptoz inhibitör faktör (AIF), OMI/yüksek sıcaklık proteini A'dır (HtrA2) (Norberg vd., 2010; Gerschenson vd., 1992).

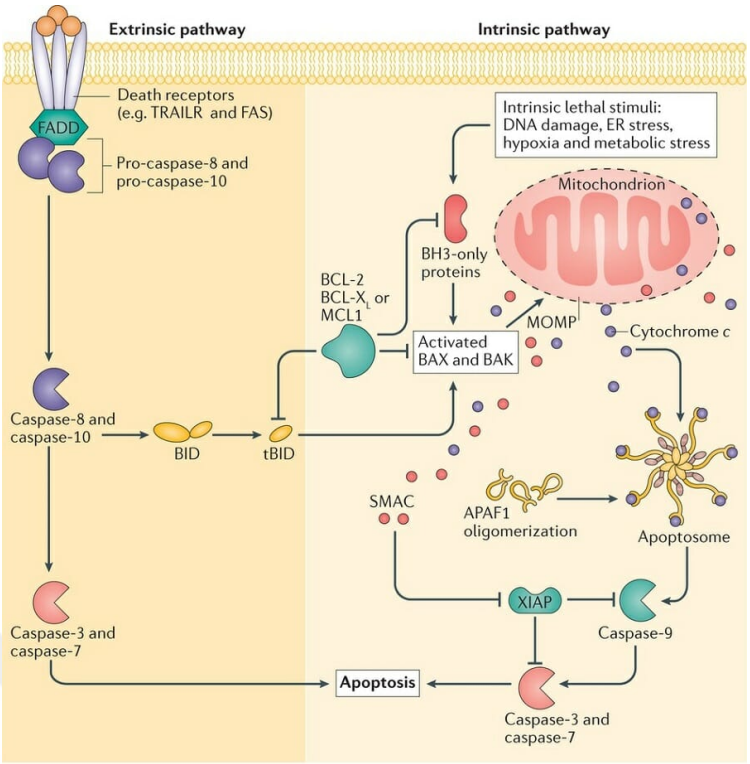
Mitokondriyal membranından sitozole salınan sitokrom C sitozolik bir protein olan APAF-1'le (apoptosis protease-activator factor 1) ve kaspaz 9 birleşerek "apoptozom" kompleksini meydana getirirler. Apoptozom kompleksi efektör (sonlandırıcı) kaspazdardan prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3'e dönüştürür (Dağdeviren vd., 2021; Campello vd., 2009).

Mitokondriden dışarıya salınan Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2 protein kompleksleri apoptoz protein inhibitörlerine (IAP) bağlanarak kaspaz 3/9 kaskatını aktifleştirirler (Gerschenson vd., 1992). Mitokondriden salgılanan apoptoz indükleyici faktör (AIF) direkt olarak çekirdeğe transloke olur ve Endonükleaz-G (ENDO-G) aracılığıyla DNA'yı parçalayarak apoptozu aktifleştirir (Dağdeviren vd., 2021).

2.14. Ekstrinsik (Reseptör aracılı/Dış) Yolak

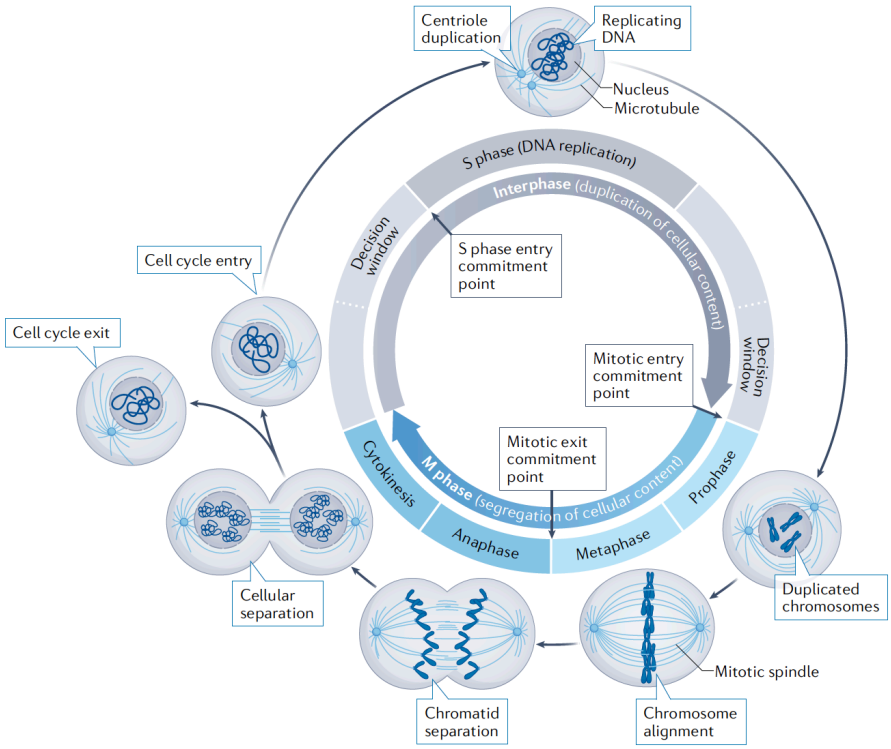
Ekstirinsik yolak, hücre membranında bulunan ”death reseptör” (DR) adı verilen ölüm reseptörleri aracılığıyla oluşmasından dolayı ölüm reseptörü yolu olarak da adlandırılmaktadır. Hücre zarı integral proteini olan ölüm reseptörlerine spesifik ölüm ligandlarının bağlanmasıyla aktive olurlar. Ölüm reseptör ailesi Tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR) süper ailesinden oluşmaktadır. FAS (Apo1 veya CD95) ve TNFR1 (p55 veya CD120a) en iyi bilinen üyelerdendir. DR 3 (Apo3, WSL-1, TRAMP veya LARD), DR 4, DR 5 (Apo2, TRAIL-R2, TRICK2 veya KILLER), DR 6 ise TNFR ailesinin diğer üyelerini oluşturmaktadır (Ashe vd., 2003; Guıccıardı vd., 2009; Choo vd., 2019) FAS ligandı (FasL) Fas reseptörlerine; TNF ve lenfotoksin α TNFR-1lere; Apo3 ligandı DR3’e; TRAIL’ler DR4 ve DR5 reseptörlerine bağlanırlar (Ashe vd., 2003; Guıccıardı vd., 2009).

Dış yolakta etkili tüm transmembran reseptörler spesifik ölüm bölgesine (Death Domain: DD) sahiptirler ve ligand ile bağlandığında bu domainler aktifleşmektedir (Elmoore vd., 2007). Ölüm domainine sahip olan FasL (FADD: FAS Adaptör Protein with Death Domain) ve TNF (TRADD: TNFR Adaptör Protein with Death Domain) olarak adlandırılmaktadır. Gelen ölüm sinyalleri ile trimerik bir yapı kazanarak aktive olan FADD’lar ölüm domainlerinin etkileşimi ile prokaspaz 8’lere bağlanırlar. Bu bağlanma ile ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC: Death Inducing Complex) meydana gelir. DISC kaspaz 8/10 ve kaspaz 3/7 kompleksini aktifleştirerek hücre ölümüne neden olurlar (Elmoore vd., 2007; Kasibhatla vd., 2003). Bu durum sonucunda apoptoz direkt (tip 1) veya dolaylı (tip 2) olarak gerçekleşebilmektedir. Dış ölüm sinyalleri aracılığı ile başlayan bu apoptotik mekanizma intirinsik yolak proteini olan BİD proteininin tBİD’e dönüştürülmesiyle devam edebilmektedir (Şekil 2.9.) (Elmoore vd., 2007; Dağdeviren vd., 2021).



Şekil 2. 9. Apoptozda intirinsik ve ekstirinsik yolaklarının şematik gösterimi (BD Editors 2017)

2.15. Hücre Döngüsü



Şekil 2. 10. Hücre döngüsünün şematik gösterimi (Matthews vd., 2022)

Hücre döngüsü en basit anlamıyla hücrelerin iki mitozu arasındaki aralık olarak adlandırılmaktadır. Hücre siklusu iki ana aşamada incelenmektedir. Bunlardan birincisi hücrenin mitoza hazırlandığı interfaz safhasıdır. İnterfaz safhası da kendi içinde G1, S ve G2 olmak üzere üç bölüme ayrılmaktadır. İkinci safha ise DNA'nın kendisini replike ettiği mitoz (M fazı olarak da adlandırılmaktadır) safhasıdır. Birçok biyolojik süreçte ve özellikle kanser oluşumunda hücre döngüsünün kontrolü hayati önem taşımaktadır. Kanser hücrelerinde hücre döngüsünün durmasını sağlayan sinyallere karşı duyarsızlık oluşmaktadır Hücre döngüsü regülasyonunda görev alan sistemlerin kanser ile yakından ilişkilerinden dolayı kanser için hücre döngüsündeki düzensizlik hastalığı olarak da tanımlanabilmektedir. Bu nedenle hücre döngüsü hedefli kanser terapilerine önem verilmektedir (Golias vd., 2004; Senderowicz vd., 2000; Sherr vd., 2000).

Hücre döngüsünün farklı evrelerindeki kontrol sistemlerinde bulunan siklin bağımlı kinazlar (CDK) siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) sayesinde hücre döngüsü işler. Hücre döngüsünün devam edebilmesi için gereken kritik hedef

proteinler siklinler tarafından fosforile edilir. Siklinler CDK'lardan farklı olarak her zaman sentez edilmezler ve inaktif formdaki CDK'ları fosforile ederek aktifleştirirerek fonksiyonlarını gösterirler. Fosforilasyonizasyonla fonksiyonlarını yerine getirdikten sonra sonra siklin düzeyleri hızlı bir şekilde azalmaktadır. Hücre siklusunun her bir aşamasında CDK ve CKI aktivasyonu/inaktivasyonu sıkı bir şekilde denetlenmektedir (Şekil 2.10) (Golias vd., 2004; Senderowicz vd., 2000; Sherr vd., 2000; Morgan vd., 1997).

2.15.1. G1/S

Mitojenik uyarı geldiğinde yeni bir hücre döngüsünün başlamasının sorumlusu G1 fazıdır. Bu faz DNA sentezi için hazırlık safhasının yapıldığı kısımdır. G1 fazında RNA ve proteinler çok hızlı bir şekilde sentez edilmektedir. G1 fazının kontrolünden sorumlu olan ve hücre döngüsü boyunca ilk sentezlenen siklin, Siklin D'dir. G1 fazında entezlenmeye başlar ve S fazında inhibe olurlar. Stabilitesi diğer siklinler kadar yüksek değildir ve ubiquitin-proteazom yolağı üzerinden yıkılırlar. D1, D2 ve D3 olmak üzere üç farklı formu bulunmaktadır. G1 fazının başında CDK4 ve CDK6 ile etkileşime geçen siklin D'ler aktif forma dönüşür ve p107 ve p130 proteinlerini (pRB) fosforlayarak hücre döngüsünün devam etmesini sağlarlar. G1 fazının sonunda meydana gelen siklin E/Cdk2 kompleksleri hücrenin mitojenik uyarının etkilemediği G1/S kontrol noktasına ilerlemesini sağlar. Siklinlerin fosforilizasyon etkileri CKI'ler tarafından inhibe edilmektedir. G1/S fazına ilerlemenin önkoşulu CKI'lerin baskılanmasıdır. Ayrıca bu fazın devam edebilmesi için birçok onkogen gen ve sinyal yolaklarınında bu aşamada görev aldığını görmekteyiz. Önreğin, ERK (ekstrasellüler sinyalleri regüle eden kinazlar) aktivasyonu CDK'ların aktivitesini artırmada önemli rol oynamaktadır. ERK'ler birçok geni baskılayarak G1 fazının ilerlemesini sağlarlar. ERK, G2/M fazında aktive olur ve Metafaz aşamasında tutulan hücrelerde genellikle fosforillenmiş bir şekilde karşımıza çıkmaktadırlar. Ayrıca MEK inhibitörlerinin (MAPK kinaz) ERK oluşumunu engelleyerek mitoza girişi engellediği belirtilmiştir. G2/M geçişinde ERK inhibe edilir ve M fazı iki kat arttığı bulunmuştur. Aynı şekilde p53 aktivasyonunun p21'ler üzerinden G1 kontrol noktasındaki Rb (büyüme inhibitör faktör) proteinlerin fosforlanmasını engelleyerek siklusu durdurmaktadır (Chiarugi vd., 1994; Sherr., 1996; Williams ve Stober., 2012; Hartwell ve Kastan., 1994; Chambard vd., 2007; Roberts vd., 2002).

2.15.2. G2/M

DNA sentezi bittikten sonra G2 fazı başlamaktadır. Bu aşamada Siklin B ve CDK kompleks oluşturur ve hızla artarlar böylece mitoza geçiş uyarılır. Siklin B-CDK kompleksinin bir diğer ismi MPF'dir (mitoz ilerleten faktör). Geç S fazında sentezlenen bu kompleks mitoz tamamlanana kadar yüksek seviyelerde kalır ancak mitozu durdurmak için Siklin B seviyesinde hızla bir düşüş gerçekleşir. Bu düşüş sayesinde MPF inhibe olur. MPF'ler Siklin B'lerin CDK'lar tarafından fosforillenmesi ile oluşmaktadırlar ancak ikinci kez başka moleküller (örneğin Wee) tarafından fosforillenmesi inaktive olmalarını sağlamaktadır. Fosforillenerek inaktive olan MPF'ler hücre döngüsünün ilerlemesini engeller ve böylece mitoz durdurulmuş olur. Aynı şekilde Myt 1'de CDK'ları fosforilleyerek Siklin B'ler ile kompleks oluşturmasını engelleyerek hücre döngüsünü durdururlar. S fazında replike olan DNA G2 fazında kondense olarak kardeş kromatidler olarak paketlenirler. Mitoz aşamasına geçişte kardeş kromatidler ekvatora dizilir ve iki ayrı kutuplara çekilirler ve iki hücreye bölünürler. Bu aşamada sentromerlerin mikrotübüllere bağlanması Siklin B- CDK kompleksi tarafından yönetilmektedir. Bu nedenle G2/M fazınından anahtar molekülü MPF'lerdir (Cheng vd., 1998; Heald vd., 1993; Marumoto vd., 2002; Foster vd., 2008; Kearns vd., 2001; Molinari, 2000; Pines ve Hunter., 1991).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Grupları

Bu tez çalışmasında MDR1 siRNA yüklü ve Hyaluronik asit kaplı eksozomlar ile KHDAK kökenli Gemcitabin dirençli KKH'lerde P-glikoprotein ekspresyonların sessizleştirilmesi ve dirençlerinin kırılması planlanmaktadır. Bu amaçla;

3 deney gruplarından oluşan 4 farklı hücre grubu kullanılacaktır. Bu gruplar:

1. Grup: İnsan akciğer kanseri hücreleri (A549)

2. Grup: İnsan akciğer kanseri (A549) kökenli Akciğer Kanser Kök Hücresi: CD133+CD326+CD44+Akciğer kanser kök hücreleri (iAKKH, hl-CSC; Cancer stem cell)

3. Grup: Dirençli insan Akciğer Kanser Kök Hücresi: Dirençli insan Akciğer kanser Hücrelerinden izole edilen CD133+CD326+ CD44+ Akciğer kanser kök hücreleri (dAKKH, RT-CSC, Human Lung Resistant Cancer stem cell)

3.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler ve Temini

3.1.1. İnsan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi (A549)

Bu tez çalışmasında kullanılan A549 hücre hattı (insan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi) American Type Culture Collection (ATCC) firmasından CCL-185™ ticari kodu ile satın alınmış ve çoğaltılarak stoklarımızda saklanmıştır. A549 hücre hattı insan 58 yaşında bir erkekten alınmış insan alveolar bazal epitelyal hücreleridir. Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir. A549 hücre hattı tüm çalışmalar boyunca iki boyutlu olarak kültür kaplarında çoğaltılmıştır.

3.1.2. CD44+CD326+CD133+akciğer kanser kök hücreleri

Bu tez çalışmasında kullanılan CD44+CD326+CD133+ Akciğer Kanser Kök Hücreleri A549 hücre hattından S-pluriBead® Maxi Reagent) Kit (PluriSelect, Leipzig, Almanya) kullanılarak immun seleksiyon yöntemi ile izole edilerek elde edilmiştir. İzole edilen hücreler istenilen yoğunluğa gelene kadar kültür kaplarında iki boyutlu olarak kültüre edildikten sonra, karakterizasyon analizleri yapıldı ve üç boyutlu olarak kültüre edildiler.

3.1.3. İnsan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücreler (iSS-MKH'ler)

Bu tez çalışmasında kullanılan insan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücreler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın 22 Ekim 2018 tarih ve 15 Karar sayılı etik onayı kapsamında sağlıklı gönüllü onam formu alınarak ve "Dejeneratif Menisküs Hasarlı Hastalarda Otolog Sinoviyal Sıvı Mezenkimal Kök Hücre Kökenli Eksozom Uygulamasının Klinik Etkinliğinin Araştırılması" projesi kapsamında insan hücre hattı olarak üretilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan insan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücrelerin (iSS-MSC) izolasyonu, karakterizasyonu ve hücre hattı olarak üretimi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kök Hücre AD ve Hücresel Tedavi, Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi, ESTEM alt yapısında gerçekleştirilmiştir.

3.2. A549 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi

3.2.1. Hücrelerin çözdürülmesi, kültürü ve stoklanması

Çalışmalar da kullanılacak olan A549 hücre hatları, DMSO (Sigma, Almanya) oranı %10 olacak şekilde besi yeri içerisinde kriyoviyal (cryovial) içerisine konduktan sonra -150°C ultra derin dondurucuda (Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) ileride yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.

-150°C ultra derin dondurucu stoklarında bulunan A549 hücre hattı çözdürülerek 300xg'de 5 dakika süresince santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edilerek DMSO uzaklaştırılmıştır. Çalışmada kullanılacak olan A549 hücreleri deneyler için yeterli sayıya ulaşana dek kültüre edilmiştir. Bunun için %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 Primocin, %1 Stabil Glutamin (Stable Glutamine (L-Alanyl-L-Glutamine Solution), 200 mM, Capricorn) içeren RPMI-1640 (Capricorn, Almanya) besi yerinde, 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 bağıl nem içeren inkübatörde çoğaltılmıştır.

Hücreler kültür kabında %70'lik oranda bir yoğunluğa ulaştığı zaman (yaklaşık 2-3 gün) alt kültürlere pasajlandı. Bunun için kültür kabındaki eski besi yeri çekildi ve Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen DPBS (Sigma, Almanya) ile 2 kez yıkama yapılarak besi yeri tamamen uzaklaştırıldı. Daha sonrasında hücreler Tripsin-EDTA (Sigma, Almanya) ile muamele edilerek süspanse edildi ve enzimi nötralize etmek için kullanılan enzim miktarının en az iki katı olacak şekilde besi yeri eklendi. Süspanse

hücreler santrifüj edilmek üzere konik dipli santifüj tüplerine alınarak 300xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti taze besi yeri ile süspanse edilerek her pasaj, stoklama ve deney işlemi öncesi hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımında ölü ve canlı hücre ayrımı yapabilmek için Tripan mavisi (Thermo, Gibco, Amerika) kullanıldı. Tripan mavisi hücre süspansiyonu ile 1:1 oranında karıştırılarak Thoma lamında ışık mikroskobu altında sayım gerçekleştirildi. Yapılan sayımda hücre sayısı için elde edilen sonuç aşağıda yer alan formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Toplam hücre sayısı = 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10.000 x dilüsyon faktörü

A549 hücreleri $5x10^5$ hücre/flask T75 flasklara (Cell Nest, Çin) ekilerek kültürlerine devam edildi. Pasajlandıktan veya deneylerde kullanıldıktan sonra hücrelerin kalan kısımları dondurularak stoklarımızda saklanmak üzere 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücre pelleti üzerine dondurma besi yeri (%60 RPMI, %35 FBS ve %5 DMSO) eklenerek süspanse hale getirilerek hücreler kriyoviallere aktarıldı. -150°C derin dondurucuda saklandı.

3.3. Gemsitabin Dirençli A549 (d-A549) Akciğer Hatlarının Oluşturulması

3.3.1. Gemsitabinin hazırlanması

Toz halinde Tokyo Chemical Industry (TCI, Japonya)'dan satın alınan Gemsitabin Hidroklorür maddesinden 2.39 mg tartılarak 2500 µL RPMI-1640 besiyeri içersinde çözüldü ve ana stok oluşturuldu. Bu ana stoktan çalışmalarda kullanılmak üzere 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Her çalışmada ana stoklar yeniden hazırlanarak taze olarak kullanılmıştır.

3.3.2. A549 hücrelerine Gemsitabin direnci kazandırmak gerekli gemsitabin dozunun Koloni oluşturma potansiyeli (CFU) analizi ile belirlenmesi

A549 hücrelerine Gemsitabin direnci kazandırılmadan önce CFU analizi gerçekleştirilerek A549 hücrelerinin maksimum dayanabildikleri Gemsitabin konsantrasyonu belirlendi. A549 hücrelerinin koloni oluşturma analizi için hücreler,

$2x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarına 2 mL besi yeri içerisinde ekim yapılmıştır. Hücreler %70 konfluensiye ulaştıklarında eski besi yeri uzaklaştırılarak 2 mL besi yeri içerişinde 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μM konsantrasyonlarında Gemcitabin hydroclorür eklendi ve 72 saat süresince inkübatörde (Panasonic MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol kuyucuğuna ilaç içermeyen besi yeri eklenmiştir. 72 saat sonunda besi yerleri çekilerek yerine taze besi yeri eklenerek 2-3 günde bir taze besi yeri ile değiştirilerek koloni oluşumları mikroskop altında gözlenmiştir. Bu işlemler 12-15 gün süresince devam ettirilmiştir. Süre sonunda eski besi yerleri çekilmiş ve ikişer kez PBS ile yıkanarak eski besi yeri uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 1 mL soğuk methanol eklenerek 20 dakika süresince kabin içerisinde hücre fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası methanolü uzaklaştırmak için her bir kuyucuk yeniden PBS ile yıkanmıştır. Fikse olan kolonilerin gözlenebilmesi için her bir kuyucuğa 1 mL kristal menekşesi (Merck, Almanya) boyası eklenmiş ve 15 dakika boyunca beklenmiştir. Süre sonunda kuyucuklar çeşme suyu ile yıkanarak fazla boyadan arındırılmıştır. Görünür hale gelen koloniler iki bağımsız kişi tarafından sayılmıştır. Hücrelerin maksimum dayanabildiği konsantrasyon belirlenerek analizlere devam edilmiştir. (Mohr vd., 2017)

3.3.3. A549 hücrelerine Gemcitabin direnci oluşturma

Gemcitabin hidroklorüre karşı A549 hücrelerinin direnç kazandırma analizleri için hücreler $2x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara 2 mL besi yeri içerisinde ekilerek %70 konfluensi olana kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında eski besi yerleri uzaklaştırıldı ve 12.5 μM konsantrasyonunda Gemcitabin ile içeren 2 mL taze besi yerleri eklenerek 72 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında taze besi yeri eklenerek koloni oluşumları her gün mikroskop altında gözlendi ve gerektiğinde besi yeri değişimleri gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 20-30 gün sonunda %70 konfluensiye ulaşan hücreler pasajlanarak T25 flasklara alınmıştır.

Yeterli konfluensiye ulaşan hücreler bir yüksek konsantrasyona maruz bırakılarak Gemcitabin direnci artırılmıştır. Direnç konsantrasyonunu artırmak için yukarıda anlatılan işlemler gerçekleştirilerek her bir deneyde Gemcitabin önceki uygulanan dozun 2 katı olacak şekilde uygulanarak her seferinde artırılarak koloni oluşumları gözlendi. Direnç kazandırma işlemleri sırasında hücre morfolojilerindeki

değişimler mikroskop altında günlük olarak gözlenmiştir. Yaklaşık olarak 15 ay sonunda Gemcitabin dirençli A549 hücre hattı oluşturuldu (Mohr vd., 2017).

3.3.4. Gemsitabin direnci geliştirilen dA549 hücrelerinde CFU analizi

A549 hücrelerine 15 ay süresince Gemsitabin muamelesi sonucunda oluşturulan 1600 µM dirençli hücre gruplarında ikinci kez CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile dirençli ancak belirgin ve sağlıklı koloni morfolojisini göstermek için gerçekleştirildi. 15 ayın sonunda Gemsitabin direnci geliştirilen A549 hücreleri için CFU analizi gerçekleştirilmiştir. Dirençli hücreler $2x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarına 2 mL besi yeri içerisinde ekim yapılmıştır. Hücreler %70 konfluensiye ulaştıklarında eski besi yeri uzaklaştırılarak 2 mL besi yeri içerişinde 1600, 800, 400, 200, 100, 50 µM konsantrasyonlarında Gemcitabin hydroclorür eklendi ve 72 saat süresince inkübatörde (Panasonic MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat sonunda besi yerleri çekilerek yerine taze besi yeri eklenerek 2-3 günde bir taze besi yeri ile değiştirilerek koloni oluşumları mikroskop altında gözlenmiştir. Bu işlemler 12-15 gün süresince devam ettirilmiştir. Süre sonunda eski besi yerleri çekilmiş ve ikişer kez PBS ile yıkanarak eski besi yeri uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 1 mL soğuk methanol eklenerek 20 dakika süresince kabin içerisinde hücre fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası metanolü uzaklaştırmak için her bir kuyucuk yeniden PBS ile yıkanmıştır. Fikse olan kolonilerin gözlenebilmesi için her bir kuyucuğa 1 mL kristal menekşesi (Merck, Almanya) boyası eklenmiş ve 15 dakika boyunca beklenmiştir. Süre sonunda kuyucuklar çeşme suyu ile yıkanarak fazla boyadan arındırılmıştır. Görünür hale gelen koloniler iki bağımsız kişi tarafından sayılmıştır. Hücrelerin maksimum dayanabildiği konsantrasyon belirlenerek analizlere devam edilmiştir. (Mohr vd., 2017)

3.3.5. Dirençli A549 Akciğer kanser hücrelerinin saflaştırılması için single cell analizi

A549 hücrelerine direnç kazandırıldıktan sonra yaptığımız kültürler sırasındaki morfolojik analizlerle heterojen bir hücre hattı elde etmek için single cell analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 1-10 adet hücre gelecek şekilde ekildikten sonra hücreler kültüre edilmiştir. Günlük olarak

morfoloji takipleri gerçekleştirilerek koloni oluşan kuyular işaretlenmiştir. En az 50 hücreden oluşan yeterli sayıda koloni meydana geldiğinde hücreler tripsinizasyon işlemi ile pasajlanarak deneyler için yeterli sayıya ulaşana dek kültüre edilmiştir. Saflaştırılmış d-A549'ler bir sonraki aşamada immunoselektif yöntemle dirençli $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ (dKKH) hücre izolasyonuna alınmıştır.

3.4. Dirençli ve Dirençsiz A549 Hücrelerinden CD326+CD133+CD44+ Akciğer Kanser Kök Hücrelerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tümörsferik Kültürü

Dirençli ve dirençsiz A549 hücrelerinden CD326+ CD133+ ve CD44+ akciğer kanser kök hücrelerin izolasyonu, manuel yöntem ile immunselektif olarak ve kitte kullanılan kitlerin boyutları kullanılarak filtrasyon-kolon yöntemi ile üç aşamada gerçekleştirildi. Her aşamada verimlilik için canlılık ve saflılık analizleri gerçekleştirilerek tamamlandı.

3.4.1. Kanser kök hücrelerin immunselektif olarak izolasyonu

Dirençli ve dirençsiz A549 hücrelerinden $CD326^+$ $CD133^+$ ve $CD44^+$ akciğer kanser kök hücrelerin izolasyonu, manuel yöntem ile immunselektif olarak ve kitte kullanılan kitlerin boyutları kullanılarak filtrasyon-kolon yöntemi ile üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İzolasyonun her aşamasında verimlilik için canlılık ve saflılık analizleri gerçekleştirilerek tamamlanmıştır. A549 hücre hattından ve dirençli A549 hücre hattından $CD326^+CD133^+$ ve $CD44^+$ Kanser kök hücrelerin (KKH; CSC) izolasyonu için S-pluriBead® Maxi Reagent Kit kullanıldı. Öncelikle $CD\ 326^+$ hücre seçilimi gerçekleştirildi. Bu amaçla; immunoseleksiyon işlemi üretici firmanın kit prosedüründe önerdiği şekilde uygulandı. $10x10^6$ hücre boncuklu antikor (universal M-pluriBead®; pluriSelect, Almanya) ile karıştırılmıştır. Hücre antikor süspansiyonu, 15 rpm ayarlı rotatorda (pluriPlix; pluriSelect, Almanya) 30 dakika boyunca karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edilerek hücre ve antikorlu boncukların bağlanması sağlanmıştır. Kit içeriğinde yer alan Buffer B ile Wash Buffer (WB) birleştirilerek hücre+antikor süspansiyonunun üzerine eklenmiştir. Kit içeriğinde yer alan mor filtre 1 mL WB ile ıslatılmış ve temiz bir 50 mL'lik santrifüj tüpünün üzerine konulmuştur. Yaklaşık 45 mL WB ile hücreler çok dikkatli bir şekilde filtrenin yırtılmamasına özen göstererek yıkandı ve antikor bağlanmamış negatif hücrelerin aşağı düşmesi sağlanmıştır. Santrifüj tüpündeki hücreler 300xg'de

5 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirilerek hücre sayımları yapıldı ve besi yeri içerisinde hücre kültür kaplarına ekimi yapılarak inkübatöre kaldırılmıştır.

Pozitif hücre seleksiyonu için kit içeriğinde yer alan kırmızı menteşeli kilit sistemi yeni bir 50 mL'lik santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Üzerine mor filtre yerleştirilerek vida kısmı çevrilerek kilitlenmesi sağlanmıştır. Bu aşamada sızıntının olup olmadığı 100 µL WB eklenerek kontrol edildi. Kit içeriğinde yer alan boncuk ve hücreleri birbirinden ayrılmasını sağlayan Buffer D ve Buffer C birleştirilmiştir. Hücrelerin üzerine eklenerek 10 dakika boyunca her 2 dakikada bir 30 saniye boyunca aynı yöne durmaksızın çevirerek hücre ve boncukların ayrılması sağlanmıştır. 10 dakika sonunda kırmızı kilit sistemi üzerinde yer alan vida çevrilerek kilit sistemi açılmış ve 15 mL WB (yıkama tamponu) ya da besi yeri ile hücreler yavaş yavaş yıkanarak boncuklardan ayrılan pozitif hücrelerin filtreden aşağı geçmesi sağlanmıştır. Bu aşamada hücreler 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve hücre pelleti sayılarak hücre ekimi gerçekleştirilmiştir (Mohamed vd., 2022).

Verimlilik ve karakterizasyon analizi tamamlanan $CD326^+$ hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında $CD133^+$ seleksiyonu yukarıda anlatılan prosedür bire bir uygulanarak gerçekleştirilmiş ve $CD326^+$ $CD133^+$ pozitif hücreler elde edilmiştir. Verimlilik ve karakterizasyon analizi tamamlandıktan sonra bir sonraki hücre izolasyonu adımına geçilmiştir.

$CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerden $CD44^+$ izolasyonu yukarıda anlatılan prosedür bire bir uygulanarak gerçekleştirilmiş ve $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ (CSC) hücreleri elde edilmiştir. Elde edilen triple pozitif hücreler için verimlilik ve karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlemler hem direnç kazandırılmamış hem de direnç kazandırılmış A549 hücrelerine uygulanmıştır. Finalde düşük Gemcitabin direncine sahip $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ (KKH) hücreleri ve yüksek Gemcitabin direncine sahip $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ (dKKH) hücreleri elde edilmiştir.

3.4.2. CD326+ CD133+ ve CD44+ akciğer kanser kök hücrelerin izolasyon verimliliğinin immunofenotipik olarak karakterizasyonu

İzolasyon verimliliği izole edilen hücrelerin canlılık ve saflılık yüzdeleri belirlenerek canlılık %15 ve üzeri belirteçler için %35 ve üzeri verimli bulunarak deneylere devam edildi. $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$(KKH) ve Dirençli $CD326^+$ $CD133^+$

$CD44^+$ (dKKH) hücrelerinin saflığı; her bir izolasyon sonrasında izolasyonu gerçekleştirilen antikor ile işaretlenerek flow sitometri cihazı ile izolasyon verimliliği ölçülmüş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Triple pozitif izolasyonlarından sonra hücre karakterizasyonları MDR1, ABCG2, CD90, CD326, CD133 ve CD44 belirteçleri flow sitometri (akan hücre ölçer; NovoCyte, Agilent, Palo Alto, CA, USA) ile, MDR1, ABCG2, CD90 ve CD44 belirteçleri immunofloresan işaretleme yöntemi ile ve büyüme eğri analizi ile karakterize edilmiştir.

3.4.2.1. CD326+ CD133+ ve CD44+kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

Her bir pozitif hücre seleksiyonundan sonra hücreler birkaç pasaj kültür edilmiş ve daha sonrasında seleksiyonu yapılan antikor ile flow sitometri ile karakterizasyonları yapılmıştır. Flow sitometri ile karakterize edilip seleksiyonun başarılı olmasını sağlayan pozitiflik elde edildiğinde diğer seçilime geçilmiştir. Bu amaçla hücreler Tripsin-EDTA ile kültür kabından kaldırılarak besi yeri uzaklaşana dek 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek PBS ile yıkanmıştır. Hücre pelleti üzerine 100 µL bağlanma solüsyonu (%2 FBS içeren DPBS) eklenerek ilgili antikordan 1 µL eklenmiştir. Antikorlar, insan hücre yüzey antijenlerine özel PerCp/Cyanine 5.5-, fikoeritrin-siyanin 7 (PE/Cyanine 7)-, fluoresan izotiyosiyonat (FITC)-, fikoeritrin (PE)- veya APC- konjuge konjuge monoklonal antikorlar (CD326, CD133, CD44, ABCG2, CD90) (Biolegend, San Diego, USA) olarak seçişmiştir. 30 dakika boyunca +4°C'de inkübe edildikten sonra izotip antikorularından 2 µL eklenerek izotip kontrolüne göre analiz edilmiştir. Hücreler hücre yıkama çözeltisi ile resüspanse edildikten sonra flow sitometri cihazında (NovoCyte, Agilent, Palo Alto, CA, USA) okutulmuş ve analizi gerçekleştirilmiştir (Greeve vd., 2012).

3.4.2.2. CD326+ CD133+ ve CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin immunfloresan işaretleme ile immunositokimyasal karakterizasyonu

Dirençli ve dirençsiz $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ hücreleri (KKH ve dKKH)'ler kültür ortamında yeterli sayıya ulaştıklarında CD44, ABCG2, CD90 ve ALDH1 monoklonal antikorları kullanılarak immunoflerasan işaretleme ile karakterize edilmişlerdir. Bu amaçla, KKH ve dKKH'ler 8 kuyucuklu cam lamlar (MARKA) üzerine $5x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 37 °C, %5 CO_2 ve nemli

ortamda kültüre edilmiştir. Bir günlük kültür sonunda hücreler 20 dk. %10 soğuk methanol (Sigma, Almanya) ile fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak hücreler boyama işlemlerine hazır hale getirilmiştir. Triton-X ile hücreler 15 dk. boyunca muamele edilerek geçirgen hale getirilmiş ve PBS ile yıkanmıştır. Antikor boyaması için fikse edilen hücreler non-spesifik bağlanmaları engellemek için 30 dk. boyunca uygun blok solüsyonlar ile oda ısısında muamele edilmiştir. Daha sonrasında CD44, ABCG2, CD90 ve ALDH1 monoklonal antikorlarıyla 4°C'de gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün lam üzerindeki primer antikorlar oda ısısındaki PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Primer antikorlara uygun olarak seçilen insan özgü CD44-FITC (yeşil), ABCG2- alexa flour 488 anti Mouse (yeşil), CD90- alexa flour 488 anti Mouse (yeşil) ve ALDH1- alexa flour 594 anti (kırmızı) (Molecular probes, Amerika) sekonder antikorlar ile 1 saat boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda lam üzerine çekirdek belirteci olan DAPİ Immunofloresan boyası (Mavi) içeren kapatma besi yeri (Thermo, Almanya) damlatılarak lamel ile kapatılmıştır. İmmunofloresan boyamaları gerçekleştirilen KKH ve dKKH'lerin görüntüleri Floresan mikroskop (ZEISS Axio Observer D1, Almanya) altında görüntülenmiştir (Li vd., 2017).

3.4.2.3. CD326+CD133+ ve CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin büyüme eğrisi

A549, KKH ve dKKH hücrelerinin karakterizasyonu için büyüme eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücreler birinci gün 50.000 adet olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve her gün Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılarak sayılmıştır. Her bir sayım not edilerek, hücreler yeniden 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Bu işlem 10 gün süresince devam ettirilerek her bir hücre için büyüme eğri grafiği oluşturulmuştur.

3.4.2.4. A549, Dirençli ve Dirençsiz CD326+ CD133+CD44+ hücrelerinde sitotoksisite analizi

A549, KKH ve dKKH hücreleri için Gemsitabine karşı IC50 değeri belirlenmesi amacı ile MTT yöntemi ile sitotoksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücreler $5x10^3$ adet /kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat boyunca adhere olmaları için beklenmiştir. 24 saatin sonunda Gemsitabin'in 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μM dozları uygulanarak besi yeri içerisinde uygulanarak 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C sıcaklıkta, %5 O2 ve %5

CO2 içeren atmosfer içeren inkübatörde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon zamanının sonunda plakalara PBS içerisinde hazırlanan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solüsyonundan eklenerek 3-4 saat inkübatörde beklenmiştir. Süre sonunda formazan kristallerinin çözülebilmesi için DMSO eklenerek karanlıkta orbital çalkalayıcı da 15 dk. Boyunca döndürülür. Mikroplaka okuyucu (Biotek, Amerika) 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okuması sağlanmıştır (Altıntop vd., 2022).

3.4.3. CD326+ CD133+ ve CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin üç boyutlu kültürü ve çoğaltılması

Tüm karakterizasyon testleri tamamlanan KKH ve dKKH'ler yeterli sayıya ulaştıktan sonra üç boyutlu olarak kültüre edilmişlerdir. Bu amaçla üç farklı yöntem denenmiştir. Bu yöntemler kısaca hücre kültür kaplarının yüzeylerinin hücre yapışmasını önleyen bazı polimerik maddeler ile kaplanması metoduna ve asılı damla tekniğine dayanmaktadır. Bu amaçla öncelikle otoklavlanarak steril edilmiş %1.5'luk agaroz ile 96 kuyucuklu plakaların yüzeyini kaplayacak kadar miktarda (50 µL) eklenerek 20 dakika boyunca steril güvenlik kabini (Laminar air flow-class II, Telstar Biovanguard, Tokyo, Japonya) içerisinde agaroz jelin donması beklenmiştir. Donan agaroz jelin üzerine sırasıyla, $2x10^4$ ve $5x10^4$ hücre/kuyu olmak üzere hücre ekimi gerçekleştirilerek tümörsfer besi yeri eklenmiştir (Li vd., 2011).

Bir diğer yöntemde asılı damla tekniği baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem kullanılırken cam petriler PDMS (Polidimetilsiloksan) polimeri ile kaplanmıştır. 60 mm cam petriler (Cell Nest, Almanya) PDMS kiti (Sylgard 184, Dow Corning, Amerika) kullanılarak Polidimetilsiloksan ile kaplanmıştır. PDMS kiti silikon baz (ön polimer) ve kürleme maddesi (çapraz bağlayıcı) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Silikon baz ve kürleme maddesi 10:1 oranında karıştırılarak cam petri kabına dökülmüştür. Oluşan hava kabarcıklarının giderilmesi için pompalı-vakumlu desikatörde (ISOLAB Rocker 300, Almanya) 20 dakika boyunca bekletilmiştir. PDMS'in sertleşmesi (kürlenmesi) için PDMS bazik elastomer karışımı olan petri kabı 50°C'de 24 saat ısıtıcıda bırakılımıştır. Hazırlanan PDMS kaplı cam petri %70 etanol ve 20 dk. güvenlik kabini içerisinde UV'ye maruz bırakılarak steril edilmiştir. Steril edilen PDMS kaplı petriler asılı damla tekniğinden yararlanılarak 5000 hücre/damla hücreler damla damla olacak şekilde ekildikten sonra petri damlaların bozulmasına izin vermeden hızlıca ters çevrilmiş ve

buharlaşmayı engellemek için cam petri içine steril su içeren minik bir kap yerleştirilerek inkübatöre yerleştirilmiştir (Kuo vd., 2017; Del Duca vd., 2004).

Sonuncu olarak Poly-D-HEMA (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Sigma, Almanya) polimeri ile kültür kapları kaplanarak sfer oluşumu sağlanmıştır. Bu amaçla 2.4 gram Poly-D-HEMA 20 mL %95 Ethanol içerisinde çözülmüştür. Bu 10x konsantrasyon olarak işaretlenmiştir. 55°C etüvde 6 saat süresince çözünmesi beklenmiş ve %95 ethanol kullanarak %1,2 olacak şekilde 1:10 dilüsyona ayarlanmıştır. Steril etmek amacı ile 0,22 filtreden geçirildikten sonra plaka ve flask kaplama işlemlerine geçilmiştir. Öncelikle kaplanacak olan kültür kapları önceden ısıtılmış 55°C etüvde bekletilerek ön bir ısıtmaya tâbi tutulmuştur. Kültür kabının yüzeyini kaplayacak kadar miktarda 1x Poly-D-HEMA solüsyonundan eklenerek 45-60°C etüvde 24 saat süresince bekletilerek yüzey kaplanması sağlanmıştır. 24 saat sonunda hücre kültür kabı 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Kaplama hem gözle hem mikroskop altında kontrol edilmiştir. Hücreler tümörsfer besi yeri içerisinde sfer oluşturmak üzere poly-D-HEMA kaplı kültür kaplarına ekimi yapılarak sfer oluşumları faz kontrast ışık mikrsokobu altında izlenmiştir (Ivascu vd., 2006; Garcia-Alegria vd., 2021).

Tumorsferik olarak kültüre edilen KKH ve dKKH'ler 3D tumorsfer besi yeri ile (3D Tumorsphere medium XF, Promocell, Almanya) 37°C sıcaklıkta, %5 O_2 ve %5 CO_2 içeren atmosfer içeren inkübatörde kültüre edilmeleri sağlanmıştır.

3.5. iSS-MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

İnsan sinoviyal sıvı Mezenkimal kök hücre (iSS-MKH) izolasyonları enzimatik ve ardışık santrifüjleme yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örnek miktarına bağlı olarak Hyase (Gibco, Amerika) eklenen örnekler 15 dakika 37°C sıcaklıkta su banyosunda inkübe edilmiş ve enzimatik reaksiyonu durdurmak amacıyla 1:1 oranında FBS içeren besiyeri eklenmiş ve daha sonrasında sırasıyla 500 g'de 10 dakika, 400 g'de 5 dakika santrifüj ederek %10 FBS, %0.2 primosin (Invivogen, Fransa), %1 (ml/ml) Glutamax (Sigma, Almanya) içeren DMEM F-12 (Capricorn, Almanya) besi yerinde 37°C sıcaklıkta, %5 O_2 ve %5 CO_2 içeren atmosfer içeren inkübatörde koloniler oluşuncaya kadar kültüre edilmişlerdir. Mikroskopta tutunmalar gözlendikten sonra eski besi yeri uzaklaştırılmış ve taze besi yeri eklenerek %70-80 konfluensiye gelene kadar 2-3 günde bir besiyeri

değiştirilmiştir. Yeterli konfluensiye ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemi (tripsin-EDTA ile 37°C'de 3-5 dk inkübasyon) ile hücreler tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Nötralizasyon ve santrifüj işlemlerinden sonra hücre pelleti yeniden kültüre edilmek üzere kültür kaplarına ekilerek inkübatöre kaldırılmıştır. Pasajlama işlemleri hücreler 3. Pasaja (pasaj 3, P3) ulaşana dek devam ettirilmiş ve P3'deki hücreler için immunofenotipik ve farklılaşma karakterizasyon analizleri yapılmıştır. iSS-MKH'lerden Eksozom eldeleri bu pasajdaki hücrelerden gerçekleştirilmiştir.

3.6. iSS-MKH'lerin Karakterizasyonu ve Kültürü

İzole edilen MKH'lerin Uluslararası Hücre ve Gen Terapisi Derneği'nin (ISCT) MKH kimliklendirmesinde belirttiği asgari standartlarına uygun olarak karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla plastik bir yüzeye yapışık olarak kültüre edilen hücreler P3'e geldiklerinde adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kök hücresel belirteçlerinin belirlenmesi açısında flow sitometri ile kök hücre spesifik antikorlarla karakterizasyon analizi gerçekleştirilmiştir (Dominici vd., 2006)

3.6.1. iSS-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

Yeterli sayıda çoğalan iSS-MKH'ler tripsinizasyon işlemi ile hücre kültür kaplarından kaldırılarak $2x10^6$ adet olacak şekilde sayımı yapıldı ve PBS içinde tek hücre süspansiyonu haline getirilerek belirlenen insan hücre yüzey antijenlerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- veya fikoeritrin (PE)- veya APC- konjuge monoklonal antikorlar (CD73, CD90, CD105, CD44, MHC Class I, CD34, CD25 ve MHC-II (HLA-DR) (Biolegend, San Diego, USA) ve bu antikorlara uygun izotip kontrollerinden 2µl eklenerek 20-30 dk. boyunca karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yıkama işlemi %0,1 sodyum azid içeren PBS çözeltisi ile yapılarak fazla boyanın uzaklaşması için 5 dk. 300xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücreler yıkama çözeltisi ile resüspense edilerek flow sitometri (NovoCyte, Agilent, Palo Alto, CA, Amerika) cihazında okutularak NovoExpress 6.0 programında analizi gerçekleştirilmiştir (Harvanová vd., 2011).

3.6.2. iSS-MKH'lerin Karakterizasyonu için in vitro Farklılaşma analizleri

3.6.2.1. Adipojenik Farklılaşma

%0,1 jelatin (bovine skin, Sigma, Almanya) ile kaplanmış steril lameller 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilerek üzerlerine iSS-MKH'ler (p3) konfluent olacak şekilde ekilmiştir. Ekim yapıldıktıktan sonra içinde %15 FBS, 0,5 mM izobutil-metilksantin (Medchemexpress, İsveç), 10^{-6}M deksametazon (Sigma, Almanya), 10 µg/ml insulin (Insulin, Human Recombinant, Solution Capricorn, Almanya), 200 µM indometazin (Medchemexpress, İsveç) ve % 0,2 primosin (Invivogen, Fransa) bulunan yüksek glukozlu DMEM kültür farklılaşma besi yerinde iki hafta boyunca kültüre edilmiştir. Farklılaşma besi yeri 3 günde bir yenilenmiş ve iki haftalık kültür süresi sonrasıdan hücre içi biriken lipidler, Oil Red O histolojik boyaması ile ve adiponectin biyobelirtecinin immunfloresan boyaması ile tespit edildi (Karaöz vd., 2017).

3.6.2.2. Osteojenik farklılaşma

%0,1 jelatin ile kaplanmış steril lameller 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilerek üzerlerine iSS-MKH'ler (p3) konfluent olacak şekilde ekilmiştir. Ekim yapıldıktıktan sonra osteojenik farklılaşma için; içinde %15 FBS, 0.5 mM izobutil-metilksantin, 10-6M deksametazon, 10 µg/ml insulin, 200 µM indometazin (Stemcell Technologies, Amerika) ve % 0,2 promisin bulunan yüksek glukoz içeren DMEM kültür osteojenik farklışama besi yerinde 30-40 gün boyunca kültüre edilmiştir. Farklılaşma besi yeri 3 günde bir yenilenmiş ve kültür süresi sonrasıda ekstrasellüler matrikste meydana gelen kalsifikasyon ve kalsiyum depolarının tespiti Alizarin Red S histolojik boyaması ve osteocalcin biyobelirtecinin immunfloresan boyaması ile gösterilmiştir (Karaöz vd., 2017).

3.6.2.3. Kondrojenik farklılaşma

Kondrojenik farklılaşma, mikropellet solüsyon kültür tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla $5x10^6$ adet hücre içeren pellet 15 mL konik tabanlı tüpte $10x10^6$ adet hücre pelleti ise 10 mm'lik tek kuyucuklu petrinin orta noktasına damlacık halinde koyularak kültür edilmiştir. 37°C de 2 saat yapışmaları için beklendikten sonra hücreler, 10 ng/ml TGF-β1 (Recombinant Human TGF-B1, Medchemexpress, HY-P7118-10), 50 µg/ml askorbik asit, 0,1 µM deksametazon (Dexamethasone, D4902, Sigma), 100µg/ml sodyum pirüvat (Sodium Pyruvate

Solution (100 mM), Capricorn), 40 µg/ml prolin (L-Proline, for cell culture 25g, Sigma), 50 mg/ml ITS (Insulin-Transferrin-Selenium (ITS), Solution 100x, Capricorn), 1% Penisilin-streptomisin içeren yüksek glikoz-DMEM kültür besi yeri ile 2 hafta süresince kültüre edilmişlerdir. İki haftalık kültür sonrası petride bulunan pellet kullanılarak, kondrojenik farklılaşma kıkırdak matriksinde bulunan fosfatlı proteoglikanlar Alcian Blue boyaması yapılarak belirlenmiştir. Fotoğrafları çekildikten sonra tüpteki pelet ile birlikte %4 paraformaldehit (ReadiUse™ 4% formaldehyde fixation solution, AAT Bioquest) ya da %10 formalin ile fikse edilip parafine gömülerek ve mikrotom cihazı (Leica, Almanya) 5 µm'lik kesitler alınmıştır. Kesitlerde kondrojenik farklılaşma, histokimyasal olarak tekrar Alsiyan mavisi ve safranin O ile ışık mikroskobu ile gösterilmiştir.

3.6.3. iSS-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

Farklılaşmamış iSS-MKH'ler steril 8 mm çapındaki cam lameller üzerine ekilerek 37 °C, %5 CO_2 ve nemli ortamda kültüre edildi. Bir günlük kültür sonunda hücreler 20 dk. %10 soğuk methanol ile fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak hücreler boyama işlemlerine hazır hale getirildi. Triton-X ile hücreler 15 dk. boyunca muamele edilerek geçirgen hale getirildi ve PBS ile yıkandı. Antikor boyaması için fikse edilen hücreler non-spesifik bağlanmaları engellemek için 30 dk. boyunca uygun blok solüsyonlar ile oda ısısında muamele edildi. Daha sonrasında Vimentin ve Nestin primet antikorlarıyla 4°C'de gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün cam lameller üzerindeki primer antikorlar oda ısısındaki PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Primer antikorlara uygun olarak seçilen vimentin- alexa flour 594 anti mouse (kırmızı) (abclonal) ve Nestin- alexa flour 488 anti mouse (yeşil) (molecular probes) sekonder antikorlar ile 1 saat boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda lamellerin üzerine çekirdek belirteci olan DAPİ Immunofloresan boyası (Mavi) içeren kapatma besi yeri damlatılmış ve lamel ile kapatılmıştır. İmmunofloresan boyamaları gerçekleştirilen iSS-MKH'lerin görüntüleri Floresan mikroskop altında görüntülenmiştir (Karaöz vd., 2017).

3.7. iSS-MKH'lerden Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.7.1. iSS-MKH'lerden eksozom izolasyonu

iSS-MKH kökenli eksozomlar ultrasantirfüj (Beckman coulture Optima XPN, Amerika) kullanılarak izole edilmişlerdir. %70 konfluensiye ulaşan iSS-MKH'ler

(P3) FBS içermeyen, %0,2 (mL/mL) primosin ve %1 (mL/mL) stabil L-Glutamin (Glutamax, Sigma, Almanya) ve DMEM-F12 besi yeri içerisinde 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücre besi yerleri toplanmış ve 3000xg'de 30 dk. santrifüj edilerek olası hücre ve hücre parçaları uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatantlar ultrasantrifüj tüplerine konularak ağırlıkları ölçülmüş ve eşitlenmeyen ultrasantrifüj tüplerinin ağırlıkları steril PBS ile eşitlenmiştir. Ultrasantrifüj tüpleri cihaza yerleştirilerek +4°C'de 120.000xg'de 90 dk. santrifüj edilerek eksozom pelletlerinin oluşması sağlanmıştır. Santrifüj süresi sonunda süpernatant uzaklaştırılarak eksozom pelleti yaklaşık olarak 300 uL PBS ile resüspense edilmiştir. Resüspense edilen iSS-MKH eksozomların (iSS-MKH-Exo) miktarlarının normalizasyonu için total protein analizi gerçekleştirilmiş ve alikotlanarak -80°C'de (Arctıko, Danimarka) analizlere kadar saklanmıştır (Han vd., 2021; Greening vd., 2015).

3.7.2. iSS-MKH-Exo'ların total protein analizi

iSS-MKH'lerden izole edilen eksozomların miktar normalizasyonu için total protein analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Qubit Protein BR Assay (İnvitrogen, Almanya) kit kullanılmıştır. Analiz üretici kitin önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Bu kapsamda, öncelikle her bir örnek üzerine 1:1 oranında soğuk RIPA buffer (Thermofisher, Amerika) eklenerek 15 dakika süresince protein dışındaki ürünlerin parçalanması sağlanmıştır. 15 dakikalık inkübasyon sonrasında her bir örnek için 199 µL kit içeriğinde yer alan Protein bufferdan ve 1 µL Reagent'tan Qubit tüplerine eklenerek 15 dk. karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübashon sonunda Qubit cihazı (İnvitrogen, Amerika) ile total protein miktarları hesaplandı. Total protein miktarı hesaplanan eksozomlar her bir alikot içerisinde 20 µL olacak şekilde -80°C'de saklandı (Chen vd., 2021).

3.7.3. iSS-MKH-Exo'ların immunfenotiplemesi

iSS-MKH'ler izole edilip alikotlanarak saklandıktan sonra bazı alikotlar alınarak kademeli çözüdürülerek eksozomlara özgü yüzey belirteçleri olan CD9 ve CD81 (Biolegend, San Diego, Amerika) ile flow sitometride analizi yapıldı. Eksozomların flow sitometri de analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için eksozomların boncuklar ile kaplanması gerekmektedir. Bu amaçla, eksozomlara özgü olan yüzey belirteçlerinden CD9 ve CD81 boncuk solüsyonu (Carboxyl Latex, İnvitrogen,

Almanya) ile kaplanmışlardır. Bunun için antikor ve boncuk solüsyonu +4ºC'de rotator cihazında bir gece boyunca döndürülerek kaplanması sağlanmıştır. Her bir boncuk-antikor solüsyonundan 20 µL ve eksozom örneğinden 80 µL alınmıştır. Eksozom+antikor karışımının üzerine 100 µL %5 BSA eklenerek non-spesifik bağlanmalar engellenmiştir. Bu karışım +4ºC'de rotator ile gece boyunca döndürülerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örneklerden 50 µL alınarak eksozoma özgü yüzey belirteçlerinden 1 µL eklenerek işaretlenmiştir. CD9 ve CD81 antikorlarıyla işaretli eksozomlar izotip antikorlarına göre analizi Flow sitometri (Agilent, NovoCyte 3005) cihazı ile okutulmuş ve NovoExpress 6.0 programı ile analizi yapılmıştır.

3.7.4. iSS-MKH-Exo'ların TEM ile karakterizasyonu

Eksozomların boyut analizi için geçirimli elektron mikroskobu ile (Transmission electron microscopy; TEM) görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Ürün hazırlığı için iki aşamalı protokol kullanılmıştır. Eksozom süspansiyonları 30 dakika boyunca karbon kaplı 200 meshli bakır gridler (Agar Scientific, İngiltere) üzerine konarak adsorbe edilmiştir. Ardından üç kez saf su ile yıkanmış ve yaklaşık 30 saniye-1 dakika boyunca %3 Uranil asetat içermeyen (UA-Zero EM Stain, Agar Scientific, İngiltere) solüsyon ile boyanmıştır. Kağıt ile kurutulan gridler direkt olarak geçirimli elektron mikroskobu (Hitachi HT7800, Japonya) ile 120 kV altında görüntülenmiştir (Moscardini vd., 2020).

3.7.5. iSS-MKH-Exo'ların zeta potansiyellerinin ölçülmesi

siRNA'ların eksozomlara yüklenmesi için sahip oldukları zeta potansiyel değerleri önem taşımaktadır. Bu amaçla Zetasizer Nano sz (Malvern Instruments, İngiltere) ile ölçüm yapılmıştır. Eksozom alikotları tek kullanımlık zeta potansiyel ölçüm küvetine (DTS1060C) eklenerek üzeri PBS ile 700 µL'ye tamamlanmıştır. Zeta potansiyel ölçümlerinde materyal "protein" olarak seçilmiş ve ölçümler 25 °C'de gerçekleştirilmiş olup 10 farklı ölçümün ortalaması 1 ölçümü yansıtacak şekilde ölçüm yapılmıştır (Soares vd., 2018).

3.8. MDR1 siRNA'ların Eksozomlarla Enkapsüle Edilmesi ve Karakterizasyonu

3.8.1. MDR1 siRNA'ların eksozomlarla enkapsülasyonu

Kanser kök hücrelerde dirence sebep olan p-glikoprotein'lerin (MDR1) sessizleştirilmesi için kullanılacak olan MDR1 siRNA'lar eksozomlar ile enkapsüle edilmesi planlanmıştır. Bu amaçla literatürde siRNA'ların eksozomlar ile enkapsülasyonunda en verimli yöntem olarak belirtilen elektroporasyon yöntemi tercih edilmiştir (Kase vd., 2021; Didiot vd., 2016). Elektroporasyon sistemi olaran Neon Transfeksiyon sistemi (Thermofisher, Almanya) kullanılmıştır. Her bir eksozom örneği ile MDR1 siRNA konsantrasyonu 1:1 olacak şekilde ayarlanmıştır. İzole edilerek -80°C'de saklanan eksozomlar her bir transfeksiyonda eksozom örneğinden 10 µg olacak şekilde hesaplanarak transfeksiyon işlemine başlanmıştır. MDR1 siRNA'ların eksozomlar ile enkapsülasyonları için elektroporasyon yöntemi tercih edilmiştir. Bu amaçla elektroporasyon değerleri çeşitli optimizasyon çalışmalarından sonra 1000 Volt, 10 ms ve 3 pulse olacak şekilde belirlenmiştir. Kit içeriğinde yer alan transfeksiyon tüplerine Elektrolit Tampon E'de 3 mL eklendikten sonra transfeksiyon pipet istasyonuna yerleştirilmiştir. Eksozom ve siRNA kompleksi kit içeriğinde yer alan Resüspansiyon tamponu (Buffer R) içerisinde total hacim 100 µL olacak şekilde süspanse edilmiştir. 100 µL'lik transfeksiyon pipet ucunun transfeksiyon pipetine doğru olarak yerleştirildiğinden emin olduktan sonra transfeksiyon istasyonunda yer alan transfeksiyon tüpü içerisine yerleştirilmiş ve transfeksiyon döngüsü işlemi başlatılmıştır. Transfeksiyon başarıyla sonuçlandıktan sonra eksozom+siRNA kompleksi üzerine 100 µL PBS eklenmiş ve 37ºC inkübatörde 24 saat süresince inkübe edilmiştir (Yang vd., 2016).

3.8.2. iSS-MKH-Exo ve -iSS-MKH-MDR1-Exo'ların uptake analizi

iSS-MKH-Exo ve FITC ile etiketli iSS-MKH-MDR-Exo'ların hücreler tarafından uptake edilebilme potansiyelleri araştırılmıştır. Eksozomlar PKH26 floresan (kırmızı) boyası ile işaretlenerek hücreler tarafından uptake'leri analiz edilmiştir. Bu amaçla PKH26 Dye kit (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Bu kapsamda A549, KKH ve dKKH hücreleri cam tabanlı 35 mM'lik petrilere $10x10^4$ adet hücre olacak şekilde ekilmiştir. Daha önceden izole edilerek -80°C'de saklanan eksozomlardan 10 µg olacak şekilde 20 µL PBS içerisinde çözülmüştür. Üzerine 80

µL Dilüent, 1 µL PKH26 floresan boyasından eklenerek 4 dk. Oda ısısında inkübe edilmiştir. 400xg'de 5 dk. Santrifüj edilerek fazla boyanın atılması sağlanmıştır. Serum içermeyen 1 mL besi yeri içerisine eklenerek hücrelerin üzerine konmuş ve inkübatörde 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 3 saatin sonunda hücreler Hoechst floresan (mavi) ile işaretlenmiş ve eksozomların hücre içi uptakeleri floresan mikroskop altında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir. (Franzen vd., 2014).

3.8.3. HA-iSS-MKH-Exo'ların HA ile kaplanması

MDR1 siRNA transfekte edilmiş her bir iSS-MKH-Exo'lar Hyaluronik asit (Bugamed, Türkiye) ile kaplanması sağlanmıştır. Bu amaçla transfeksiyon sonrasında her bir iSS-MKH-MDR1-Exo'lara 1000µg/mL içeren HA solüsyonunundan 40 µL eklenmiş ve PBS ile 100 µL'ye tamamlanarak ve HA ile kaplanması için 37ºC inkübatörde 24 saat süresince inkübe edilmiştir (Li vd., 2022)

3.8.3.1. HA-iSS-MKH-Exo'ların TEM ile karakterizasyonu

Eksozomların HA ile kaplanmasının analizi için geçirimli elektron mikroskobu ile (Transmission electron microscopy; TEM) görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Ürün hazırlığı için iki aşamalı protokol kullanılmıştır. Eksozom süspansiyonları 30 dakika boyunca karbon kaplı 200 meshli bakır gridler üzerine konarak adsorbe edilmiştir. Ardından üç kez saf su ile yıkanmış ve yaklaşık 30 saniye-1 dakika boyunca %3 Uranil asetat içermeyen solüsyon ile boyanmıştır. Kağıt ile kurutulan gridler direkt olarak geçirimli elektron mikroskobu ile 120 kV altında görüntülenmiştir (Moscardini vd., 2020).

3.8.4. MDR1 hedefli siRNA'ların iSS-MKH-Exo'lara transfeksiyonunu belirlemek için iSS-MKH-Exo'larından total RNA izolasyonu

RNA izolasyonu öncesi örneklerden Nanodrop cihazı ile RNA ölçümü gerçekleştirilmiştir.

siRNA yüklenmiş MKH eksozomlarından Total RNA izolasyonu Invitrogen Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Cat. No. 4478545, Almanya) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda miRNA yıkama solüsyonu 1 çözeltisine ve yıkama solüsyonlarına %100 etanol çözeltileri ve denatürasyon solüsyonuna 2-Merkaptoetanol eklenerek hazırlanmıştır. Sonrasında RNA izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Eksozom solüsyonu 1x PBS ile 200 µL olacak şekilde

resüspanse edilmiştir. 200 µL kadar denatürasyon solüsyonundan eklenerek buz üzerinde 5 dk. Boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 200 µL asit: fenol çözeltisi eklenerek 30-60 saniye boyunca vorteksleyerek karışması sağlanmıştır. 12.000xg'de 5 dakika oda ısısında santrifüj edilerek akuöz ve organik faz ayrımı gözlenmiştir. Akuöz faz diğer fazları bozmadan temiz bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine %100 etanol eklenerek pipetaj işlemi yapılmıştır. Her örnek için toplama tüpüne kitin içeriğinde yer alan filtre (Filter cartridge) yerleştirilmiştir. 700 µL lizat/etanol karışımı filtreye aktarılmış ve 10.000×g'de yaklaşık 15 saniye boyunca karışım filtreden geçene kadar santrifüjlenmiştir. Altta kalan kısım dökülerek ve lizat/etanol karışımı filtreden geçene kadar santirfüj işlemi tekrarlanmıştır. santrifüj sonrasında filtreye 700 µL miRNA Yıkama solüsyonu 1 eklenmiş ve 10,000×g'de 15 saniye boyunca santrifüj edilerek alt kalan kısım atılmıştır. Yıkama solüsyonu 2/3'den 500 µL eklenerek santifüj işlemi tekrar edilmiştir. Filtre temiz bir tüpe aktarılarak 50 µL önceden 95°C'ye ısıtılmış Elution Buffer eklenmiş ve 30 saniye boyunca santrifüj edilmiştir. Altta kalan RNA içeren eluant toplanarak Nanodrop (Thermo Scientif, Almanya) ile RNA miktarı ölçülmüştür. RNA'lar bir sonraki işleme kadar –80° C'de muhafaza edildi.

3.8.5. iSS-MKH-Exo'lara siRNA transfeksiyonunun kapasitesinin agaroz jel ile gösterilmesi

Eksozomlardan izole edilen MDR1 siRNA'ların eksozom içeriğine yüklenip yüklenmediğinin ölçülebilmesi için agaroz jelde yürütülmüştür. Bu amaçla %2,5 Agaroz jel 1x TBE tamponu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan agaroz jel 45 ºC'ye gelene kadar ısıtılmış ve içine 80 µL ethidium bromür eklenmiştir. Agaroz jel yürütülmesi için yatak elektroforez (Thermo midicell Primo, Almanya) kullanıldı. Elektroforeze uygun tarak takılarak yükseklik kontrol edilmiştir. Hazırlanan jel dökülerek 15-20 dk. boyunca tamamen donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak örnek yükleme bölümleri oluşturulmuştur. Jeli yürütmek için 1x TBE tamponu jelin üstüne geçene kadar döküldü. Her bir örneğe 5 µL loading tamponu eklenerek örnekler yükleme bölümüne dikkatli bir şekilde yüklendi. Güç kaynağı (Consort, Belçika) önce 50 Voltta 2 saat boyunca sonra 70 Voltta 40 dakika boyunca çalıştırılarak örneklerin jelde yürümesi sağlandı. Süre sonunda jel görüntüleme sistemi (UVİTEC, İngiltere) ile görüntülenmiştir (Büyükköroğlu vd., 2016).

3.8.6. iSS-MKH-Exo'larının HA ile enkapsülasyonunun ve siRNA transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler üzerindeki MTT yöntemi ile sitotoksisitesinin analizi

HA, Saf eksozom, HA ile kaplı eksozom (HA-Exo) MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR için MTT yöntemi ile A549, KKH ve dKKH'ler için 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla A549, KKH ve dKKH'ler $5x10^3$ adet hücre/ kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat boyunca inkübatörde inkübe edilmişlerdir. 24 saat sonunda tüm hücre gruplarının besi yeri uzaklaştırılarak serum içermeyen besi yeri ortamı içerisinde HA, Saf eksozom, HA ile kaplı eksozom (HA-Exo) MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR numuneleri verilmiş ve 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C inkübatörde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon zamanının sonunda plakalara PBS içerisinde hazırlanan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solüsyonundan eklenerek 3-4 saat inkübatörde beklenmiştir. Süre sonunda formazan kristallerinin çözülebilmesi için DMSO eklenerek karanlıkta orbital çalkalayıcı da 15 dk. Boyunca döndürülür. Mikroplaka okuyucu (Biotek, Amerika) 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okuması sağlanmıştır (Altıntop vd., 2022).

3.9. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler üzerindeki apoptotik etkisinin aktif kaspaz 3 ile IF yöntemle analizi

Exo-MDR ve HA-Exo-MDR ile sessizleştirilen A549, KKH ve dKKH'lerin üzerindeki Gemcitabinin etkisi aktif kaspaz 3 antikoru ile işaretlenerek İF yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla hücrelere MTT ile belirlenen 3 µM Gemcitabin dozu uygulanmış, kontrol gruplarına ise 1600 µm Gemcitabin dozu uygulanmıştır. $10x10^4$ adet A549, KKH ve dKKH'ler 8 kuyucuklu lamlara 300 µL besi yeri içerisinde ekilmiş ve 24 saat süresince beklenmiştir. 24 saatlik süre sonunda siRNA içeren ve içermeyen eksozomlar hücrelere uygulanarak 48 saat sessizleşmeleri beklenmiştir. 48 saat süre sonunda Gemcitabin dozları uygulanarak hücreler inkübatöre kaldırılmış 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 20 dk. %10 soğuk methanol ile fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak hücreler boyama işlemlerine hazır hale getirildi. Triton-X ile hücreler 15 dk. boyunca muamele edilerek geçirgen hale getirildi ve PBS ile yıkandı. Antikor boyaması (aktif

kaspaz 3) için fikse edilen hücreler non-spesifik bağlanmaları engellemek için 30 dk. boyunca uygun blok solüsyonlar ile oda ısısında muamele edildi. Daha sonrasında aktif kaspaz 3 antikoruyla 4°C'de gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün cam lameller üzerindeki primer antikorlar oda ısısındaki PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Primer antikorlara uygun olarak seçilen alexa flour 594 anti mouse (kırmızı) (abclonal) alexa flour 488 anti mouse (yeşil) (molecular probes) sekonder antikorlar ile 1 saat boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda lamellerin üzerine çekirdek belirteci olan DAPİ Immunofloresan boyası (Mavi) içeren kapatma besi yeri damlatılmış ve lamel ile kapatılmıştır. İmmunofloresan boyamaları gerçekleştirilen hücrelerin görüntüleri Floresan mikroskop altında görüntülenmiştir.

3.10. MDR1 Hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonu Sonrası A549, KKH ve dKKH'lerdeki MDR1 Ekspresyonunun Flow Sitometrik Analizi

Exo-MDR ve HA-Exo-MDR ile sessizleştirilen A549, KKH ve dKKH'lerin üzerindeki Gemcitabinin etkisiyle MDR1 proteinlerinde meydana gelen değişimler için flow sitometri ile MDR1 analizi gerçekleştirilmiştir. Hücrelere MTT ile belirlenen 3 µM Gemcitabin dozu uygulanmış, kontrol gruplarına ise 1600 µm Gemcitabin dozu uygulanmıştır. Bu amaçla $10x10^4$ adet A549, KKH ve dKKH'ler 6 kuyucuklu plakalara 1 mL besi yeri içerisinde ekilmiş ve 24 saat süresince beklenmiştir. 24 saatlik süre sonunda siRNA içeren ve içermeyen eksozomlar hücrelere uygulanarak 48 saat sessizleşmeleri beklenmiştir. 48 saat süre sonunda Gemcitabin dozları uygulanarak hücreler inkübatöre kaldırılmış 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüm hücreler tripsin ile kaldırılmış ve soğuk PBS ile yıkanarak 300xg'de 5dk. boyunca santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir. Pellet haline getirilen hücreler üzerine 100 µL bağlanma solüsyonundan eklenmiş ve üzerine 1 µL anti-MDR1 antikoru eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler flow sitometri cihazı ile okutulmuş ve izotip kontrolüne göre NovoExpress 6.0 programı ile analiz edilmişlerdir (Gazitt vd., 1992).

3.11. MDR1 Hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'lerdeki Apoptotik Etkisinin Annexin V/PI İle Flow Sitometrik Analizi

Exo-MDR ve HA-Exo-MDR ile sessizleştirilen A549, KKH ve dKKH'lerin üzerindeki Gemcitabinin apototik etkisinin araştırılması için annexin V/PI analizi yapılmıştır. Bu amaçla deney hücrelerine MTT analizi ile belirlenen 3 µM Gemcitabin dozu uygulanmış, negatif kontrol gruplarına ise 3 µM ve 1600 µM Gemcitabin dozu uygulanarak apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla 10x104 adet A549, KKH ve dKKH'ler 6 kuyucuklu plakalara 1 mL besi yeri içerisinde ekilmiş ve 24 saat süresince beklenmiştir. 24 saatlik süre sonunda siRNA içeren ve içermeyen eksozomlar hücrelere uygulanarak 48 saat sessizleşmeleri beklenmiştir. 48 saat süre sonunda Gemsitabin dozları uygulanarak hücreler inkübatöre kaldırılmış 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüm hücreler tripsin ile kaldırılmış ve soğuk PBS ile yıkanarak 300xg'de 5dk. boyunca santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir. Pellet haline getirilen hücreler üzerine 100 µL bağlanma solüsyonundan eklenmiş ve üzerine 1 µL Annexin V, flow tüplerin duvarına 1 µL PI boyası eklenerek karanlık ortamda 15 dk. inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler flow sitometri cihazı ile analiz edilerek kontrol grubuna göre apoptoz dereceleri belirlenmiştir (Altıntop vd., 2022).

3.12. MDR1 Hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'lerdeki Apoptotik Etkisinin Flow sitometri İle Hücre Döngüsü Analizi

Exo-MDR ve HA-Exo-MDR ile sessizleştirilen A549, KKH ve dKKH'lerin üzerindeki Gemcitabinin apototik etkisinin araştırılması için flow sitometri ile hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Hücrelere MTT analizi ile belirlenen 3 µM Gemcitabin dozu uygulanmış, kontrol gruplarına ise 1600 µM Gemsitabin dozu uygulanarak apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla $10x10^4$ adet A549, KKH ve dKKH'ler 6 kuyucuklu plakalara 1 mL besi yeri içerisinde ekilmiş ve 24 saat süresince beklenmiştir. 24 saatlik süre sonunda siRNA içeren ve içermeyen eksozomlar hücrelere uygulanarak 48 saat sessizleşmeleri beklenmiştir. 48 saat süre sonunda Gemsitabin dozları uygulanarak hücreler inkübatöre kaldırılmış 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüm hücreler tripsin ile kaldırılmış ve

soğuk PBS ile yıkanarak 300xg'de 5dk. boyunca santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir. Pellet haline getirilen hücrelere vorteks üzerinde %70'lik soğuk etanol damla damla eklenerek yarım saat boyunca 4ºC'de inkübe edilmiştir. RNase A içeren enzim solüsyonu (1x) 200 µg/mL olacak şekilde; PI içeren boyama solüsyonu ise (1x) 50µg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. İnkübasyon sonunda RNase A solüsyonundan her örnek başına 50 µL olacak şekilde eklenerek 30 dakika 37ºC inkübatörde 30 dk. bekletilmiştir. 30 dakikanın sonunda hücreler flow tüplerine alınmış ve 1 µL PI boyası eklenerek 37ºC'de 15 dk. daha inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda hücreler flow sitometri cihazında okutularak kontrol grubuna göre NovoExpress 6.0 programı ile analiz edilmişlerdir (Dolanbey vd., 2021).

3.13. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'lerin Real Time (qPCR) İle Genotipik Analizi

A549, KKH ve dKKH'ler için BCL-2, MDR1 ve SİTOKROM C genlerinin ekspresyonları RT2-PCR analizi ile belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle A549, KKH ve dKKH'lerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ölçülerek cDNA sentez işlemi yapılmıştır. cDNA'ları elde edilen hücreler ilgili primer antikorlarla RT^2-PCR analizi gerçekleştirilmiş ve alınan sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüne göre hesaplanarak istatistiksel analizi yapılmıştır.

3.13.1. A549, KKH ve dKKH'lerden Total RNA izolasyonu

A549, KKH ve dKKH'ler $1x10^5$ hücre/kuyucuk şeklinde ekilerek hücreler kültüre edilmiştir. Eksozom, siRNA yüklü eksozom, HA-kaplı eksozom ve HA-kaplı siRNA yüklü eksozomlar FBS içermeyen besi yeri içinde uygulanarak 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 µM Gemcitabin dozları ilgili kuyucuklara uygulanmış ve 24 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak pellet haline getirilmiş ve RNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir. Total RNA izolasyonu Hybrit R total RNA purification kit (GeneAll, Güney Kore) protokolü izlenerek gerçekleştirilmiştir. Ön hazırlık olarak; RL Buffer çözeltisine 150 µl 2-Merkaptoetanol, Lyse ALL çözeltisine 60 µl 2-Merkaptoetanol eklenmiştir. Diğer işlemler sırayla şu şekilde yapılmıştır.

- Tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler soğuk PBS ile yıkanarak 300xg'de 5 dk. boyunca santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir.

- Hücre pelletine 400 µl RL tamponu eklenerek vortekslenmiştir.
- Homojenize olmuş örnekler üzerine 100 µL Lyse ALL solüsyonu eklenip tekrar vortekslenmiştir.
- Maksimum hızda 2 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
- Supernatant kit içeriğinde yer alan homogenization spin-column (Önceden 30 µL Buffer A solüsyonu eklenerek aktive edilmiş) içeren 2 mL'lik bir tüpe aktarılıp 2 dk 12000xg'de santrifüj (Hermle Z216 MK, Almanya) edilmiştir.
- Kolondan alta geçen sıvı bölüme 700 µL saf etanol eklenerek pipetleme yapılmış ve homojenize edilmiştir.
- Karışım RNA binding spin-column içeren 2 mL'lik bir tüpe aktarılarak 2 dk 12000xg'de santrifüj edilmiştir.
- Total RNA purifikasyonu için 2-8^{0}C'de saklanan RNA binding spin-column üzerine 500 µL Wash buffer'dan (yıkama tamponu) eklenmiş ve 1 dk boyunca 11000xg'de santrifüj edilmiş ve altta kalan karışım uzaklaştırılmıştır. Kalan karışımların uzaklaştırmak için 11000xg'de 1 dk. boyunca santrifüj edilmiştir.
- RNA binding spin-column yeni bir tüpe yerleştirilerek 30 µL RNase-free su eklenmiş ve 11000xg'de 2 dk. boyunca santrifüj edilmiştir.
- RNA binding spin-column çıkarılarak örnekler CDNA sentezine kadar saklanmak üzere –80 ° C'ye kaldırılmıştır.

3.13.2. RNA konsantrasyonunun ölçümü

Total RNA'ları izole edilen deney grupları içeren A549, KKH ve dKKH'lerin RNA konsantrasyonları NanoDrop 2000 Spektrometre (Thermo Scientific-ND 2000c, Almanya) cihazı kullanılarak 260nm ve 280nm dalga boyunda saflığı ve konsantrasyonu (ng/µL) ölçülmüştür. Elde edilen ölçüm değerlerine göre RNA konsantrasyonları eşitlenerek cDNA sentezine geçilmiştir.

3.13.3. cDNA eldesi

Hücre gruplarından izole edilen total RNA'lardan cDNA eldesi için Wizscript cDNA Synthesis (Wizbio solution, Kore) kiti kullanılmıştır. RNA konsantrasyonları eşitlendikten sonra Tablo 3.1'de yer alan bileşenler kullanılarak 20 µL'lik miks hazırlanmıştır. Hazırlanan bileşenler 42°C'de 5 dk Thermal cycler cihazında (Thermo, Almanya) inkübe edilmişlerdir. İnkübayon sonunda revers transkipsiyon karışımı Tablo X'de verildiği şekilde hazırlanmıştır

Tablo 3. 1. Gen ekspresyonu cDNA sentezi için hazırlanan karışım içeriği

Karışım	**Miktar (µL)**
Template RNA & primer mix	1
10X reaction buffer	2
RNase Inhibitor (40U/µL	0.5
Reverse Transcriptase (200 U/µL)	1
DTT (100mM)	1
RNase free water	20 µl'ye tamamlanana kadar
Toplam	20

3.13.4. Real Time (qPCR) gen ekspresyon analizi ile A549, KKH ve dKKH'lerde apoptozun belirlenmesi

Real time PCR (qPCR) ile hücrelerdeki MDR1 geninin eskpresyon düzeyinde değişimler ve apoptozda etkili genler olan BCL-2 ve SİTOKROM C genleri araştırılmıştır (Tablo 3.3) Bu amaçla real time PCR işlemini gerçekleştirebilmek için qPCR SYBR-Green MasterMix, w/o ROX, (ABT Biotech, cat. no: Q03-01-05) Tablo x'de belirtilen bileşenlerle master mix hazırlanmıştır (Tablo 3.2.). Bu aşamada primerler ve kit içeriğinde yer alan master mix 0.1 µL'lik Qiagen PCR tüplerine eklenerek, eşit miktarda cDNA'lar ilave edilmiştir. Daha sonrasında qPCR (Qiagen, Rotor-Gene Q 5plex HRM System, Almanya) ile Tablo 3.4'de verilen koşullarda PCR reaksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve software Rotor-Gene Q Software 2.3.5.1

kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar 2-ΔΔCT formülüne göre hesaplamaları yapılmıştır.

Tablo 3. 2. qPCR master-mix bileşen ve hacimleri

Bileşenler	**X1**
2x Amplifyme probe mix	10 µL
Forward primer (10 µM)	0.6 µL
Reverse primer (10 µM)	0.6 µL
Probe (10 µM)	0.2 µL
50x ROX solusyonu	0.4 µL
Template DNA/cDNA	(Eşitlenen miktarda) x µL
PCR-grade water	20 µL'ye kadar eklenir

Tablo 3. 3. Analizlerde kullanılan primer dizileri

Gen adı	**Primer dizileri**
ABCB1	F-5'-TTGCTGCTTACATTCAGGTTTCA-3'
	R-AGCCTATCTCCTGTCGCATT
BCL-2	F-5'-TTGACAGAGGATCATGCTGTACTT-3'
	R-5'-ATCTTTATTTCATGAGGCACGTT-3'
CYCS	F-5'-TGTGCCAGCGACTAAAAAGA-3'
(Sitokrom C)	R-5'-CCTCCCTTTTCAACGGTGT-33
GAPDH	R-5'-GCACAAGAGGAAGAGAGAGACC-3'
	F-5'AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'

Tablo 3. 4. qPCR'da kurulan PCR reaksiyon koşulları

STEP	Tempetuare	Time	Cycle
İlk denatürasyon ve polimeraz aktivasyonu	95°C	10 dk.	1x
Denatürasyon	95°C	20 sn.	40x
Hedef DNA komponenti ile birleşme ve uzama	60°C	30 sn.	
Bekletme	72°C	30 n.	

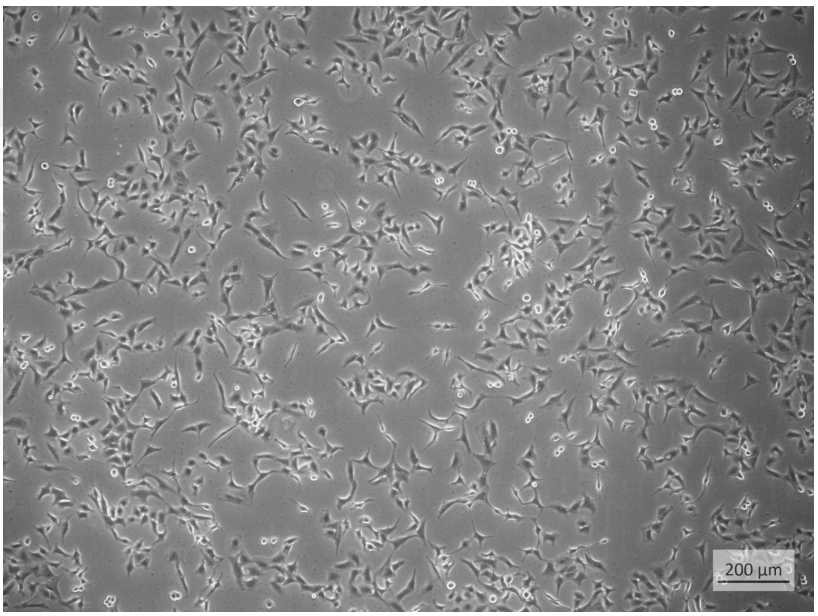
3.14. İstatistiksel analiz

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma şeklinde sunuldu. İstatistiksel analizler GaphPad Prism 9.3.1 yazılımı kullanılarak yapıldı. Deneysel süre boyunca grupların etkileşimli etkilerini değerlendirmek etmek için tek ve iki yönlü varyans analizleri (ANOVA) kullanıldı. Deney grupları arasındaki *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ve ve ****p<0,0001 şeklinde gösterildi. Bir fark $p < 0.05$ olduğunda %95'lik bir güven aralığı ile anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. A549 Hücrelerinin Kültürü

Daha önceki projeler için alınıp çoğaltılan A549 hücre hattı (insan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi) -150 °C stoklarımızda saklanmıştır. Stoklarımızdan çıkarılarak gerekli sayıya ulaşana dek hücreler kültüre edilmiştir. Kültür süresi boyunca günlük olarak faz-kontrast mikroskobu ile incelenerek fotoğraf çekimleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan mikroskobik incelemelerde Şekil 4.1.'de gösterildiği gibi epitelyal karakterde morfoloji göstermektedirler.



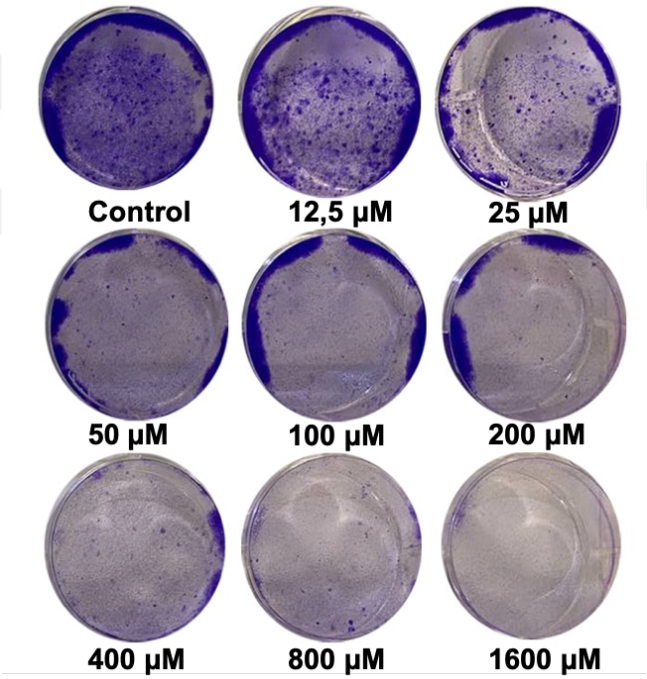
Şekil 4. 1. A549 hücrelerinin 25.pasajın 2.gününde (P25) faz kontrast invert mikroskobik görüntüsü (ölçü çubuğu = 200 µm).

4.2. Gemsitabin Dirençli A549 (d-A549) Akciğer Hatlarının Oluşturulması

A549 hücrelerine Gemsitabin direnci kazandırılırken ilk olarak A549 hücrelerinin maksimum dayanabildikleri Gemsitabin konsantrasyonu koloni oluşturma potansiyeli (CFU) analizi ile belirlendi. Daha sonra belirlenen doz ile hücre hattı muamele edilerek koloni oluşturabilen en yüksek doz ile d-A549 hücre hattı elde edildi. Son olarak d-A549 hücre hattına ikinci kez CFU analizi ile dirençli koloni morfolojileri gösterildi.

4.2.1. Koloni oluşturma potansiyeli (CFU) analizi

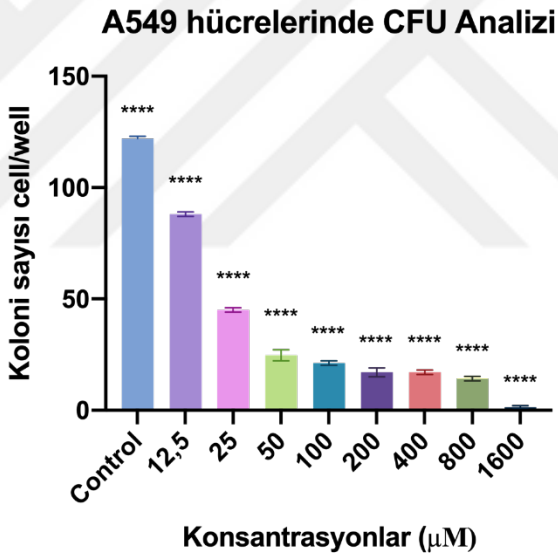
A549 hücrelerine Gemsitabin direnci kazandırılmadan önce CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile A549 hücrelerinin maksimum dayanabildikleri Gemsitabin konsantrasyonu belirlendi. A549 hücrelerinin maksimum dayanabileceği en yüksek doz seçimi gerçekleştirildi. Yapılan CFU analizinde Tablo 4.1.'de de belirtildiği üzere 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 µM dozları uygulandı ve kontrol hücrelerine göre %50 inhibisyon 12,5 µM ile 25 µM arasında olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3). Bu nedenle direnç kazandırma işlemi 12,5 µM dozdan başlandı. Daha yüksek dozlar uygulandığında koloni sayı ve boyutlarında herhangi bir gelişme gözlenmedi. 12,5 µM Gemsitabin ile 72 saat süresince maruz kalan A549 hücrelerinin oluşturdukları direnç koloni morfolojileri Şekil 4.4-A'da görülmektedir.



Şekil 4. 2. A549 hücrelerinde farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında oluşan kolonilerin CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile gösterimi. 1600 µM doz (I) görüntüsünde koloni oluşumu gözlenmez iken IC_{50} dozuna göre oldukça yüksek olan 12,5 µM (B) dozunda sağlıklı ve belirgin koloniler izlendi.

Tablo 4. 1. A549 hücrelerinde farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile elde edilen koloni sayıları.

Konsantrasyon (µM)	CFU
Kontrol	122
12,5	88
25	45
50	25
100	21
200	17
400	17
800	14
1600	1

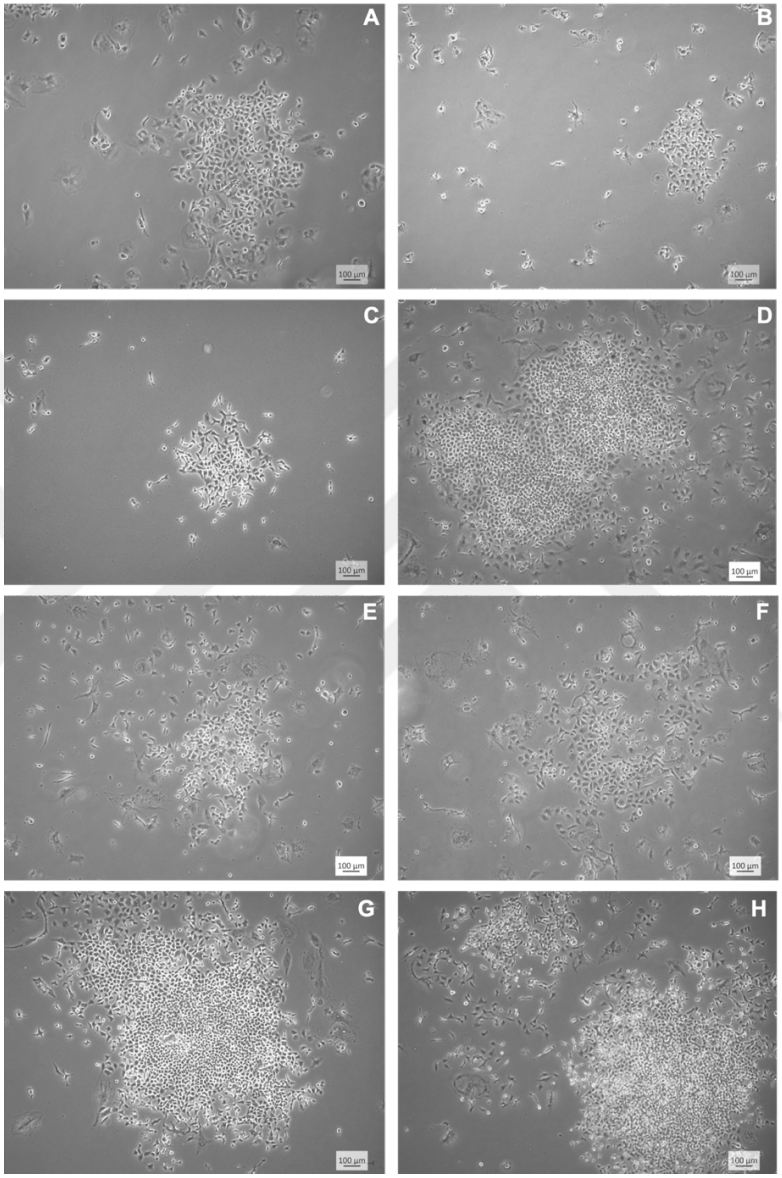


Şekil 4. 3. A549 hücrelerinde farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile elde edilen kolonilerin istatiksel analizi ($p<0.0001$****)

4.2.2. A549 hücrelerine Gemsitabin direnci oluşturulması

CFU analizi ile belirlenen 12,5 µM Gemsitabin dozu A549 hücrelerine uygulandıktan 72 saat sonra direnç oluşturan koloniler ışık mikroskobu altında incelendi. 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 µM dozları için sırasıyla A549 hücrelerinin geliştirdikleri direnç koloniler Şekil 4.4'de belirtilmiştir. İlk veriler elde

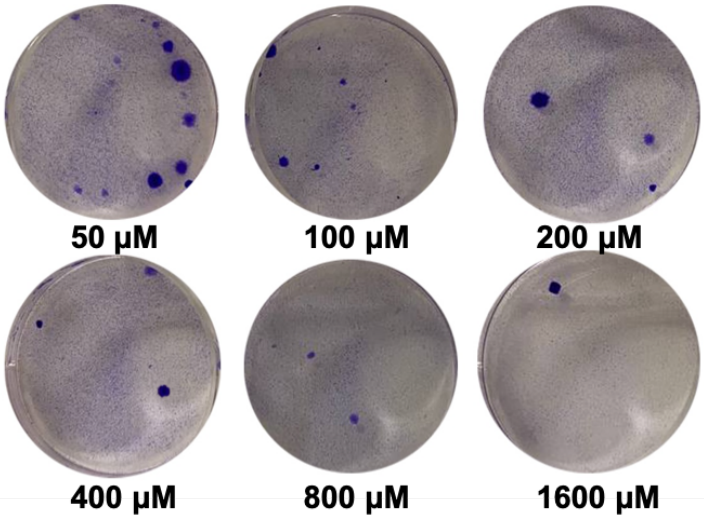
edildikten sonra sağlıklı ve belirgin koloni oluşturabilen en yüksek doz ile a549 hücre hattının dirençli hat haline indüksiyon çalışmalarına devam edilerek d-A549 hücre hattı elde edildi. Ortalama 15 ay sonunda 1600 µM'lık doz kullanılarak d-A549 hücre hattı elde edilmiştir.



Şekil 4. 4. A549 hücrelerinde her bir Gemsitabin dozu uygulaması sonrasında direnç geliştiren kolonilerinin faz kontrast invert mikroskobik görüntüsü **A:**12,5 µM, **B:** 25 µM, **C:** 50 µM, **D:** 100 µM, **E:** 200 µM, **F:** 400 µM, **G:** 800 µM, **H:** 1600 µM dozlarında hücre koloni görüntüleri. **H:** 1600 µM dozlarında izlenen belirgin ve sağlıklı koloniler (ölçü çubuğu 100 µm).

4.2.3. Gemsitabin direnci geliştirilen hücrelerde CFU Analizi

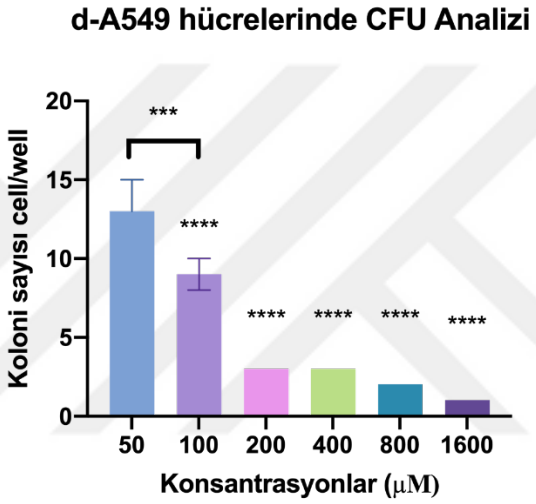
A549 hücrelerine 15 ay süresince Gemsitabin muamelesi sonucunda oluşturulan 1600 µM dirençli hücre gruplarında ikinci kez CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile dirençli ancak belirgin ve sağlıklı koloni morfolojisini göstermek için gerçekleştirildi. 50, 100, 200, 400, 800, 1600 µM Gemsitabin ile muamele edilen hücrelerin 15. Günün sonunda geliştirdikleri koloni morfolojileri Şekil 4.4.de belirilmiştir. CFU analizine göre geliştirilen koloni sayı ve boyutlarının doz arttıkça arttığı izlenmektedir. (Tablo 4.2 ve Şekil 4.5). Bu nedenle direnç kazandırma işlemi başarı ile gerçekleştiğinden kanser kök hücre izolasyon işlemlerine geçildi.



Şekil 4. 5. Gemsitabin dirençli A549 hücrelerinde farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında oluşan kolonilerin CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile gösterimi. 1600 µM dozun uygulandığı kuyucukta genel olarak koloni oluşumu net olarak gözlenmezken az sayıda kuyucukta 1 adet sağlıklı ve belirgin koloni izlendi.

Tablo 4. 2. Gemsitabin dirençli A549 hücrelerinde CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile elde edilen koloni sayıları.

Konsantrasyon (µM)	CFU
50	11
100	8
200	3
400	3
800	2
1600	1



Şekil 4. 6. Dirençli A549 hücrelerinin maksimum dayanabildikleri Gemsitabin konsantrasyonu belirlemek için gerçekleştirdiğimiz koloni oluşturma potansiyeli (CFU) analizinde CFU analizi ve histokimyasal olarak kristal viyole boyaması ile elde edilen koloni sayılarının istatiksel analizi ($p<0.0001$****). Farklı dozlarda Gemsitabin maruziyeti sonrasında 100 µM dozda 50 µM ile karşılaştırıldığında daha az sayıda koloni izlendi ($p<0.0002$***). 100, 200, 400, 800, 1600 µM dozları 50 µM ile karşılaştırıldığında daha az sayıda koloni izlendi ($p<0.0001$****). Sonuç olarak bu analizde A549 hücrelerinin maksimum dayanabildikleri Gemsitabin konsantrasyonu 1600 µM olarak belirlendi.

4.3. Dirençli ve dirençsiz A549 hücrelerinden CD326+CD133+CD44+ Akciğer Kanser Kök Hücrelerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tümörsferik kültürü

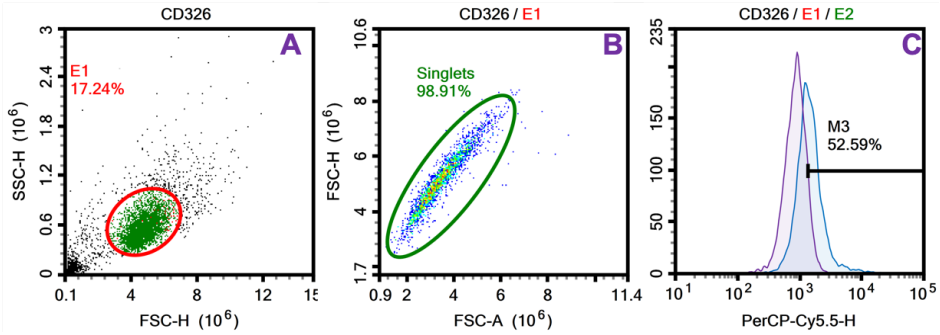
Dirençli ve dirençsiz A549 hücrelerinden CD326$^+$ CD133$^+$ ve CD44$^+$ akciğer kanser kök hücrelerin izolasyonu, manuel yöntem ile immunselektif olarak ve kitte kullanılan kitlerin boyutları kullanılarak filtrasyon-kolon yöntemi ile üç aşamada gerçekleştirildi. Her aşamada verimlilik için canlılık ve saflılık analizleri gerçekleştirilerek tamamlandı.

4.3.1. Dirençsiz CD326+CD133+CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin izolasyon verimliliğinin immunofenotipik olarak karakterizasyonu

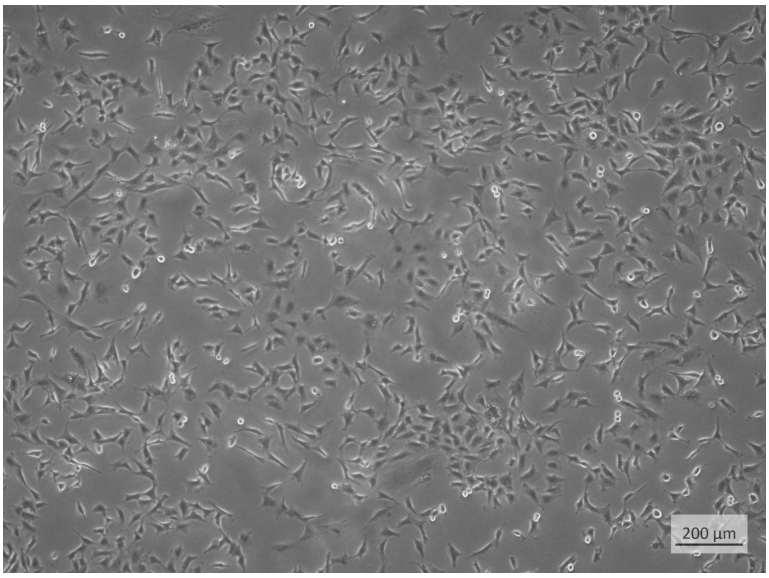
İzolasyon verimliliği izole edilen hücrelerin canlılık ve saflılık yüzdeleri belirlenerek canlılık %15 ve üzeri belirteçler için %35 ve üzeri verimli bulunarak deneylere devam edildi.

4.3.1.1. CD326+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

CD326$^+$ izolasyonu gerçekleştirildikten sonra izolasyon verimliliği için flow sitometri ile immunofenotipik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre CD326 pozitifliği %52.59 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). İzole edilen CD326$^+$ hücrelerinin morfolojileri ışık mikroskobu altında görüntülenmişlerdir. (Şekil 4.8) İzolasyonun başarısı kanıtlandıktan sonra CD133 izolasyon işlemine geçilmiştir.



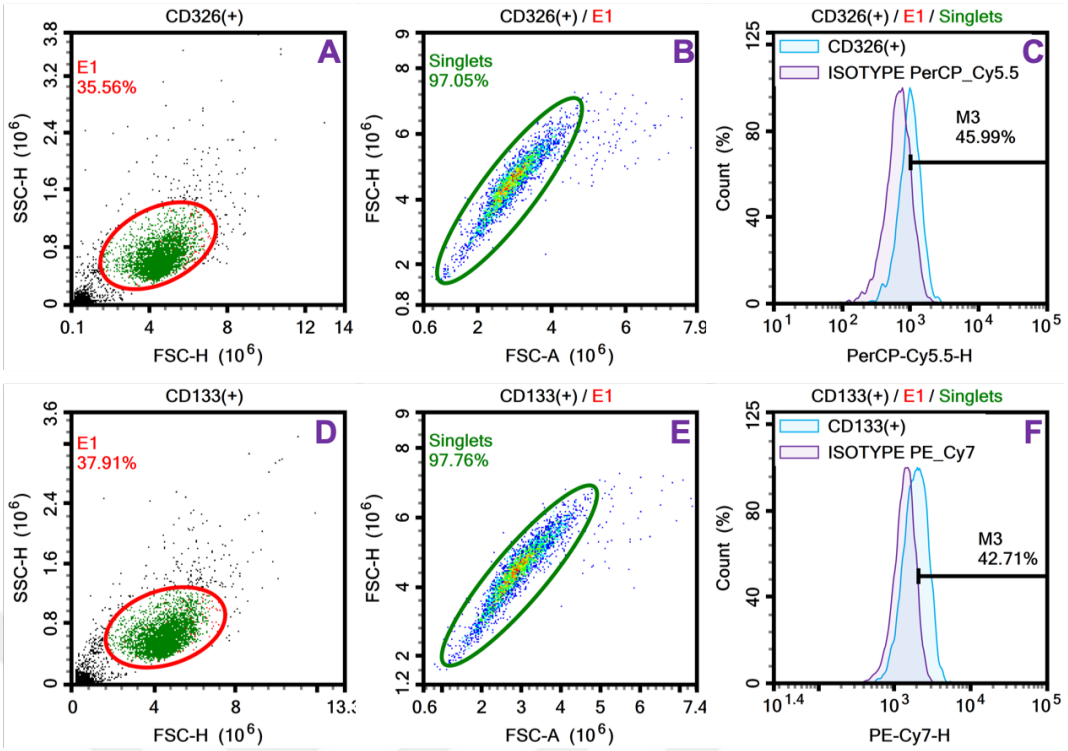
Şekil 4. 7. İzolasyonun birinci aşamasında; A549 hücrelerinden CD326$^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. **A:** CD326$^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %17.24 oranında canlılık belirlendi. **C:** İzolasyon sonrası CD326$^+$ pozitifliği %52.59 olarak izlendi.



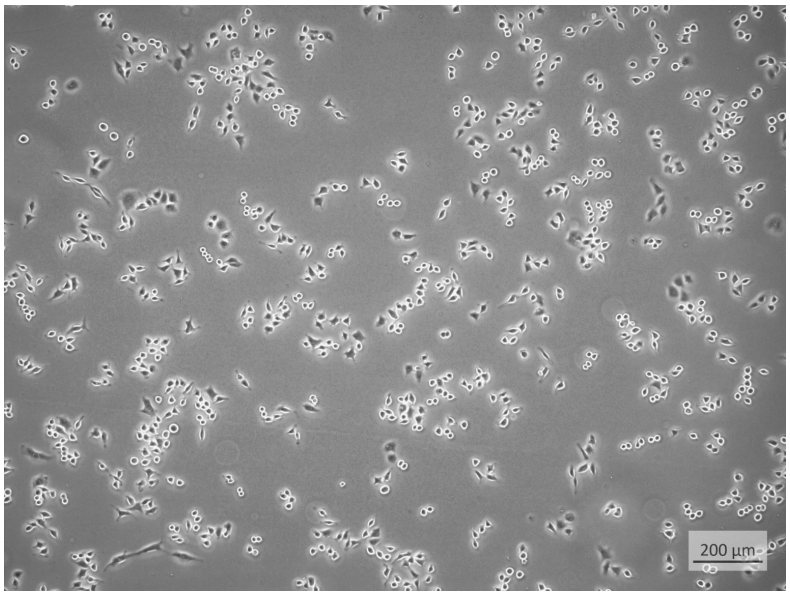
Şekil 4. 8. A549 hücrelerinden elde edilen $CD326^+$ hücre izolasyonunun birinci aşaması sonrası hücrelerin faz kontrast invert mikroskobik görüntüsü (ölçü çubuğu = 200 µm).

4.3.1.2. CD133+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

$CD133^+$ izolasyonu gerçekleştirildikten sonra izolasyon verimliliği için flow sitometri ile immunofenotipik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre CD133 pozitifliği %42.71 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Ayrıca CD326 pozitifliğinin devam ettiğini göstermek için gerçekleştirilen immunofenotipik analizde pozitiflik %45.99 olarak bulunmuştur. Böylece kültür boyunca CD326 pozitifliğin de devam ettirildiği gösterilmiştir. İzole edilen dirençsiz $CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinin morfolojileri ışık mikroskobu altında görüntülenmişlerdir. (Şekil 4.10) İzolasyonun başarısı kanıtlandıktan sonra CD44 izolasyon işlemine geçilmiştir.



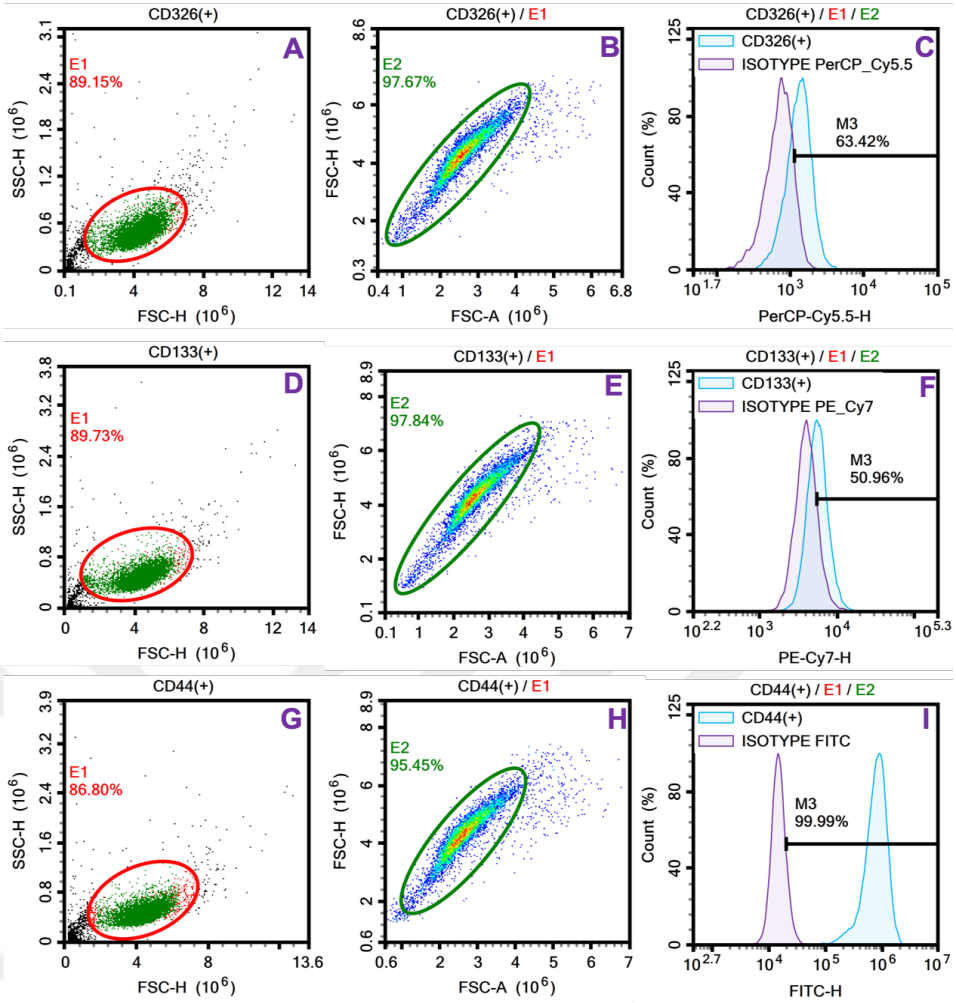
Şekil 4. 9. CD326^{+} hücrelerinden CD133^{+} hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. **A:** CD326^{+} ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %35.56 oranında canlılık belirlendi. **C:** İzolasyon sonrası CD326^{+} pozitifliği (%45.99); **D:** CD133^{+} ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %37.91 oranında canlılık belirlendi. **F:** İzolasyon sonrası CD133^{+} pozitifliği (%42.71) olarak izlendi.



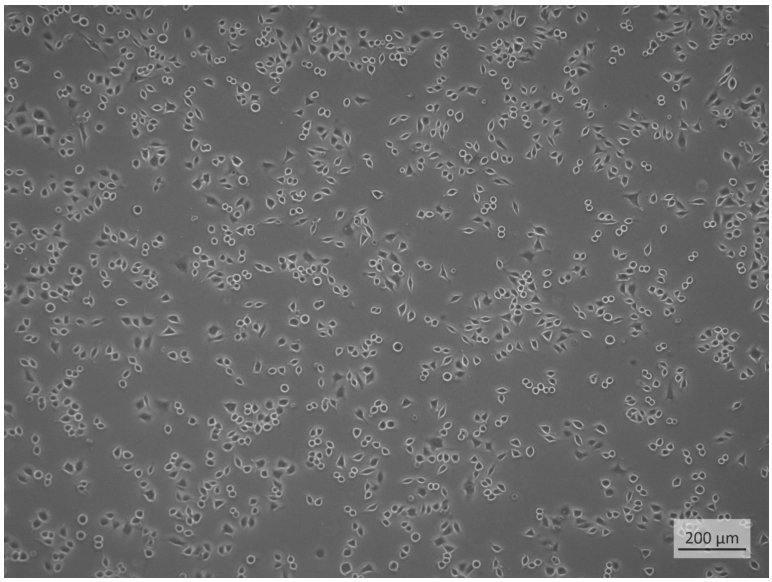
Şekil 4. 10. $CD326^+$ hücrelerinden elde edilen $CD133^+$ hücre izolasyonu sonrası $CD326^+$ ve $CD133^+$hücrelerinin faz kontrast invert mikroskobik görüntülenmesi (ölçü çubuğu = 200 µm).

4.3.1.3. CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

$CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinden $CD44^+$ izolasyonu gerçekleştirildikten sonra izolasyon verimliliği için flow sitometri ile immunofenotipik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre CD44 pozitifliği %99.99 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11). Ayrıca CD326 ve CD133 pozitifliğinin devam ettiğini göstermek için gerçekleştirilen immunofenotipik analizde pozitiflikler sırasıyla %63.42 ve %50.96 olarak bulunmuştur. Böylece kültür boyunca CD326 ve CD133 pozitifliklerinin de korunduğu gösterilmiştir. İzole edilen dirençsiz $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ hücrelerinin morfolojileri ışık mikroskobu altında görüntülenmişlerdir. (Şekil 4.12)



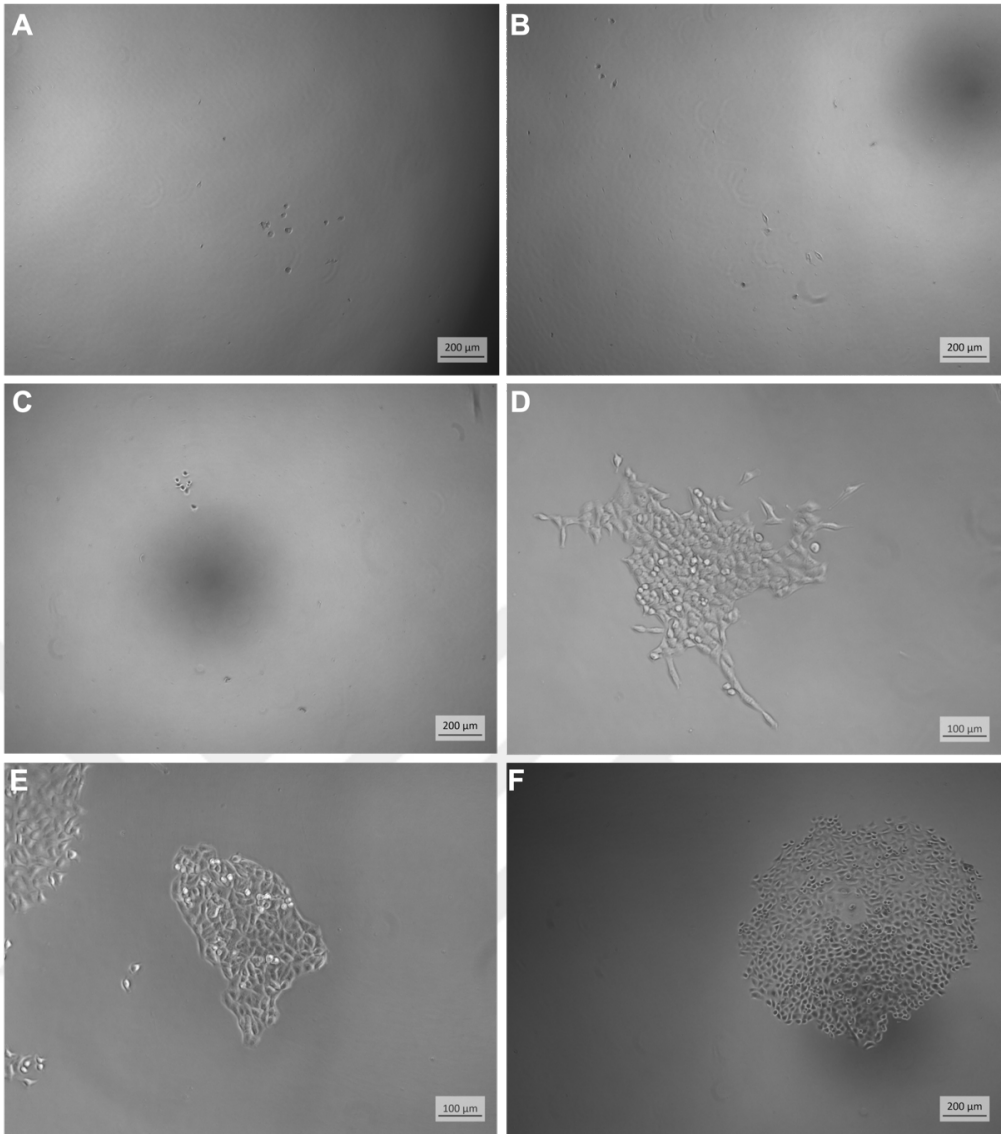
Şekil 4. 11. $CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinden $CD44^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. **A:** $CD326^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %89.15 oranında canlılık belirlendi. **C:** İzolasyon sonrası $CD326^+$ pozitifliği (%63.42); **D:** $CD133^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %89.73 oranında canlılık belirlendi. **F:** İzolasyon sonrası $CD133^+$ pozitifliği (%50.96); **G:** $CD44^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %86.80 pozitiflik belirlendi. **I:** İzolasyon sonrası $CD44^+$ pozitifliği (%99.99)



Şekil 4. 12. $CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinden elde edilen $CD44^+$ hücre izolasyonu sonrası $CD326^+$ $CD133^+CD44^+$ hücrelerinin faz kontrast invert mikroskobik görüntülenmesi (ölçü çubuğu = 200 µm).

4.3.2. Dirençli A549 Akciğer kanser hücrelerinin saflaştırılması için single cell analizi

A549 hücrelerine daha önceden bahsedilen yöntemlerle direnç kazandırıldıktan sonra yaptığımız kültürler sırasındaki morfolojik analizlerle heterojen bir hücre hattı elde ettiğimizi belirledik. Bu nedenle hücre hattını homojen bir hale getirebilmek için single cell analizi yapılarak homojen bir hücre grubu elde edildi. Bu amaçla 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 1-10 adet hücre gelecek şekilde ekilip 1-10 adet hücre olan kuyucukların günlük morfolojik takibi yapılarak koloni oluşan kuyucuklardaki hücreler ile kültüre devam edilerek dirençli A549 hücrelerinden tek hücreden oluşturulmuş dolayısıyla saflaştırılımış homojenize hücre grubu başarıyla elde edilmiştir. 7-8. günün sonunda direnç kolonisi gelişen kuyucuklar işaretlenmiş ve faz kontrast invert mikroskop altında görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.13). 15 günün sonunda hızla büyüyen en az 50 hücreden oluşan belirgin sınırlara sahip ve canlı koloni görüntüsünde (hiç ya da çok az koyu renkli bölge) olan koloniler pasajlanarak deneyler için yeterli sayıya ulaşana dek çoğaltıldı.



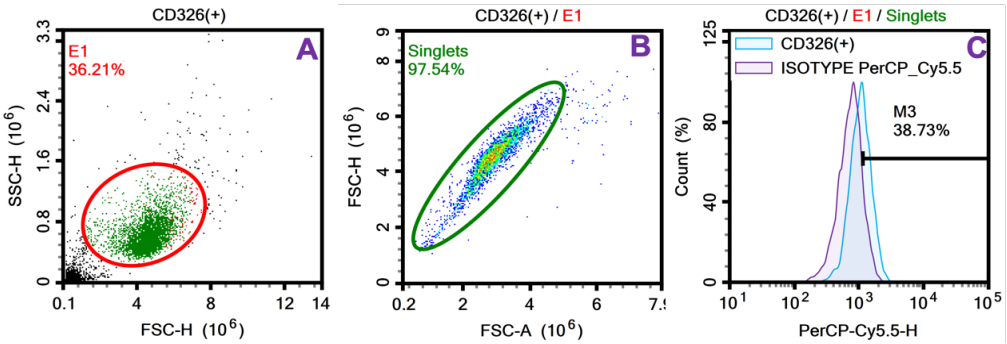
Şekil 4. 13. Dirençli A549 hücreleri için yapılan single cell izolasyonunda faz kontrast ışık mikroskop altındaki görüntüleri. **A, B** ve **C:** 1-10 adet hücre düşen hücrelerin ekim yapıldıktan sonraki sıfırıncı gündeki görüntüsü. D: 7-8. Günlerde oluşan ilk koloni görüntüleri. **E-F:** 15. Gündeki dirençli hücre kolonileri daha belirgin olarak izlendi (ölçü çubuğu = 200 µm).

4.3.3. Dirençli CD326+CD133+CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin izolasyon verimliliğinin immunofenotipik karakterizasyonu

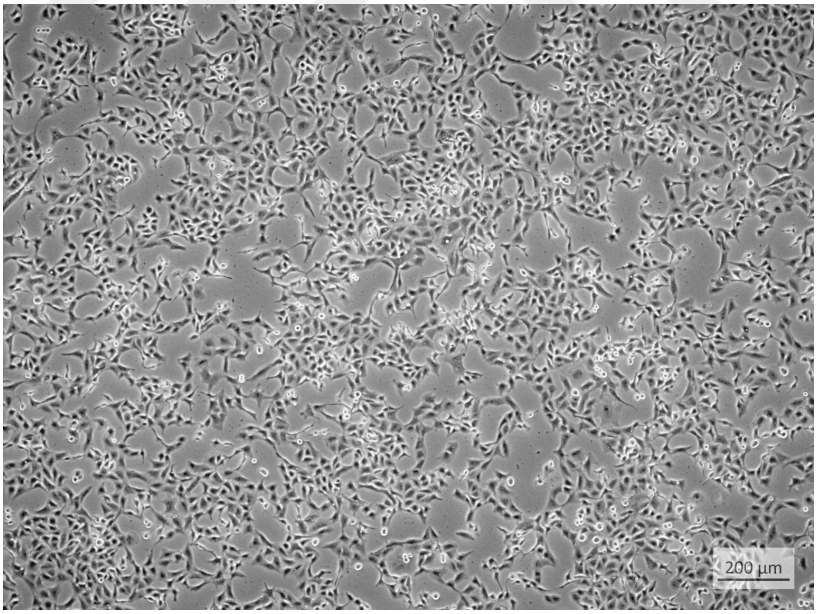
4.3.3.1. CD326+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

Gemsitabin dirençli A549 hücrelerinden $CD326^{+}$ izolasyonu gerçekleştirildikten sonra izolasyon verimliliği için flow sitometri ile

immunofenotipik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre CD326 pozitifliği %38.73 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14). İzole edilen CD326$^+$ hücrelerinin morfolojileri ışık mikroskobu altında görüntülenmişlerdir. (Şekil 4.15) İzolasyonun başarısı kanıtlandıktan sonra CD133 izolasyon işlemine geçilmiştir.



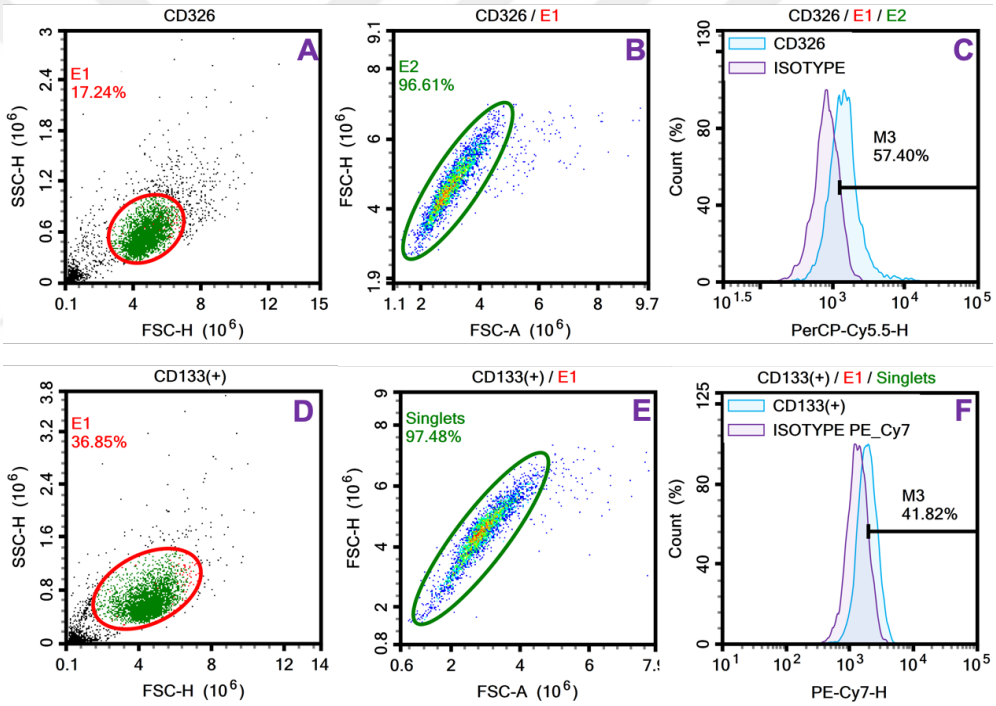
Şekil 4. 14. İzolasyonun birinci aşamasında; d-A549 hücrelerinden CD326$^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. **A:** CD326$^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %36.21 oranında canlılık belirlendi. **C:** İzolasyon sonrası CD326$^+$ pozitifliği %38.73 olarak izlendi.



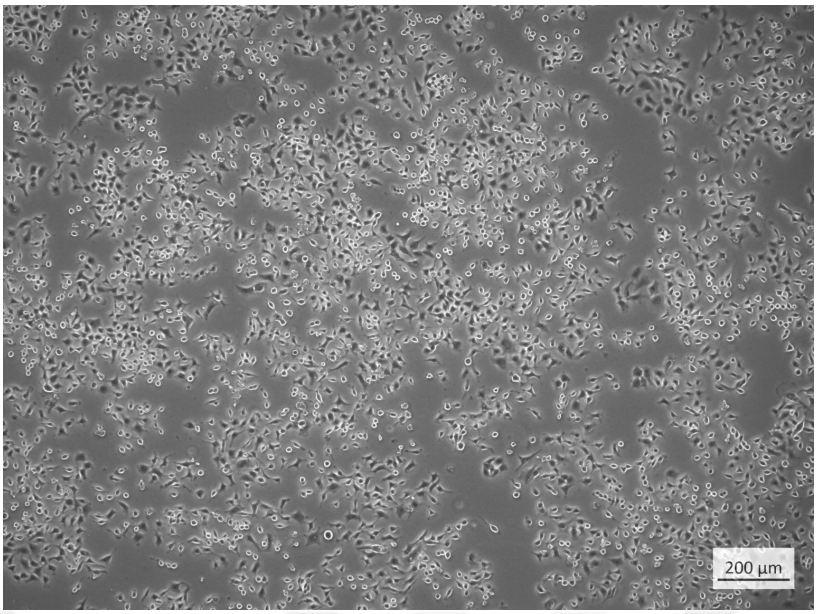
Şekil 4. 15. dA549 hücrelerinden elde edilen CD326$^+$ hücre izolasyonunun birinci aşaması sonrası hücrelerin faz kontrast invert mikroskobik görüntüsü (ölçü çubuğu = 200 µm).

4.3.3.2. CD133+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

Dirençli CD326^{+} hücrelerinden CD133+ izolasyonu gerçekleştirildikten sonra izolasyon verimliliği için flow sitometri ile immunofenotipik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre CD133 pozitifliği %41.82 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16). Ayrıca CD326 pozitifliğinin devam ettiğini göstermek için gerçekleştirilen immunofenotipik analizde pozitiflik %57.40 olarak bulunmuştur. Böylece kültür boyunca CD326 pozitifliğinin de korunduğu gösterilmiştir. İzole edilen dirençsiz CD326^{+} CD133^{+} hücrelerinin morfolojileri ışık mikroskobu altında görüntülenmişlerdir. (Şekil 4.17) İzolasyonun başarısı kanıtlandıktan sonra CD44 izolasyon işlemine geçilmiştir.



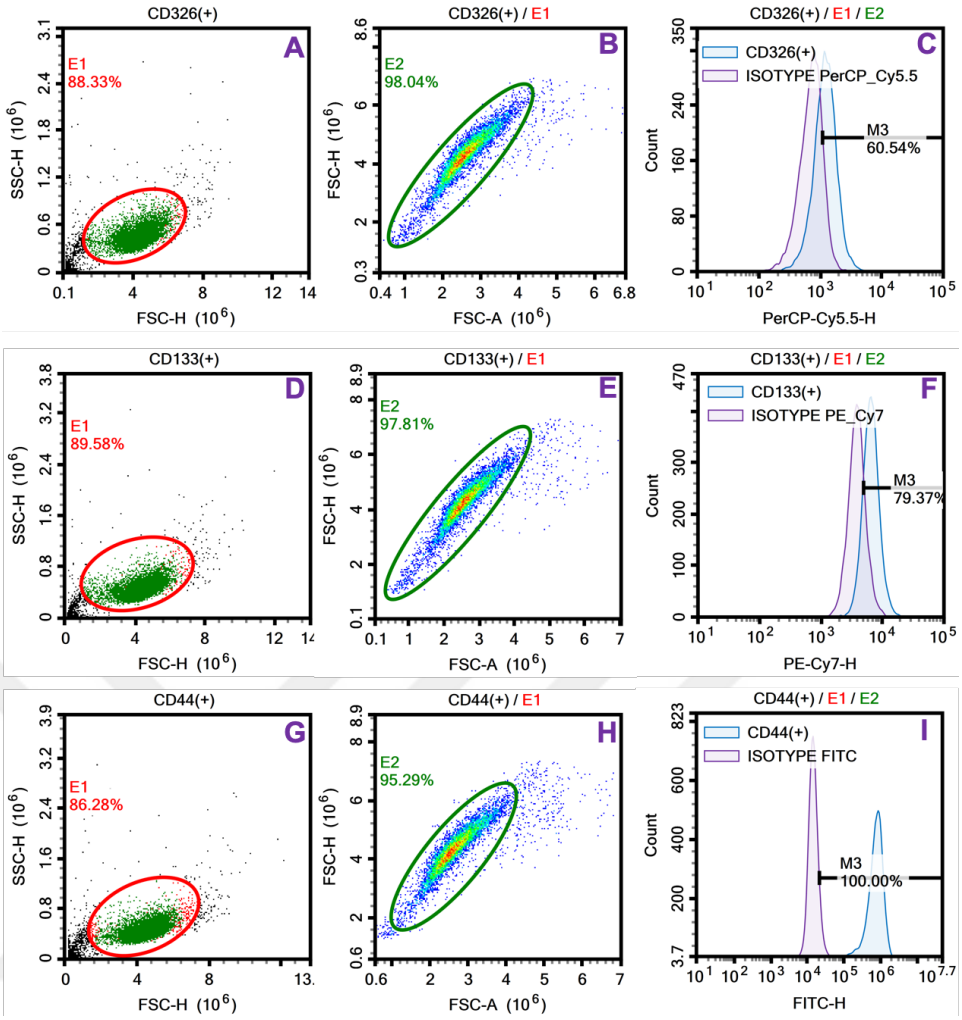
Şekil 4. 16. CD326^{+} hücrelerinden CD133^{+} hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. **A:** CD326^{+} ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %17.24 oranında canlılık belirlendi. **C:** İzolasyon sonrası CD326^{+} pozitifliği (%57.40); **D:** CD133^{+} ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %36.85 oranında canlılık belirlendi. **F:** İzolasyon sonrası CD133^{+} pozitifliği (%41.82) olarak izlendi.



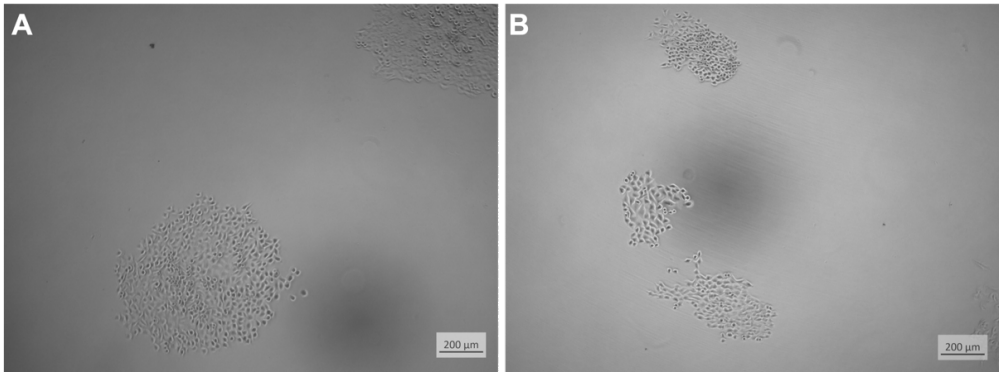
Şekil 4. 17. Dirençli $CD326^+$ hücrelerinden elde edilen $CD133^+$ hücre izolasyonu sonrası $CD326^+$ ve $CD133^+$hücrelerinin faz kontrast invert mikroskobik görüntülenmesi (ölçü çubuğu = 200 µm).

4.3.3.3. CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

Dirençli $CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinden $CD44^+$ izolasyonu gerçekleştirildikten sonra izolasyon verimliliği için flow sitometri ile immunofenotipik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre CD44 pozitifliği %100 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18). Ayrıca CD326 ve CD133 pozitifliğinin devam ettiğini göstermek için gerçekleştirilen immunofenotipik analizde pozitiflikler sırasıyla %60.54 ve %79.37 olarak bulunmuştur. Böylece kültür boyunca CD326 ve CD133 pozitifliklerinin de korunduğu gösterilmiştir. İzole edilen dirençsiz $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ hücrelerinin morfolojileri ışık mikroskobu altında görüntülenmişlerdir. (Şekil 4.19)



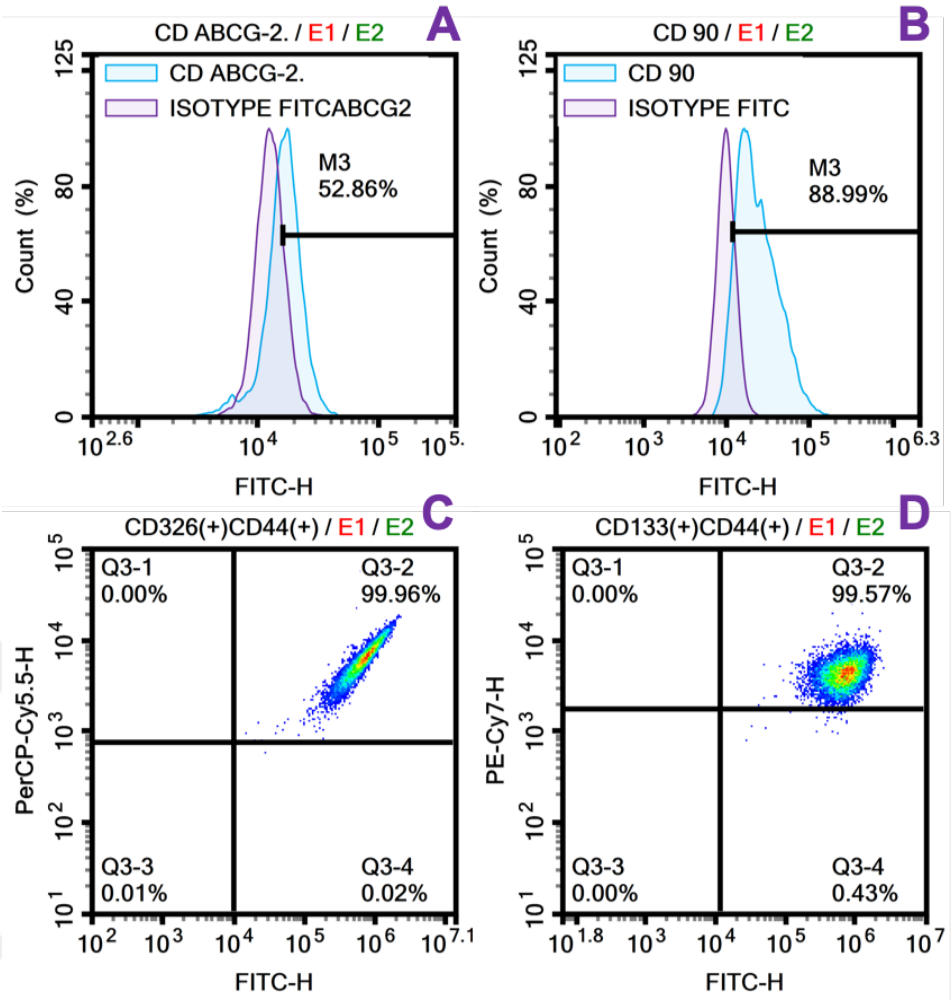
Şekil 4. 18. Dirençli $CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinden $CD44^+$ hücre izolasyonu sonrası izolasyon verimliliğinin flow sitometri ile analizi. **A:** $CD326^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %88.33 oranında canlılık belirlendi. **C:** İzolasyon sonrası $CD326^+$ pozitifliği (%60.54); **D:** $CD133^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %89.58 oranında canlılık belirlendi. **F:** İzolasyon sonrası $CD133^+$ pozitifliği (%79.37); G: $CD44^+$ ilk kapılaması yapılırken elde ettiğimiz sonuca göre %86.28 pozitiflik belirlendi. **I:** İzolasyon sonrası $CD44^+$ pozitifliği (%100.00) olarak izlendi.



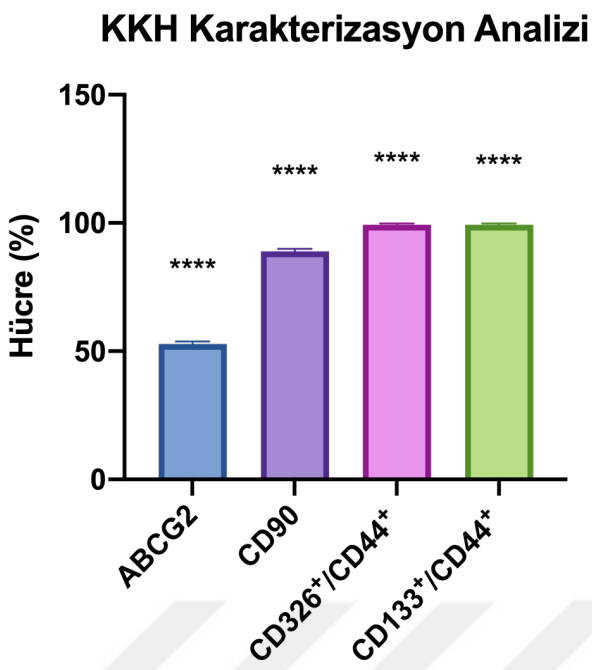
Şekil 4. 19. Dirençli $CD326^+$ $CD133^+$ hücrelerinden $CD44^+$ hücre izolasyonu sonrası faz kontrast ışık mikroskobu altındaki direnç koloni görüntüsü. (ölçü çubuğu = 200 µm). İzolasyondan sonraki dördüncü (B) ve yedinci (A) gününde oluşan koloni görüntüleri.

4.3.4. İzole edilen dirençli ve dirençsiz $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ hücrelerinin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonları

İzole edilen dirençli ve dirençsiz $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ hücrelerinin ileri kanser kök hücre karakterizasyonları için flow sitometri ile ABCG2, CD90 ve $CD326^+/CD44^+$ ve $CD133^+/CD44^+$ beraber poziriflikleri için analizler gerçekleştirilmiştir. $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ hücreler için ABCG2, CD90 ve $CD326^+/CD44^+$ ve $CD133^+/CD44^+$ beraber pozitiflikleri için sırasıyla %52.86, %88.99, %99.96 ve %99.57 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.).

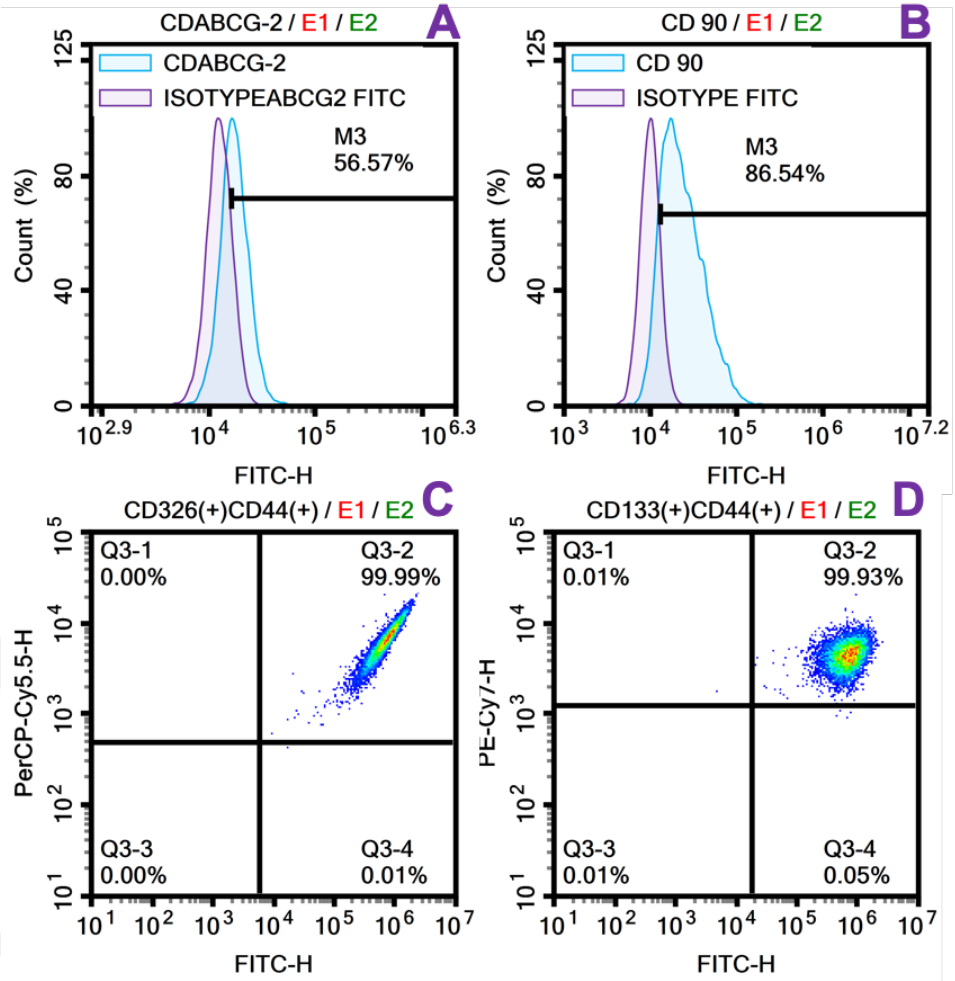


Şekil 4. 20. Dirençsiz $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinin (KKH) flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu. Kanser kök hücrelere özgü immunofenotipik yüzey belirteçleri bakımından ABCG2, CD90 ve $CD326^{+}/CD44^{+}$ ve $CD133^{+}/CD44^{+}$ beraber pozitiflikleri flow sitometri ile gösterilmiştir. **A:** ABCG2 pozitifliği %52.86 olarak **B:** CD90 pozitifliği %88.99 olarak, **C:** $CD326^{+}CD44^{+}$ beraber pozitifliği 99.96 olarak ve **D:** $CD133^{+}$ $CD44^{+}$ beraber pozitifliği %99.57 olarak belirlendi.

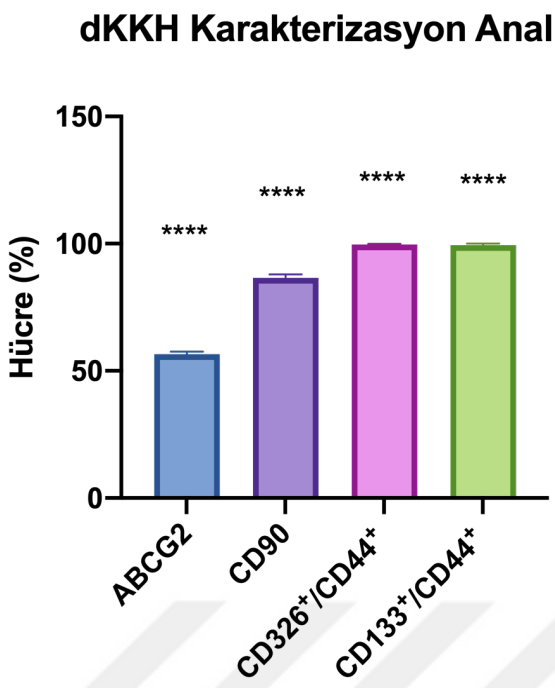


Şekil 4. 21. Dirençsiz $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinin (KKH) flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu verilerinin gösterimi ve istatiksel analizi gerçekleştirildi. Tüm flow sitometrik sonuçlar anlamlı olarak bulundu ($p<0.0001$****).

Dirençli $CD326^{+}$ $CD133^{+}$ $CD44^{+}$ hücreler için yapılan ABCG2, CD90 ve $CD326^{+}/CD44^{+}$ ve $CD133^{+}/CD44^{+}$ beraber pozitiflikleri ise sırasıyla %56.57, %86.54, %99.99 ve %99.93 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23). Hem dirençsiz hem de dirençli kanser kök hücreler için elde edilen pozitifliklere göre KKH oldukları belirlenmiştir.



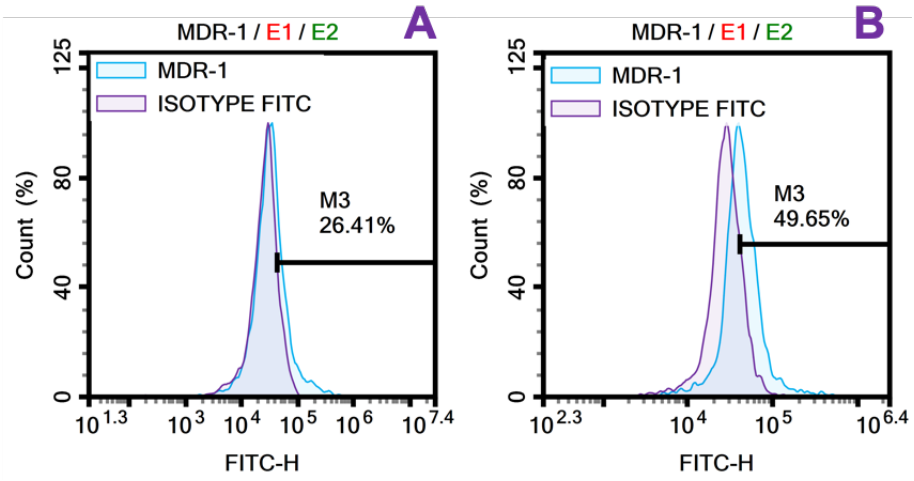
Şekil 4. 22. dirençli $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinin (dKKH) flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu. Kanser kök hücrelere özgü immunofenotipik yüzey belirteçleri bakımından ABCG2, CD90 ve $CD326^{+}/CD44^{+}$ ve $CD133^{+}/CD44^{+}$ beraber pozitiflikleri flow sitometri ile gösterilmiştir. **A:** ABCG2 pozitifliği %56.57 olarak **B:** CD90 pozitifliği %86.54 olarak, **C:** $CD326^{+}CD44^{+}$ beraber pozitifliği 99.99 olarak ve **D:** $CD133^{+}$ $CD44^{+}$ beraber pozitifliği %99.93 olarak belirlendi.



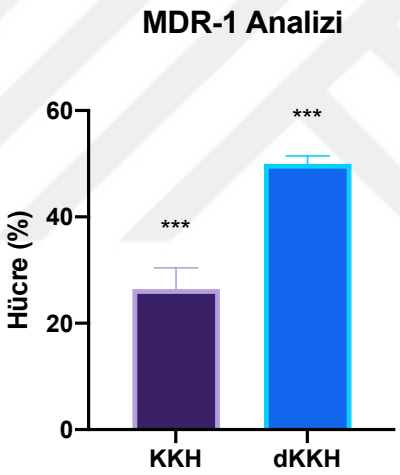
Şekil 4. 23. Dirençli $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinin (KKH) flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu verilerinin gösterimi ve istatiksel analizi gerçekleştirildi. Tüm flow sitometrik sonuçlar anlamlı olarak bulundu ($p<0.0001$****).

4.3.5. Dirençsiz ve dirençli CD326+CD133+CD44+ hücrelerinde MDR1'in flow sitometri ile immunofenotipik analizi

15 ay boyunca Gemsitabin direnci kazandırılarak kanser kök hücre izolasyonu gerçekleştirilen hücrelerde flow sitometri ile immunofenotipik olarak MDR-1 analizi gerçekleştirilmiştir. Dirençsiz ve dirençli $CD326^{+}$ $CD133^{+}$ $CD44^{+}$ (KKH)'lerde MDR-1 pozitifliği sırasıyla %26.41 ve %49.65 olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25) Dirençli KKH'lerin dirençsiz KKH'lere göre 1.87 kat daha fazla MDR-1 eksprese ettiği sonucuna ulaşılmıştır. dKKH'lerin KKH'lere göre daha yüksek MDR1 eksprese ettiği sonucuna ulaşıldı.



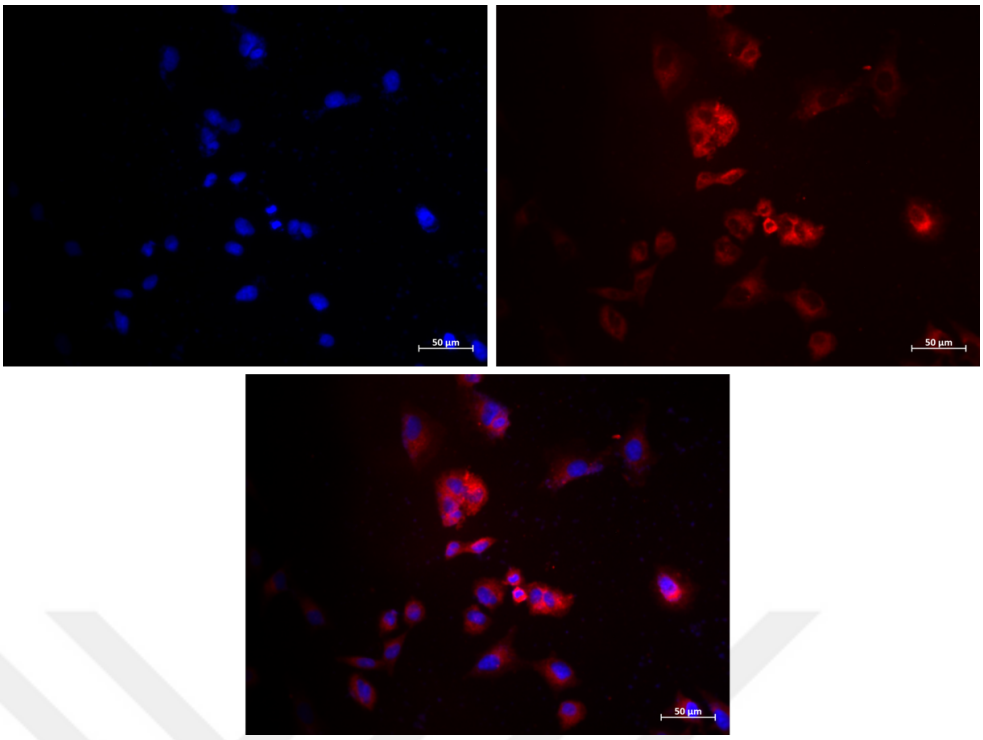
Şekil 4. 24. KKH ve dKKH'lerin MDR1 ekspresyonlarının flow sitometri ile karşılaştırılması. **A:** KKH'lerde MDR1 ekspresyonu %26.41 olarak **B:** dKKH'lerde MDR1 ekspresyonu %49.65 olarak bulundu.



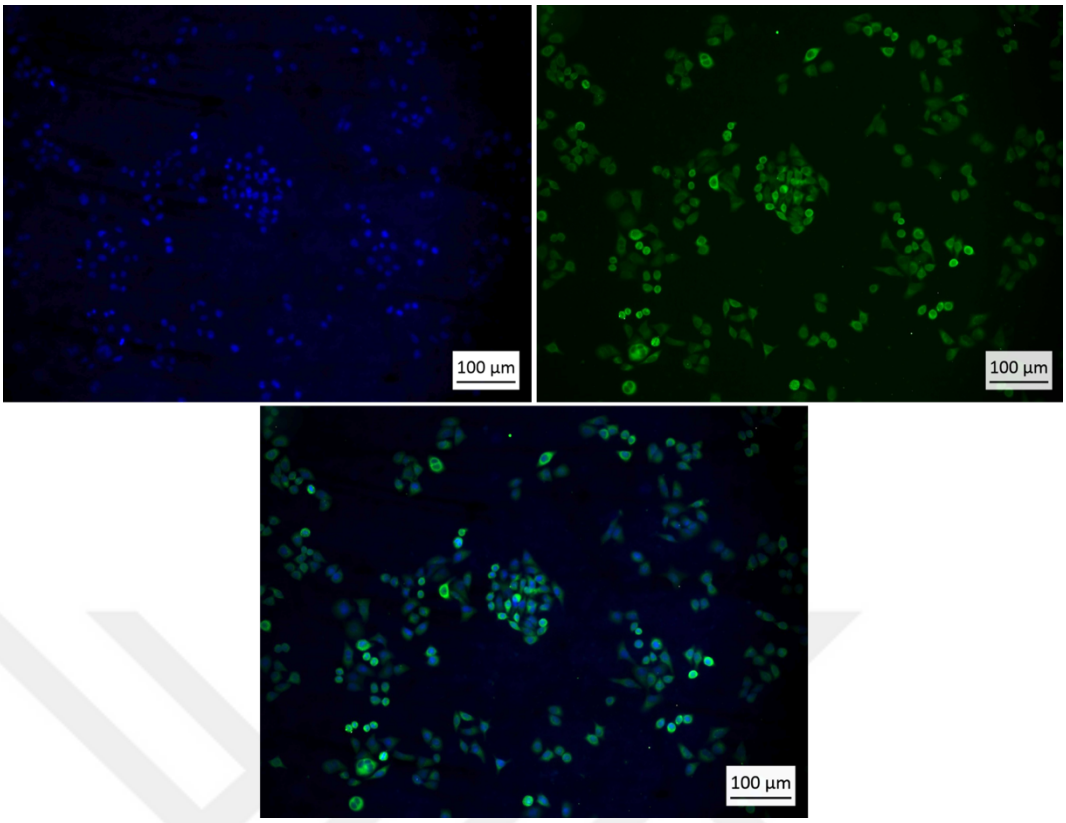
Şekil 4. 25. KKH ve dKKH'lerin flow sitometri ile elde edilen MDR1 ekspresyonları. dKKH'lerin KKH'lere göre daha yüksek MDR1 eksprese ettiği belirlendi ($p<0.0002$***).

4.3.6. Dirençsiz ve dirençli CD326+CD133+CD44+kanser kök hücrelerin immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu

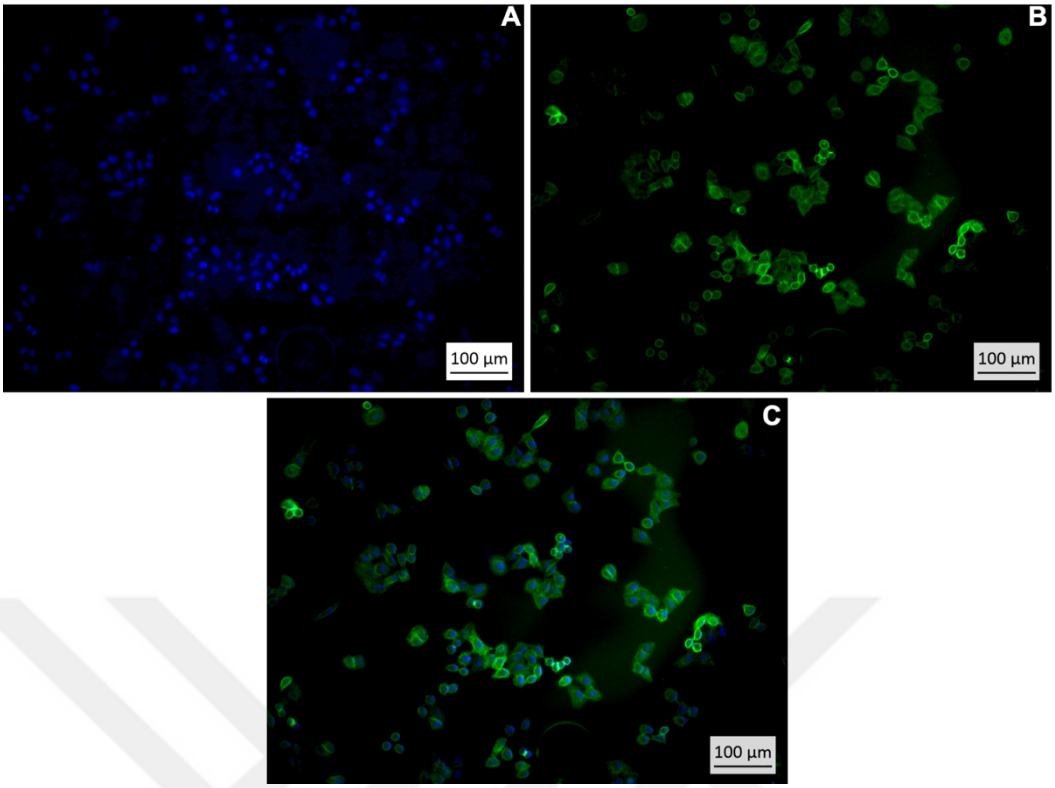
İzolasyonları ve karakterizasyonları gerçekleştirilen KKH için İF işaretleme yöntemi ile ileri karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda ALDH1 (Şekil 4.26), MDR1(Şekil 4.26), ABCG2(Şekil 4.27), CD90(Şekil 4.28) ve CD44(Şekil 4.29) antikor spesifik boyamaları ile floresan mikroskop altında KKH için pozitiflikleri başarıyla gösterilmiştir.



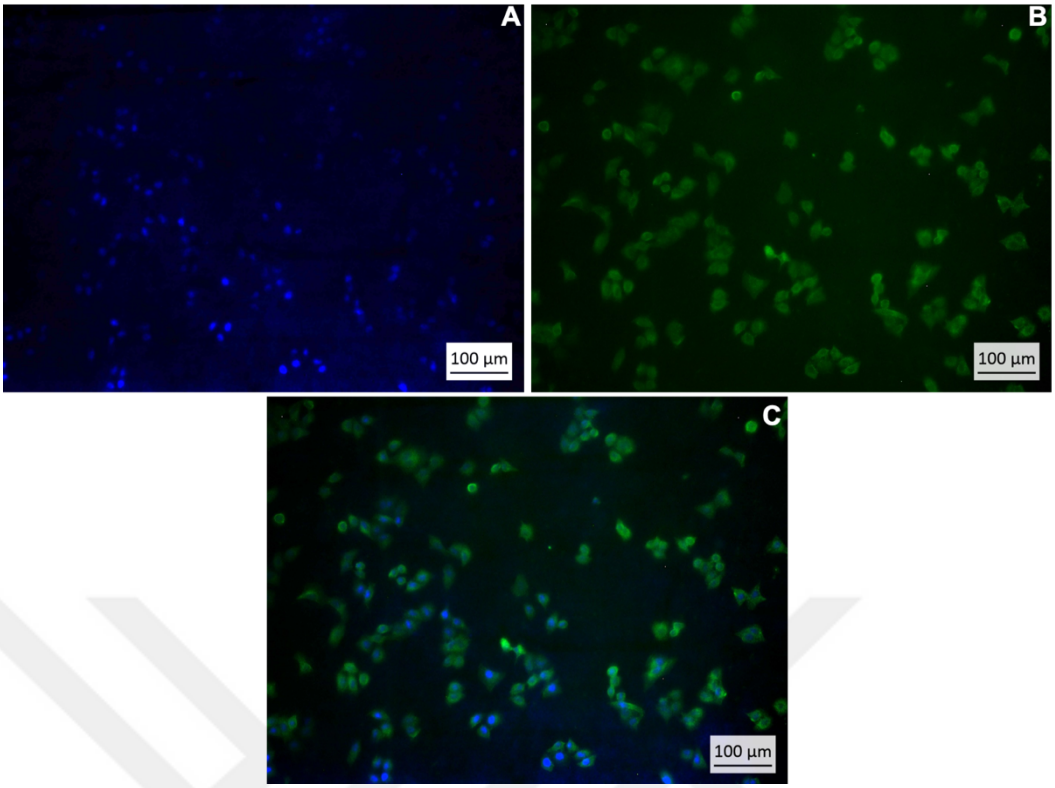
Şekil 4. 26. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. ALDH1 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** ALDH1 (kırmızı) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).



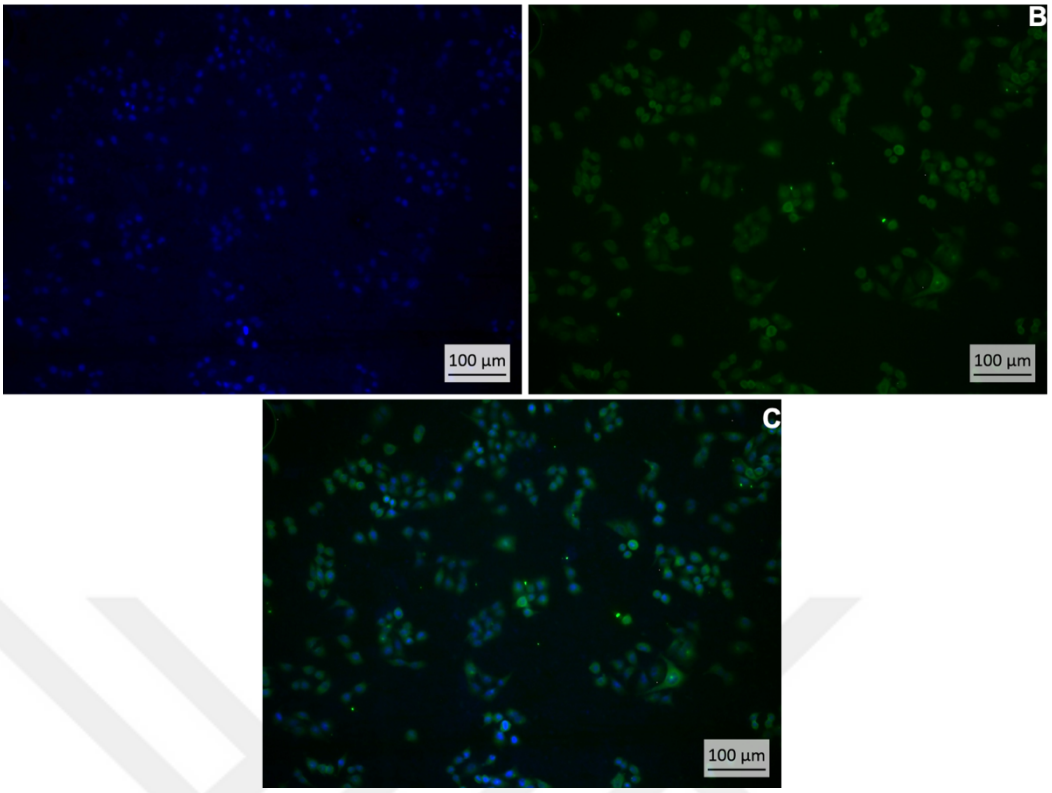
Şekil 4. 27. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. ABCG2 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** ABCG2 (yeşil) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu =100 µm).



Şekil 4. 28. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD44 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** CD44 (yeşil) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).

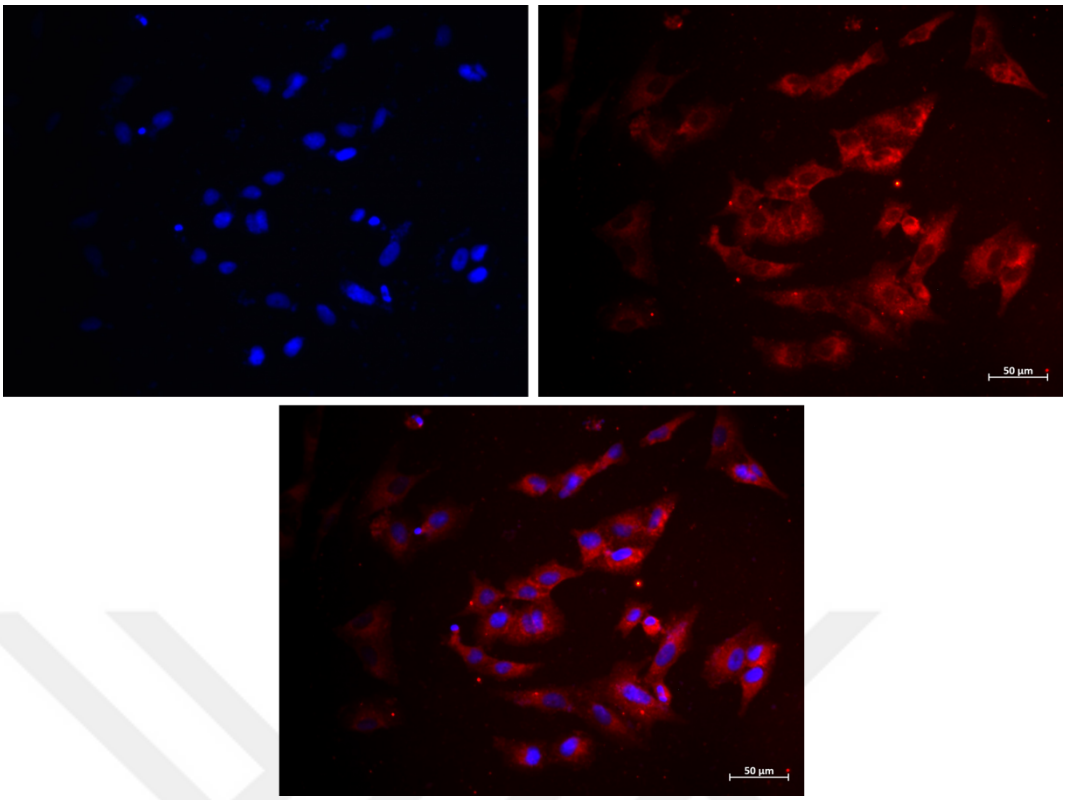


Şekil 4. 29. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD90 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** CD90 (yeşil) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).

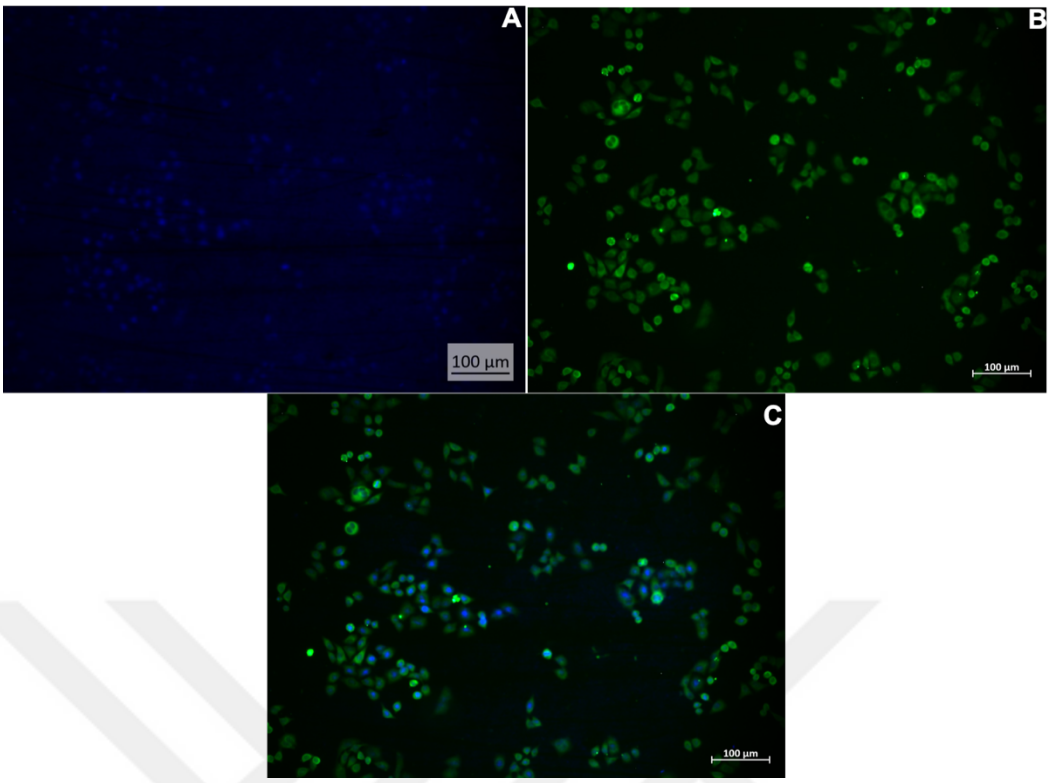


Şekil 4. 30. Dirençsiz CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. MDR1 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** MDR1 (yeşil) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).

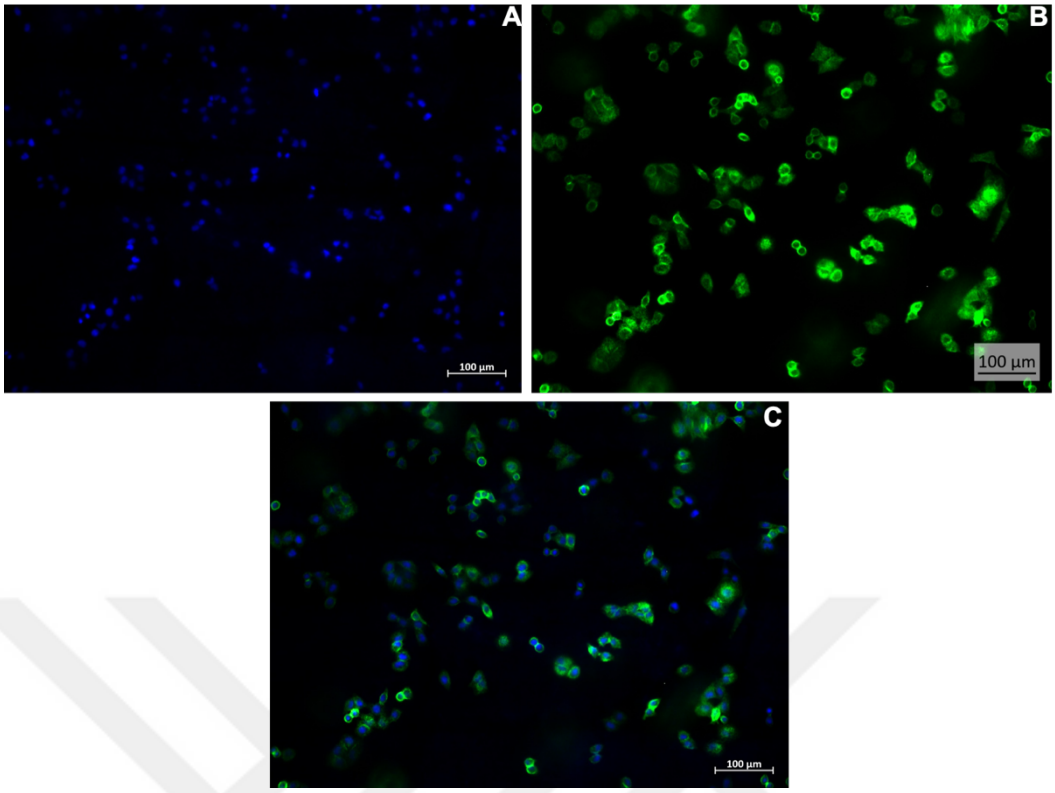
İzolasyonları ve karakterizasyonları gerçekleştirilen dKKH için İF işaretleme yöntemi ile ileri karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda ALDH1 (Şekil 4.31), MDR1 (Şekil 4.32), ABCG2 (Şekil 4.33), CD90 (Şekil 4.34) ve CD44 (Şekil 4.35) antikor spesifik boyamaları ile floresan mikroskop altında KKH için pozitiflikleri başarıyla gösterilmiştir.



Şekil 4. 31. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. ALDH1 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** ALDH1 (kırmızı) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).

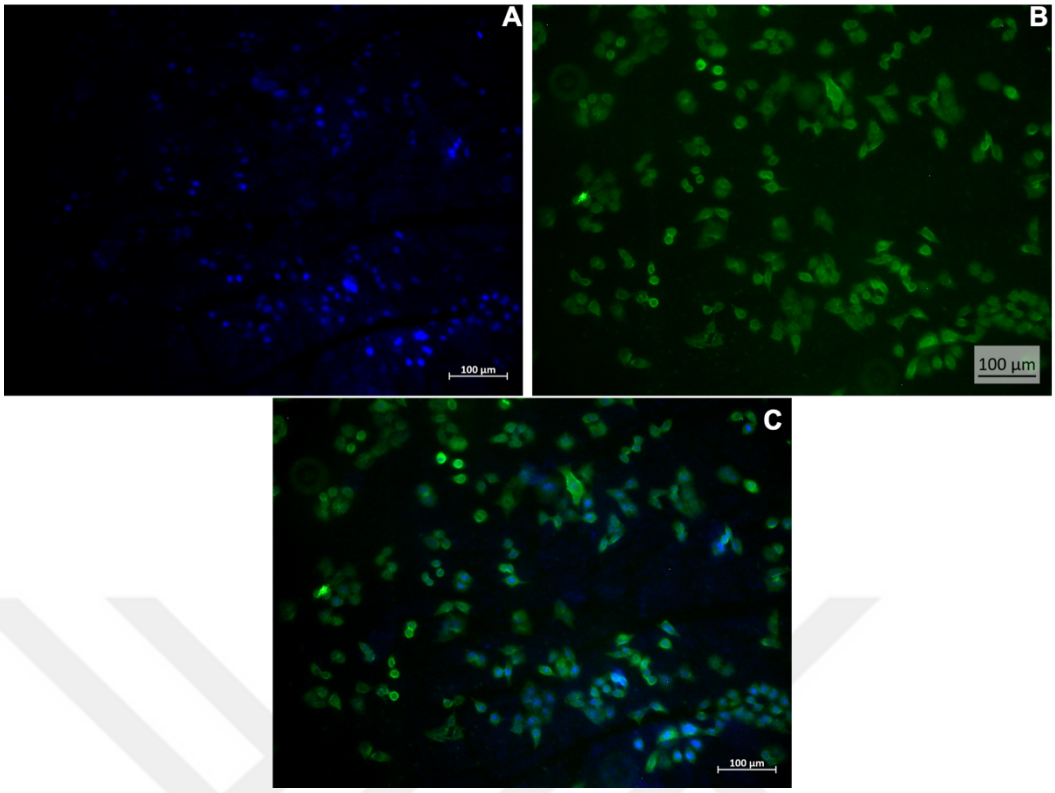


Şekil 4. 32. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. ABCG2 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** ABCG2 (yeşil) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).

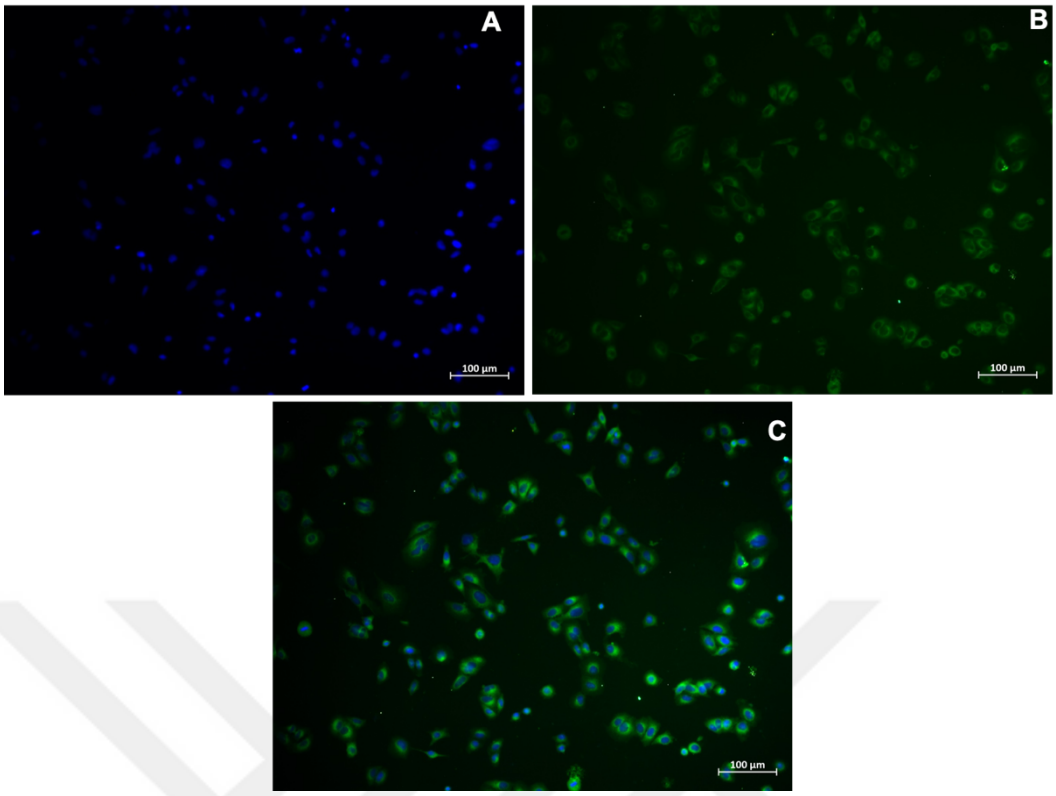


Şekil 4. 33. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD44 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** CD44 (yeşil) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).

s



Şekil 4. 34. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD90 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** CD90 (yeşil) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).



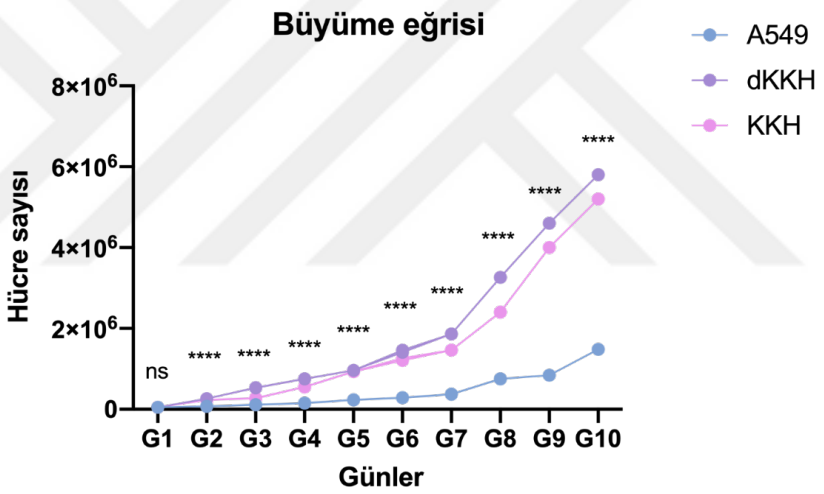
Şekil 4. 35. Dirençli CD326+ CD133+ CD44+ kanser kök hücrelerde immunhistokimyasal analiz ile immunofenotipik karakterizasyonu. MDR1 pozitif hücrelerin immunfluoresan mikroskobik görünümü. **A:** DAPİ (mavi) **B:** MDR1 (yeşil) **C:** Birleştirilmiş (Merge) (ölçü çubuğu = 100 µm).

4.3.7. CD326+CD133+CD44+Akciğer kanser kök hücrelerin büyüme eğrisi

A549, KKH ve dKKH hücrelerinin karakterizasyonu için büyüme eğrisi analizi 10 gün süresince hücre sayımı yaparak gerçekleştirildi. Başlangıçta $5x10^4$ adet ekilen hücrelerin her gün kaldırılıp sayılarak büyüme grafikleri çıkarıldı. A549, KKH ve dKKH'lara ait büyüme eğrileri Şekil 4.36'da verilmiştir. Büyüme eğrisi verilerinin gösterildiği Tablo 4.3'e göre başlangıçta $5x10^4$ adet hücre ekildi.10 günün sonunda A549 hücrelerinin 29,6 kat artarak $148x10^4$ adet hücre sayısına ulaştığı gösterilmiştir. KKH'lerin 10 günün sonunda başlangıç hücre sayısına göre 104 kat, dKKH hücrelerinin ise 116 kat çoğaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre A549 hücrelerine göre 10 günlük KKH ve dKKH hücrelerinin çoğalma hızları sırasıyla 3,51 kat ve 3,9 kat olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 4. 3. A549, KKH ve dKKH hücrelerinin 10 günlük kültür boyunca her gün sayılmasıyla elde edilen hücre sayıları.

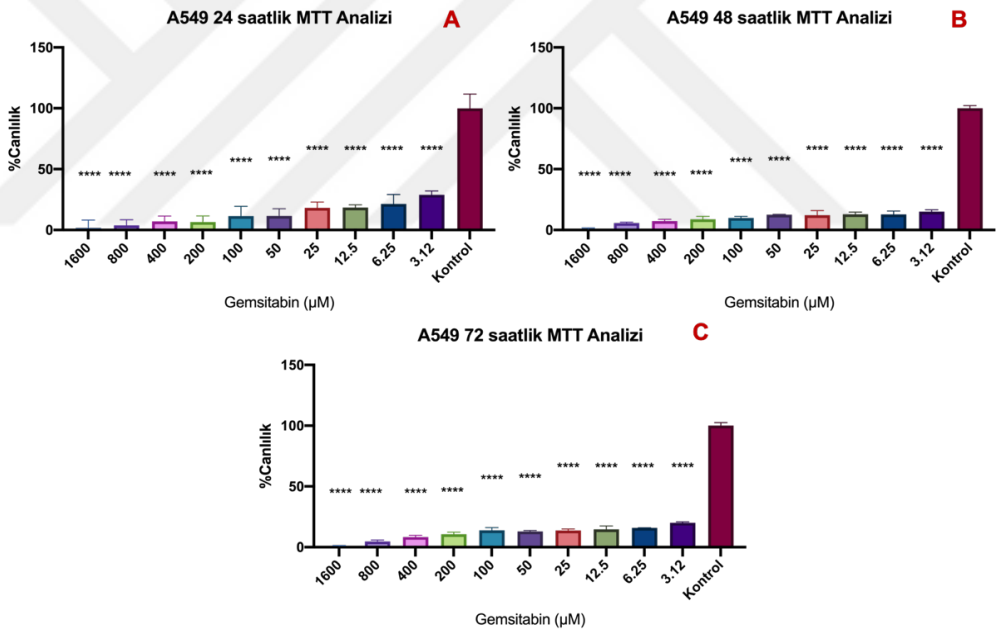
Günler	A549	KKH	dKKH
G1	$5x10^4$	$5x10^4$	$5x10^4$
G2	$7x10^4$	$23x10^4$	$26x10^4$
G3	$11x10^4$	$27x10^4$	$53x10^4$
G4	$15x10^4$	$55x10^4$	$75x10^4$
G5	$23x10^4$	$93x10^4$	$96x10^4$
G6	$28x10^4$	$121x10^4$	$141x10^4$
G7	$37x10^4$	$146x10^4$	$186x10^4$
G8	$75x10^4$	$240x10^4$	$326x10^4$
G9	$84x10^4$	$40x10^5$	$46x10^5$
G10	$148x10^4$	$52x10^5$	$58x10^5$



Şekil 4. 36. A549, KKH ve dKKH hücrelerine ait 10 günlük büyüme eğrisi grafiği ve istatiksel analizi ($p<0.0001$****, $p<0.1234^{ns}$). dKKH'ler, A549 ve KKH'lere göre daha yüksek mitotik aktivasyon ile yüksek oranda büyüme eğrisi gösterdi. KKH'ler ise A549 hücrelerine göre daha yüksek mitotik aktivasyon ile yüksek oranda büyüme eğrisi gösterdiği belirlendi.

4.3.8. A549, Dirençli ve Dirençsiz CD326+CD133+CD44+hücrelerinde sitotoksisite analizi

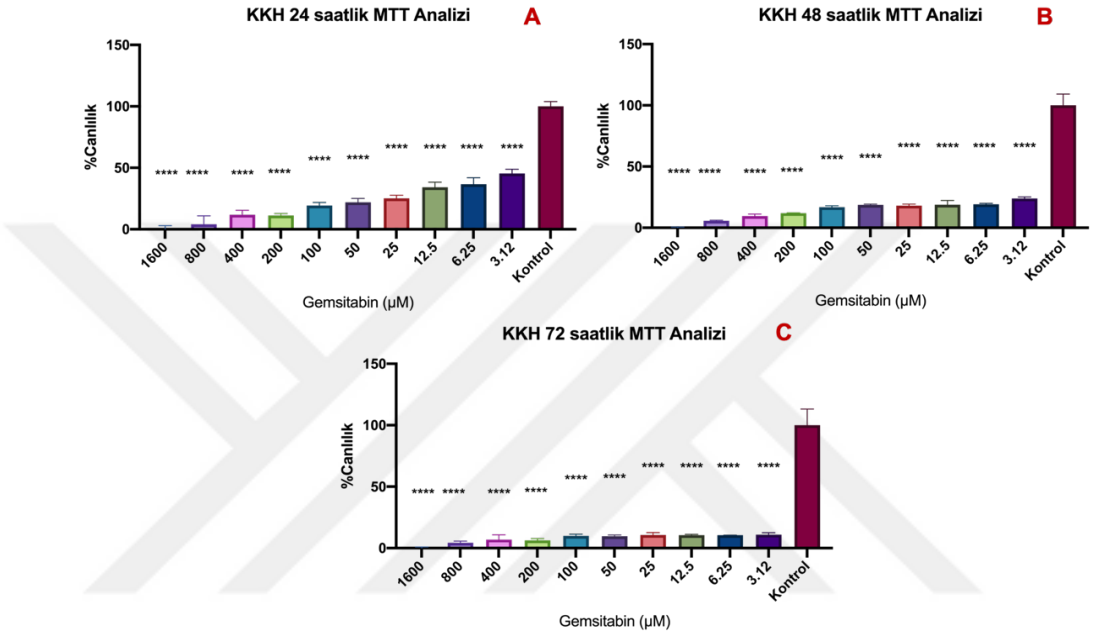
A549, KKH ve dKKH hücrelerinde Gemsitabinin sitotoksik/proliferatif etkisinin belirlenebilmesi için 24, 48 ve 72 saat süresince MTT analizi gerçekleştirilmiştir. A549 hücrelerinde Gemsitabinin 24, 48 ve 72 saatlik etkisi ile elde edilen veriler sırasıyla Şekil 4.37'de sunulmuştur. A549 hücrelerinde gerçekleştirilen analizde 24, 48 ve 72 saatlerde tüm Gemsitabin dozlarında yüksek sitotoksik etki gözlenmiştir. Bulunan sonuçlar kontrol grubuna göre analiz edildiğinde istatiksel olarak yüksek anlamlı olarak hesaplanmıştır ($p<0.0001$). A549 hücrelerinde IC_{50} (%50'sinin inhibe olduğu konsantrasyon, inhibisyon konsantrasyonu) değerleri 24, 48 ve 72. Saatlerde sırasıyla 2.581 (R^2 0.82), 2.140 (R^2 0.88), 2.251 (R^2 0.84) µM olarak hesaplanmıştır. 24, 48 ve 72. saatler arasındaki sonuçlar karşılaştırıldığında önemli bir değişim izlenmemiştir.



Şekil 4. 37. Gemsitabin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan % canlılık verileri. **A:** 24 saatlik analiz sonuçları **B:** 48 saatlik analiz sonuçları **C:** 72 saatlik analiz sonuçları ($p<0.0001$****)(n=6)

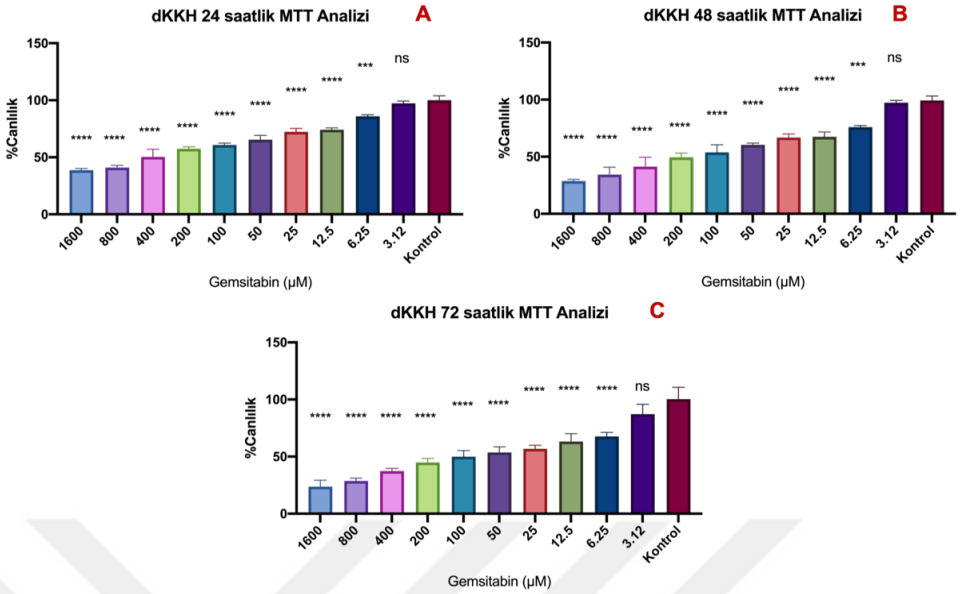
Dirençsiz KKH'lerde Gemsitabin'in 24, 48 ve 72 saatlik etkisi ile elde edilen veriler sırasıyla Şekil 4.38'de sunulmuştur. KKH'lerde gerçekleştirilen analizde 24, 48 ve 72 saatlerde tüm Gemsitabin dozlarında yüksek sitotoksik etki gözlenmiştir. Bulunan sonuçlar kontrol grubuna göre analiz edildiğinde istatiksel olarak yüksek

anlamlı olarak hesaplanmıştır ($p<0.0001$). KKH'lerde IC_{50} değerleri 24, 48 ve 72. Saatlerde sırasıyla 2.238 (R^2 0.78), 2.168 (R^2 0.78), 2.163 (R^2 0.90) µM olarak hesaplanmıştır. Zamana bağlı olarak sitotoksik etkinin düşük dozlarda da artığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca elde edilen IC_{50} değerleri A549 hücrelerindeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir.



Şekil 4. 38. Gemsitabin konsantrasyonlarının dirençsiz KKH'lerde MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri **A:** 24 saatlik analiz sonuçları **B:** 48 saatlik analiz sonuçları **C:** 72 saatlik analiz sonuçları ($p<0.0001$****)(n=6)

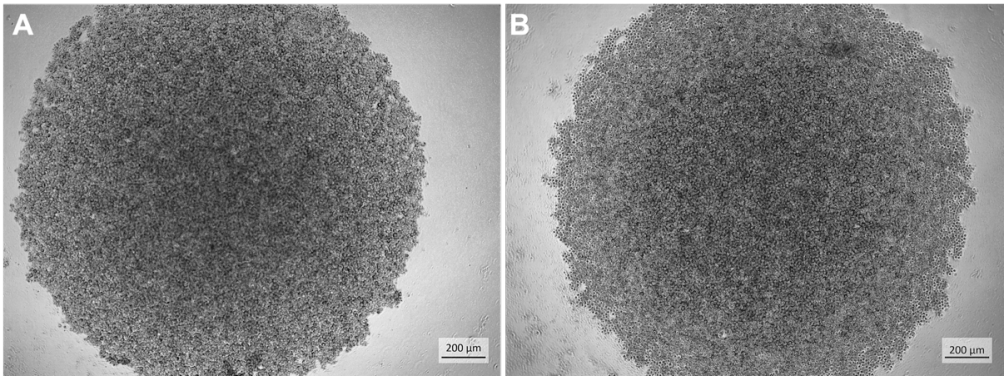
Gemsitabin dirençli KKH'lerde Gemsitabin'in 24, 48 ve 72 saatlik etkisi ile elde edilen veriler sırasıyla Şekil 4.39'da sunulmuştur. dKKH'lerde gerçekleştirilen analizde 24, 48 ve 72 saatlik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre sitotoksik etki göstermiştir. Tüm saatlerde 3.17 µM Gemsitabin dozu haricinde tüm dozlar kontrol grubuna göre yüksek anlamlılık göstermiştir ($p<0.0002$, $p<0.0001$). 3.17 µM Gemsitabin dozu kontrol grubuna göre tüm saatlerde istatiksel olarak "ns" olarak hesaplanmıştır. dKKH'lerde IC_{50} değerleri 24, 48 ve 72. Saatlerde sırasıyla 851,61 (R^2 0.70), 290.652 (R^2 0.86), 331.893 (R^2 0.79) olarak hesaplanmıştır. Zamana bağlı olarak sitotoksik etkinin düşük dozlarda kısmen arttığı ancak A549 ve KKH'de elde edilen sitotoksik dozlar kadar etkili olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. 72. Saatte Gemsitabin direncinin hala devam ettiği görülmektedir.



Şekil 4. 39. Gemsitabin konsantrasyonlarının dirençli KKH'lerde MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri A: 24 saatlik analiz sonuçları B: 48 saatlik analiz sonuçları C: 72 saatlik analiz sonuçları ($p<0.1234^{ns}$, $p<0.0002$***, $p<0.0001$****)(n=6)

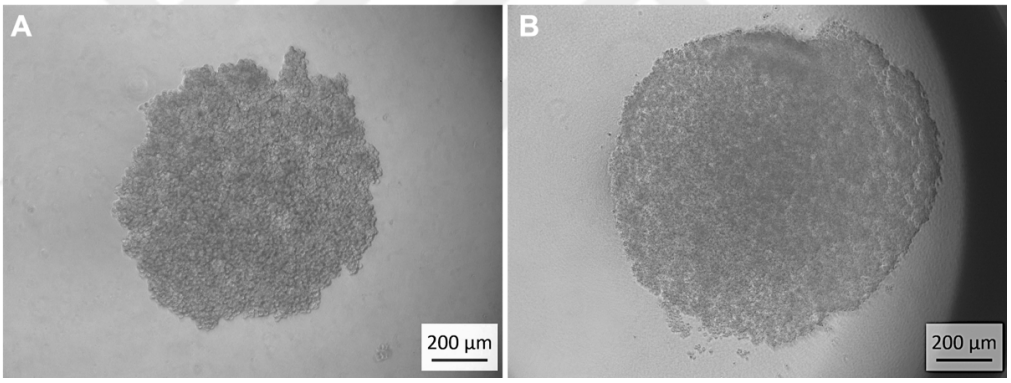
4.3.9. Dirençli ve dirençsiz CD326+CD133+CD44+ Akciğer kanser kök hücrelerin üç boyutlu kültürü ve çoğaltılması

Üç boyutlu sferik kültür için kullanılan üç yöntemin her birinde verimli KKH sferleri elde edildi. Birinci yöntemde elde edilen sferler kuyucuk başına bir adet olmak üzere belirgin sınırlara sahip ve canlı (koyu alanlara sahip olmayan) sferler 3. Günde elde edildi (Şekil 4.40.).



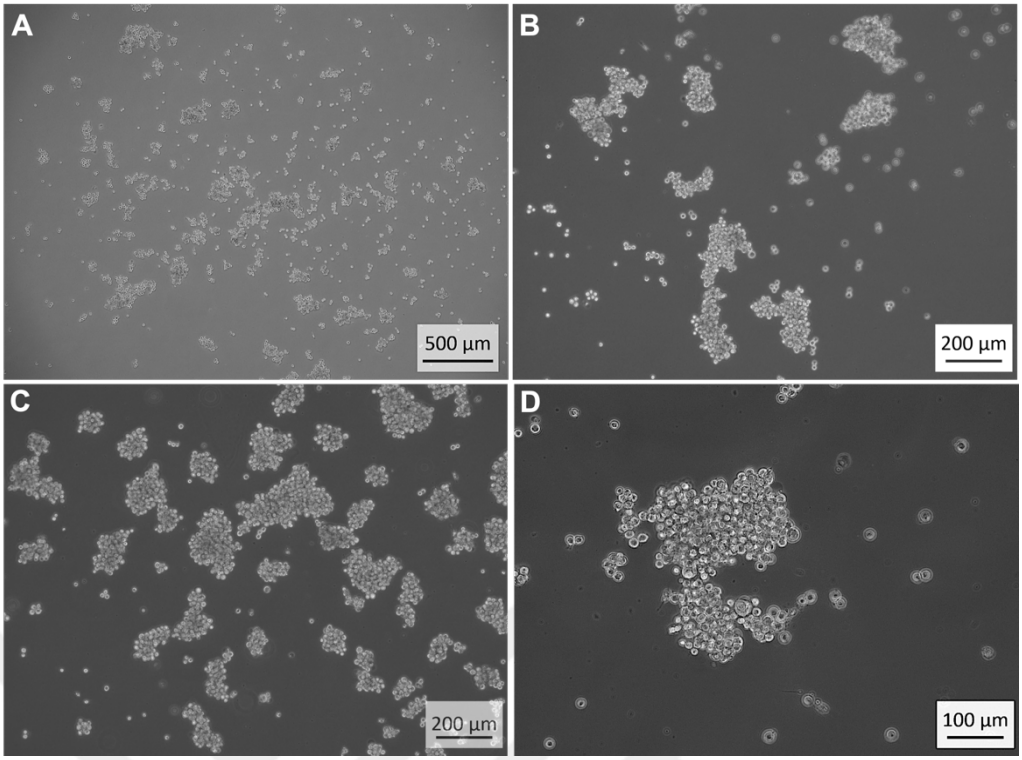
Şekil 4. 40. Dirençli ve dirençsiz KKH'lerde Agaroz jel üzerinde oluşan sferoid oluşumlarının faz kontrast ışık mikroskop altında 3. gündeki görüntüleri **A:** Dirençli KKH. **B:** Dirençsiz KKH (ölçü çubuğu = 200 µm)

İkinci yöntemde ise elde edilen sferler damlacık başına bir adet olmak üzere belirgin sınırlara sahip ve canlı (koyu alanlara sahip olmayan) sferler şeklinde 24-48 saatte elde edildi (Şekil 4.41).



Şekil 4. 41. Dirençli ve dirençsiz KKH'lerde PDMS ve asılı damla tekniği ile oluşturulan sferoid oluşumlarının faz kontrast ışık mikroskop altındaki 24-48 saatlik görüntüleri **A:** Dirençli KKH **B:** Dirençsiz KKH (ölçü çubuğu = 200 µm),

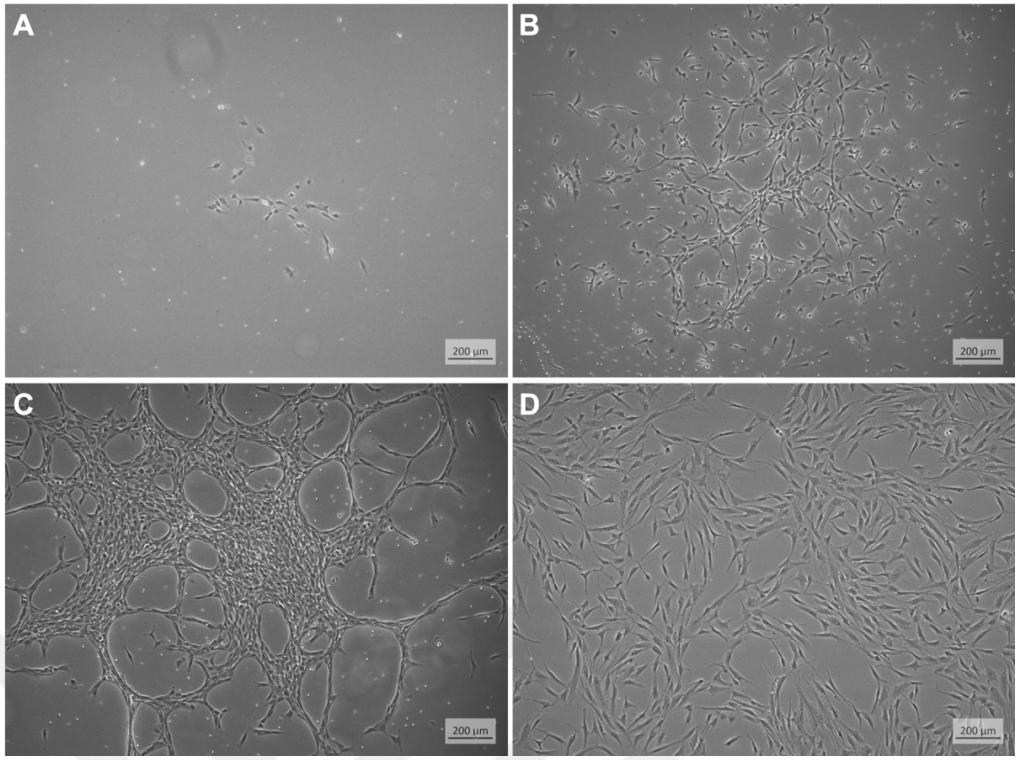
Üçüncü ve son yöntemde ise kuyucuk başına diğer yöntemlere kıyasla tek bir sfer oluşumundan ziyade az hücreli ve ancak daha çok sayıda sferoid oluşumları şeklinde 4-5. Gün itibari ile oluştuğu ve 6. günde ise pasaj zamanının geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.42). Kültür ortamında jel ve benzeri ekstra malzemelerin olduğu birinci yöntem deney sonrası gerçekleştirilecek analizlerde hücrelerle yapılacak analizlere zarar vereceği ve ikinci yöntemin ise kültür hızını yavaşlatacağı dikkate alınarak üçüncü yöntem seçilerek deneylere devam edildi.



Şekil 4. 42. Dirençli ve dirençsiz KKH'lerde Poly-D-HEMA polimeri ile oluşturulan sferoid oluşumlarının faz kontrast ışık mikroskop altındaki 24-48 saatlik görüntüleri **A:** Dirençsiz KKH sferlerinin görünümü (ölçü çubuğu = 200 µm). **B:** Dirençsiz KKH sferlerin büyük ölçek ile görünümü (ölçü çubuğu = 500 µm). **C:** Dirençli KKH sferlerinin görünümü (ölçü çubuğu = 200). **D:** Dirençli KKH sferlerin büyük ölçek ile görünümü (ölçü çubuğu = 100 µm).

4.4. iSS-MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

İnsan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücre'ler (iSS-MKH'ler) izolasyondan sonraki hücre kültürü sırasında hücreler günlük olarak faz-kontrast mikroskobu altında kontrol edilmiş ve mezenkim karakterde olduklarına ait fotoğraf çekimleri yapılmıştır. Yapılan faz kontrast invert mikroskobik günlük morfolojik analizler sonucunda Şekil 4.43'de de iSS-MKH'lerin iğsi şekilli ve fibroblast-benzeri morfolojiye sahip sağlıklı bir mezenkim karakter gösterdiği görüldü. Kültüre edilen iSS-MKH'ler pasaj 3'te (P3) yeterli sayıya ulaştıklarında immunofenotopik (flow sitometrik ve immunositokimyasal işaretleme) ve farklılaştırma karakterizasyon analizleri gerçekleştirilerek farklılaşmanın gerçekleşip gerçekleşmediği histokimyasal ve immunokimyasal olarak belirlendi.

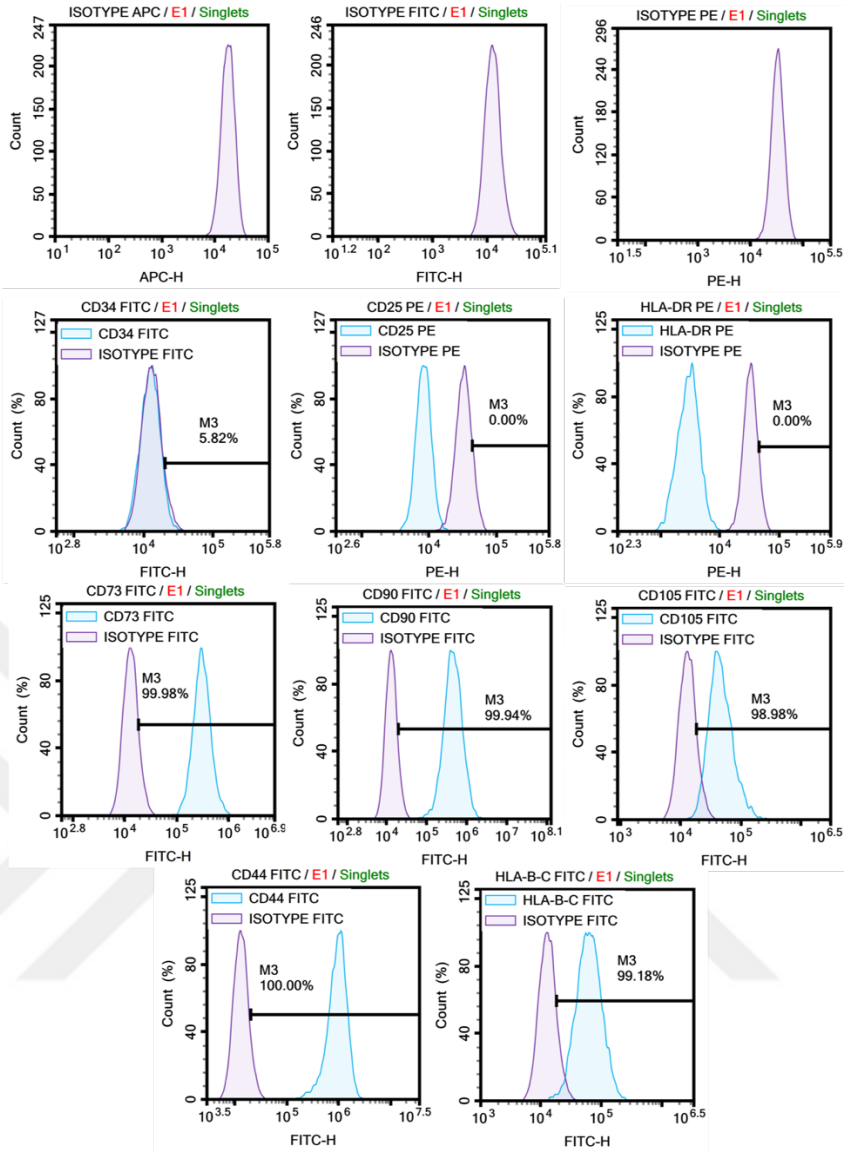


Şekil 4. 43. İzolasyon sonrasında kültüre edilen iSS-MKH'lerin faz kontrast ışık mikroskobu altındaki görüntüleri **A:** İzolasyon sonrasında besi yeri değiştirildikten sonra kültür kabına tutunan iSS-MKH'lerin (Pasaj 0) faz kontrast ışık mikroskop altında görüntüleri **B-C:** izolasyon sonrası iSS-MKH'lerin (P3) koloni oluşturma potansiyellerinin görüntüsü **C:** iSS-MKH'lerin P9'da iken sürdürdükleri fibroblastik morfolojilerinin gösterimi (ölçü çubuğu = 200 µm).

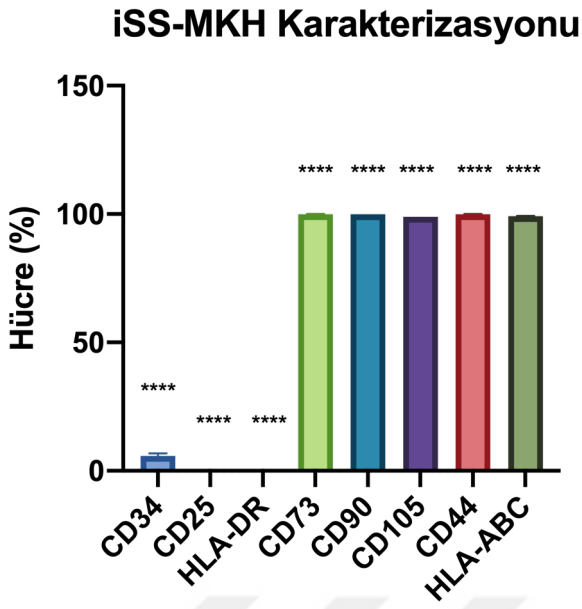
4.5. iSS-MKH'lerin İmmunofenotipik Olarak Karakterize Edilmesi

4.5.1. iSS-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

iSS-MKH'ler P3'te flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.44 ve Şekil 4.45). Yapılan bu analizde iSS-MKH'lerin CD34 (%5,82), CD25(%0,00) MHC-II (HLA-DR) (%0,00) belirteçlerinin ekspresyonlarını negatif eksprese ederken; CD73 (%99,98), CD90 (%99,94), CD105 (%98,98), CD44 (%100,00) ve MHC-I (HLA-ABC) (%99,18) pozitif eksprese ettiği belirlendi.



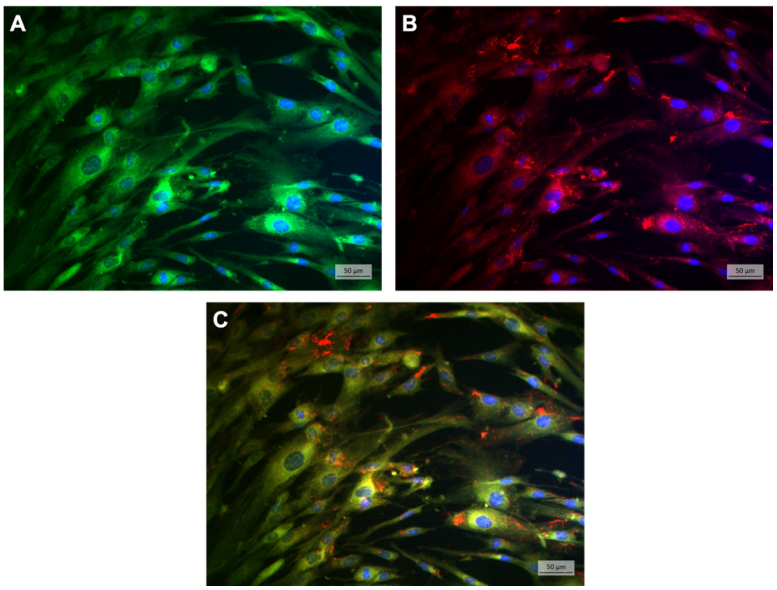
Şekil 4. 44. İnsan sinoviyal sıvıdan izole edilmiş hücrelerin flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu. MKH'lere özgü immunofenotipik yüzey belirteçleri bakımından CD34, CD25, MHC-II (HLA-DR) negatifliği ve CD73, CD90, CD105, CD44 ve MHC-I (HLA-ABC) pozitifliği flow sitometri ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 45. İnsan sinoviyal sıvıdan izole edilmiş hücrelerin flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonunun veri grafiği ($p<0.0001$****)

4.5.2. iSS-MKH'lerin immunofluoresan işaretleme ile immunofenotiplemesi

iSS-MKH'lerin karakterizasyonu için ilaveten vimentin ve nestin antikorları ile IF ile işaretlendiğinde pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.46).



Şekil 4. 46. iSS-MKH'lerin İmmunofloresan işaretleme (İF/IHC) karakterizasyon deneyleri. Farklılaşmamış hücrelerin (a) Nestin (yeşil) ve (b) Vimentin (kırmızı) İF işaretlenmesi (Ölçü çubuğu =50 µm). Hücre çekirdekleri İF analizlerde DAPI boyası (mavi) ile işaretlenmiştir.

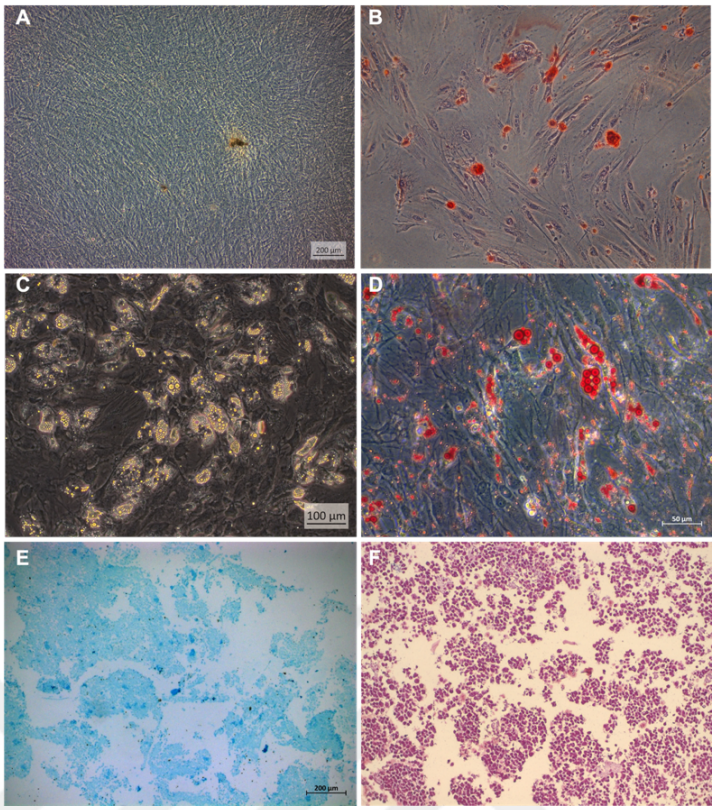
4.5.3. iSS-MKH'lerin karakterizasyonu için *in vitro* farklılaşma analizleri

MKH'lerin farklılaştırma karakterizasyonu için mezoderm kökenli hücrelere farklılaşabilme özelliklerinin gösterilebilmesi amacıyla hücreler; adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma analizlerine alındığında her üç tip hücreye farklılaşabildiği belirlendi. Adipojenik indüksiyon sonrasında farklılaşan iSS-MKH'lerde nötral yağ damlacıklarının Oil Red-O boyası ile pozitifliği ve immunofloresan olarak adiponektin pozitifliği gösterilmiştir (Şekil 4.47 ve Şekil 4.48).

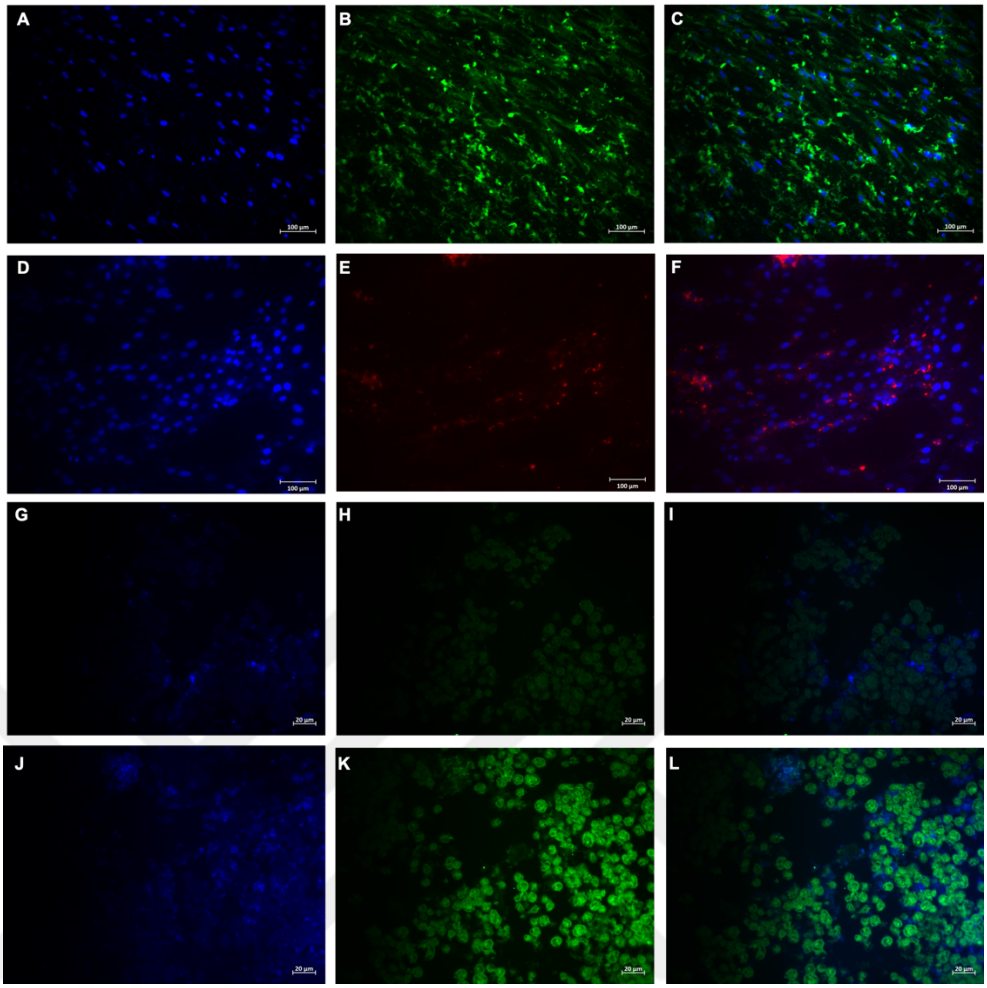
Osteojenik farklılaşma besi yeri ile muamele edilen iSS-MKH'lerde farklılaşma sonrası meydana gelen mineral birikimi Alizarin Red S (kırmızı) boyasıyla gösterildi (Şekil 4.47). Osteonektin pozitifliği ise if işaretleme ile gösterildi. (Şekil 4.48).

Kondrojenik farklılaşma ile yüksek oranda sülfat içeren glikoprotein ve glikozaminglikanların Alsiyan Blue ve Safranin O ile histolojik olarak boyanması sonucunda MKH'lerin mezodermal yönde farklılaştığı gösterilmiştir (Şekil 4.47). İF işaretleme ile Kollajen 1, Kollajen 2 pozitifliği floresan mikroskop altında gösterilmiştir (Şekil 4.48)

İnsan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücrelerin (iSS-MKH) kültür kabına yapışarak kültür edildiği, adiposit, osteoblast ve kondrositlere farklılaşabilme potansiyellerine sahip oldukları çeşitli histolojik ve İF işaretlemeler ile kanıtlanmıştır. Ayrıca MKH spesifik antikorlarındaki pozitif ve negatif ekspresyonları ile karakterize edilmişlerdir. Sonuç olarak bu tez kapsamında kullanılan insan sinoviyal sıvı kökenli MKH'lerin Uluslararası Hücre ve Gen Terapisi Derneği'nin (ISCT) asgari standartlarına (Dominici vd., 2006) uygun olarak MKH oldukları teyit edildiği için bu hücreler ile yapılacak deneylere devam edilebildi.



Şekil 4. 47. iSS-MKH'lerin immunhistokimyasal boyamalar ile karakterizasyon deneyleri. Farklılaşmış hücrelerin **A:** Osteojenik indüksiyondan 22 gün sonra oluşan mineral nodüllerin zıt-faz mikroskobik görüntüleri (Ölçü çubuğu =200 µm) **B:** Osteojenik farklılaşmış hücrelerde mineral nodüllerin Alizarin Red S boyası ile gösterilmesi (kırmızı) (Ölçek çubuğu =500 µm) **C:** Adipojenik indüksiyondan 20 gün sonra yağ hücrelerine dönüşmüş MKH'lerin zıt-faz mikroskobik görünümü (Ölçek çubuğu =100 µm) **D:** Adipojenik farklılaşmış hücrelerde nötral yağ damlacıkları Oil Red O boyası (kırmızı) ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu =50 µm) **E:** Kondrojenik farklılaşma sonrası Alcian mavisi (ölçü çubuğu = 200 µm) F: Safranin O ile boyanmış hücreler (ölçü çubuğu = 100 µm).



Şekil 4. 48. iSS-MKH'lerin İmmunofloresan işaretleme (İF) karakterizasyon deneyleri. **A, B, C**: Osteojenik indüklenmiş hücrelerde İF işaretleme ile Osteokalsinin floresan mikroskop görüntüsü DAPI (mavi), Osteokalsin (yeşil) (ölçü çubuğu=100 µm) **D, E, F:** Adipositlere farklılaşmış hücrelerde İF işaretleme ile Adiponektinin floresan mikroskop görüntüsü DAPI (mavi), Adiponektin (kırmızı) (ölçü çubuğu=100 µm) **G, H, I:** Kondrojenik farklılaşmış hücrelerde Kollajen 1'in İF işaretleme ile floresan mikroskoptaki görüntüsü DAPI (mavi) Kollajen 1 (yeşil) **J, K, L:** Kondrojenik farklılaşmış hücrelerde Kollajen II'in İF işaretleme ile floresan mikroskoptaki görüntüsü DAPI (mavi) Kollajen 1 (yeşil).

4.6. iSS-MKH'lerden Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

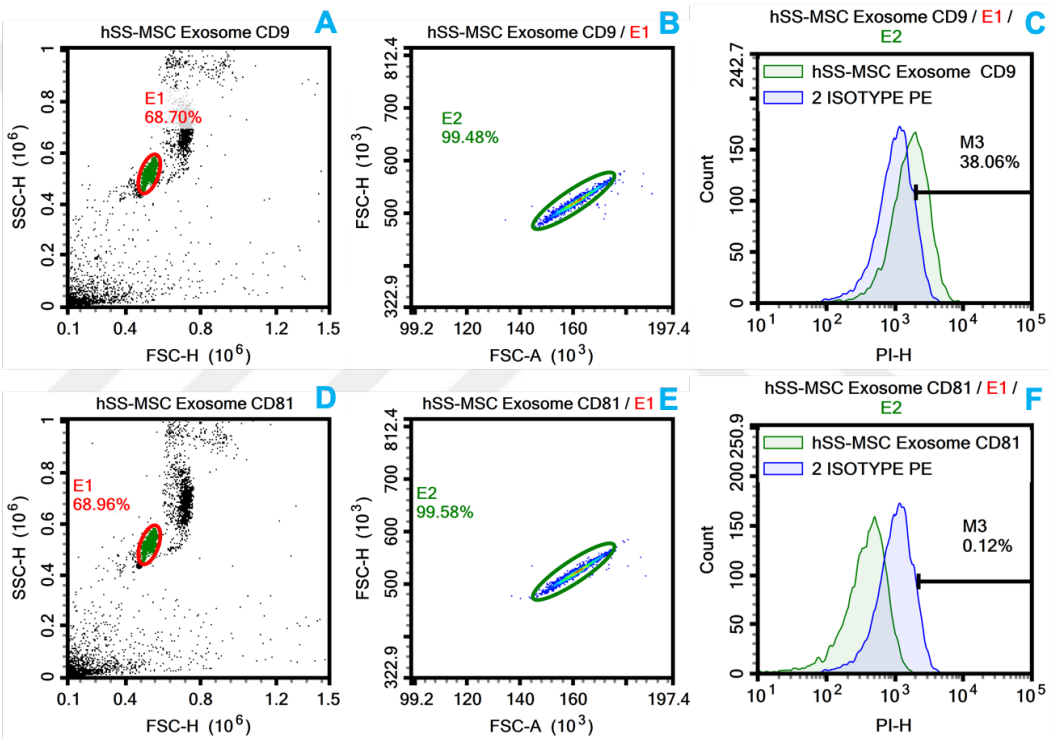
4.6.1. iSS-MKH-Exo'ların total protein analizi

16 saat süresince serum içermeyen besi yeri ortamında inkübe edilen iSS-MKH'lerden elde edilen eksozomlar ultrasantrifüj tüpüne konarak pellet haline

getirildi. Elde edilen pelletin total protein miktarı ölçüldü. Qubit Protein BR Assay kullanılarak yapılan bu analizde total protein miktarı 13,7 ug/uL bulundu ve alikotlanarak -80°C'de (ARCTİKO, Danimarka) saklandı.

4.6.2. iSS-MKH-Exo'ların immunfenotiplemesi

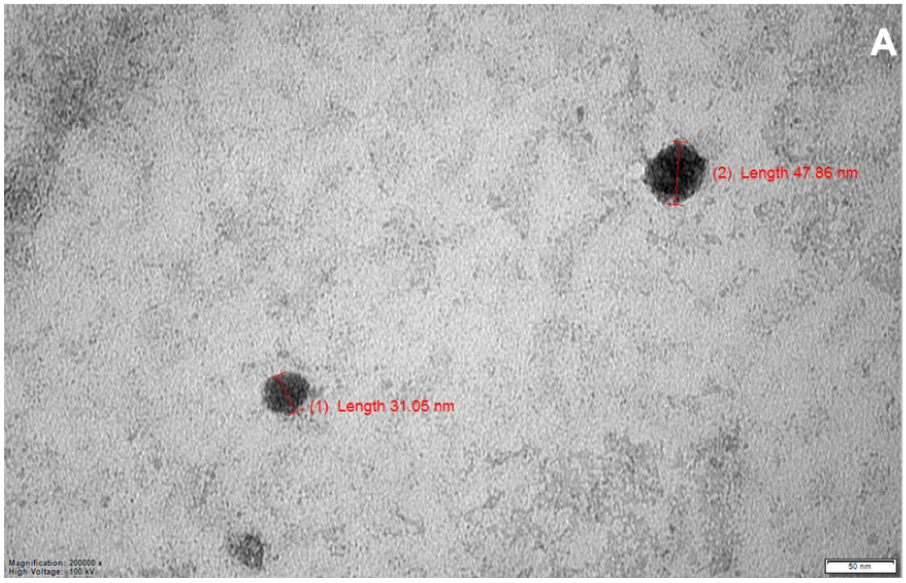
iSS-MKH-Exo'lar izole edilip alikotlanarak saklandıktan sonra bazı alikotlar alınarak kademeli çözdürüldü ve eksozomlara özgü yüzey belirteçleri olan CD9 ve CD81 (Biolegend, San Diego, ABD) ile flow sitometride analizi yapıldı. Yapılan flow sitometrik analizde antikorların izotip kontrollerine göre CD9 (38,06) ve CD81 (%0,12) pozitif eksprese ettiği sonucuna ulaşılmıştır. (Şekil 4.49).



Şekil 4. 49. iSS-MKH'lerden izole edilmiş eksozomların flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu. Eksozomlara özgü immunofenotipik yüzey belirteçleri bakımından **A, B, C:** CD9. **D ,E, F:** CD81 pozitiflikleri flow sitometri ile gösterilmiştir.

4.6.3. iSS-MKH-Exo'ların TEM ile karakterizasyonu

iSS-MKH'lerden izole edilen eksozomlar için Yüksek kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile 120 kV altında alınan görüntüler ile boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.50'da da sunulduğu üzere eksozom boyutları 31,05 nm ve 47.86 nm olarak belirlenmiştir.

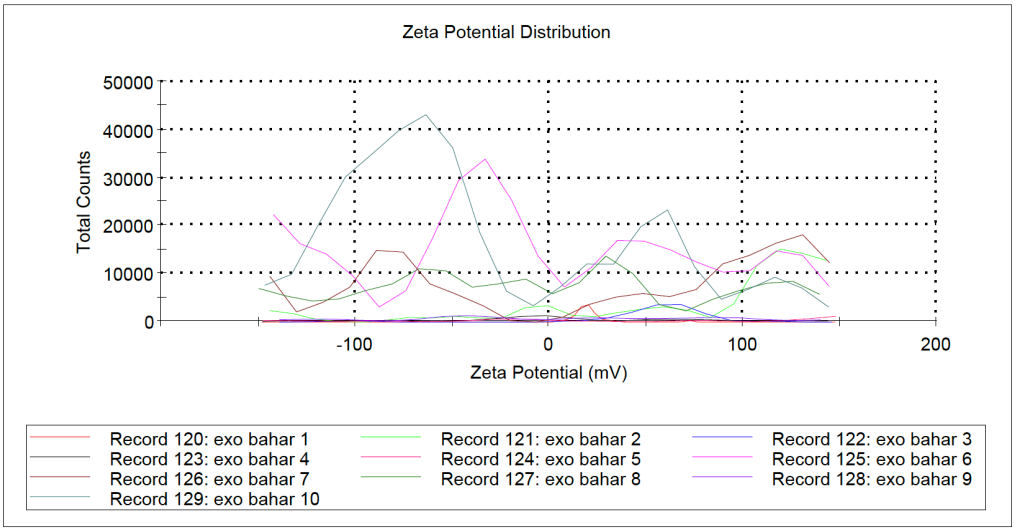


Şekil 4. 50. iSS-MKH'den izole edilen eksozomların TEM ile görüntülenmesi ve boyut analizi (Ölçü Çubuğu = 50 nm)

4.6.4. iSS-MKH-Exo'ların zeta potansiyellerinin ölçülmesi

iSS-MKH-eksozomların siRNA yüklenme kapasitelerinin ölçülebilmesi için Zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Zeta potansiyel ölçüm cihazında 10 farklı ölçüm ortalaması ile elde edilen sonuca göre 7.08 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.51). Bu da negatif yüklü olan gen ürününün eksozomlara transfekte olması için uygun olduğunu göstermektedir.

			Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV):	7,08	**Peak 1:**	-78,3	64,6	30,6
Zeta Deviation (mV):	189	**Peak 2:**	56,7	18,4	15,6
Conductivity (mS/cm):	9,50	**Peak 3:**	18,8	9,0	13,4



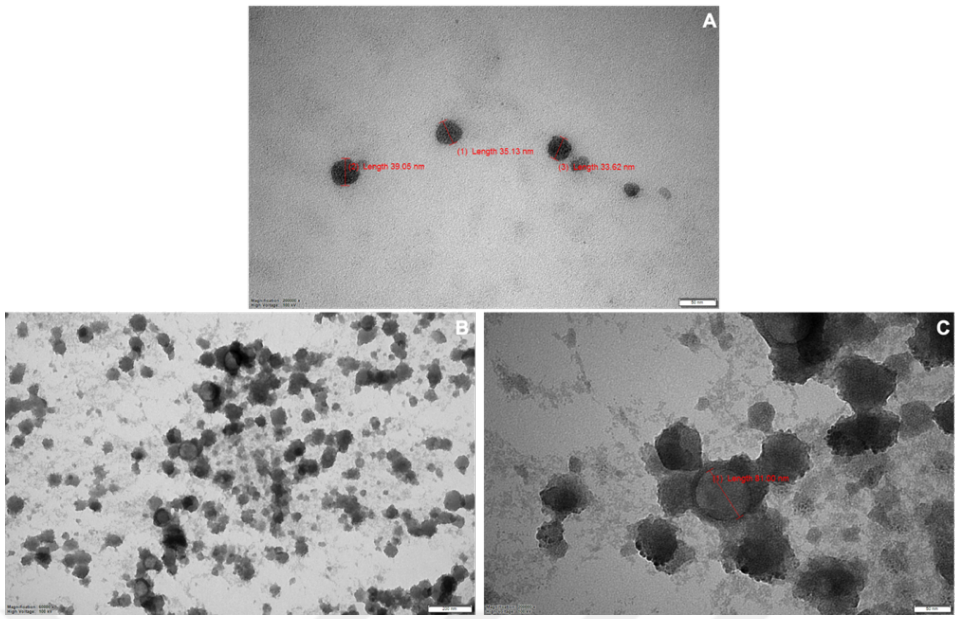
Ş

ekil 4. 51. iSS-MKH-eksozomlarının zeta potansiyellerinin ölçülmesi

4.7. MDR1 siRNA'ların Eksozomlarla Enkapsüle Edilmesi ve Karakterizasyonu

4.7.1. MDR1 siRNA'ların eksozomlarla enkapsülasyonunun TEM ile gösterilmesi

iSS-MKH'lerden izole edilen eksozomların Hyaluronik Asit ile kaplanmaları Yüksek kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile 120 kV altında alınan görüntüler ile Şekil 4.52'de gösterilmiştir. Şekil 4.52'de de sunulduğu üzere Hyaluronik asit ile muamele edilmeyen eksozomlar ile karşılaştırıldığında HA ile inkübasyon sonucunda eksozomların başarıyla kaplandığı izlenmiştir.



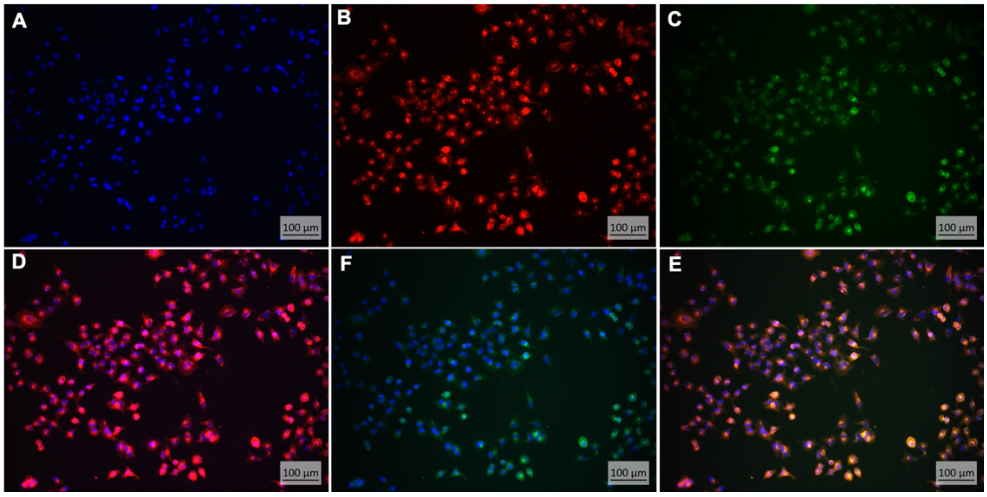
Şekil 4. 52. Hyaluronik asit ile kaplanan iSS-MKH-eksozom numunelerinin TEM ile görüntülenmesi A: Hyaluronik asit ile kaplanmamış kontrol iSS-MKH-eksozom görüntüsü (Ölçü Çubuğu = 50 nm). B: Hyaluronik asit ile kaplanmış iSS-MKH-eksozomların görüntüsü (Ölçü Çubuğu = 200 nm). C: Hyaluronik asit ile kaplanmış iSS-MKH-eksozomların büyük ölçekli görüntüsü (Ölçü Çubuğu = 50 nm).

4.7.2. iSS-MKH-Exo'lara MDR-1 siRNA'ların transfeksiyonu ve transfeksiyonun kontrolü

iSS-MKH eksozomlara Neon Transfeksiyon cihazı kullanarak elektroporasyon yöntemi ile MDR1 siRNA'lar transfekte edilmiştir. Transfeksiyonun başarısının kontrolü için öncelikle uptake analizi, yükleme öncesi ve sonrası RNA ölçümleri ve eksozomlardan RNA izolasyonu ile agaroz jeldeki görüntüleri elde edilmiştir.

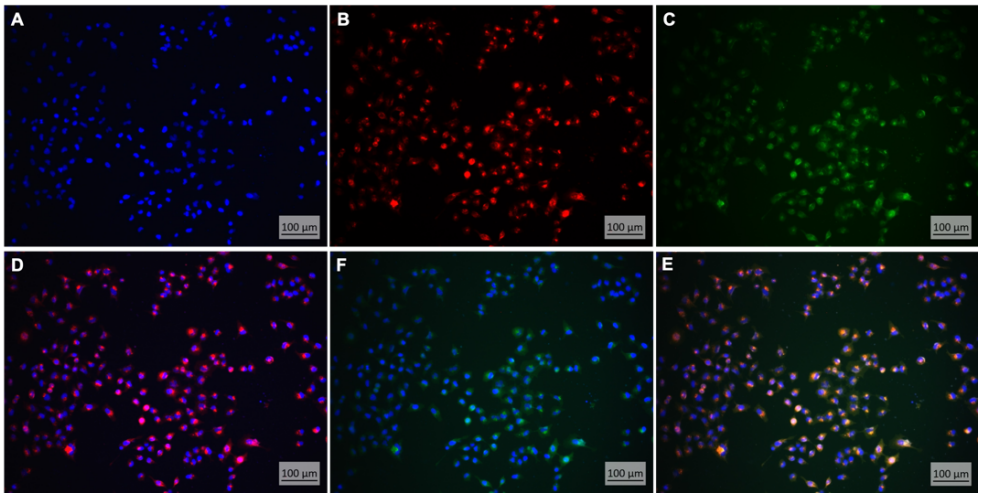
4.7.3. iSS-MKH-eksozomların uptake analizi

iSS-MKH-Exo ve iSS-MKH-MDR-1-Exo'ların A549, KKH ve dKKH'ler tarafından uptake edilebilme potansiyelleri araştırılmıştır. MDR1 negatif kontrol siRNA transfekte edilmiş iSS-MKH-Exo'ların uptake kontrolü FITC (yeşil) etiketli olan siRNA'lar üzerinden yapılmıştır. A549 hücreleri için gerçekleştirilen uptake analizinde Şekil 4.53'de görüldüğü üzere iSS-MKH-Exo'lar kırmızı ile görünürken, FITC (yeşil) ile işaretli olan MDR1 siRNA içeren eksozomlar floresan mikroskop altında yeşil renk olarak görünmüşlerdir. Sonuç olarak siRNA içeren eksozomların tüm hücreler tarafından başarı ile uptake edilebildikleri gösterilmiştir.



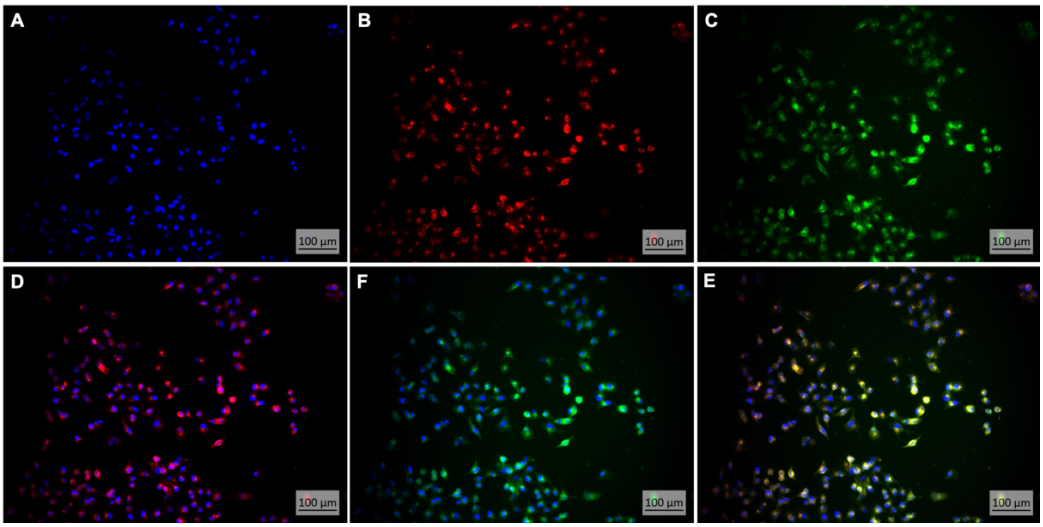
Şekil 4. 53. A549 hücreleri için iSS-MKH-Exo-MDR-1'lerin uptake analizinin floresan mikroskop altında gösterimi **A:** Dapi ile boyanan A549 hücreleri (mavi) **B:** PKH26 işaretli eksozomların görüntüsü (kırmızı) **C**: FITC-işaretli MDR-1 siRNA'ların görüntüsü (yeşil) **D:** A549 hücre (mavi) ve eksozom (kırmızı) uptakelerin birlikte gösterimi **E:** A549 hücre (mavi) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi **F:** A549 hücre (mavi), eksozom (kırmızı) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi (ölçü çubuğu = 100 µm)

KKH'ler için gerçekleştirilen uptake analizinde Şekil 4.54'de görüldüğü üzere iSS-MKH-Exo'lar kırmızı ile görünürken, FITC (yeşil) ile işaretli olan MDR1 siRNA içeren eksozomlar floresan mikroskop altında yeşil renk olarak görünmüşlerdir. Sonuç olarak siRNA içeren eksozomların tüm hücreler tarafından başarı ile uptake edilebildikleri gösterilmiştir.



Şekil 4. 54. KKH'ler için iSS-MKH-Exo-MDR-1'lerin uptake analizinin floresan mikroskop altında gösterimi **A:** Dapi ile boyanan A549 hücreleri (mavi) B: PKH26 işaretli eksozomların görüntüsü (kırmızı) **C:** FITC-işaretli MDR-1 siRNA'ların görüntüsü (yeşil) **D:** A549 hücre (mavi) ve eksozom (kırmızı) uptakelerin birlikte gösterimi **E:** A549 hücre (mavi) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi **F:** A549 hücre (mavi), eksozom (kırmızı) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi (ölçü çubuğu = 100 µm)

dKKH'ler için gerçekleştirilen uptake analizinde Şekil 4.55'de görüldüğü üzere iSS-MKH-Exo'lar kırmızı ile görünürken, FITC (yeşil) ile işaretli olan MDR1 siRNA içeren eksozomlar floresan mikroskop altında yeşil renk olarak görünmüşlerdir. Sonuç olarak siRNA içeren eksozomların tüm hücreler tarafından başarı ile uptake edilebildikleri gösterilmiştir.



Şekil 4. 55. dKKH'ler için iSS-MKH-Exo-MDR-1'lerin uptake analizinin floresan mikroskop altında gösterimi **A:** Dapi ile boyanan A549 hücreleri (mavi) **B:** PKH26 işaretli eksozomların görüntüsü (kırmızı) C: FITC-işaretli MDR-1 siRNA'ların görüntüsü (Yeşil) **D:** A549 hücre (Mavi) ve eksozom (kırmızı) uptakelerin birlikte gösterimi **E:** A549 hücre (Mavi) ve MDR-1 siRNA (Yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi **F:** A549 hücre (mavi), eksozom (kırmızı) ve MDR-1 siRNA (yeşil) uptakelerin birlikte gösterimi (ölçü çubuğu = 100 µm)

4.7.4. MDR1 hedefli siRNA'ların iSS-MKH-Ekso'lara transfeksiyonunu belirlemek için iSS-MKH-Ekso'larının RNA analizi

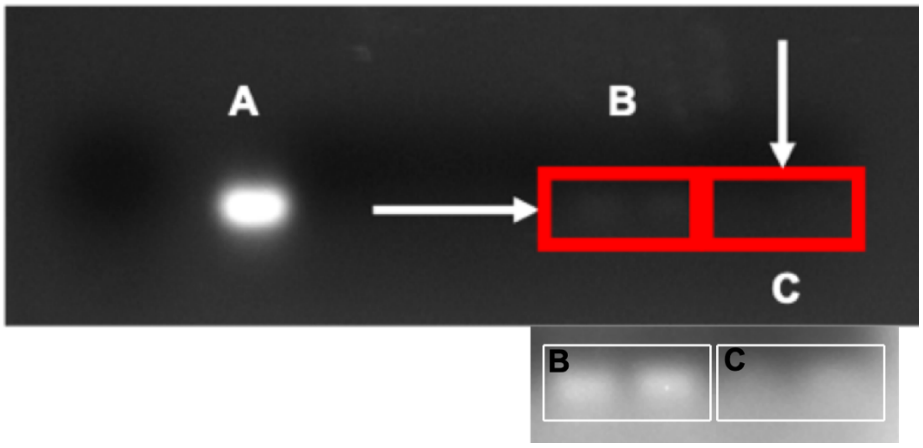
iSS-MKH-eksozomlara MDR-1 siRNA'lar transfekte edilmeden önce Nanodrop cihazı ile RNA konsantrasyonları ölçülerek kaydedilmiştir. Transfeksiyon işleminden sonra ultra santrifüj ile çöktürülerek ortamda kalan RNA konsantrasyonu ve eksozomlardan RNA izolasyonu ile elde edilen RNA konsantrasyonu ölçülerek aralarındaki farklar hesaplanmıştır. Tüm gruplar için eksozom miktarları eşitlenmiştir. Tablo 4.4'de de belirtildiği üzere siRNA yüklenmemiş eksozomların RNA içerikleri 10.6 ng/µL olarak belirlenmiştir. siRNA yüklenmiş eksozomlardan 27.5 ng/µL, Hyaluronik asit ile kaplanmış siRNA yüklü eksozomlardan ise 31.1 ng/µL RNA konsantrasyonu elde edilmiştir. Saf eksozomlar ile siRNA yüklenen eksozom RNA konsantrasyonları karşılaştırıldığında iSS-MKH-Eksozom-siRNA'lar 2.59 kat; HA- iSS-MKH-Eksozom-siRNA'lar 2.93 kat daha fazla RNA içerdiği bulunmuştur. Sonuç olarak HA kaplı ve saf eksozomlara siRNA'ların başarı ile transfekte edildiği belirlenmiştir.

Tablo 4. 4. iSS-MKH-Eksozomlar ve HA-iSS-MKH-Eksozomlar için siRNA yüklenme konsantrasyonlarının belirlenmesi

GRUPLAR	**RNA KONSANTRASYONLARI**
Negatif MDR-1 siRNA	224.3 ng/µL
Ultrasantrifüj sonrası süpernatant	1.3 ng/µL
İSS-MKH-Eksozomlardan RNA izolasyonu sonrası	10.6 ng/µL
İSS-MKH-Eksozom-siRNA'lardan RNA izolasyonu sonrası	27.5ng/µL
HA-İSS-MKH-Eksozom-siRNA'lardan RNA izolasyonu sonrası	31.1 ng/ µL

4.7.5. iSS-MKH-Eksolara siRNA transfeksiyonunun belirlenmesi için MDR1 proteininin jel elektroforez ile belirlenmesi

İSS-MKH-Eksozom ve HA-İSS-MKH-Eksozom'lara FITC işaretli negatif MDR-1 siRNA transfeksiyonu sonrası total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların siRNA verifikasyonu için agaroz jelde elektroforez yapılarak RNA bantları gözlenmiştir (Şekil 4.56). Elde edilen RNA bantlaro negatif kontrol siRNA ile karşılaştırıldığında elde edilen RNA'ların transfekte edilen siRNA'lar olduğu ve eksozomlara başarıyla transfekte edildiği sonucuna ulaşılmıştır.

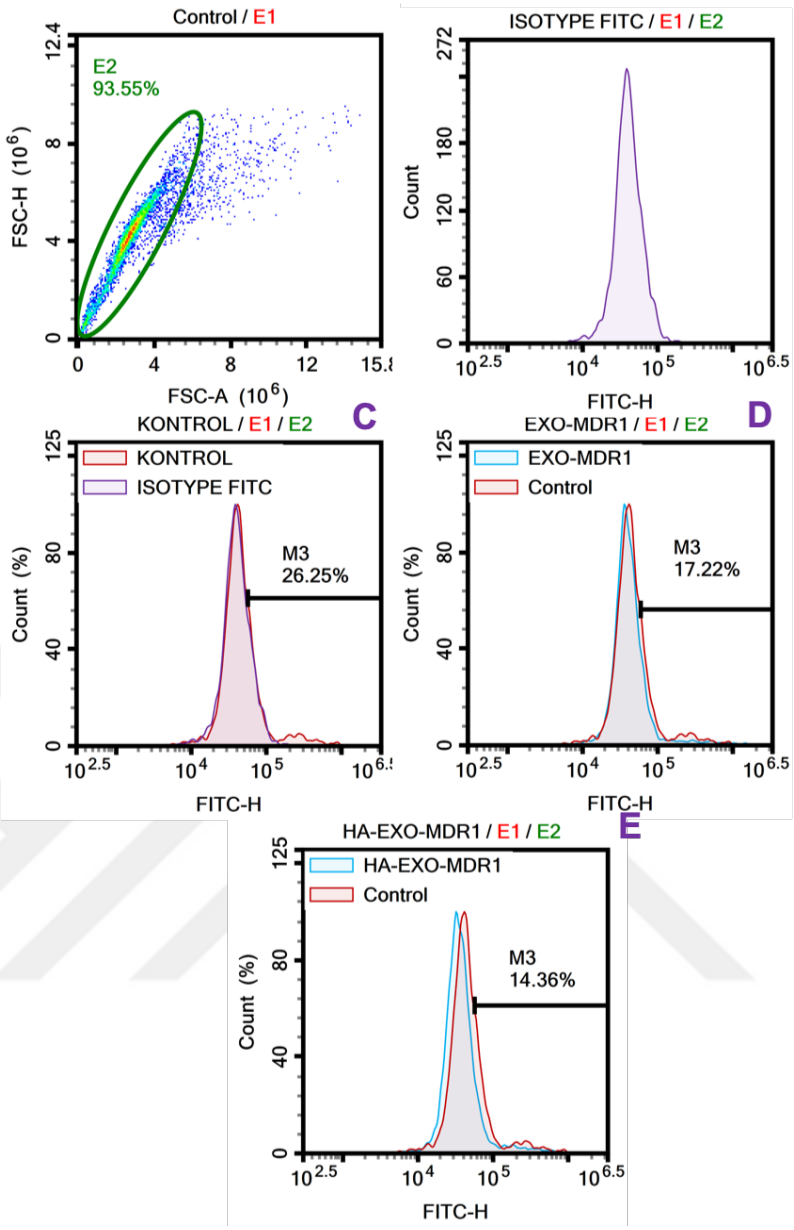


Şekil 4. 56. FITC işaretli negatif MDR-1 siRNA transfekte iSS-MKH-Eksozom ve HA-iSS-MKH-Eksozom'ların agaroz jelde alınan floresan görüntülerinin gösterimi **A:** Negatif MDR-1 siRNA **B:** Exo-MDR **C:** HA-Exo-MDR

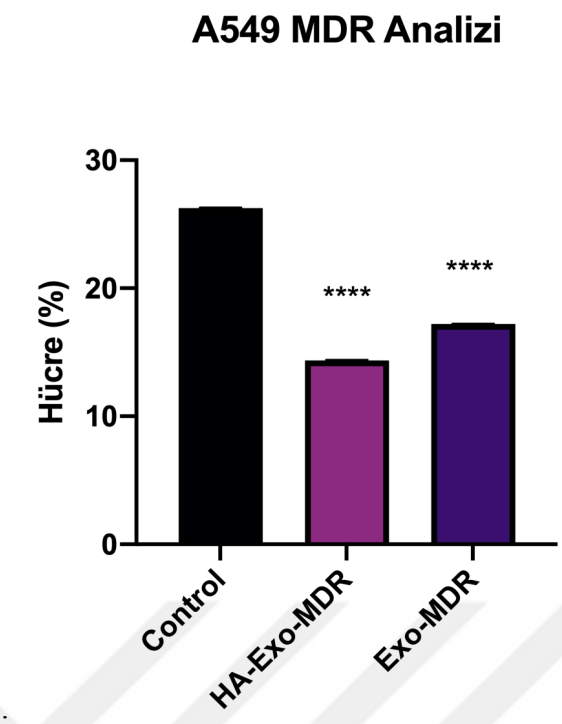
4.7.6. iSS-MKH-Eksolara siRNA transfeksiyonunun belirlenmesi için flow sitometri analizi

A549, KKH ve dKKH'lerde siRNA enkapsüle iSS-MKH-Exo'ların MDR protein ekspresyon düzeylerinin belirlenebilmesi için flow sitometrik analizler gerçekleştirilmiştir.

A549 hücrelerindeki flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen MDR1 analizi ve istatiksel değerlendirmeleri Şekil 4.57 ve 4.58'de, MDR1 ekspresyon düzeyleri ise Tablo 4.5'de belirtilmiştir. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR'lerin A549 hücreleriyle 48 saatlik inkübasyon sonrasında tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatiksel olarak yüksek anlamlılık elde edilmiştir ($p<0.001$****). A549 hücrelerinde hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubunda MDR1 ekspresyonu %26.25 olarak bulunmuştur. siRNA içeren iSS-MKH-Eksozom (Exo-MDR) grubunda %17.22 ve siRNA içeren HA ile kaplı iSS-MKH-Eksozom (HA-Exo-MDR) grubunda %14.36 olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre MDR ekspresyon seviyelerinde Exo-MDR grubunda 1.52 kat; HA-Exo-MDR grubunda ise 1.82 kat azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak A549 hücrelerinde hem Exo-MDR hem de HA-Exo-MDR uygulamalarıyla MDR1 başarıyla sessizleştirilmiştir.



Şekil 4. 57. A549 hücrelerindeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları (% Hücre)



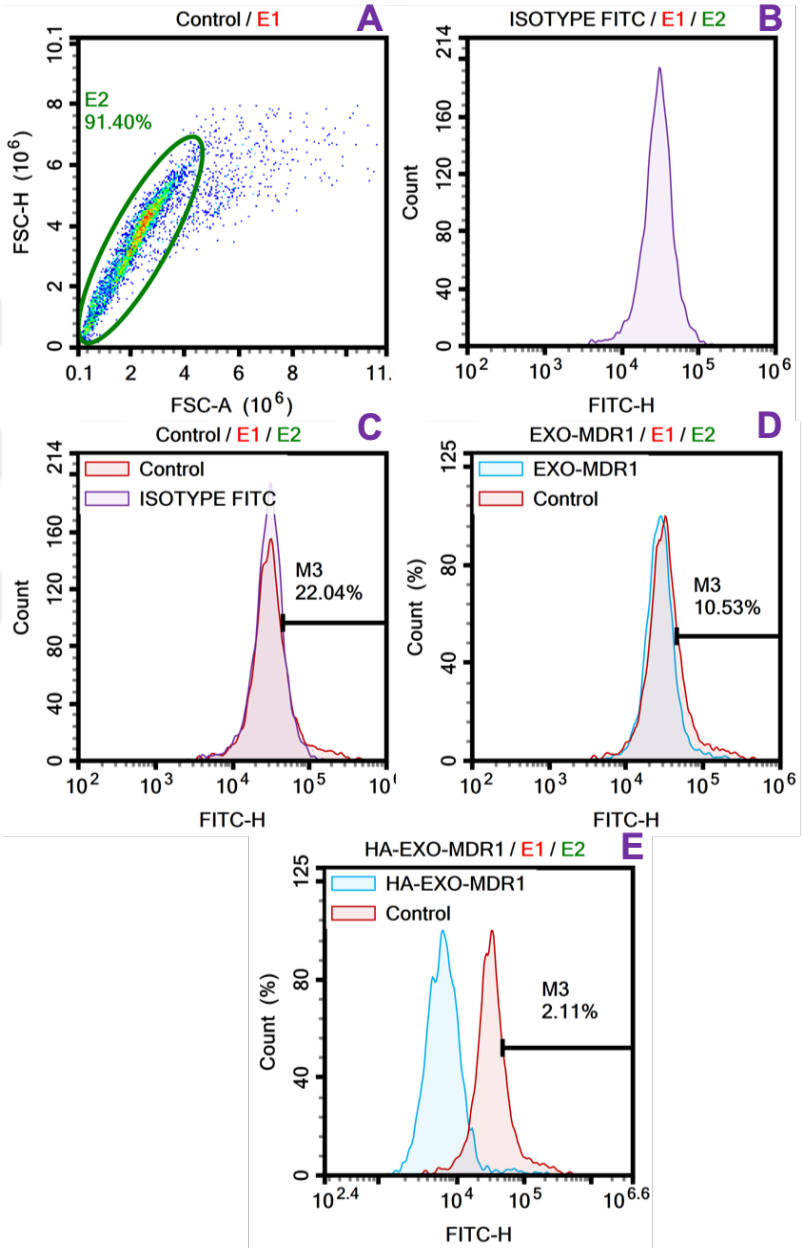
Şekil 4. 58. A549 hücrelerindeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları ve istatiksel değerlendirmelerinin gösterimi (p<0.0001****)

Tablo 4. 5. A549 hücrelerindeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzey verileri

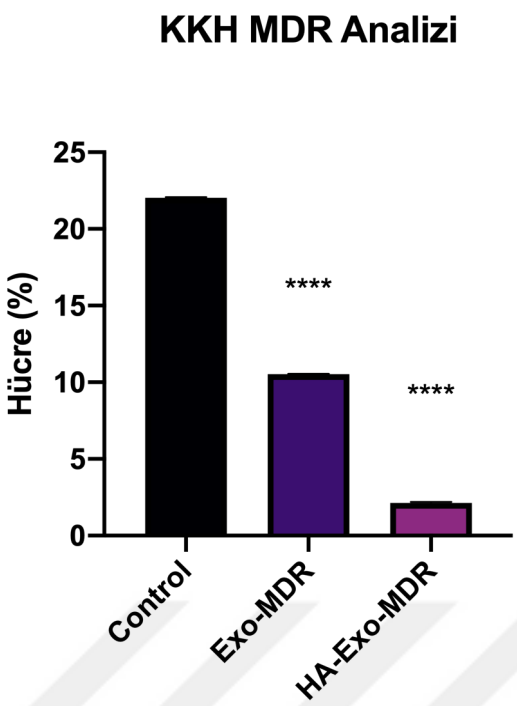
A549 MDR1	**MDR1 (%)**
Kontrol	26,25 ± 0,04
EXO-MDR	17,22 ± 0,01
HA-EXO-MDR	14,36 ± 0,04

KKH'lerde flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen MDR1 analizi ve istatiksel değerlendirmeleri Şekil 4.59 ve 4.60'de, MDR1 ekspresyon düzeyleri ise Tablo 4.6'de belirtilmiştir. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR'lerin KKH'lerle 48 saatlik inkübasyon sonrasında tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatiksel olarak yüksek anlamlılık elde edilmiştir (p<0.001****). KKH'lerde hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubunda MDR1 ekspresyonu %22.04 olarak bulunmuştur. siRNA içeren iSS-MKH-Eksozom (Exo-MDR) grubunda %%10.53 ve siRNA içeren HA ile kaplı

iSS-MKH-Eksozom (HA-Exo-MDR) grubunda %2.11 olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre MDR ekspresyon seviyelerinde Exo-MDR grubunda 2.09 kat; HA-Exo-MDR grubunda ise 10.44 kat azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak KKH'lerde hem Exo-MDR hem de HA-Exo-MDR uygulamalarıyla MDR1 başarıyla sessizleştirilmiştir.



Şekil 4. 59. KKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları (% Hücre)



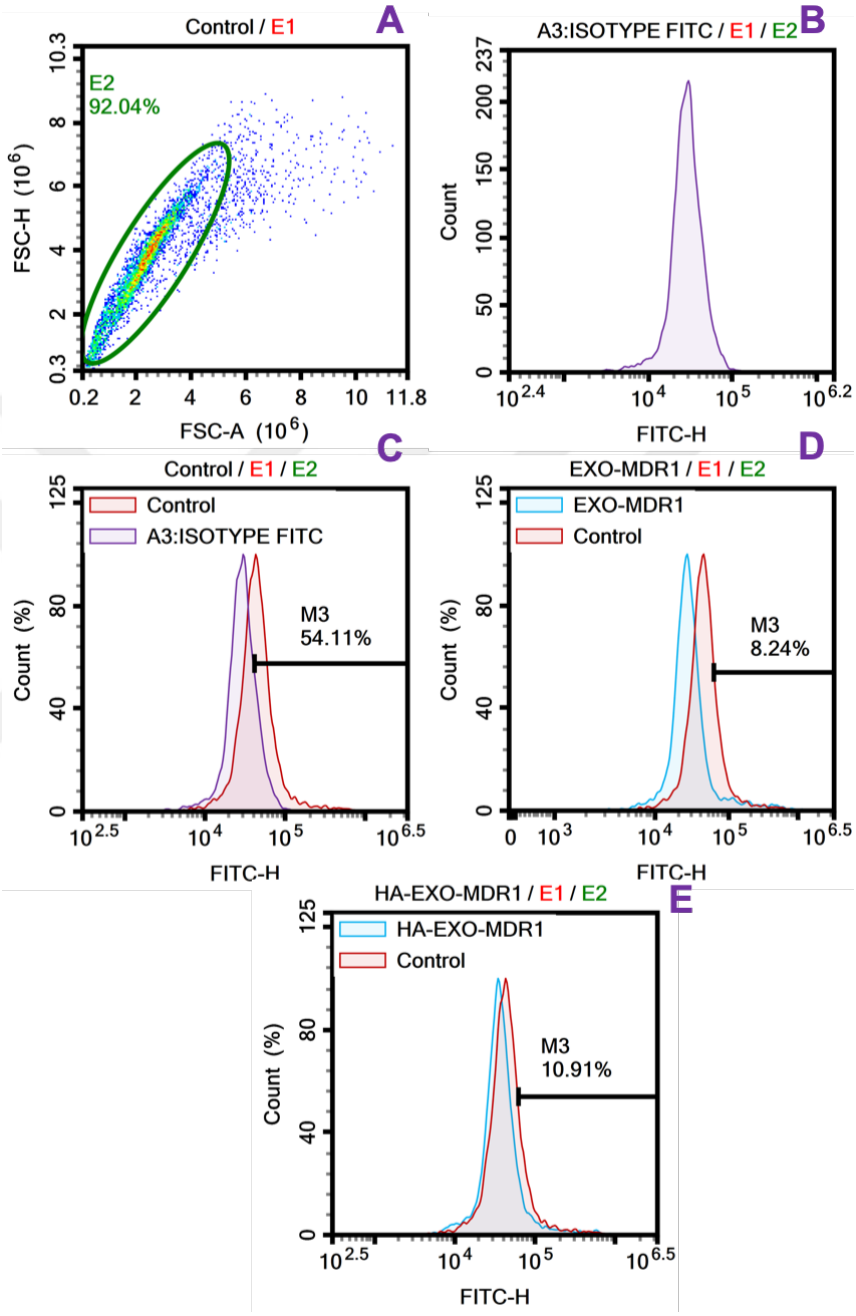
Şekil 4. 60. KKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları ve istatiksel değerlendirmelerinin gösterimi ($p<0.0001$****)

Tablo 4. 6. KKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzey verileri

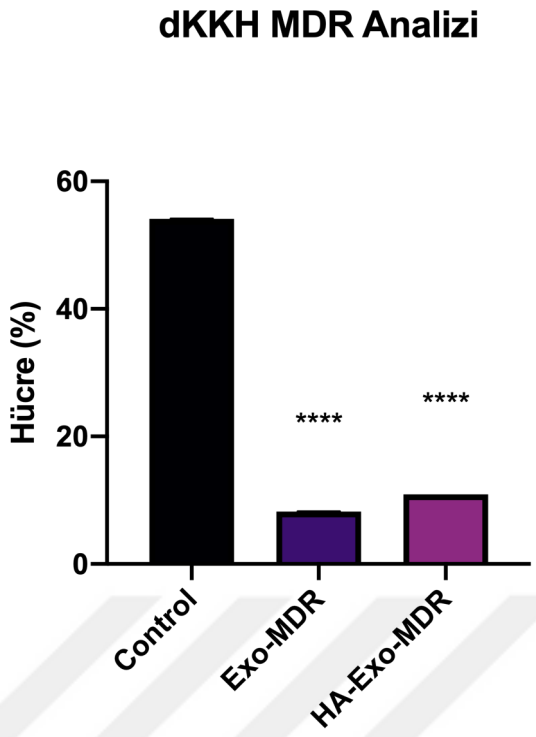
KKH MDR1	**MDR1 (%)**
Kontrol	22,04 ± 0,03
EXO-MDR	10.53 ± 0,01
HA-EXO-MDR	2.11 ± 0,04

Gemsitabin dirençli KKH'lerde flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen MDR1 analizi ve istatiksel değerlendirmeleri Şekil 4.61 ve 4.62'de, MDR1 ekspresyon düzeyleri ise Tablo 4.7'de belirtilmiştir. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR'lerin dKKH'lerle 48 saatlik inkübasyon sonrasında tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatiksel olarak yüksek anlamlılık elde edilmiştir ($p<0.001$****). KKH'lerde hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubunda MDR1 ekspresyonu %54.11 olarak bulunmuştur. Exo-MDR grubunda %8.24 ve HA-Exo-MDR grubunda %10.91 olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre MDR ekspresyon seviyelerinde Exo-

MDR grubunda 6.56 kat; HA-Exo-MDR grubunda ise 4.95 kat azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak KKH'lerde hem Exo-MDR hem de HA-Exo-MDR uygulamalarıyla MDR1 başarıyla sessizleştirilmiştir.



Şekil 4. 61. dKKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları (% Hücre)



Şekil 4. 62. dKKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzeyindeki değişimlerinin flow sitometrik sonuçları ve istatiksel değerlendirmelerinin gösterimi ($p<0.0001$****)

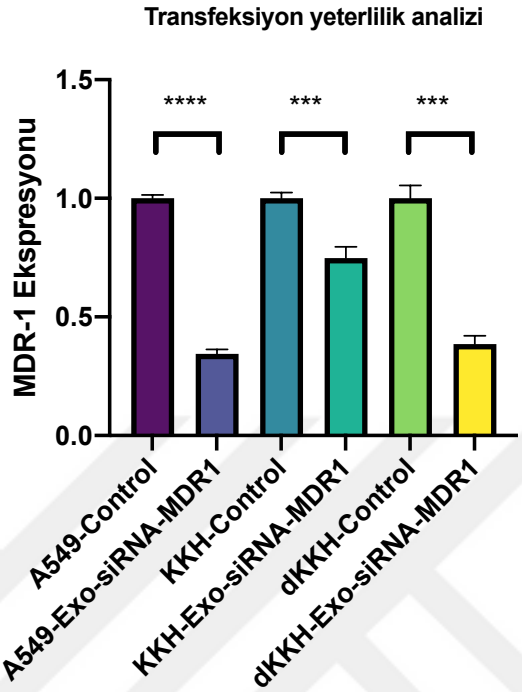
Tablo 4. 7. dKKH'lerdeki Exo-MDR, HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında MDR1 ekspresyon düzey verileri

dKKH MDR1	**MDR1 (%)**
Kontrol	54.11 ± 0,04
EXO-MDR	8.24 ± 0,03
HA-EXO-MDR	10.91 ± 0,01

4.7.7. iSS-MKH-Eksozomlara siRNA transfeksiyonunun belirlenmesi için RT-qPCR ile analizi

A549, KKH ve dKKH'lar ile yapılan transfeksiyon verimlilik analizinde MDR siRNA transfekte edilen eksozomların A549, KKH ve dKKH'lerde MDR-1 geninin ekspresyon seviyelerinde düşüşe neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.63). Transfeksiyon uygulanmayan kontrol hücre gruplarına göre sırasıyla A549 hücrelerinde 2.9 kat; KKH'lerde 1.4 kat ve dKKH'lerde ise 2.63 kat MDR gen

ekspresyon seviyelerinde azalma görülmüştür. siRNA içeren eksozomların hücreler tarafından başarıyla uptake edildiği ve siRNA'ların transfekte edildiği sonucuna ulaşılmıştır.

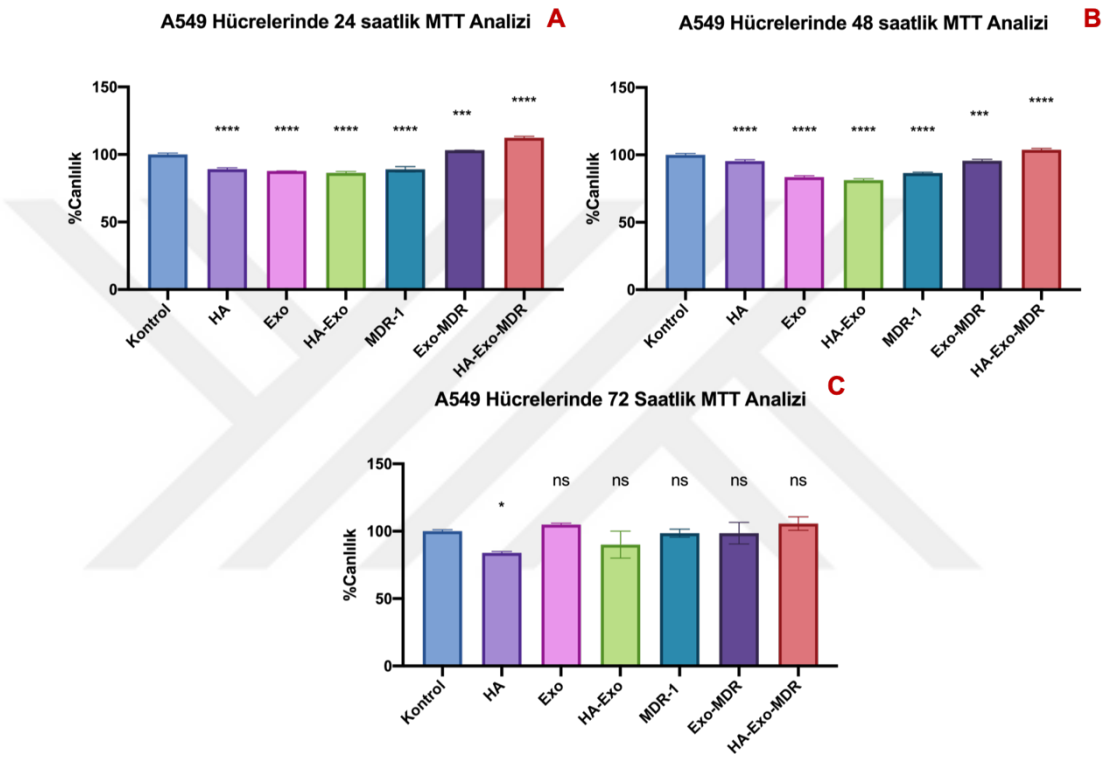


Şekil 4. 63. MDR siRNA içeren eksozomların A549, KKH ve dKKH'lerdeki transfeksiyonun qPCR analizi ile kontrolü ($p<0.0001$****, $p<0.0002$***)

4.8. iSS-MKH-Eksozomlarının HA ile Enkapsülasyonunun ve siRNA Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler Üzerindeki Sitotoksisitesinin Analizi

HA, Saf eksozom, HA ile kaplı eksozom (HA-Exo) MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR için MTT yöntemi ile A549, KKH ve dKKH'ler için 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri için HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR-1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR gruplarıyla 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve istatiksel analizleri Şekil 4.64'de gösterilmiştir. Gerçekleştirilen sitotoksisite analizinde 24 ve 48 saat için tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatiksel olarak yüksek anlamlılık elde edilmiştir ($p<0.0001$, $p<0.0002$). 72. Saatte ise HA grubu hariç tüm gruplar istatiksel olarak "ns" olarak hesaplanmıştır ($p<0.01234$). Analizi gerçekleştirilen grupların herhangi birinde 24, 48 ve 72. Saatlerde sitotoksik etki gözlenmemiştir. HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR-1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR grupları için

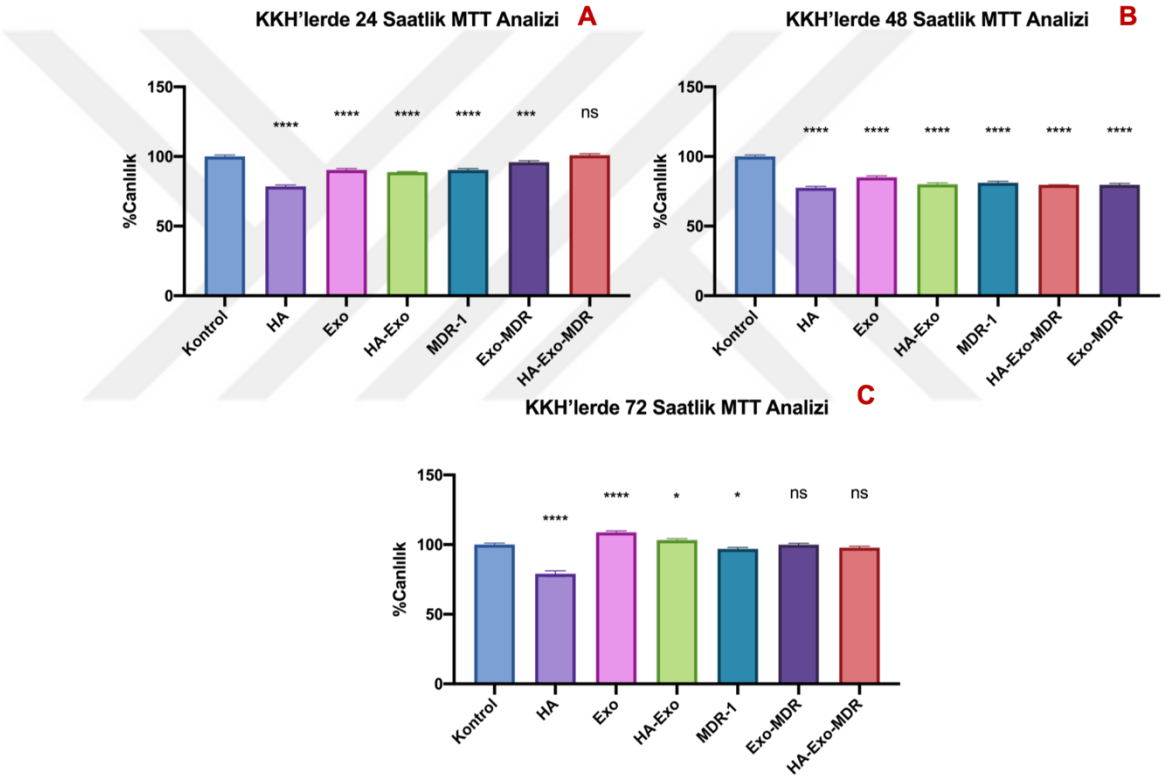
24. Saatte sırasıyla %89.20, %87.75, %86.43, %89.04, %103.2, %112.5; 48. Saat için %95.45, %83.55, %81.33, %86.51, %95.66, %103.8; 72. Saatte ise %83.96, %105.0, %90.07, %98.54, %105.7 olarak elde edilmiştir. Kontrol 100 olarak kabul edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre tüm saatler HA-Exo-MDR grubu proliferatif etki göstermiştir. Ayrıca 24. Saatte Exo-MDR grubu proliferatif etki göstermiştir. En düşük proliferatif etki %81.33 ile 48. Saatte HA-Exo grubunda izlenmiştir.



Şekil 4. 64. HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR'nin A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri **A:** 24 saatlik analiz sonuçları **B:** 48 saatlik analiz sonuçları **C:** 72 saatlik analiz sonuçları ($p<0.0001$****, $p<0.0002$***, $p<0.332$*, $p<1234^{ns}$)(n=6)

KKH'ler için için HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR gruplarıyla 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve istatiksel analizleri Şekil 4.65'de gösterilmiştir. Gerçekleştirilen sitotoksisite analizlerinde sadece 48. Saatte tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatiksel olarak yüksek anlamlılık elde edilmiştir ($p<0.0001$). 24. Saatte HA-Exo-MDR grubu "ns" olarak hesaplanırken diğer gruplar yüksek anlamlı

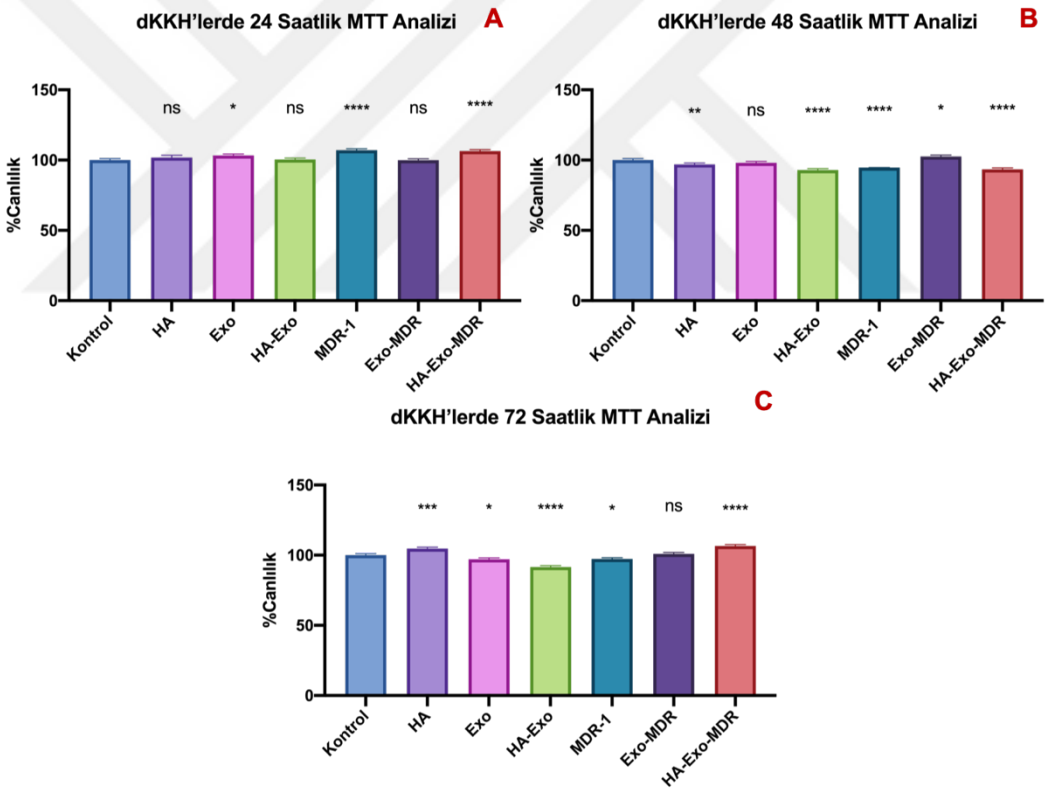
olarak değerlendirilmiştir ($p<0.0001$, $p<0.1234$). 72. Saatte sadece HA ve Exo gruplarında yüksek anlamlılık izlenmiştir ($p<0.0001$). Gerçekleştirilen analizlerin herhangi birinde yüksek sitotoksik etki gözlenmemiştir. HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR grupları için 24. Saatte sırasıyla %78.60, %90.25, %88.83, %90.27, %90.27, %100.9 olarak; 48. Saatte %77.62, %85.10, %80.12, %81.14, %79.64 olarak; 72. Saatte ise %79.10, %108.8, %103.2, %96.93, %99.97, %97.82 olarak elde edilmiştir. Kontrol %100 olarak kabul edilerek yapılan analizde 24. Saatte HA-Exo-MDR, 72. Saatte Saf Eksozom ve HA-exo grubunda proliferatif etki görülmüştür. En düşük proliferatif etki %77.62 ile HA grubunda 48. Saatte izlenmiştir.



Şekil 4. 65. HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR'nin KKH'lerde MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri **A**: 24 saatlik analiz sonuçları **B**: 48 saatlik analiz sonuçları **C:** 72 saatlik analiz sonuçları ($p<0.0001$****, $p<0.0002$***, $p<0.332$*, $p<1234^{ns}$)(n=6)

dKKH'ler için için HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR gruplarıyla 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve istatiksel analizleri Şekil 4.66'de gösterilmiştir. Gerçekleştirilen sitotoksisite analizlerde 24., 48. Ve 72. Saatlerde ve

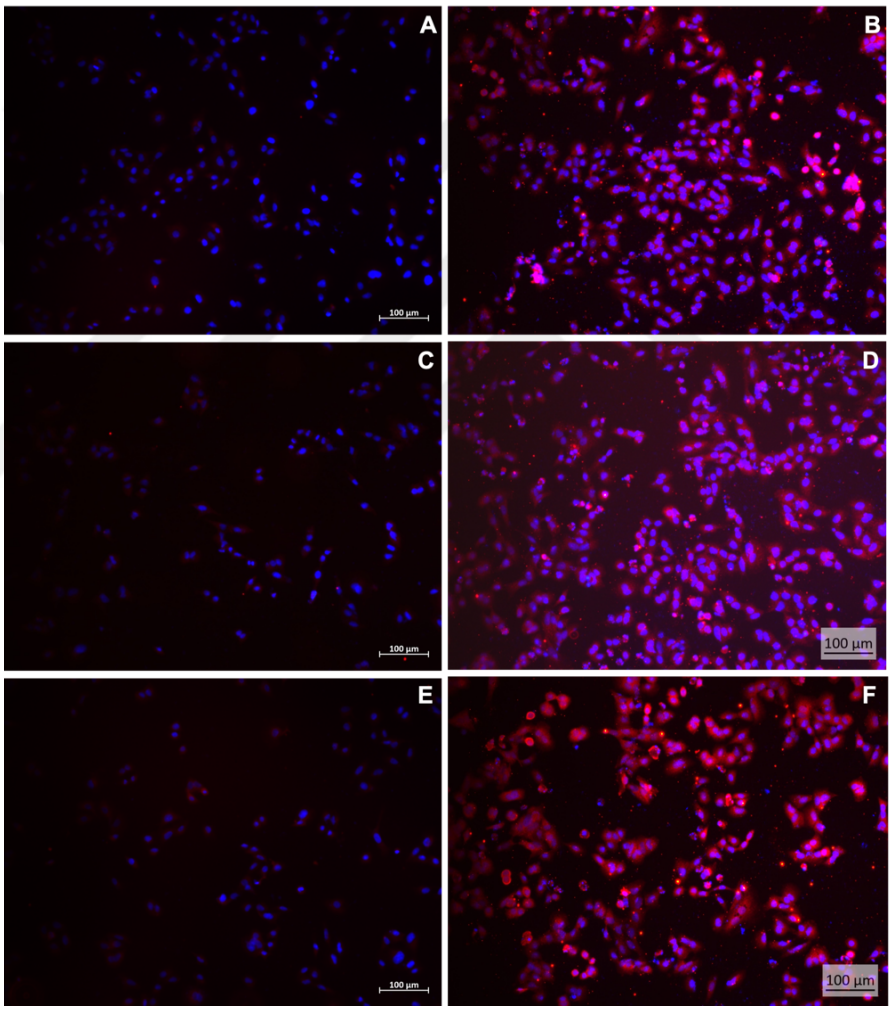
tüm gruplarda herhangi bir sitotoksik etki ile karşılaşılmamıştır. Hatta A549 ve KKH grubuna göre daha yüksek proliferatif etki ile karşılaşılmıştır. Tüm saatlerde HA-Exo-MDR gurbunda kontrol grubuna göre istatiksel olarak yüksek anlamlılık hesaplanmıştır ($p<0.0001$). HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR-1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR grupları için 24. Saatte sırasıyla %101.8, %103.4, %100.5, %107.1, %99.88, %106.4 olarak; 48. Saatte %96.90, %98.07, %92.90, %94.63, %102.6, %93.49 olarak; 72. Saatte ise %104.7, %97.02, %91.57, %97.25, %100.9, %106.5 olarak elde edilmiştir. Kontrol %100 olarak kabul edilerek yapılan analizde 24. Saatte saf eksozom, MDR1, HA-Exo-MDR, 48. Saatte Exo-MDR ve 72. Saatte HA, eXO-MDR ve HA-Exo-MDR grubunda proliferatif etki gözlenmiştir. En düşük proliferatif etki %91.57 ile Exo grubunda 72. Saatte izlenmiştir ancak istatiksel olarak düşük anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p<0.0332$).



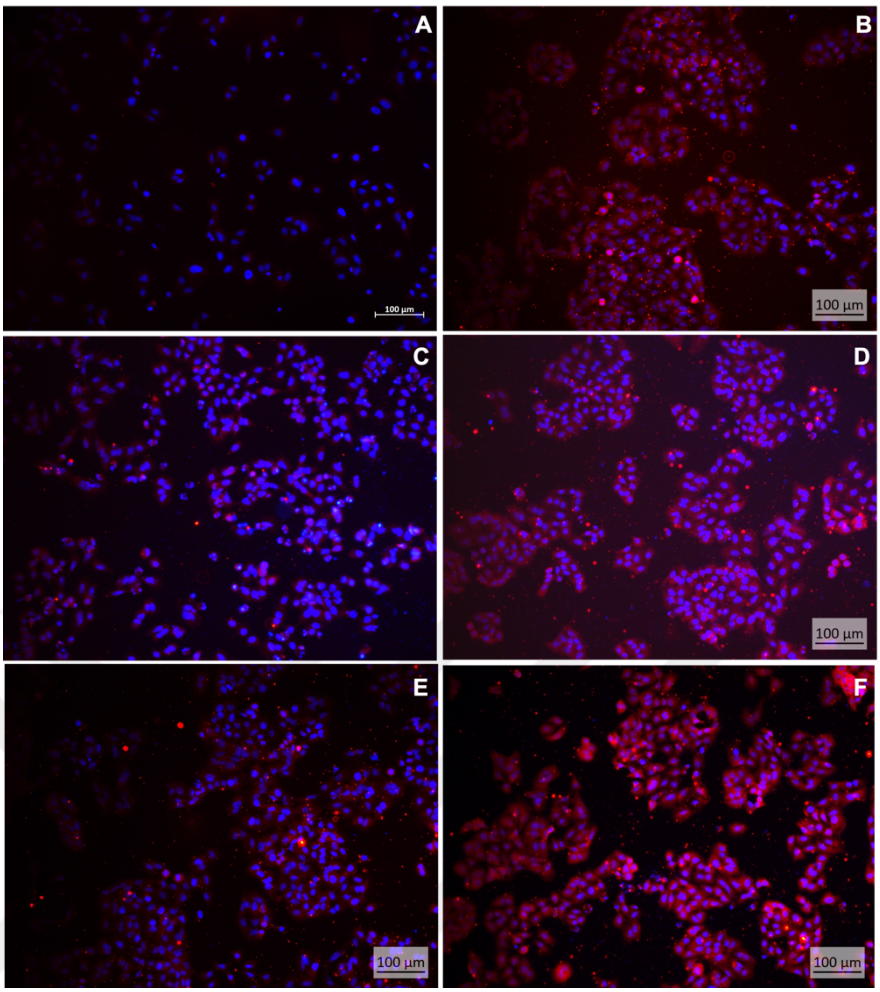
Şekil 4. 66. HA, Saf eksozom, HA-Exo, MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR'nin KKH'lerde MTT yöntemine göre hesaplanan %canlılık verileri **A:** 24 saatlik analiz sonuçları **B:** 48 saatlik analiz sonuçları **C:** 72 saatlik analiz sonuçları ($p<0.0001$****, $p<0.0002$***, $p<0.0021$**, $p<0.332$*, $p<1234^{ns}$)(n=6)

4.9. MDR1 Hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Aktif Kaspaz 3 ile IF Yöntemle Analizi

KKH ve dKHH'lerde İF işaretleme ile aktif kaspaz 3 boyaması gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla 1600 µM Gemsitabin, Exo-MDR, 3 µM G-Exo-MDR, HA-Exo-MDR, 3 µM G-HA-Exo-MDR uygulanan KKH'lerde belirlenen kaspaz 3 aktivasyonu Şekil 4.67'de verilmiştir. Kaspaz 3, Gemsitabin uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre daha fazla floresan ışıma vermiştir (kırmızı).



Şekil 4. 67. KKH'lerde İF işaretleme ile aktif Kaspaz 3'ün floresan mikroskop altında gösterimi. **A:** Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) **B:** 1600 µM Gemsitabin Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) C: Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) **D:** 3 µm G-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) **E:** HA-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) **F:** 3 µm G-HA-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm)



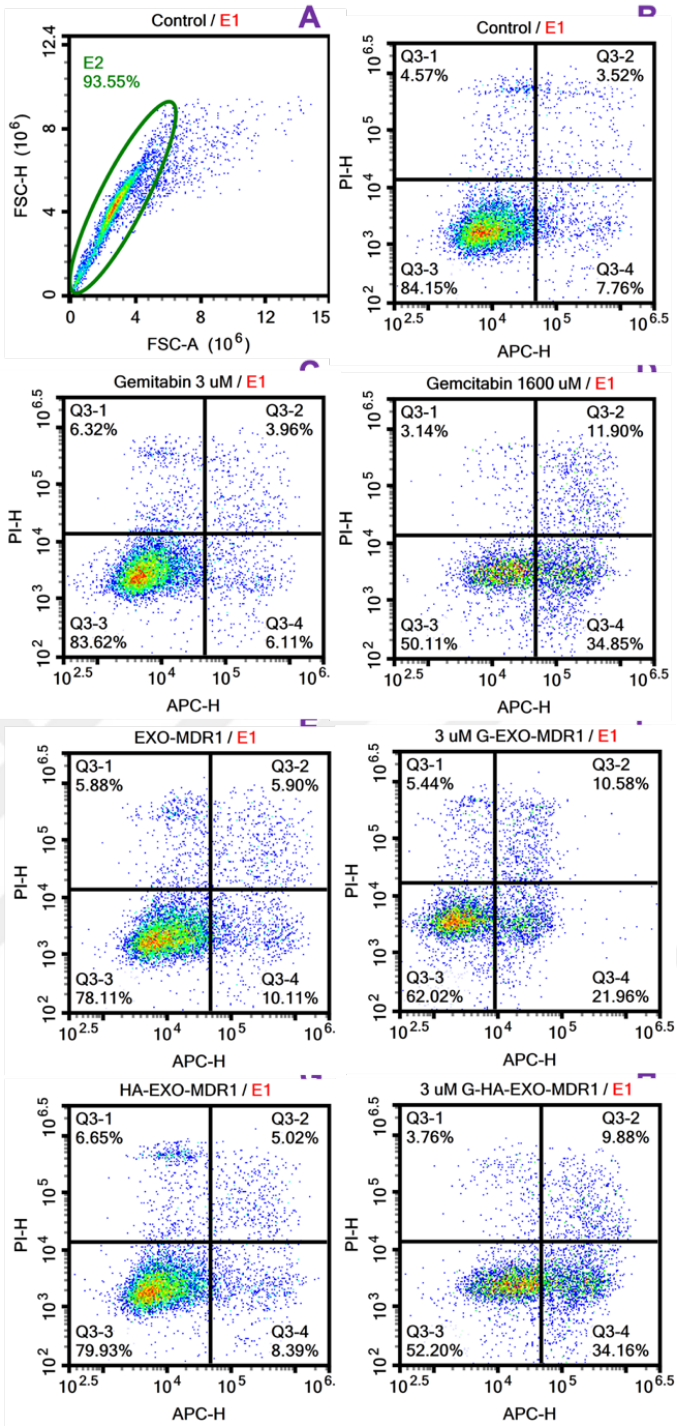
Şekil 4. 68. dKKH'lerde İF işaretleme ile aktif Kaspaz 3'ün floresan mikroskop altında gösterimi. **A:** Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) **B:** 1600 µM Gemsitabin Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) **C:** Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) **D:** 3 µm G-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) **E:** HA-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm) F:3 µm G-HA-Exo-MDR Kontrol (ölçü çubuğu = 100 µm)

Sırasıyla 1600 µM Gemsitabin, Exo-MDR, 3 µM G-Exo-MDR, HA-Exo-MDR, 3 µM G-HA-Exo-MDR uygulanan dKKH'lerde belirlenen kaspaz 3 aktivasyonu Şekil 4.68'de verilmiştir. Kaspaz 3, Gemsitabin uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre daha fazla floresan ışıma vermiştir (kırmızı).

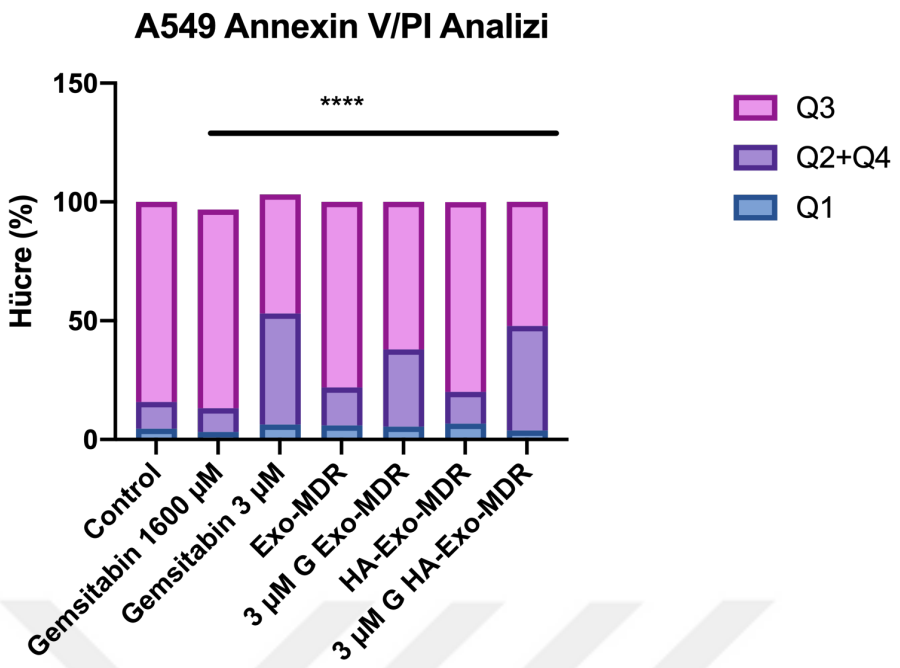
4.10. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Annexin V/PI ile Flow Sitometrik Analizi

A549, KKH ve dKKH'ler iSS-MKH-Eksozom-siRNA'lar ile inkübe edildikten sonra Gemsitabinin apoptotik etkilerinin belirlenebilmesi için flow sitometri cihazı ile Annexin V/PI analizi gerçekleştirilmiştir.

A549 hücrelerindeki flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen Annexin V/PI analizi ve istatiksel değerlendirmeleri şekil 4.69 ve Şekil 4.70'de, apoptotik değerler ise Tablo 4.8'de belirtilmiştir. 24 saatlik Gemsitabin muamelesinden sonra A549 hücrelerinde tüm gruplarda kontrol grubuna göre erken ve geç apoptozda artış gözlenmiştir. Tüm gruplar kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). A549 hücrelerinde kontrol grubunda erken ve geç apoptotik değer %11.28 olarak bulunurken, 1600 μM Gemsitabin uygulanan hücrelerde apoptozun artarak %46.75 olduğu gözlenmiştir. iSS-MKH-Eksozomların (Exo-MDR) uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz kontrol grubu ile benzerlik göstererek %16.01 iken Exo-MDR sonrası 3 μM Gemsitabin uygulanan grupta apoptotik değer artış göstererek %32.54 olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde siRNA içeren HA ile kaplı iSS-MKH-Eksozomlarda (HA-Exo-MDR) erken ve geç apoptoz değerlerinin kontrol grup ile benzer olarak %13.41 bulunurken 3 μM Gemsitabin sonrasında %44.04'e yükseldiği gözlenmiştir. Ayrıca 3 μM Gemsitabin uygulanan A549 hücrelerinde %10.07 olarak erken ve geç apoptoz oranı bulunmuş ve kontrol hücrelerine göre anlamlı bir apoptotik etki gözlenmemiştir.



Şekil 4. 69. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin A549 hücrelerindeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçları (% Hücre).

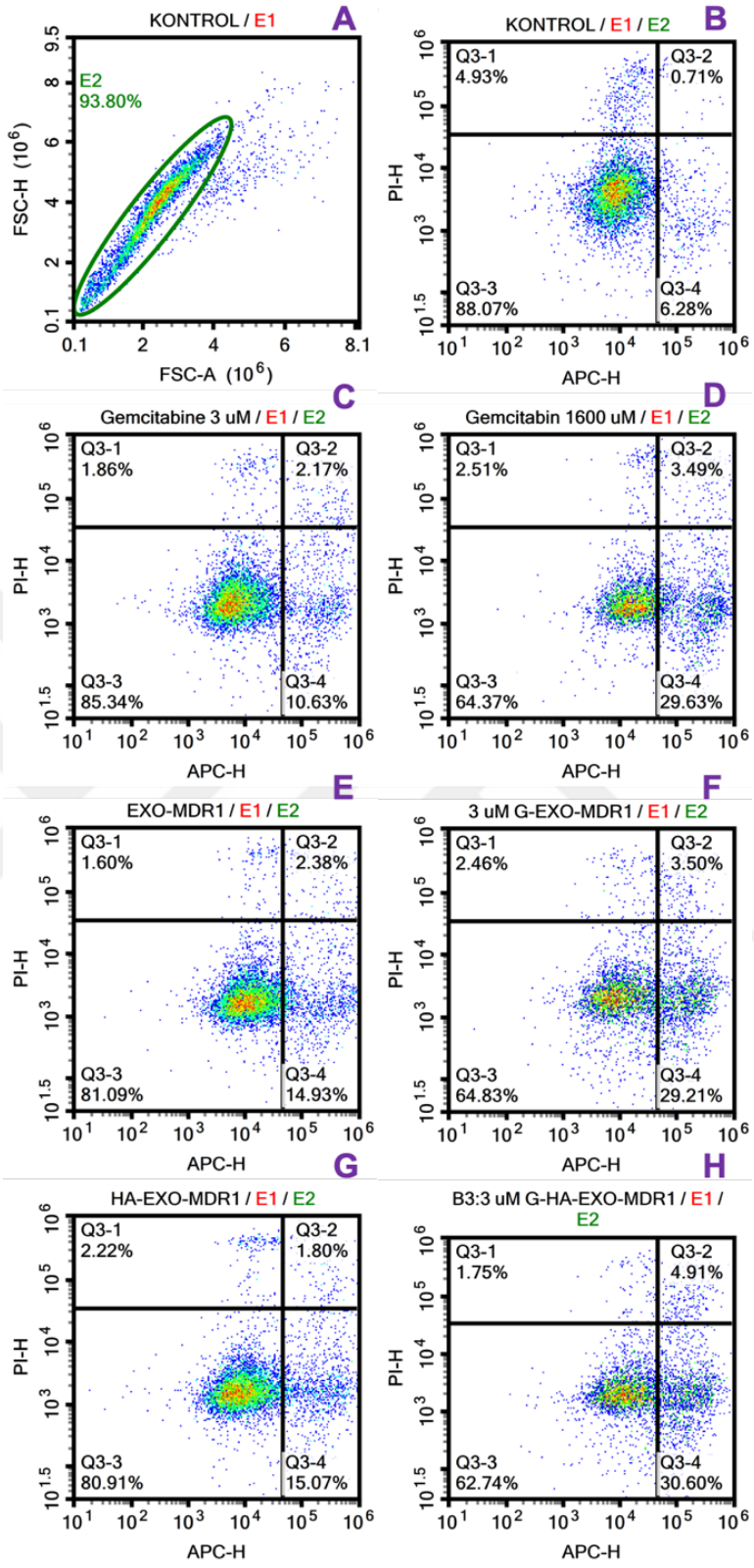


Şekil 4. 70. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin A549 hücrelerindeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçlarının ve istatiksel değerlerinin gösterimi (% Hücre) (P<0.0001****)

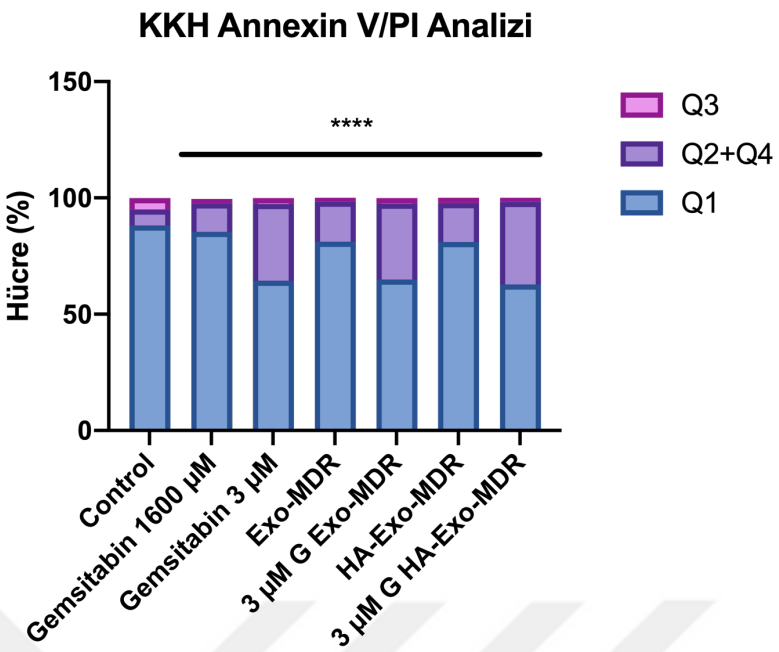
Tablo 4. 8. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin A549 hücrelerindeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin gösterimi

A549 Annexin V/PI	**Q1**	**Q2+Q4**	**Q3**
Kontrol	4,57	11,28	84,15
Gemcitabin 3 µM	3,14	10,07	83,62
Gemcitabin 1600 µM	6,32	46,75	50,11
EXO-MDR	5,88	16,01	78,11
3 µM G EXO-MDR	5,44	32,54	62,02
HA-EXO-MDR	6,65	13,41	79,93
3 µM G HA-EXO-MDR	3,76	44,04	52,2

KKH'lerde flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen Annexin V/PI analizi ve istatiksel değerlendirmeleri Şekil 4.71 ve Şekil 4.72'de, apoptotik değerler ise Tablo 4.9'de belirtilmiştir. KKH'lerde Gemsitabin ile 24 saat tedavi sonrasında tüm gruplarda kontrol grubuna göre erken ve geç apoptozlarda artış tespit edilmiş ve istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). KKH hücrelerinde kontrol grubunda erken ve geç apoptotik değer %6,99 olarak bulunurken, 1600 µM Gemsitabin uygulanan hücrelerde apoptozun %33.12 olduğu gözlenmiştir. iSS-MKH-Eksozomların (Exo-MDR) uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz %17.31 iken Exo-MDR sonrası 3 µM Gemsitabin uygulanan grupta apoptotik değer artış göstererek %32.71 olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde HA-Exo-MDR grubunda erken ve geç apoptoz değerleri %16.87 olarak belirlenmiş ve 3 µM Gemsitabin sonrasında %35.51'e yükseldiği gözlenmiştir. Ayrıca KKH'lerde sadece 3 µM Gemsitabin uygulaması ile erken ve geç apoptoz oranı %12.8 belirlenmiştir.



Şekil 4. 71. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin KKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçları (% Hücre).

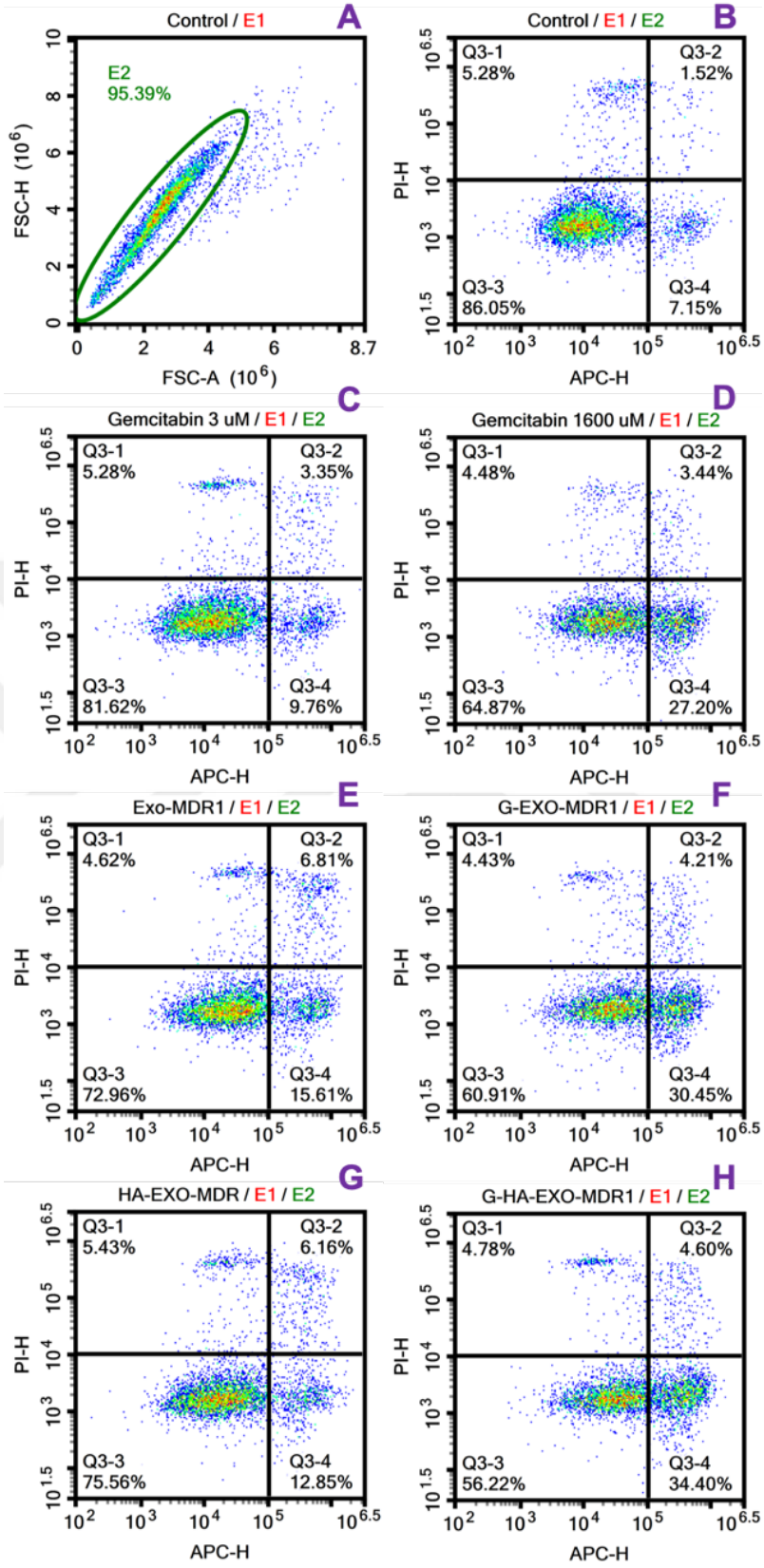


Şekil 4. 72. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin KKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçlarının ve istatiksel değerlerinin gösterimi (% Hücre) (P<0.0001****).

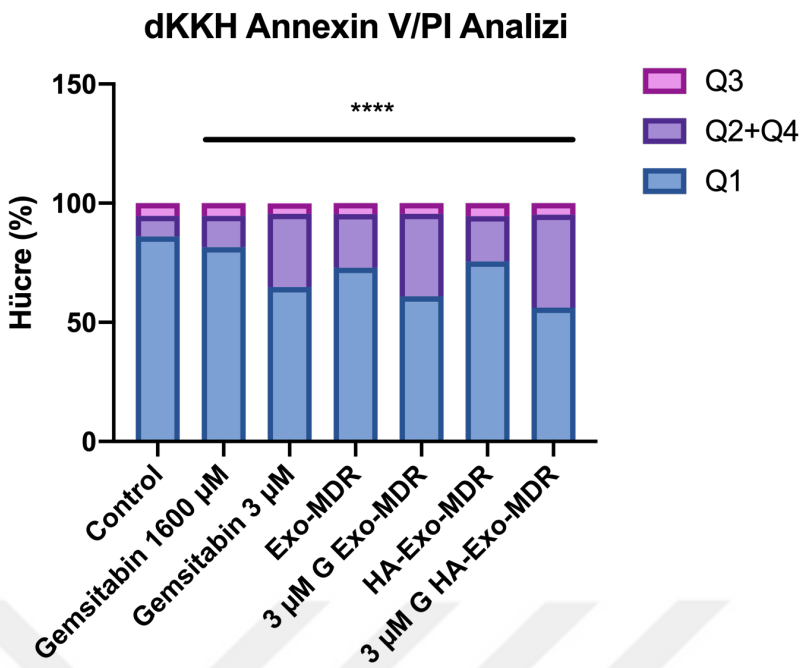
Tablo 4. 9. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin KKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin gösterimi

KKH Annexin V/PI	**Q1**	**Q2+Q4**	**Q3**
Kontrol	4,93	6,99	88,07
Gemcitabin 3 µM	1,86	12,8	85,34
Gemcitabin 1600 µM	2,51	33,12	64,37
EXO-MDR	1,6	17,31	81,09
3 µM G EXO-MDR	2,46	32,71	64,83
HA-EXO-MDR	2,22	16,87	80,91
3 µM G HA-EXO-MDR	1,75	35,51	62,74

dKKH'lerde flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen Annexin V/PI analizi ve istatiksel değerlendirmeleri Şekil 4.73 ve Şekil 4.74'de, apoptotik değerler ise Tablo 4.10'de belirtilmiştir. dKKH'lerde 3 µM ve 1600 µM Gemsitabin ile 24 saat tedavi sonrasında tüm gruplarda kontrol grubuna göre erken ve geç apoptozlarda artış tespit edilmiş ve istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). dKKH'lerde kontrol grubunda erken ve geç apoptotik değer %8,67 olarak bulunurken, 1600 µM Gemsitabin uygulanan hücrelerde apoptozun %30.64 olduğu gözlenmiştir. Exo-MDR uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz %22.41 iken Exo-MDR sonrası 3 µM Gemsitabin uygulanan grupta apoptotik değer artış göstererek %34.66 olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde HA-Exo-MDR grubunda erken ve geç apoptoz değerleri %19.01 olarak belirlenmiş ve 3 µM Gemsitabin sonrasında %39.00'e yükseldiği gözlenmiştir. Ayrıca 3 µM Gemsitabin uygulanan dKKH'lerde erken ve geç apoptoz etki oranı %13.1 olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 73. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin dKKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçları (% Hücre).



Şekil 4. 74. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin dKKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin flow sitometrik sonuçlarının ve istatiksel değerlerinin gösterimi (%Hücre) ($p<0.0001$****)

Tablo 4. 10. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında Gemsitabinin dKKH'lerdeki canlı, ölü, geç apoptoz ve erken apoptoz değerlerinin gösterimi

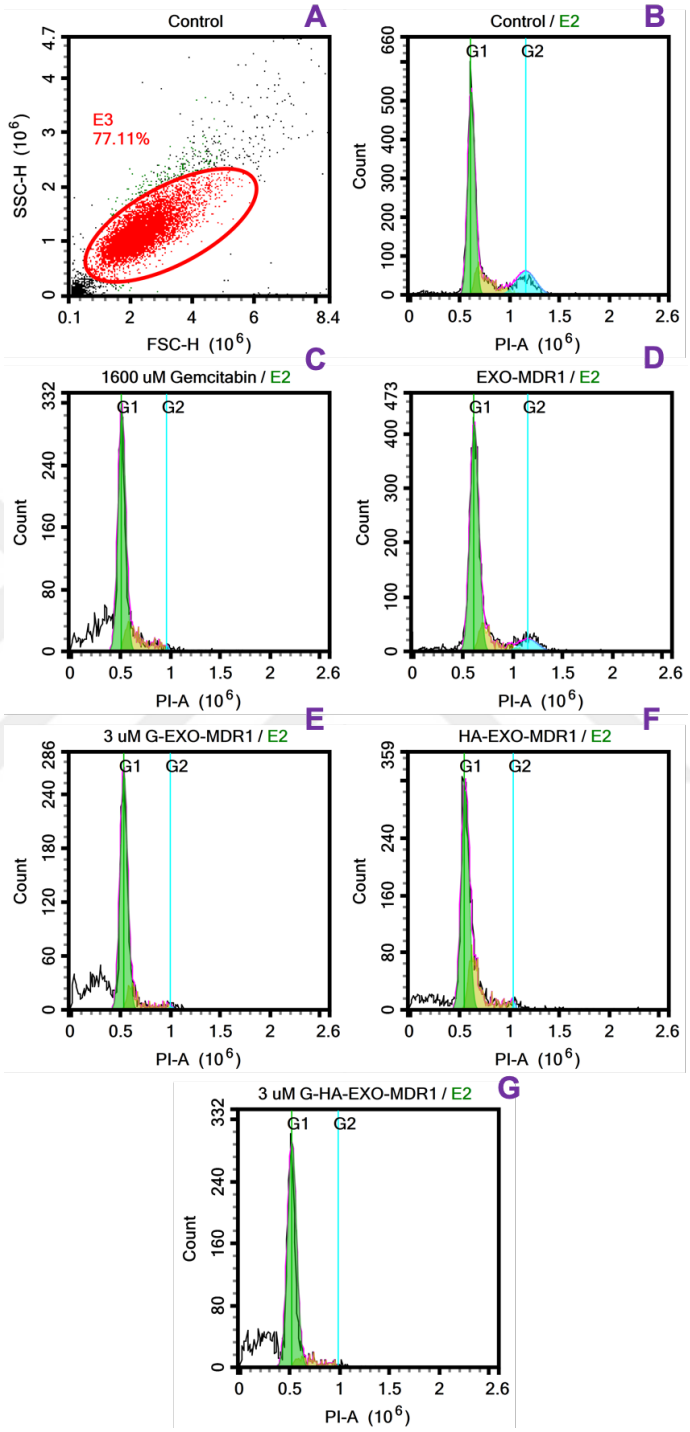
dKKH Annexin V/PI	Q1	Q2+Q4	Q3
Kontrol	5,28	8,67	86,05
Gemcitabin 3 µM	5,28	13,11	81,62
Gemcitabin 1600 µM	4,48	30,64	64,87
EXO-MDR	4,62	22,42	72,96
3 µM G EXO-MDR	4,43	34,66	60,91
HA-EXO-MDR	5,43	19,01	75,56
3 µM G HA-EXO-MDR	4,78	39,00	56,22

4.11. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'ler Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Flow Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi

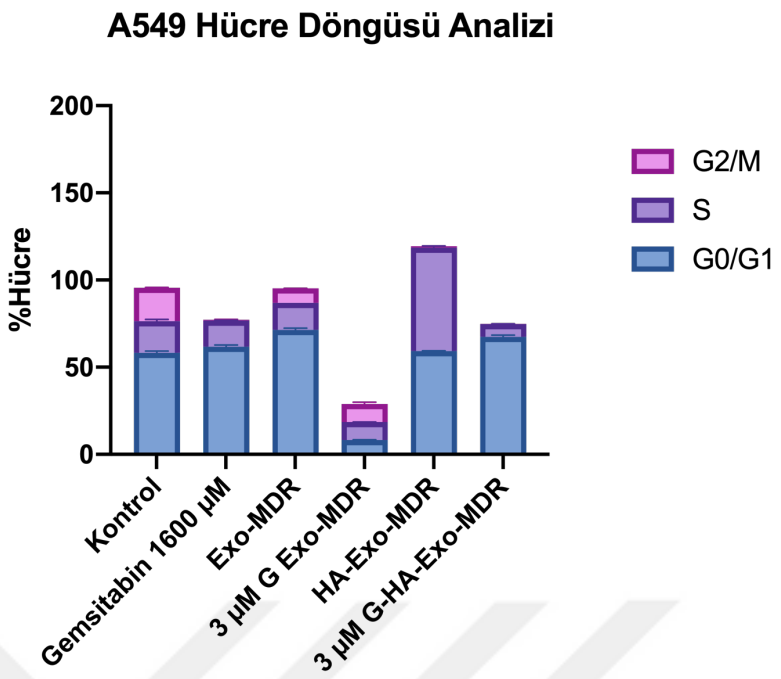
A549, KKH ve dKKH'ler iSS-MKH-Eksozom-siRNA'lar ile inkübe edildikten sonra Gemsitabinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri flow sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Bu etki G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin yüzdelerine bağlı olarak belirlenmiştir.

A549 hücrelerindeki flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi Şekil 4.75 ve Şekil 4.762da , hücre döngüsü G0/G1, S ve G2/M fazındaki hücre % verileri ise Tablo 4.11'de belirtilmiştir. 24 saatlik Gemsitabin muamelesinden sonra A549 hücrelerinde G0/G1 fazında Kontrol grubuna göre önemli bir değişim gözlenmemiştir. G0/G1 değerleri sırasıyla kontrol grubunda %58.18, 1600 µM Gemsitabin grubunda %61.75, Exo-MDR grubunda %71.46, G-Exo-MDR'de %61.86, HA-Exo-MDR'de %52,29 ve HA-G-Exo-MDR'de %67.44 olarak belirlenmiştir. S fazında ise aynı gruplar sırasıyla %18.29, %15.07, %10.28, %25.19 ve %7.35 olarak hesaplanmıştır. S fazında HA-G-Exo-MDR grubunda önemli bir azalma ve HA-Exo-MDR grubunda ise önemli bir artış gözlenmiştir.

G2/M fazında aynı gruplar sırası ile %19.15, %8.29, %0.01, %0.83 ve %0.07 olarak hesaplanmıştır. G2/M fazında 1600 µM Gemsitabin, 3 µM G-Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve 3 µM G-HA-Exo-MDR grubunda azalma gözlenmiştir.



Şekil 4. 75. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında A549 hücrelerindeki DNA Histogramı

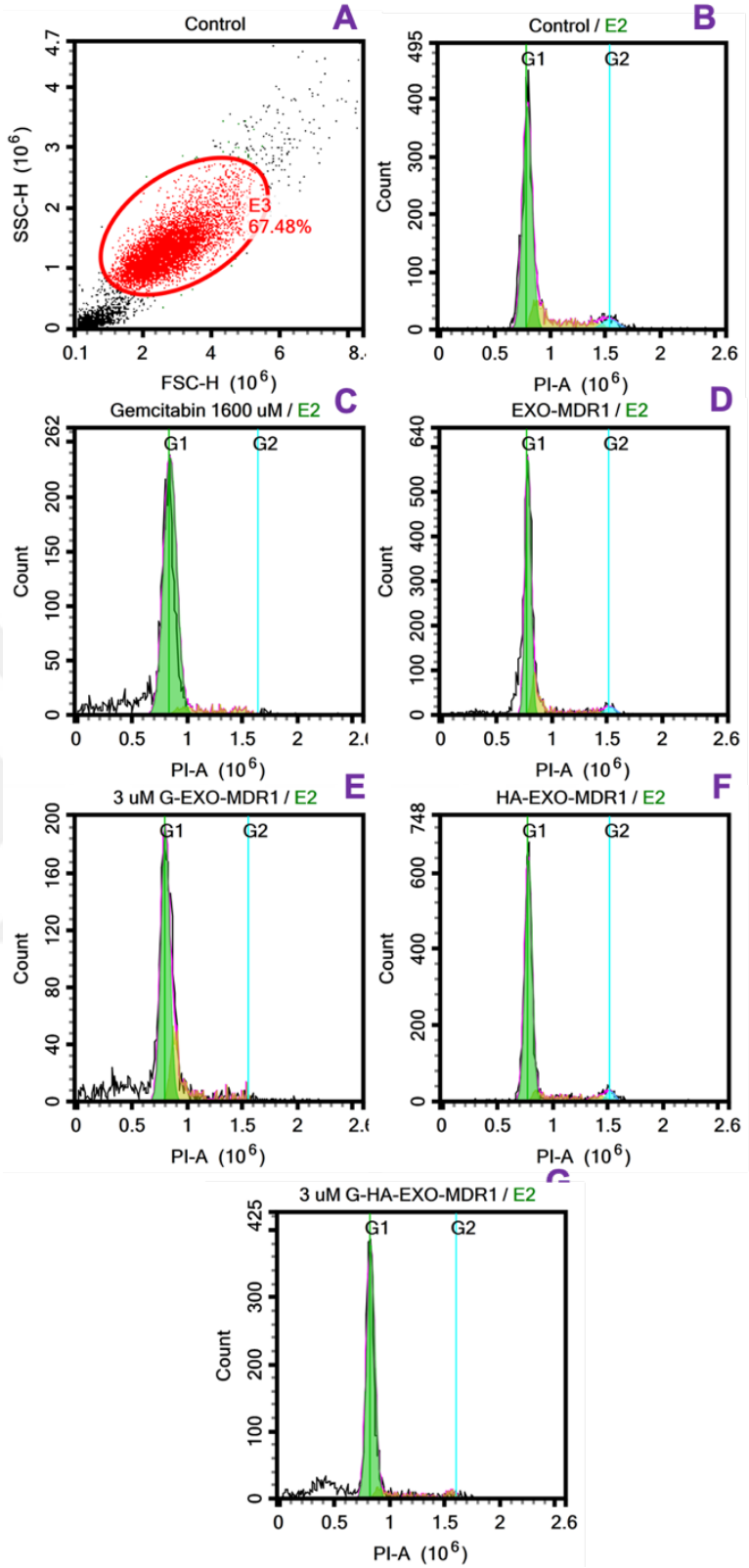


Şekil 4. 76. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında A549 hücrelerindeki DNA Histogramının ve istatiksel analizinin gösterimi

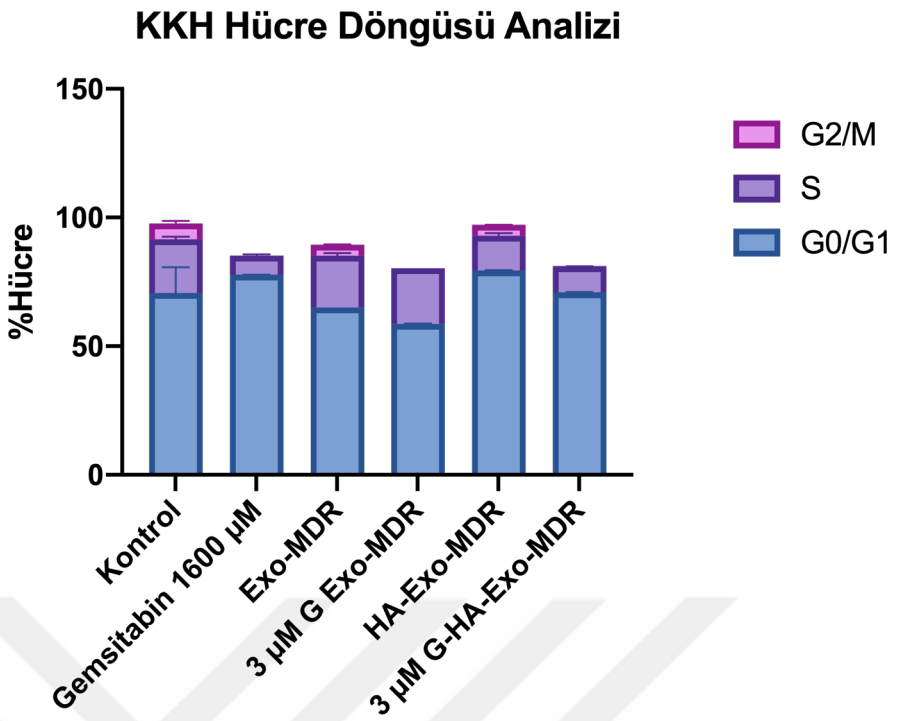
Tablo 4. 11. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında A549 hücrelerindeki G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimlerin gösterimi

A549 Hücre Döngüsü	**G0/G1**	**S**	**G2/M**
Kontrol	58,18	18,29	19,15
Gemsitabin 1600 µM	61,75	15,07	0,5
EXO-MDR	71,46	15,42	8,29
3 µM G EXO-MDR	61.86	10,28	0.63
HA-EXO-MDR	59,29	25.19	0,83
3 µM G HA-EXO-MDR	67,44	7,35	0,07

KKH'lerdeki flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi Şekil 4.77 ve Şekil 4.78'de, hücre döngüsü G0/G1, S ve G2/M fazındaki hücre % verileri ise Tablo 4.12'de belirtilmiştir. 24 saatlik Gemsitabin muamelesinden sonra KKH grupların hiçbirinde G0/G1 fazında önemli bir değişim gözlenmemiştir. G0/G1 değerleri kontrol grubu, 1600 µM Gemsitabin, Exo-MDR, G-Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve HA-G-Exo-MDR gruplarında sırasıyla %70.7, %77.76, %65.04, %58.68, %79.49, %70.98 olarak hesaplanmıştır. S fazında 1600 µM Gemsitabin uygulaması ile önemli bir azalma gözlenirken, HA-Exo-MDR ve HA-G-Exo-MDR gruplarında da kontrol grubuna göre bir azalma izlenmiştir. Exo-MDR ve G-Exo-MDR grupları kontrol ile benzer seviyelerde arrest göstermişlerdir. S fazında ise aynı gruplar sırasıyla %20.89, %7.71, %20.17, %21.58, %13.48 ve%10.06 olarak belirlenmiştir. G2/M fazında aynı gruplar sırası ile %6.08, %0.00, %4.20, %0.01, %4.18 ve %0.14 olarak hesaplanmıştır. G2/M fazında 1600 µM Gemsitabin, G-Exo-MDR ve HA-G-Exo-MDR grubunda önemli azalmalar gözlenmiştir.



Şekil 4. 77. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında KKH'lerdeki DNA Histogramı



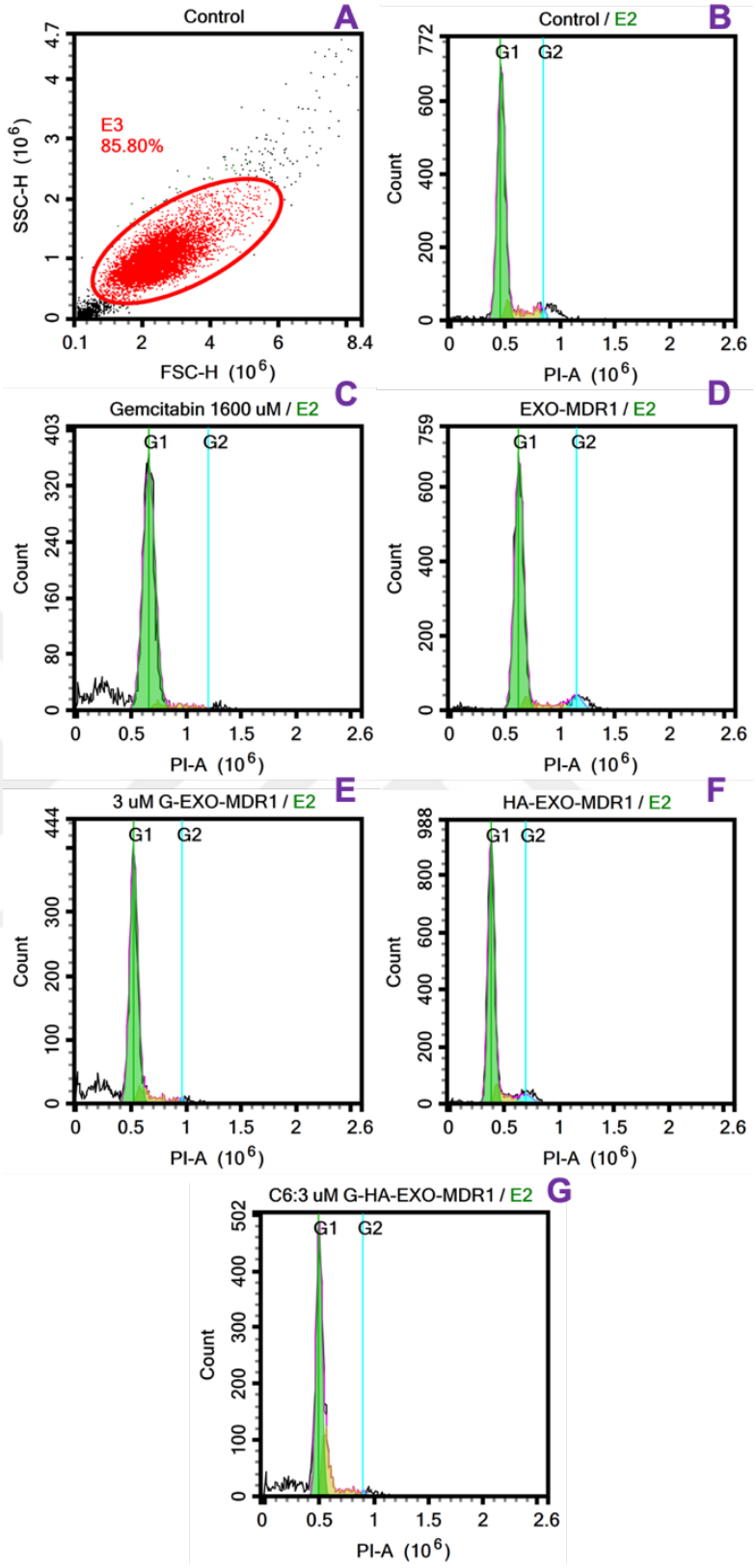
Şekil 4. 78. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında KKH'lerdeki DNA Histogramının ve istatiksel analizinin gösterimi

Tablo 4. 12. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında KKH'lerdeki G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimlerin gösterimi

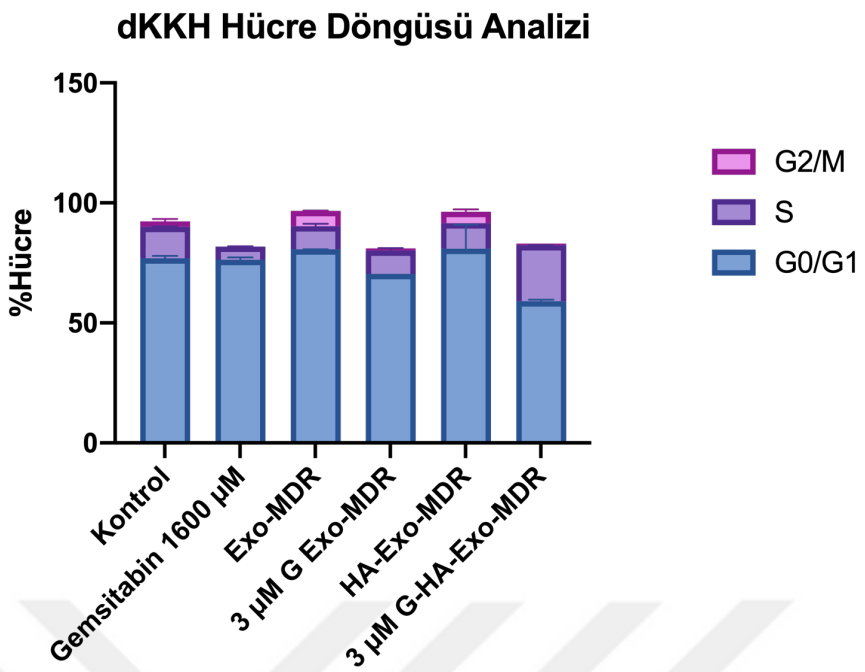
KKH Hücre Döngüsü	G0/G1	S	G2/M
Kontrol	70,70	20,89	6,08
Gemsitabin 1600 µM	77,76	7,71	0.00
EXO-MDR	65,04	20,17	4,20
3 µM G EXO-MDR	58,68	21,58	0,01
HA-EXO-MDR	79,49	13,48	4,18
3 µM G HA-EXO-MDR	70,98	10,06	0,14

Dirençli KKH'lerdeki flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi Şekil 4.79 ve Şekil 4.80'de, hücre döngüsü G0/G1, S ve G2/M fazındaki hücre % verileri ise Tablo 4.13'de belirtilmiştir. 24 saatlik Gemsitabin muamelesinden sonra dKKH'lerde G0/G1 fazında G-HA-Exo grubunda bir azalma

gözlenmiştir. G0/G1 değerleri kontrol grubu, 1600 µM Gemsitabin, Exo-MDR, G-Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve HA-G-Exo-MDR gruplarında sırasıyla %76.98, %76.35, %80.63, %70.42, %80.88 ve %58.74 olarak belirlenmiştir. S fazında ise 1600 µM Gemsitabin uygulaması ile önemli bir azalma gözlenirken, HA-G-Exo-MDR grubunda ise kontrol grubuna göre bir artış olmuştur. S fazında ise aynı gruplar sırasıyla %13.13, %5.42, %9.72, %9.76, %10.71 ve %23.33 olarak hesaplanmıştır. G2/M fazında aynı gruplar sırasıyla %2.16, %0.09, %6.33, %0.90, %5.66 ve %0.69 olarak belirlenmiştir. G2/M fazında 1600 µM Gemsitabin, G-Exo-MDR ve HA-G-Exo-MDR grubunda önemli azalmalar gözlenirken, Exo-MDR ve HA-Exo-MDR gruplarında kontrol gruplarına göre bir artış izlenmiştir.



Şekil 4. 79. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında dirençli KKH'lerdeki DNA Histogramı



Şekil 4. 80. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında dKKH'lerdeki DNA Histogramının ve istatiksel analizinin gösterimi

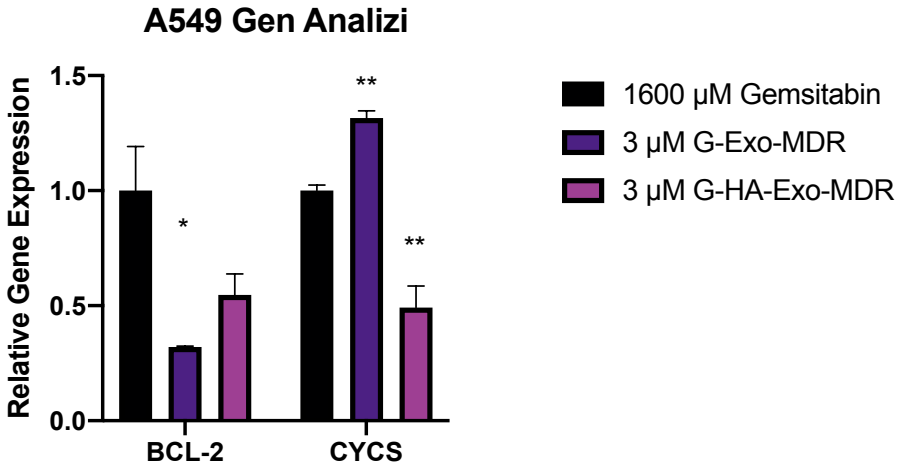
Tablo 4. 13. Exo-MDR, HA-Exo-MDR ve Gemsitabin uygulaması sonrasında dKKH'lerdeki G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki değişimlerin gösterimi

dKKH Hücre Döngüsü	**G0/G1**	**S**	**G2/M**
Kontrol	76,98	13,13	2,16
Gemsitabin 1600 µM	76,35	5,42	0,09
EXO-MDR	80,63	9,72	6,33
3 µM G EXO-MDR	70,42	9,76	0,90
HA-EXO-MDR	80,88	10,71	5,66
3 µM G HA-EXO-MDR	58,74	23,33	0,69

4.12. MDR1 hedefli siRNA (Exo-MDR) Transfeksiyonunun A549, KKH ve dKKH'lerin MDR1 Geni ve Apoptozunun Üzerindeki Etkisinin Real Time (qPCR) ile Genotipik Analizi

A549, KKH ve dKKH'lerde 1600 µM Gemsitabin; 3 µM G-Exo-MDR ve 3 µM G-HA-Exo-MDR gruplarında ise 3 µM Gemsitabin muamelesinden sonra BCL-2 ve CYCS genleri için qPCR analizi gerçekleştirilmiştir.

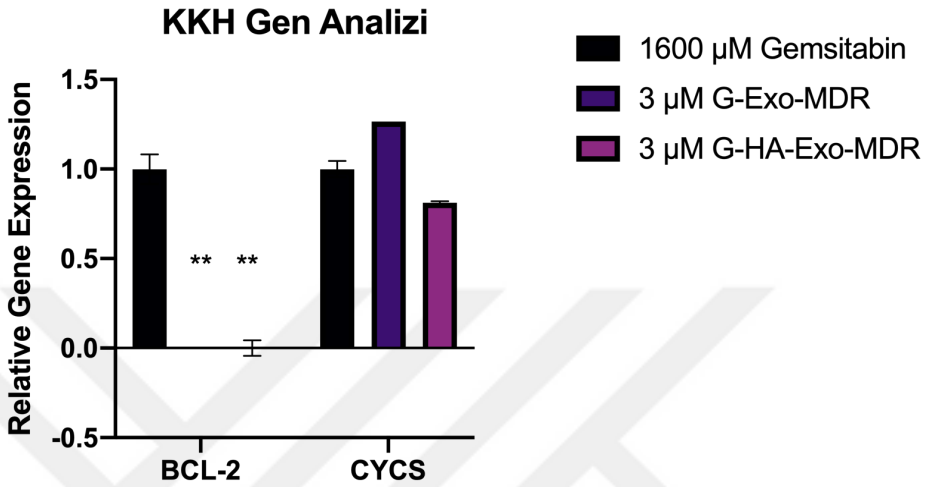
A549 hücrelerinde Bcl-2 ve CYCS geni için yapılan qPCR analiz ve hesaplamaları Şekil 4.81'de verilmiştir. A549 hücrelerinde Bcl-2 anti-apoptotik geni için ise 1600 µM Gemsitabin grubuna göre 3 µM G-Exo-MDR 3.12 kat, 3 µM G-HA-Exo-MDR grubu ise 1.85 kat azalma göstermiştir. 1600 µM Gemsitabin uygulanan grup ile karşılaştırıldığında; 3 µM G-Exo-MDR grubu 3 µM G-HA-Exo-MDR grubuna göre istatiksel olarak daha anlamlı bulunmuştur ($p<0.0332$*). Mitokondriyal iç yolakta görevli olan CYCS gen ekspresyonunda 1600 µM Gemsitabin grubuna göre 3 µM G-Exo-MDR 1.31 kat artış gösterirken, 3 µM G-HA-Exo-MDR grubu 2.04 kat azalma göstermiştir. 1600 µM Gemsitabin uygulanan grup ile karşılaştırıldığında; hem 3 µM G-Exo-MDR grubu hem de 3 µM G-HA-Exo-MDR grubu istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0021$**).



Şekil 4. 81. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR sonrası Gemsitabin uygulanmış A549 hücrelerinde BCL-2 ve CYCS genlerinin ifadeleri ($p<0.0021$**, $p<0.0332$*)

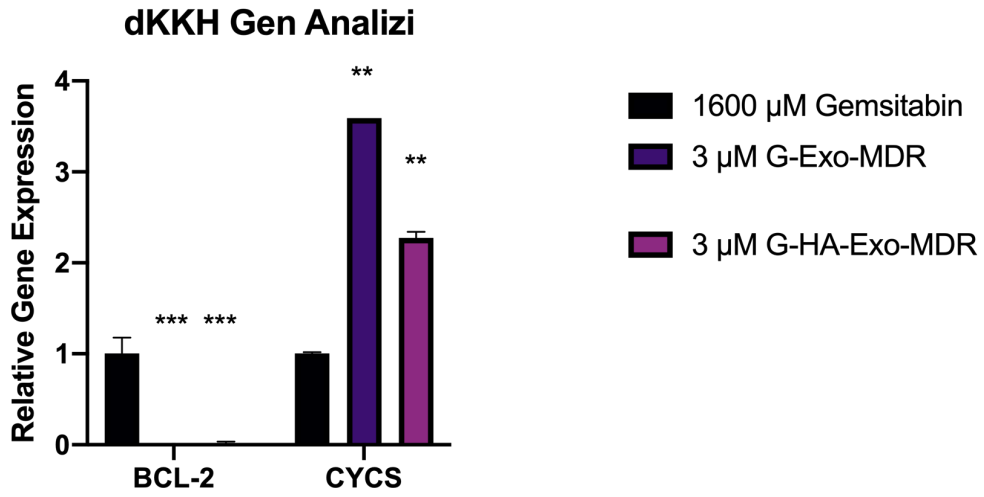
Dirençsiz KKH'lerde Bcl-2 ve CYCS geni için yapılan qPCR analiz ve hesaplamaları Şekil 4.82 verilmiştir. KKH'lerde Bcl-2 anti-apoptotik geni için ise

1600 µM Gemsitabin grubuna göre 3 µM G-Exo-MDR 1 kat, 3 µM G-HA-Exo-MDR grubu ise 1 kat azalma göstermiştir. Bu azalmalar istatiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir($p<0.0021$**). Mitokondriyal iç yolakta görevli olan CYCS gen ekspresyonunda 1600 µM Gemsitabin grubuna göre 3 µM G-Exo-MDR 1.26 kat artış gösterirken, 3 µM G-HA-Exo-MDR grubu 1.23 kat azalma göstermiştir.



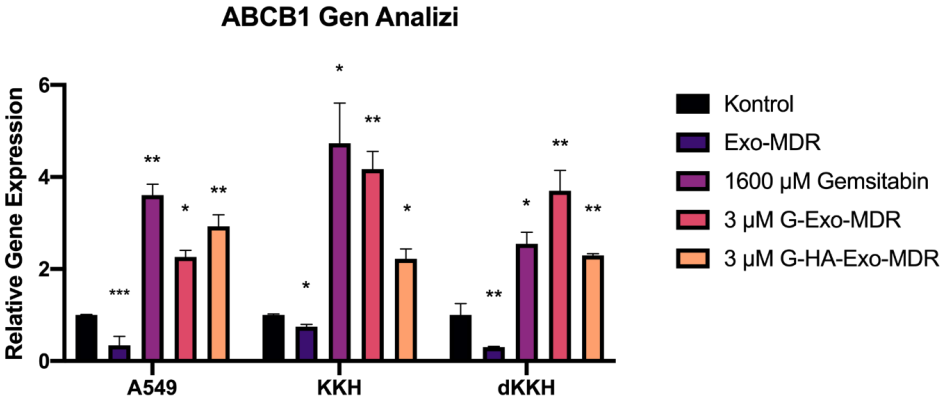
Şekil 4. 82. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR sonrası Gemsitabin uygulanmış KKH'lerde BCL-2 ve CYCS genlerinin ifadeleri ($p<0.0021$**, $p<0.0332$*)

Dirençli KKH'lerde Bcl-2 ve CYCS geni için yapılan qPCR analiz ve hesaplamaları Şekil 4.83'de verilmiştir. dKKH'lerde Bcl-2 anti-apoptotik geni için ise 1600 µM Gemsitabin grubuna göre 3 µM G-Exo-MDR 1.00 kat, 3 µM G-HA-Exo-MDR grubu ise 1.00 kat azalma göstermiştir. Bu azalmalar istatiksel olarak yüksek anlamlı olarak hesaplanmıştır ($p<0.0002$***). Mitokondriyal iç yolakta görevli olan CYCS gen ekspresyonunda 1600 µM Gemsitabin grubuna göre 3 µM G-Exo-MDR 3.25 kat artış gösterirken, 3 µM G-HA-Exo-MDR grubu 2.27 kat azalma göstermiştir. Bu artışlar istatiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir ($p<0.0021$).



Şekil 4. 83. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR sonrası Gemsitabin uygulanmış dKKH'lerde BCL-2 ve CYCS genlerinin ifadeleri ($p<0.0002$***, $p<0.0021$**)

ABCB1 gen analizi için A549, KKH ve dKKH'lerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.84). Yapılan qPCR analizinde ABCB1 gen ekspresyonları Exo-MDR, 1600 µM Gemsitabin, 3 µM G-Exo-MDR ve 3 µM G-HA-Exo-MDR grupları için A549 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 2.94 kat azalırken, 0.27 kat, 0.44 kat, 0.34 kat artmıştır. KKH'lerde sırasıyla 1.35 kat azalırken, 0.21 kat, 0.23 kat, 0.45 kat artmıştır. dKKH'lerde ise sırasıyla 3.33 kat azalırken, 0.39 kat, 0.27 kat, 0.43 kat artmıştır.



Şekil 4. 84. Exo-MDR ve HA-Exo-MDR sonrası Gemsitabin uygulanmış A549, KKH ve dKKH'lerde ABCB1 (MDR1), geninin ($p<0.0002$***, $p<0.0021$**, $p<0.0332$*)

5. TARTIŞMA

Her gün yeni gelişen tedavi stratejilerine rağmen kanserin her yıl insidans ve mortalitesi artmaktadır. Kanser tedavi stratejileri genel olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi ve bu yöntemlerin kombinasyonu olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak son dönemlerde kemoterapötiklerin yetersiz etkileri nedeniyle sürekli olarak yeni ilaç keşifleri üzerinde de durulduğunu görmekteyiz. Bu durum hali hazırda elimizde bulunan kemoterapötiklerin artık atıl duruma gelmesi anlamına gelmektedir. Yeni bir ilaç geliştirilmesi 4 aşamadan oluşan yaklaşık 14 yıl süren birçok deneysel ve sistematik prosesten geçmektedir. Tüm kanıtlanmış pozitif etkileri ile ruhsatlandırılmış olmalarına rağmen günün sonunda toplanan ilaçlar olduğunu görmekteyiz (Adams ve Brantner., 2006). İlaçların zamanla etkilerini kaybetmeleri hücrelerin özellikle kanser kök hücrelerin sahip olduğu direnç mekanizmalarından kaynaklanmaktadır. Üzerinde en çok araştırılan ve tanımlanan direnç mekanizması proteini P-glikoproteindir. ABC transporter aile üyelerinden olan P-glikoproteinler ATP bağımlı olarak çalışırlar ve temel görevleri istenmeyen molekülleri hücre dışına eflaks etmektir. Kanser hücrelerinde ekspresyonlarının çok yüksek olması onları hedef protein haline getirmiştir. Kanser kök hücrelerde P-glikoproteinlerin ekspresyon düzeylerinin çok yüksek olduğu gösterilmiştir. Kanser tedavilerine karşı geliştirilen direncin altında yatan temel sebep kanser kök hücre özelliği taşıyan hücreler tarafından geliştirilen çeşitli direnç mekanizmalarından kaynaklanmaktadır (De Angelis vd., 2019).

Kanser hücrelerinin bir etken ile maruziyeti sonrasında koloni oluşturma potansiyellerinin gösterilmesi sıklıkla direnç geliştirme ile ilişkilendirilmektedir (Ikeda vd., 2011). Bizim çalışmamızda Gemsitabine direnci kazandırılan A549 hücrelerine ilk aşamada CFU analizi gerçekleştirilerek direnç kazandırmak için başlangıç gemsitabine konsantrasyonu belirlenmiştir. A549 hücrelerine direnç kazandırıldıktan sonra CFU analizinden elde edilen koloniler dirençsiz A549 kolonilerine göre belirgin ve büyük direnç kolonileri elde edilmiştir. dA549 hücrelerinden elde edilen bu direnç kolonilerinin her birinin içerdiği hücre sayısı, koloni şekli, boyutu, bütünlüğü ve belirgin sınırlar içerip içermediği gibi morfolojik özellikleri liteatür ile uyum göstermektedir. Ikinci aşamada ise A549 hücreleri Gemsitabin ile periyodik olarak maruz bırakılarak direnç kazandırılırken her bir doz uygulamasından sonra günlük olarak faz kontrast invert mikroskopta morfoloji

kontrolleri yapılarak oluşan belirgin sınırlara sahip, yeterli boyutta ve canlı direnç kolonileri belirlendi. Sonuçlarımıza göre her bir Gemsitabine konsantrasyonu ile muamaleden sonra hücrelerin koloni formunda prolifere olmaları direnç uygulanan konsantrasyona direnç geliştirdiklerini göstermiştir. Çalışmamızda Gemsitabin direnci kazandırma analizleri sırasında elde edilen koloni morfolojileri literatürde yer alan dirençli-hücre koloni morfolojileri ile paralellik göstermiştir (Mohr vd., 2017).

Akciğer kanser kök hücrelerinde özellikle CD326 (EpCAM), CD133 (prominin-1) ve CD44 (Hücre yüzey adezyon molekülü) belirteçlerinin yüksek ekspresyon profili ile karşılaşılmıştır (Zhou vd., 2015; Satar vd., 2018; Zheng vd., 2022; Yu vd., 2012; Hong vd., 2009). Yapılan bir çalışmada, A549 ve H460 KHDAK hücrelerinden MicroBeads (MiniMACS separator- MiltenyiBiotec) kullanılarak gerçekleştirilen $CD133^+$ hücre izolasyon ve karakterizasyonu flow sitometri ile gerçekleştirilmiş ve canlılık ve proliferasyon analizi, sfer oluşum kapasiteleri değerlendirilmiştir. A549 ve H460 hücrelerinin CD133 pozitifliğini sırasıyla %2,8 ve %2,4 olarak bulmuşlardır (Wang vd., 2021). Lin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, A549 hücrelerinde CD326 ve CD133 birlikte pozitifliği %0.1 olarak bildirilmiştir (Lin vd., 2012). A549 hücrelerinde CD44 pozitifliği %68.16 olarak belirtilirken, $CD44^+/CD133^+$ birlikte pozitifliği %0.4 olarak belirtilmiştir (Roudi vd., 2014). Bizim çalışmamızda KKH'lerin izolasyon basamakları sırasında ve kültürün ilk aşamalarında karakterizasyon için yaptığımız analizlerde CD326 pozitifliği %63.42, $CD326^+/CD44^+$ beraber pozitifliği %99.96 olarak, CD133 pozitifliği %50.96 ve $CD133^+/CD44^+$ beraber pozitifliği ise %99.57 olarak hesaplanmıştır. dKKH'lerin izolasyon basamakları sırasında ve kültürün ilk aşamalarında karakterizasyon için yaptığımız analizlerde ise $CD326^+$'liği %60.54, $CD326^+/CD44^+$ beraber pozitifliği %99.99 olarak, $CD133^+$ %79.37 ve $CD133^+/$ $CD44^+$ beraber pozitifliği %99.93 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre dirençli ve dirençsiz A549 hücrelerinden KKH izolasyonu ve kültürünün verimli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Akciğer kanser hücrelerinde (A549) yapılan araştırmalarda CD326 ve CD90 ekspresyon düzeyi %80.00 ve %11.60 iken, koşullandırılmış besi yeri (LC212-CM) ile yapılan muameleden sonra CD326 ekpsresyon düzeyi %68.50 düşerken CD90 ekpsresyon düzeyi %32.60'a yükselmiştir (Camerlingo vd., 2019). Ayrıca, birkaç çalışmada da EMT'nin kanser kök hücre fenotipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada karakterizasyon için yapılan flow analizlerinde CD133 ve CD326'nın yanı

sıra dirençli ve dirençsiz kanser kök hücrelerinin CD90 belirtecini pozitif olarak eksprese ettiği belirlendi. CD133 (stemness marker) ve EMT markerı olan CD90'ı (mezenkimal marker) eksprese etmeleri hem kök hücre hem de EMT karakterinde kanser hücreleri özelliklerini taşıdıklarını göstermektedir. Literatürde daha önce dirençli A549 hücrelerinden kanser kök hücre izolasyonu yapan ve karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak sonuçlarımıza göre dirençli kanser kök hücre hattında CD133 ekspresyon düzeyinin dirençsiz kanser kök hücredekinden daha fazla olması en iyi bilinen kanser kök hücre belirteci olarak CD133/Prominin-1'in direnç ilişkisinden kaynaklandığı sonucuna varıldı.

ABCG2 proteini ABC taşıyıcı protein ailesi üyelerinden olan bir transmembran proteindir. MDR1 gibi ATP bağımlı olarak aktifleşir ve ilaç ve moleküllerin eflaksından sorumlu önemli bir proteindir. Bu nedenle kanser kök hücrelerdeki yüksek ekspresyonları nedeniyle genellikle önemli markerlardan biri olarak kabul edilmektedir (Sung vd., 2008). ABCG2'nin kök hücre farklılaşmasında ve ilaç dirençli kanser hücrelerinde düzenleyici olarak görev aldığı ve kanser kök hücrelerde ekspresyonlarının yükseldiği belirtilmiştir (Tang vd., 2014). Bu doğrultuda bu tez çalışmasında dirençli ve dirençsiz kanser kök hücrelerinde ABCG2 ekspresyonunun pozitif olması bu çalışmalarla paralel olarak bulunmuştur.

Önemli ilaç direnç proteinlerinden olan MDR'nin kanser kök hücrelerindeki ekspresyonu ile ilgili yapılan çok sayıda çalışma yakından ilişkili olduklarını göstermiştir (Akunuru vd., 2012; Tripathi vd., 2016; Fong vd., 2010). Bu tez çalışmasında, dirençli ve dirençsiz kanser kök hücrelerde izolasyon verimlilik analizlerine ek olarak ABCG2, CD90 ve MDR1 belirteçleri ile ileri karakterizasyon analizleri yapıldığında, dirençsiz kanser kök hücrelerinde ABCG2, CD90 ve MDR1 belirteçleri sırasıyla %56.82, %88.99 ve %26.41 oranında bulunurken dirençli kanser kök hücrelerde aynı belirteçler sırasıyla %56.57, %86.54, %49.65 oranında pozitiflik göstermiştir. Bizim izole ettiğimiz CD326, CD133 ve CD44 belirteçleri bakımından pozitiflik gösteren dirençli ve dirençsiz kanser kök hücrelerinde ileri karakterizasyon analizleri yapıldığında aynı zamanda ABCG2 ve CD90 gibi diğer kanser kök belirteçlerini de eksprese ettiklerini belirledik. Dirençli ve dirençsiz akciğer KKH'lerde ABCG2 ve CD90 belirteç seviyeleri açısından önemli bir fark gözlenmemesine rağmen dirençli KKH'lerde MDR1 ekspresyonu açısından dirençsiz KKH'lere göre 1.87 kat daha fazla eksprese olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Dirençli

KKH'lerindeki MDR1 ekspresyon seviyesindeki artışın sebebinin Gemcitabine karşı geliştirilen yüksek direnç sebebiyle olduğu sonucuna varılmıştır (Gerlach vd., 1986).

Bu çalışmada flow sitometrik analizlerin yanı sıra kanser hücrelerinde direnç markerı olan MDR1 ve ABCG2, kanser hücre yüzey adezyon molekülü olan CD44 ve EMT mesenchymal markerı olan CD90 ve KKH markerı olarak kabul edilen pluripotent kök hücre belirteci olan ALDH1 belirteçlerinin ekspresyonlarının pozitivitesi aynı zamanda immunoflourecence tekniklerle gösterilerek desteklendi. Bu çalışma ile ilk kez izole edilen dKKH'lerin bu belirteçleri pozitif olarak eksprese ediyor olması; izole ettiğimiz dirençli kanser kök hücre hattının dirençsiz kökenli A549 kanser kök hücre hattına hem de şimdiye kadar elde edilmiş ve rapor edilmiş kanser kök hücre hatlarının özellikleri ile güçlü bir benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

A549, dirençsiz ve dirençli KKH hatları için büyüme eğri grafiği çıkarıldığında ikinci gün sayımında dKKH'lerin, A549 hücrelerine göre 3.71 kat, dirençsiz olanların ise 3.28 kat onuncu günde ise dKKH'ler 3.91 kat, KKH'ler 1.11 kat daha fazla hızda prolifere olduğu görüldü. Üstelik direnç kazandırılmış KKH'lerin dirençsiz KKH'lere göre daha yüksek proliferasyon yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar bu çalışmada ilk kez izole edilen dKKH'lerin, KKH karakteristik özelliklerine sahip olduğunu gösteren immunofenotipik belirteçlerin pozitif ekspresyon kanıtlarını destekler niteliktedir (Sancho vd., 2016).

Ikeda ve ekibi A549 hücrelerinde Gemsitabin dirençli A549 hücrelerinde bazı kemoterapötiklerin etkilerini araştırmışlardır ve elde ettikleri verilere göre dirençli A549 hücreleri dirençsiz A549 hücrelerine göre daha yüksek Gemsitabin direnci göstermiştir (Ikeda vd., 2011). A549 hücrelerine Gemsitabin direncinin kazandırılmasının araştırıldığı başka bir çalışmada ise direnç kazandırılmış hücrelerde IC_{50} değerinin 6.56 μM'dan 921.09 μM'a artırıldığı gösterilmiştir (Dong vd., 2004). Bizim çalışmamızın sitotoksisite analizlerinde de IC_{50} değeri dirençli ve dirençsiz kanser kök hücreler arasında farklılık göstermesi bu çalışmalarla uyumlu iken ilginç olarak bizim çalışmamızda kök hücre özellikli olmaksızın IC_{50} değeri dirençsiz ve dirençli kanser kök hücreler arasında da belirgin bir farklılık gösterdi. İzole ettiğimiz dKKH'lerin bir diğer karakterizasyon testi olan sitotoksisite analizinde, Gemsitabin direnci olmayan A549 hücrelerinin IC_{50} değerlerinin, onlardan izole edilen KKH'lerle benzer olduğu gözlenirken dKKH'lerin daha yüksek

değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç bize gemsitabin direnci olmayan kanser hücreleri ya da ondan izole edilen kök hücreler arasında proliferasyon hızı açısından bir fark oluşmadığını ancak direnç kazandırıldığında kanser kök hücrelerinin proliferasyonunda dirençsiz kanser ve kanser kök hücrelerine göre son derece belirgin bir artış olduğunu göstermektedir. Yapılan immunofenotipleme analizi ile dirençli ve dirençsiz kanser kök hücreleri MDR1 ekspresyon seviyeleri açısından karşılaştırıldığında yine belirgin derece ekspresyon seviyesinin yüksek olması bu bulguyu destekler niteliktedir. Sonuç olarak dirençten sorumlu olan ve düzenleyen tüm farktörlerin proliferasyon üzerinde kanserin kök hücreliliğinden bile daha etkili olduğu ilk kez bu çalışmada ortaya konulmuştur.

Uzun yıllardır laboratuvar ortamında hücreler iki boyutlu olarak tek tabakalı hücre kültür sistemleri üzerinden araştırmalar yapılmaktadır. Hücrelerin kültüre edildikleri kültür kaplarında *in vivo* ortamları bulamamalarından dolayı organizmada bulundukları genotipik ve fenotipik özellikleri gösterememektedirler. Bu nedenle 2B in vitro kültür teknikleri doğal *in vivo* ortamı taklit etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu ihtiyaçlar doğrultusunda üç boyutlu hücre kültür platformları ortaya çıkmıştır. 3B kültür ortamlarının sayesinde hücrelerin *in vivo* ortamlarını daha iyi taklit edebildiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Kapałczyńska vd., 2018; Ravi vd., 2015). Kanser kök hücrelerin varlığı konusunda ilk deliller ortaya çıktıktan sonra bir tümörden ya da ticari bir kanser hücre hattından kanser kök hücreleri izole edilebilmesi için yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar kısa zamanda ürün vermis ve bilim dünyası kanser kök hücreleri izole edebilmiş ve izole ettikleri hücreler üzerinde pekçok analiz gerçekleştirebilmiştir. Ancak bu seferde çalışmacıların karşısına kanser kök hücrelerin in vitro ortamda kültür edilerek çoğaltamaması ve çoğaltılması sırasında kanser kök hücre karakteristiklerini devam ettirememeleri gibi başka zorluklar olarak ortaya çıkmıştır. Işte bu noktada bu sorunların çözümü olarak 3B kültür ve sferoid formda kültür tekniklerinin geliştirilmesi olmuştur (Akunuru vd., 2012). Bu çalışmada izole ettiğimiz dirençli dKKH'lerinin bir diğer karakterizasyon testi olan sferoid oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde kullandığımız üç teknikte de başarılı sonuçlar elde edildi. Agarozun kullanıldığı birinci yöntemden elde edilen sferlerin, Zhang ve arkadaşlarının MCF-7 hücreleri ile yaptığı agaroz kaplı plakalardaki 3B modellemeler ile benzerlik gösterdiği izlenmiştir (Zhang vd., 2016). Asılı damlacık ve PDMS'in birlikte kullanıldığı ikinci yöntemden elde edilen

sferlerin, benzer bir metot ile 24 saatin sonunda sfer oluşturabilen Kuo ve arkadaşları'nın çalışması ile benzerdir (Kuo vd., 2017). Poly-D-HEMA polimerinin kullanıldığı son yöntemde ise izole ettiğimiz dKKH'lerin diğer yöntemlerdeki gibi başarılı bir şekilde sfer oluşturabildiğini gösterdik. Kim ve arkadaşları asılı damla tekniği ve Poly-HEMA yöntemleri ile sfer oluşturma kabiliyetini karşılaştırmış ve Poly-HEMA yöntemi ile daha az hücreli ama sayıca daha fazla sfer oluşumu gözlenirlen asılı damla tekniğinde ise daha fazla sayılı ama tek bir sfer oluşumunun gözlendiğini rapor etmişlerdir. İki yöntemin de geleneksel 2B kültür yönteminden hücre sayısı, eksozom üretimi gibi yönlerinden daha avantajlı olduğunu da belirlemişlerdir (Kim vd., 2018). Her üç yöntemde de izole ettiğimiz dKKH'lerin üç boyutlu kültürde sferoid oluşturma kabiliyetine sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak ilk iki yöntemde, çok sayıda hücreden oluşan ve boyut olarak daha büyük olan az sayıda/tek sfer (sıklıkla 1 adet) oluşumu gözlenirken; Poly-D-HEMA kullanılan yöntemde ise az sayıda hücreden oluşan ve boyut olarak daha küçük olan çok sayıda sferler elde edilmiştir. Bu karakterizasyon analizinin sonucu olarak izole ettiğimiz dirençli dKKH'lerin, üç boyutlu olarak kültür edildiğinde, kanser kök hücrelere özgü sferoid oluşturma yeteneğinde olduğu sonucuna vardık.

P-glikoprotein (MDR1) ekspresyonları yükselmiş olan KKH ve özellikle dKKH'lerin Gemsitabin dirençlerinin kırılması için siRNA aracılı bir sistem kullanılmıştır. Bu sistem ile ABCB1 genine özgü siRNA'lar eksozomlar ile enkapsüle edilerek hücrelerde uptake olması sağlanmıştır. siRNA'ların enkapsüle edilmeden verilmesi endonükleazlar tarafından hızlıca degrede olmasına ve etki verimliliğinin düşmesine sebep olmaktadır. Bu amaçla birçok enkapsülasyon yöntemi denenmiş ve daha yüksek etki verimliliği sağladığı kanıtlanmıştır (Zare vd., 2022). Özellikle polimerik enkapsülasyon yöntemleri çeşitli manüplasyonlar ile hücre hedeflendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Daha önce izole edilen ve ayrıntılı analizler ile karakterizasyonu tamamlandıktan sonra kriyoprezerve edilerek saklanmış olan insan sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücreler (iSS-MKH'ler), bu tez çalışması için çözülerek kültüre alındı. Günlük faz kontrast invert mikroskop ile yapılan morfolojik analizlerde hücreler, kültür kabına yapışarak kültüre olabildikleri ve iğsi şekilli ve fibroblast-benzeri morfolojiye sahip sağlıklı bir mezenkimal kök hücre karakteri segiledi. Çözülen hücreler ayrıca dondurma sonrası MKH özelliklerini devam ettirip

ettirmediklerini ortaya koymak için MKH paneli ile flow sitometri yoluyla immunfenotipik analize alındığında elde ettiğimiz sonuçlar ve daha önce yaptığımız ayrıntılı karakterizasyon analizindeki sonuçlarımız izole ettiğimiz iSS-MKH'lerin; Uluslararası Hücre ve Gen Terapisi Derneği'nin (ISCT) MKH'leri karakterize etmek için belirlediği minimal özellikleri taşıdığını ve mezenkimal kök hücre karakterinde olduğu sonucuna varıldı (Dominici vd., 2006).

Eksozomlar vücutta tüm hücreler tarafından salgılanan ve tüm sıvılarda yer alan hücreler arası iletişim materyalidir. Doğal, insana özgü (otolog), doğal olarak protein, RNA lipid gibi molekül taşıma kapasiteleri, hücreler tarafından kolay uptake edilebilmeleri, vücutta en uzak noktaya kadar ulaşabilmeleri, fagositozdan kaçabilmeleri ve hedefe spesifik manipüle edilebilmeleri gibi özellikleri sebebiyle son yıllarda dikkat çeken bir konu haline gelmiştir (Fu vd., 2020). Bu amaçla bu tez çalışmasında iSS-MKH'lerden ultrasantrifüj yöntemi ile eksozomlar izole edilip karakterizasyon analizleri gerçekleştirildikten sonra flow sitometrik, ultrastrüktürel (TEM), boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçlarımız izole ettiğimiz eksozomların eksozoma özgü özellikleri taşıdığını ve eksozom karakterinde olduğunu ve literatür ile karşılaştırıldığında siRNA'ların yüklenmesi için uygun potansiyele sahip olduğu düşünülmüştür (Chen vd., 2020; Melo vd., 2015; Xu vd., 2017; Beit-Yannai vd., 2018).

Karakterizasyon işlemleri tamamlanan eksozomların ve MDR1'i (ABCB1) hedefleyen siRNA yüklemesi gerçekleştirilen eksozomların uptake analizleri gerçekleştirildiğinde hücrelerin her iki tipteki eksozomu da uptake ettiğini gösteren sonuçlarımız, siRNA transfekte edilen ve edilmeyen eksozomların eksozoma spesifik fonksiyonlarını da gösterdiğini ve siRNA transfeksiyonunun eksozomların fonksiyonel özelliklerine herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı. Ayrıca sonuçlarımız, hem elektroporasyon yöntemi ile siRNA'ların eksozomlara hem de hücrelere siRNA içeren eksozomların başarılı bir şekilde aktarıldığını gösterdi (El-Andaloussi vd., 2012; Wang vd., 2012; Zhang vd., 2018).

Nanoteknolojik olarak ürünlerin hedeflendirmesinde FDA onaylı polimer olan Hyaluronik Asit (HA), klinik ve pre-klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Literatür taramalarında eksozomların Hyaluronik Asit ile kaplandığı çok fazla çalışmaya rastlanılmamıştır. Daha çok HA ile kaplanmış nanopartiküler ve hidrojel sistemlerle kombinasyonlarından oluşan çalışmalar karşımıza çıkmaktadır. Li ve

arkadaşlarının 2022'de yaptıkları bir çalışmada eksozomlar HA ile kombinlenmiş bir nanopartiküler sistemle kaplanması sağlanmıştır (Li vd., 2022). İlaç ve moleküllere karşı direnç geliştirmede sferoidlerin, hücreler arası bağlantı ve hücre-ekstrasellüler matriks proteinlerinin etkileşimleri aracılığıyla önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hyaluronik asit aracılı (CD44 üzerinden) hücresel reseptörlerdeki ve E-kaderin aracılı adezyon moleküllerdeki bozulmalar kanser hücrelerinde direnç geliştirmede önemli basamaklar arasında yer almaktadır (Croix vd., 1998; Green vd., 2004). Bu tez çalışmasında ise ultrasütrüktürel sonuçlarımız eksozomların başarıyla HA ile kaplandığını gösterdi (Li vd., 2022).

Eksozomlara MDR1 hedefli siRNA yüklenmesinde elektroporasyon yöntemi kullanılmıştır. siRNA'ların transfeksiyon verimliliğin en yüksek olduğu yöntem olarak kabul edilmektedir (Faruqu vd., 2018). Hücrelerde siRNA içeren eksozomların hücrelerdeki transfeksiyon kontrolü için qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre hücrelerde sessizleşmenin başarılı bir şekilde gerçekleştiği kontrol gruplarına göre sırasıyla A549 hücrelerinde MDR1'in (ABCB1) 2.9 kat; KKH'lerde 1.4 kat ve dKKH'lerde ise 2.63 kat daha az ekspresyon seviyesi ile gösterilmiştir. KKH ve dKKH'lerde ABCB1 gen ekspresyonunun daha az görünmesi hücre tamir mekanizmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Analiz aşamasına kadar siRNA'nın etkisinin azalarak ebeveyn hücreye göre daha dirençli bir özellik gösteren KKH'ler ve dKKH'lerde MDR1 ekspresyonu artırmış olabileceği tahmin edilmektedir. Ancak gen düzeyinde sessizleşmenin tüm hücrelerde başarılı bir şekilde sağlandığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca eksozomlara siRNA yüklendikten HA ile kaplanmış ve kaplanmamış eksozomlarda yaptığımız RNA izolasyonu ve jel elektroforez sonuçlarımız siRNA'ların eksozomlara başarıyla yüklendiğini HA ile kaplamanın bu siRNA transfeksiyonuna olumsuz etkisinin olmadığını göstermiş bulunduk. Ayrıca siRNA yüklenme miktarının belirlenmesi için eksozomlardan RNA ölçümleri Nanodrop ile gerçekleştirildiği ve kontrol grubu olan saf eksozomlarda 10.6 ng/µL; siRNA transfeksiyon sonrasında Exo-MDR'lerde 27.5 ng/ µL ve HA-Exo-MDR'lerde 31.1 ng/µL olarak belirlendiği sonuçlarımız siRNA'ların eksozomlara başarılı bir şekilde transfekte edildiğini gösterdi.

Hem genotipik hem de fenotipik düzeyde yaptığımız analizlerin sonuçları, bu tez çalışmasında kullandığımız tüm dirençli ve dirençsiz ve kanser ve kanser kök hücre gruplarının hepsinde bu çalışmada kullandığımız taşıyıcı aracılı siRNA aktarım

yöntemi sonucu tüm hücre gruplarında MDR1 ekspresyonunun azaldığının belirlenmesiyle susturulabildiği gösterilmiştir. Hücrelere siRNA içeren eksozomlar uygulandıktan sonra flow sitometri ile MDR1 protein ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Yaptığımız veri tabanı taramaları sonucunda, elde edilen sonuçlarımız, benzeri yayınlanmış sonuçlar ile karşılaştırmak istendiğinde benzeri daha önce yayınlanmış herhangi bir makaleye rastlanılmamıştır. A549, KKH ve dKKH'lerde gerçekleştirilen MDR1 analizine göre Exo-MDR grubu ve HA-Exo-MDR grupları uygulanmış kontrol grubuna göre ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. A549 hücrelerinde Exo-MDR grubu ve HA-Exo-MDR grupları sırasıyla 1.52 kat ve 1.82 kat azalma gözlenmiştir. KKH'lerde ise sırasıyla 2.09 kat ve 10.44 kat azalma gözlenmiştir. dKKH'lerde ise sırasıyla 6.56 kat ve 4.95 kat azalma hesaplanmıştır. Sonuç olarak A549, KKH ve dKKH'lerde hem Exo-MDR hem de HA-Exo-MDR uygulamalarıyla MDR1 başarıyla sessizleştirilmiştir. En yüksek sessizleşme KKH'lerde HA-Exo-MDR'ler ile gerçekleşmiştir (Zheng vd., 2015; Kandasamy vd., 2022).

Apoptotik analizlere geçmeden önce hücrelere uygulanacak olan moleküller için A549, KKH ve dKKH hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat süresince MTT yöntemi ile sitotoksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre HA, Saf eksozom, HA ile kaplı eksozom (HA-Exo) MDR1 siRNA, Exo-MDR, HA-Exo-MDR gruplarının sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Analiz gruplarının hiçbiri A549, KKH ve dKKH'leri üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Böylece deney gruplarında elde edilen apoptotik ve sitotoksik verilerin Gemsitabin etken maddesi kaynaklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Bilindiği gibi bu tez çalışmasında dirençli KKH özelliğine sahip hücrelerde direnç geninin (MDR1/ABCB1) sessizleştirilebilmesi için eksozom aracılı siRNA transfekte ettiğimiz kanser hücre gruplarında hücre cevabının; apoptotik (Annexin V/PI ve Aktif Kaspaz 3 IF) ve hücre döngüsü analizlerinden elde ettiğimiz sonuçları ile direnç geninin sessizleştirildiği hücrelerde apoptozun artması ve G0 evresindeki hücre arrestinin artması ile başarılı bir şekilde Gemsitabin duyarlılığının oluşturduğu gösterildi (Paskeh vd., 2022). Sonuçları daha ayrıntılı bir şekilde ele alırsak; kaspazlar normal durumda hücrelerde inaktif olarak bulunan ancak sinyal geldiğinde proteolitik olarak kaskat halinde birbirlerini aktifleştiren enzimlerdir. İlgili hedef proteinlerini keserek apoptozda etkili olurlar. Sağlıklı hücrelerde ICAD'a

(Deoxyribonuclease-kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü) CAD'lara bağlı halde durarak aktifleşmesini engeller. Apoptotik sinyal ile CAD enzimi (DNase kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) DNA'yı nükleozom birimlerine parçalar ve kaspaz-3 aktif edilir. Aktif kaspaz 3 bir endonükleazdır ve DNA'yı parçalama özelliğine sahip olduğundan hızlı birşekilde DNA'yı 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmentlere ayırır. Bu değişimlerle beraber hücrelerde apoptotik blebler oluşur ve apoptotik süreç başlar. Aktif kaspaz 3 analizinin Gemsitabin uygulanan gruplarda uygulanmayan gruplara göre yüksek pozitiflik gösterdiği sonuçlarımız; direnç geninin sessizleştirildiği hücrelerde apoptozun indüklendiğini literatür ile uyumlu olarak gösterilmiştir (Cohen 1993; Sakahira vd., 1998).

Bu tez çalışmasını yaparken gemstabin uygulamadan yaptığımız sonuçlarında son derece dikkat çekici bulgu; olan yalnızca MDR1 genindeki sessizleşme ile Gemsitabin uygulanmadan bile hem Exo-MDR hem de HA-Exo-MDR grubunda apoptozun indüklenmiş olmasıdır. Yapılan son çalışmalar neticesinde MDR1 geninin over-ekspresyonuna sahip olan hücrelerin apoptotik protein olan P53'ten yoksun olduğunu bulmuşlardır. Bu da bize MDR1 geninin p53 ile apoptozu aktive etmekte etkili olduğunu ve dolayısı ile hücrelerde anti-apoptotik etki gösterdiğini göstermektedir. Bu nedenle MDR1'in sessizleştirilmesi ile apoptotik etkinin artması beklenmektedir. Bizim çalışmamızda tüm hücre gruplarında da bu durumu kanıtlar nitelikte sonuçlar elde edilmiştir (Marchi vd., 2004). MDR1 sessizleştirilmesinin KKH ve dKKH hücrelerinde A549 hücrelerine göre daha yüksek apoptotik etki yaptığına dair bulgumuzun A549 hücrelerinin MDR1 ekspresyonlarının kanser kök hücre gruplarına göre daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hatta bu etkinin KKH'ye göre dKKH'lerde apoptotik etkinin daha yüksek olmasının; en çok MDR1 ekspresyonunun dirençli kanser kök hücrelerde yüksek eksprese edilmesiden kaynaklanmaktadır (Qing vd., 2022; Marchi vd., 2004). Hem KKH hem de dKKH grubunda HA-Exo-MDR grubu Exo-MDR grubu ile ortalama olarak birbirlerine yakın sonuçlar göstermişlerdir.

ABCB1'in sessizleştirilebilmesi için eksozom aracılı siRNA transfekte ettiğimiz çeşitli kontrol ve deney gruplarında elde edilen apoptotik hücre cevabı; MDR1'in sessizleştirildiği A549 ve KKH ve dKKH'lerde 3 μM Gemsitabin gibi düşük bir dozda bile indüklenen apoptozun, MDR1 aktif olan dKKH'lerdeki 1600 μM Gemsitabin dozunun indüklediği apoptoza oranla daha az olması MDR geninin

sessizleştirilmesinin gerçekleştirildiğini ve MDR geninin ekspresyonunun azalmasının KKH ve dKKH'lerinde hücrelerinde literatür ile uyumlu olarak apoptozu artırdığını ortaya konuldu.

3 µM'lık son derece düşük Gemsitabin doz uygulamasında bile A549 hücrelerinde apoptotik etki %13.11 iken 3 µM G Exo-MDR ve 3 µM G HA-Exo-MDR uygulaması yapılan yapılan A549 hücrelerinde sırasıyla %34.66 ve %39.00'a yükselmiştir. MDR1 sessizleşmesi gerçekleştirilmiş ve Gemsitabin uygulanmış gruplarda en yüksek apoptotik etki dirençli kanser kök hücrelerde HA ile kaplanmış eksozom grubunda izlenmiştir. Hyaluronik Asit ile kaplanmamış gruba göre HA-G-Exo-MDR grubundaki fazlalığın HA kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Literatüre bakıldığında Hyaluronik asit ile kaplanan birçok nanoteknolojik molekülün $CD44^+$ hücreler ile etkileşime girerek daha fazla apoptotik etki gösterdiği görülmektedir (Wang vd., 2017). Gemsitabin uygulandığında eksozom aracılı MDR1 hedefli siRNA sessizleştirilmesinin etkinliğini artırdığını gösteren bulgularımızın HA'in; KKH ve dKKH'lerinde gemsitabine olan duyarlılığın artırılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Sonuç olarak KKH gruplarında MDR1 genlerindeki sessizleşme ile 3 µM Gemsitabin dozunun erken ve geç apoptotik etkiye sebep olması oldukça dikkat çekicidir.

Kanser kök hücrelerin sessiz faza geçerek yıllarca burada kalabilmeleri önemli en önemli spesifik özelliklerinden biridir. Kök hücre havuzunun korunması, devamlılığı ve hücrelerin sessiz konumda bekleyebilmelerinde çeşitli transfeksiyon faktörleri, hücre döngüsündeki protein ve inhibörlerin rolü çok önemlidir (Cheng v., 2000). Hücre döngüsünde etkili olan pek çok molekül kanser ile yakından ilişkili olduğundan birçok kemoterapötik ilaç hücre döngüsü sistemi üzerinde etki göstermektedir. Klinikte kullanımda olan çoğu kemoterapötik ilaç proliferatif (logaritmik) fazda olan hücreleri hedef almaktadır. Gemsitabin de hücre döngüsünde S fazında replike olan DNA'ları ve ribonükleotid redüktazı hedef alarak bir inhibitör görevi gören kemoterapötik ajandır (Hamed vd., 2013).

Çalışmamızdaki A549 hücreleri, KKH ve dKKH'lerin kontrol gruplarında G0/G1 hücre düzeylerinde arresti KKH ve dKKH hücrelerine göre daha azdır. G0/G1 arresti ile S fazında kontrol grubuna göre hücre yüzdesinin azalmasına sebep olmuştur. Kontrol grubunda G2/M fazının en yüksek olduğu ve Gemsitabin uygulanan her grupta kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu ve sitokenezin

durduğu gözlenmiştir. A549 hücrelerinde Exo-MDR ve HA-Exo-MDR gruplarında da G2/M fazında kontrol grubuna göre daha düşük yüzdeler sergilemiştir. Bu durumun A549 hücrelerinin MDR ekspresyon düzeylerinin KKH ve dKKH'lere göre daha düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 4.57, Şekil 4.59, Şekil 4.61). Eksozom aracılı MDR sessizleştirmesi ile kanser kök hücreler açısından daha yüksek görünmektedir ancak bu A549 hücrelerinin düşük MDR aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Daha öncede bahsedildiği gibi MDR1 hücrelerde p53 ekspresyonunu baskılamaktadır. MDR1 ekspresyonunun ortadan kalkması hücrelerde apoptotik süreçleri aktive etmektedir. Sonuç olarak HA kaplanmasının apoptoz üzerindeki etkisi tek başına HA olmayan gruplara göre çok büyük bir fark yaratmadığı ancak Gemsitabin ile beraber etkili sonuçlanmıştır.

KKH'lerde de A549 hücrelerine benzer şekilde G0/G1 de birikim göstererek G1/S evresinde arrest gerçekleşmiştir. A549'dan farklı olarak hücre birikimi G0/G1 fazında daha fazladır. S faz arresti Exo-MDR ve G-Exo-MDR gruplarında diğer gruplara göre en yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Ayrıca KKH'lerde MDR direncinden dolayı Exo-MDR ve HA-Exo-MDR'lerde G2/M birikiminin Gemsitabin uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Gemsitabin ile muamele sonucunda G2/M blokajı ile Gemsitabin uygulanan tüm gruplarda sitokinez durdurulmuştur.

dKKH'lerde de KKH'lere benzer bir trend gösterirken G0/G1 fazında daha yüksek düzeyde hücre birikimi gözlenmiştir. dKKH'lerde G-HA-Exo grubu en düşük G0/G1 yüzdesine sahip olduğu görülmektedir. dKKH'lerde Exo-MDR ve HA-Exo-MDR'lerdeki G2/M birikimi kontrol ve Gemsitabin uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir ve bu durumun yüksek MDR direncinden kaynaklandığı düşünülmektedir. (Shah vd., 2001) Aynı şekilde S fazında da en yüksek hücre birikiminin olduğu görünmüştür. Burada hücreler S fazında birikim yaparak G2 fazında arrest olmuşlardır. Wang ve arkadaşlarının Taxol dirençli A549 hücrelerinde MDR1 sessizleştirmesi ile yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızla benzer trend göstermiştir. MDR1 sessizleşmesi sonrasında dirençli hücre grubunda G2/M'nin düşerek S fazında arrest gerçekleşme eğiliminde olduğu belirtilmiştir (Wang vd., 2022). dKKH'lerde MDR1 sessizleşmesi sonrasında hücrelerde G2/M fazının kontrol grubuna göre yükseldiği yani mitotik süreçlerin aktive olduğu belirlenmiştir. Uygulanan MDR1 siRNA'nın analizlerle başarılı bir şekilde gen sessizleşmesi

gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Buradaki mitotik aktivasyon dKKH'lerdeki bu G2/M aktivasyonunun hali hazırda yüksek MDR1 ekspresyonları nedeniyle tepki olarak MDR1 ekspre etmeye çalıştıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu tepkinin Gemsitabin maruziyeti ile kalktığı görülmektedir.

Kök hücrelerin G0 evresinde sessiz konuma geçtiği ile ilgili birçok çalışma yer almaktadır. Kanser kök hüclerin G0/G1 fazlarında birikimlerinin yüksek olması kök hücrelerle benzer özellik göstermektedir. Buradan yola çıkarak hücrelerin sessizleşme eğiliminde olması hücrelerin tamir mekanizmalarını devreye sokabilmek için reverse (tersinir) hücre döngüsü ile ilişkili olabilir. Aynı zamanda sessizleşme eğiliminde olan KKH'lerde G0 arresti yüksek kemoterapötik direnç gösteren yani Mdr ekspresyon düzeyi yüksek olan hücrelerle ilişkilendirilmektedir (Venezia vd., 2004; Gharagozloo vd., 2012; Arai vd., 2004; Zhan vd., 2013). Sonuç olarak hücre döngüsü analizlerinde 3 μM Gemsitabin uygulaması ile elde edilen sonuçlar 1600 μM Gemsitabin ile elde edilen sonuçlardan daha iyidir.

Apoptozda etkili olan Bcl-2 süper ailesi anti-apoptotik üyelerinden BCL-2 geni ve ve apoptozda intirinsik ve endoplazmik retikulum yolaklarında ana rol oynayan Sitokrom C (CYCS) için qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. A549 hücrelerinde 1600 μM Gemsitabin ile muamele edilen hücrelere göre Exo-MDR ve HA-Exo-MDR uygulaması sonrasında 3 μM Gemsitabin uygulanmış hücrelerde Bcl-2 ekspresyonunun daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da uyguladığımız tedavinin anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunda azalmaya sebep olduğunu ve apoptotik süreçlerde daha etkin bir tedavi olabileceğini düşündürmüştür. Aynı şekilde Sitokrom C ekspresyon seviyelerinde de artış ile beraber intirinsik apoptotik yolağın aktive olduğunu görmekteyiz.

KKH'lerde ise Bcl-2'nin her iki grupta da yüksek düzeyde down-regüle olduğunu 1600 μM Gemsitabin uygulamasına göre istatiksel olarak yüksek anlamlılık sergilediğini görmekteyiz. Uygulanan tedavi protokollerimizin Bcl-2 gen ekspresyonu açısından apoptotik süreçlerde daha etkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Sitokrom C seviyesinde sadece Exo-MDR grubunda bir artış gözlenmiştir. HA-Exo-MDR grubunda ise azalma izlenmektedir. Ancak bu değişimler istatiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

dKKH grubunda Bcl-2 gen ekspresyonu her iki grupta da istatiksel olarak yüksek anlamlılıkla beraber down-regüle olmuştur. Bu da 1600 μM Gemsitabin uygulamasına göre apoptozisde dKKH'lerin yüksek düzeyde etkili olduğunu göstermiştir. Sitokrom C seviyesindeki değişimler ise dKKH'lerde her iki grup içinde up-regülasyon şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bu sonuçlar 1600 μM Gemsitabin grubuna göre istatiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Exo-MDR grubu HA-Exo-MDR'lere göre daha yüksek bir ekspresyon seviyesi sergilemiş ancak istatiksel olarak aralarında fark çıkmamıştır. Sitokrom C ekspresyon seviyelerindeki en yüksek ifade dKKH'lerde bulunmuştur ve ayrıca yüksek Bcl-2 down-regülasyonu göstermiştir. Bu da uygulanan tedavi yöntemlerinin dKKH'lerde en etkili olduğunu göstermiştirdir. Yapılan Annexin V/PI analizlerinde ve hücre döngüsü analizleri de bu sonuçlar ile koreledir. Tüm analizler incelendiğinde uygulanan tedavi yöntemlerinde eksozomların HA ile kaplanmasının tedavi açısından önemli bir fark yaratmadığı bulunmuştur. Yapılan apoptotik analizlere göre bu tez kapsamında uygulanan tedavi yöntemleri Sitokrom C etkili olarak intirinsik yolak üzerinden etkili olmuştur.

A549, KKH ve dKKH'lerde ABCB1 gen sessizleştirmesi ile ilgili yapılan genotipik analizde tüm gruplardaki ekspresyon değişimlerinin birbiriyle korele olduğu gözlenmiştir. Tüm gruplarda Exo-MDR grubu kontrol grubuna göre gen ekspresyon seviyesinde azalmaya sebep olurken Gemsitabin uygulanan gruplarda MDR1 ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu hücrelerin Gemsitabin ilacına karşı geliştirdikleri bir hücre koruma mekanizmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hücreler kemoterapötik gibi bir tehdit ile karşılaştıklarında MDR genlerinin aktif ederek özellikle p53 üzerinden hücre tamir mekanizmalarını devreye sokmaktadırlar. Böylece MDR sentezini artırarak ilaç eflaksını sağlamaya çalışırlar (Thottassery vd., 1997; Nakagawa vd., 2006). Tüm hücre gruplarında Gemsitabin ile karşılaştıklarında aynı şekilde MDR ekspresyonlarını artırmışlardır. Ancak yaptığımız apoptotik analiz sonuçlarına göre bu ekspresyon mekanizmasının yeterli olmadığını ve uygulanan tedavi yöntemlerinin özellikle dirençli kanser kök hücre grubu üzerinde daha etkili olduğunu görmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut doktora tez çalışmasında Gemsitabin direnci kazandırılan akciğer kanser hücrelerinden kanser kök hücre karakteri gösteren hücreler başarı ile izole edilmiş ve karakterize edilmişlerdir. Kanser kök hücreler hedefli tedavi stratejileri ile kanser oluşumu, metastaz, nüks ve yüksek tedavi direnci gibi kanser tedavisinin önündeki engeller aşılabilme potansiyeline sahiptir. Kanser kök hücrelerin temel özellikleri arasında en sık sahip oldukları ilaç direnç mekanizmalarının yüksek ekspresyon profilleri ile karşılaşmaktayız. Çoklu ilaç direnci (MDR) kanser kök hücrelerin temel özelliklerinden biri olmakla birlikte kanser tedavi yöntemlerinin önündeki en önemli engellerin başında gelmektedir. Mevcut tedavi stratejilerinin kanser kök hücre hedefli olmamaları nedeniyle güncel tedaviler yıllar içerisinde başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Yeni tedavilerin geliştirilmesi ülke ve hasta başına düşen maliyetleri çok artırmaktadır. Yeni bir ilaç keşfinin 500-2000 milyon Euro'yu bulan ve ortalama 14 yıl süren maliyetleri nedeniyle hali hazırda etkinliği kanıtlanmış olan moleküllerin kullanılması daha önemlidir. Bu nedenle tedavi stratejilerinin kolay, ulaşılabilir ve düşük maliyetli olması her zaman temel hedefler arasındadır. Çalışmamız yüksek MDR aktivitesi gösteren Gemsitabin ilaç direnci geliştirilmiş akciğer kanser kök hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde dirençli kanser kök hücrelerin yüksek MDR aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

Son yıllarda gen tedavi strateji ve uygulamaları oldukça dikkat çeken bir alan haline gelmiştir. Gen tedavilerinin uygulanmasında birçok biyoteknolojik ürün eşlik etmektedir. Son yapılan pre-klinik ve klinik araştırmalarda başarılı bir tedavi yöntemi olduğu bulunan eksozomların doğal olmaları, otolog olarak kullanılabilmeleri ve protein, lipid, gen ve ilaç gibi molekülleri taşımaya müsait multifonksiyonel yapılarından dolayı kullanım stratejileri değişmiştir. Eksozomlar hedef gen ürününü otolog olarak başarılı bir şekilde taşıyarak hücreler tarafından kolaylıkla uptake edilebilmektedirler. Bu kapsamda kanser tedavilerinde hedeflendirilmiş eksozomlar aracılı tedavi stratejileri ile özellikle kanser kök hücreler üzerinde etkili yöntemler geliştirmekte önemli bir adımdır. Çalışmamızda eksozomlara hedef gen ürünü başarılı bir şekilde transfekte edilmiş ve hücreler tarafından uptake edilmişlerdir. Yapılan analizlerle hücrelerde ABCB1 geni hedefli siRNA'lar hem KKH'lerde hem de dKKH'lerde başarılı bir şekilde gen regülasyonu sağlamışlardır.

Dirençli ve dirençsiz KKH'lerde MDR1 siRNA içeren eksozomlar ile tedavi sonrasında Gemsitabin uygulanmış ve apoptotik analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlere göre Gemsitabin direnci kırılarak etkin doz 533.33 kat azaltılmıştır. Yapılan apoptotik analizler sonucunda erken ve geç apoptozda yüksek oranda pozitiflikle beraber Sitokrom C seviyesinde yüksek artışlar gözlenmiştir. Bu nedenle uygulanan tedavi yöntemlerinin iç yolak üzerinden etki gösterdiği düşünülmektedir. Apoptozdaki etkin yolaklar daha derin ve kapsamlı olarak araştırılarak mekanizmalarının ortaya çıkarılması gerekmektedir. Ayrıca yapılan tedavi ile özellikle kanser kök hücre gruplarında hücre tamir mekanizmalarının devreye girerek MDR ekspresyonlarını artırdığı gözlenmiştir. Bu mekanizmanın açığa çıkarılmasıyla olası dirençlerin kırılma stratejilerinde önemli olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Adams, C. P., & Brantner, V. V. (2006). Estimating the cost of new drug development: is it really $802 million?. Health affairs, 25(2), 420-428.

Akamine, T., Tagawa, T., Ijichi, K., Toyokawa, G., Takamori, S., Hirai, F., ... & Maehara, Y. (2019). The significance of CD44 variant 9 in resected lung adenocarcinoma: correlation with pathological early-stage and EGFR mutation. Annals of Surgical Oncology, 26(5), 1544-1551. https://doi: 10.1245/s10434-018-07137-2

Akim, A., Zafar, M. N., Safdar, N., Sung, Y. Y., & Muhammad, T. S. T. (2021). Understanding Hyaluronan Receptor (CD44) Interaction, HA-CD44 Activated Potential Targets in Cancer Therapeutics. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 11(3), 426.

Akunuru, S., James Zhai, Q., & Zheng, Y. (2012). Non-small cell lung cancer stem/progenitor cells are enriched in multiple distinct phenotypic subpopulations and exhibit plasticity. Cell death & disease, 3(7), e352-e352.

Alamgeer, M., Neil Watkins, D., Banakh, I., Kumar, B., Gough, D. J., Markman, B., & Ganju, V. (2018). A phase IIa study of HA-irinotecan, formulation of hyaluronic acid and irinotecan targeting CD44 in extensive-stage small cell lung cancer. Investigational New Drugs, 36(2), 288-298. https://doi:10.1007/s10637-017-0555-8

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Cancer as a microevolutionary process. In Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Garland Science.

Altıntop, M. D., Özdemir, A., Temel, H. E., Cevizlidere, B. D., Sever, B., Kaplancıklı, Z. A., & Çiftçi, G. A. (2022). Design, synthesis and biological evaluation of a new series of arylidene indanones as small molecules for targeted therapy of non-small cell lung carcinoma and prostate cancer. European Journal of Medicinal Chemistry, 244, 114851.

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nature biotechnology, 29(4), 341-345.

Anguela, X. M., & High, K. A. (2019). Entering the modern era of gene therapy. Annu Rev Med, 70(1), 273-288.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Antimisiaris, S. G., Mourtas, S., & Marazioti, A. (2018). Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery. Pharmaceutics, 10(4), 218.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., ... & Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell, 118(2), 149-161.

Arisan, E. D., Kutuk, O., Tezil, T., Bodur, C., Telci, D., & Basaga, H. (2010). Small inhibitor of Bcl-2, HA14-1, selectively enhanced the apoptotic effect of cisplatin by modulating Bcl-2 family members in MDA-MB-231 breast cancer cells. Breast cancer research and treatment, 119(2), 271-281.

Ashe, P. C., and Berry, M. D. (2003). Apoptotic signaling cascades. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 27, 199– 214.

Ayla, Ş., Öktem, G., TANRIVERDİ, G., & BİLİR, A. (2013). Kanser Kök Hücresi. Zeynep Kamil Tıp Bülteni, 44(4), 190-196

Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. Journal of biomedical science, 25(1), 1-18.

Bade, B. C., & Cruz, C. S. D. (2020). Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. Clinics in chest medicine, 41(1), 1-24

Baig, M. S., Roy, A., Rajpoot, S., Liu, D., Savai, R., Banerjee, S., ... & Wary, K. K. (2020). Tumor-derived exosomes in the regulation of macrophage polarization. Inflammation Research, 69(5), 435-451.

Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Węglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, P., ... & Zembala, M. (2006). Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. Cancer Immunology, Immunotherapy, 55(7), 808-818.

Behzad, F., Naghib, S. M., Tabatabaei, S. N., Zare, Y., & Rhee, K. Y. (2021). An overview of the plant-mediated green synthesis of noble metal nanoparticles for antibacterial applications. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 94, 92-104.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Beit-Yannai, E., Tabak, S., & Stamer, W. D. (2018). Physical exosome: exosome interactions. Journal of cellular and molecular medicine, 22(3), 2001-2006.

Benoit, Y. D., Guezguez, B., Boyd, A. L., & Bhatia, M. (2014). Molecular Pathways: Epigenetic Modulation of Wnt–Glycogen Synthase Kinase-3 Signaling to Target Human Cancer Stem Cells Epigenetic Modulation of Wnt–GSK3 Signaling. Clinical Cancer Research, 20(21), 5372-5378.

Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., ... & Chaput, N. (2016). Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. Oncoimmunology, 5(4), e1071008.

Björk, T., Nilsson, O., Dahlén, U., Matikainen, M. T., Cockett, A. T., Abrahamsson, P. A., & Lilja, H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to α1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. The Journal of urology, 150(1), 100-105.

Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature medicine, 3(7), 730-737.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68(6), 394-424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Brunelle, J. K., & Letai, A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. Journal of cell science, 122(4), 437-441.

Burlacu, A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. Journal of cellular and molecular medicine, 7(3), 249-257.

Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E., & Yazan, Y. (2016). Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 109, 174-183

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E., & Yazan, Y. (2016). Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 109, 174-183.

Camerlingo, R., Miceli, R., Marra, L., Rea, G., D'Agnano, I., Nardella, M., ... & Rocco, G. (2019). Conditioned medium of primary lung cancer cells induces EMT in A549 lung cancer cell line by TGF-ß1 and miRNA21 cooperation. PloS one, 14(7), e0219597.

Campello, S., & Scorrano, L. (2009). The mitochondrial pathway: focus on shape changes. In Essentials of Apoptosis (pp. 151-175). Humana Press, Totowa, NJ.

Caon, I., Bartolini, B., Parnigoni, A., Caravà, E., Moretto, P., Viola, M., ... & Passi, A. (2020, May). Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan. In Seminars in Cancer Biology (Vol. 62, pp. 9-19). Academic Press. https://doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.007

Cappella, P., Tomasoni, D., Faretta, M., Lupi, M., Montalenti, F., Viale, F., ... & Ubezio, P. (2001). Cell cycle effects of gemcitabine. International journal of cancer,93(3), 401-408.

Castella, E. M., Ariza, A., Pellicer, I., Fernandez-Vasalo, A., & Ojanguren, I. (1998). Differential expression of CD44v6 in metastases of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. Journal of clinical pathology, 51(2), 134-137

Chakraborty, S., & Rahman, T. (2012). The difficulties in cancer treatment. Ecancermedicalscience, 6. https://doi: 10.3332/ecancer.2012.ed16

Chalbatani, G. M., Dana, H., Gharagouzloo, E., Grijalvo, S., Eritja, R., Logsdon, C. D., ... & Marmari, V. (2019). Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach. International journal of nanomedicine, 14, 3111.

Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1773(8), 1299-1310.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Chen, J., Chen, J., Cheng, Y., Fu, Y., Zhao, H., Tang, M., Zhao, H., Lin, N., Shi, X., Lei, Y., 2020. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect beta cells against hypoxia-induced apoptosis via miR-21 by alleviating ER stress and inhibiting p38 MAPK phosphorylation. Stem cell research & therapy 11, 1-13. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01610-0

Chen, Y., Zhu, Q., Cheng, L., Wang, Y., Li, M., Yang, Q., ... & Liu, F. (2021). Exosome detection via the ultrafast-isolation system: EXODUS. Nature Methods, 18(2), 212-218.

Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K. K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. Nature Reviews Cancer, 14(8), 535-546.

Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J., & Roussel, M. F. (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(3), 1091-1096.

Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M., & Basi, G. (1994). Apoptosis and the cell cycle. Cellular & molecular biology research, 40(7-8), 603-612.

Chijimatsu, R., Yano, F., Saito, T., Kobayashi, M., Hamamoto, S., Kaito, T., ... & Nakamura, N. (2019). Effect of the small compound TD-198946 on glycosaminoglycan synthesis and transforming growth factor β3-associated chondrogenesis of human synovium-derived stem cells in vitro. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 13(3), 446-458.

Choo, Z. E., Loh, A. H. P., & Chen, Z. X. (2019). Destined to die: Apoptosis and pediatric cancers. Cancers, 11(11), 1623.

Chung, I. M., Rajakumar, G., Venkidasamy, B., Subramanian, U., & Thiruvengadam, M. (2020). Exosomes: Current use and future applications. Clinica Chimica Acta, 500, 226-232.

Cohen J J (1993): Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. American College of Physicians, CHEST, 103: 99-101.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M. H., & Dubrovska, A. (2015, April). A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. In Seminars in cancer biology (Vol. 31, pp. 16-27). Academic Press.

Collino, F., Deregibus, M. C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., ... & Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. PloS one, 5(7), e11803.

Cory, S., and Adams, J.M., (2002). The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Reviews Cancer, 2, 647-656.

Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. New England journal of medicine, 358(5), 502-511.

Croix, B. S., Man, S., & Kerbel, R. S. (1998). Reversal of intrinsic and acquired forms of drug resistance by hyaluronidase treatment of solid tumors. Cancer letters, 131(1), 35-44.

Croker, A. K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B. D., Hess, D. A., & Allan, A. L. (2009). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. Journal of cellular and molecular medicine, 13(8b), 2236-2252.

Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. Clinics in chest medicine, 32(4), 605-644.

Csoka, K., Liliemark, J., Larsson, R., & Nygren, P. (1995, August). Evaluation of the cytotoxic activity of gemcitabine in primary cultures of tumor cells from patients with hematologic or solid tumors. InSeminars in oncology (Vol. 22, No. 4 Suppl 11, pp. 47-53).

Czernek, L., & Düchler, M. (2020). Exosomes as messengers between mother and fetus in pregnancy. International Journal of Molecular Sciences, 21(12), 4264.

Dağdeviren, (2021) T. Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 13(3), 120-135.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Das, P. R., & Sherif, S. M. (2020). Application of exogenous dsRNAs-induced RNAi in agriculture: Challenges and triumphs. Frontiers in Plant Science, 11, 946.

De Angelis, M. L., Francescangeli, F., La Torre, F., & Zeuner, A. (2019). Stem cell plasticity and dormancy in the development of cancer therapy resistance. Frontiers in oncology, 9, 626.

Deepali Waghray., Qinghai Zhang. (2018) "Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-glycoprotein in Cancer Treatment". J Med Chem. June 28; 61(12): 5108–5121

DeGorter, M. K., Xia, C. Q., Yang, J. J., & Kim, R. B. (2012). Drug transporters in drug efficacy and toxicity. Annual review of pharmacology and toxicology, 52, 249-273.

Del Duca, D., Werbowetski, T., & Del Maestro, R. F. (2004). Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. Journal of neuro-oncology, 67(3), 295-303.

Deniz G, Ünlü I, Kömürcüoğlu B, Pulur A, Karaca İ, Karaca SY, et al. (2017) Histopathological and molecular features of lung cancer. The Journal of Tepecik Education and Research Hospital. 2017;27(2):77-87.

Deregibus, M. C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., ... & Camussi, G. (2007). Endothelial progenitor cell–derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 110(7), 2440-2448.

Detterbeck FC, Decker RH, Tanoue L, Lilenbaum RC. Non-small cell lung cancer. DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology. (10th Edition). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2015; 41: 495-535.

Didiot, M. C., Hall, L. M., Coles, A. H., Haraszti, R. A., Godinho, B. M., Chase, K., ... & Khvorova, A. (2016). Exosome-mediated delivery of hydrophobically modified siRNA for huntingtin mRNA silencing. Molecular Therapy, 24(10), 1836-1847.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Doherty, G. J., Tempero, M., & Corrie, P. G. (2018). HALO-109–301: a Phase III trial of PEGPH20 (with gemcitabine and nab-paclitaxel) in hyaluronic acid-high stage IV pancreatic cancer. Future Oncology 14(1), 13-22. https://doi:10.2217/fon-2017-0338

Dolanbay, S. N., Kocanci, F. G., & Aslim, B. (2021). Neuroprotective effects of allocryptopine-rich alkaloid extracts against oxidative stress-induced neuronal damage. Biomedicine & Pharmacotherapy, 140, 111690.

Dominici, M., Blanc, K. Le, Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 8(4): 315–317. https://doi.org/10.1080/14653240600855905

Dong, M., Lin, C., Feng, F. Y., Zhang, X. Y., Fu, M., Liang, X., ... & Wu, M. (2004). Development and characterization of a gemcitabine-resistant variant of human lung adenocarcinoma cell line A549. Ai Zheng= Aizheng= Chinese Journal of Cancer, 23(6), 667-671.

Donnenberg, V. S., & Donnenberg, A. D. (2005). Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. The Journal of Clinical Pharmacology, 45(8), 872-877.

Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F., & Wicha, M. S. (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. Cell proliferation, 36, 59-72.

Duan, L., Xu, L., Xu, X., Qin, Z., Zhou, X., Xiao, Y., ... & Xia, J. (2021). Exosome-mediated delivery of gene vectors for gene therapy. Nanoscale, 13(3), 1387-1397.

Działo, E., Rudnik, M., Koning, R. I., Czepiel, M., Tkacz, K., Baj-Krzyworzeka, M., ... & Błyszczuk, P. (2019). WNT3a and WNT5a transported by exosomes activate WNT signaling pathways in human cardiac fibroblasts. International journal of molecular sciences, 20(6), 1436.

El-Andaloussi, S., Lee, Y., Lakhal-Littleton, S., Li, J., Seow, Y., Gardiner, C., ... & Wood, M. J. (2012). Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nature protocols*, *7*(12), 2112-2126.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol, 35(4), 495–516.

Erbaycu AE.(2020) Akciğer kanserinde epidemiyoloji ve risk faktörleri.

Ergelen R, Cagatay Çimşit N.(2013) Akciğer Tümörleri. Bulletin of Thoracic Surgery/Toraks Cerrahisi Bülteni. 2013;4(3):178-188.

Erster, S., & Moll, U. M. (2005). Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. Biochemical and biophysical research communications, 331(3), 843-850.

Fang, W., & Vangsness Jr, C. T. (2021). Implications of anti-inflammatory nature of exosomes in knee arthritis. Cartilage, 13(2_suppl), 204S-212S.

Faruqu, F. N., Xu, L., & Al-Jamal, K. T. (2018). Preparation of exosomes for siRNA delivery to cancer cells. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (142), e58814.

Faruqu, F. N., Xu, L., & Al-Jamal, K. T. (2018). Preparation of exosomes for siRNA delivery to cancer cells. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (142), e58814. https://doi:10.3791/58814 (2018).

Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros M., et al. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer;

Fong, M. Y., & Kakar, S. S. (2010). The role of cancer stem cells and the side population in epithelial ovarian cancer. Histology and histopathology.

Foster, I. (2008). Cancer: A cell cycle defect. Radiography, 14(2), 144-149.

Franzen, C. A., Simms, P. E., Van Huis, A. F., Foreman, K. E., Kuo, P. C., & Gupta, G. N. (2014). Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. BioMed research international, 2014.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Freedman DN, Thun JM. Tobacco products Massive and still growing causes of cancer worldwide. In: World cancer report: cancer research for cancer prevention, editors: Wild PC, Weiderpass E, Stewart WB. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020: p.50-60. Available from: http://publications.iarc.fr/586. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO. (Erişim tarihi: 12 Aralık 2021)

Fu, S., Wang, Y., Xia, X., & Zheng, J. C. (2020). Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery. NanoImpact, 20, 100261.

Gajos-Michniewicz, A., & Czyz, M. (2020). WNT signaling in melanoma. International journal of molecular sciences, 21(14), 4852.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., ... & Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer research, 64(19), 7011-7021.

Garcia-Alegria, E., Potts, B., Menegatti, S., & Kouskoff, V. (2021). In vitro differentiation of human embryonic stem cells to hemogenic endothelium and blood progenitors via embryoid body formation. STAR protocols, 2(1), 100367.

Gazitt, Y., He, Y. J., Chang, L., Koza, S., Fisk, D., & Graham-Pole, J. (1992). Expression of N-myc, c-myc, and MDR-1 proteins in newly established neuroblastoma cell lines: a study by immunofluorescence staining and flow cytometry. Cancer research, 52(10), 2957-2965.

Gerlach, J. H., Kartner, N., Bell, D. R., & Ling, V. (1986). Multidrug resistance. Cancer Surveys, 5(1), 25-46.

Gerschenson, L. E., & Rotello, R. J. (1992). Apoptosis: a different type of cell death. The FASEB Journal, 6(7), 2450-2455.

Gharagozloo M, Mirzaei HR, Bagherpour B, Rezaei A, Kalantari H, Sanei MH et. al. Cell cycle analysis of the CD133 + and CD133 - cells isolated from human colorectal cancer. J Can Res 2012;8:399-403.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., ... & Dontu, G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell stem cell, 1(5), 555-567.

Goldstein, L. A., Zhou, D. F., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F., & Butcher, E. C. (1989). A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. Cell, 56(6), 1063-1072. https://doi: 10.1016/0092-8674(89)90639-9

Golebiewska, A., Brons, N. H., Bjerkvig, R., & Niclou, S. P. (2011). Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. Cell stem cell, 8(2), 136-147.

Golias, C. H., Charalabopoulos, A., & Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. International journal of clinical practice, 58(12), 1134-1141.

Gollapudi, S., & Gupta, S. (2001). Anti-P-glycoprotein antibody-induced apoptosis of activated peripheral blood lymphocytes: a possible role of P-glycoprotein in lymphocyte survival. Journal of clinical immunology, 21(6), 420-430.

Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., & Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. The Journal of experimental medicine, 183(4), 1797-1806.

Green, S. K., Francia, G., Isidoro, C., & Kerbel, R. S. (2004). Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. Molecular cancer therapeutics, 3(2), 149-159.

Greening, D. W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B. J., & Simpson, R. J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. In Proteomic Profiling (pp. 179-209). Humana Press, New York, NY.

Greve, B., Kelsch, R., Spaniol, K., Eich, H. T., & Götte, M. (2012). Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. Cytometry Part A, 81(4), 284-293.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Guıccıardı M., and. Gores, G. (2009). The Death Receptor Pathway. Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research, 119-150.

Gündüz, E., Dinçer, M., Yıldız, G., Bal, C., & Gülbaş, Z. (2012). The frequency and clinical relevance of multidrug resistance protein expression in patients with lymphoma. Turkish Journal of Hematology, 29(2), 120. https://doi:10.5505/tjh.2012.60362

Ha, D., Yang, N., & Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. Acta Pharmaceutica Sinica B, 6(4), 287-296.

Hajdu, S. I. (2011). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. Cancer, 117(5), 1097-1102.

Hamburger, A. W., & Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. Science, 197(4302), 461-463

Hamed, S. S., Straubinger, R. M., & Jusko, W. J. (2013). Pharmacodynamic modeling of cell cycle and apoptotic effects of gemcitabine on pancreatic adenocarcinoma cells. Cancer chemotherapy and pharmacology, 72(3), 553-563.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature, 404(6775), 293-296

Han, Z., Peng, C., Yi, J., Zhang, D., Xiang, X., Peng, X., ... & Qiao, L. (2021). Highly efficient exosome purification from human plasma by tangential flow filtration based microfluidic chip. Sensors and Actuators B: Chemical, 333, 129563.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. cell, 100(1), 57-70.

Hartwell, L. H., & Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. Science, 266(5192), 1821-1828.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Harvanová, D., Tóthová, T., Sarissky, M., Amrichová, J., & Rosocha, J. (2011). Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. Folia Biol (Praha), 57(3), 119-124.

Heald, R., McLoughlin, M., & McKeon, F. (1993). Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. Cell, 74(3), 463-474.

Heng, W. S., Gosens, R., & Kruyt, F. A. (2019). Lung cancer stem cells: origin, features, maintenance mechanisms and therapeutic targeting. Biochemical pharmacology, 160, 121-133.

Hong, S. P., Wen, J., Bang, S., Park, S., & Song, S. Y. (2009). CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. International journal of cancer, 125(10), 2323-2331.

Hua, J., Mutch, D. G., & Herzog, T. J. (2005). Stable suppression of MDR-1 gene using siRNA expression vector to reverse drug resistance in a human uterine sarcoma cell line. Gynecologic oncology, 98(1), 31-38.

Huang, W., Xiao, D. Z., Wang, Y., Shan, Z. X., Liu, X. Y., Lin, Q. X., ... & Yu, X. Y. (2014). Fn14 promotes differentiation of human mesenchymal stem cells into heart valvular interstitial cells by phenotypic characterization. Journal of cellular physiology, 229(5), 580-587.

Hulkoti, N. I., & Taranath, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 121, 474-483.

Iida, H., Suzuki, M., Goitsuka, R., & Ueno, H. (2012). Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. International journal of oncology, 40(1), 71-79.

Ivascu, A., & Kubbies, M. (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. SLAS Discovery, 11(8), 922-932. https://doi.org/10.1177/1087057106292763.

Jain, S., Pathak, K., & Vaidya, A. (2018). Molecular therapy using siRNA: Recent trends and advances of multi target inhibition of cancer growth. International journal of biological macromolecules, 116, 880-892.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. Advanced pharmaceutical bulletin, 9(2), 205.

Jia, Y., & Xie, J. (2015). Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. Genes & Diseases, 2(4), 299-306.

Jiang, X. C., & Gao, J. Q. (2017). Exosomes as novel bio-carriers for gene and drug delivery. International journal of pharmaceutics, 521(1-2), 167-175.

Jinek, M., & Doudna, J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. nature, 457(7228), 405-412.

Johnsen, K. B., Gudbergsson, J. M., Skov, M. N., Pilgaard, L., Moos, T., & Duroux, M. (2014). A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles—endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1846(1), 75-87.

Johnstone, R. W., Cretney, E., & Smyth, M. J. (1999). P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 93(3), 1075-1085.

Jung, H., Kim, H. H., Lee, D. H., Hwang, Y. S., Yang, H. C., & Park, J. C. (2011). Transforming growth factor-beta 1 in adipose derived stem cells conditioned medium is a dominant paracrine mediator determines hyaluronic acid and collagen expression profile. Cytotechnology, 63(1), 57-66.

Junk, A., & Riess, F. (2006). From an idea to a vision: There's plenty of room at the bottom. American Journal of Physics, 74(9), 825-830.

Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. The Journal of clinical investigation, 126(4), 1208-1215.

Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., ... & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. Nature, 546(7659), 498-503.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kandasamy, G., & Maity, D. (2022). Current Advancements in Self-assembling Nanocarriers-Based siRNA Delivery for Cancer Therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113002.

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., ... & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures–a comparison of different types of cancer cell cultures. Archives of Medical Science, 14(4), 910-919

Karagüzel, A., Kalay, E., & Celep, F. (2007). RNA interferans (RNAi): gen sessizleştirilmesi ve tedavi edici uygulamaları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 33(1), 41-44.

Karaöz E, İnci Ç.(2014) Stem cell Used in Treatment Resources and Their isolation Techniques, Turkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics 20147(3):7-16.

Karaöz, E., Demircan, P. Ç., Erman, G., Güngörürler, E., & Sarıboyacı, A. E. (2017). Kemik İliği, Wharton Jölesi ve İnsan Yağ Doku-Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünsüpresif Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. Turkish Journal of Hematology. 34(3): 213–225. https://doi.org/10.4274/tjh.2016.0171

Kase, Y., Uzawa, K., Wagai, S., Yoshimura, S., Yamamoto, J. I., Toeda, Y., ... & Tanzawa, H. (2021). Engineered exosomes delivering specific tumor-suppressive RNAi attenuate oral cancer progression. Scientific reports, 11(1), 1-12.

Kasibhatla, S., ve Tseng, B. (2003). Why Target Apoptosis in Cancer Treatment?, Maxim Pharmaceuticals, (2), 573–580.

Kaur, S., Singh, S. P., Elkahloun, A. G., Wu, W., Abu-Asab, M. S., & Roberts, D. D. (2014). CD47-dependent immunomodulatory and angiogenic activities of extracellular vesicles produced by T cells. Matrix biology, 37, 49-59.

Kearns, W. G., & Liu, J. M. (2001). Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. Current Genomics, 2(2), 171-180.

Kelly, P. N., Dakic, A., Adams, J. M., Nutt, S. L., & Strasser, A. (2007). Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. Science, 317(5836), 337-337.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., ... & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. Nature, 546(7659), 498-503.

Khoursheed, M., Mathew, T. C., Makar, R. R., Sonia, L., Abul, H., Asfar, S., ... & Al-Bader, A. (2002). Expression of CD44s in human colorectal cancer. Pathology & Oncology Research, 8(3), 170-174

Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., ... & Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell, 121(6), 823-835.

Kim, H. S., Choi, D. Y., Yun, S. J., Choi, S. M., Kang, J. W., Jung, J. W., ... & Kim, D. W. (2012). Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. Journal of proteome research, 11(2), 839-849.

Kim, I. G., Lee, J. H., Kim, S. Y., Heo, C. K., Kim, R. K., & Cho, E. W. (2021). Targeting therapy-resistant lung cancer stem cells via disruption of the AKT/TSPYL5/PTEN positive-feedback loop. Communications Biology, 4(1), 1-17.

Kim, K., Choi, H., Choi, E. S., Park, M. H., & Ryu, J. H. (2019). Hyaluronic acid-coated nanomedicine for targeted cancer therapy. Pharmaceutics, 11(7), 301

Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., ... & Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12(3), 655-664.

Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Yuan, D., Deygen, I., Klyachko, N. L., ... & Batrakova, E. V. (2018). Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 14(1), 195-204.

Kim, M., Yun, H. W., Park, D. Y., Choi, B. H., & Min, B. H. (2018). Three-dimensional spheroid culture increases exosome secretion from mesenchymal stem cells. Tissue engineering and regenerative medicine, 15(4), 427-436.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kim, W. T., & Ryu, C. J. (2017). Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. BMB reports, 50(6), 285.

Knoblich, J. A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. Cell, 132(4), 583-597.

Kolahalam, L. A., Viswanath, I. K., Diwakar, B. S., Govindh, B., Reddy, V., & Murthy, Y. L. N. (2019). Review on nanomaterials: Synthesis and applications. Materials Today: Proceedings, 18, 2182-2190.

Kolahalam, L. A., Viswanath, I. K., Diwakar, B. S., Govindh, B., Reddy, V., & Murthy, Y. L. N. (2019). Review on nanomaterials: Synthesis and applications. Materials Today: Proceedings, 18, 2182-2190. https://doi:10.1016/j.matpr.2019.07.371.

Kong, T., Ahn, R., Yang, K., Zhu, X., Fu, Z., Morin, G., ... & Huang, S. (2020). CD44 promotes PD-L1 expression and its tumor-intrinsic function in breast and lung cancers. Cancer research, 80(3), 444-457. https://doi: 10.1158/0008-5472.Can-19-1108

Koren, A., Rijavec, M., Kern, I., Sodja, E., Korosec, P., & Cufer, T. (2016). BMI1, ALDH1A1, and CD133 transcripts connect epithelial-mesenchymal transition to cancer stem cells in lung carcinoma. Stem cells international, 2016. https://doi: 10.1155/2016/9714315

Kumar, K., Rani, V., Mishra, M., & Chawla, R. (2022). New paradigm in combination therapy of siRNA with chemotherapeutic drugs for effective cancer therapy. Current Research in Pharmacology and Drug Discovery, 100103.

Kuo, C. T., Wang, J. Y., Lin, Y. F., Wo, A. M., Chen, B. P., & Lee, H. (2017). Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. Scientific Reports, 7(1), 1-10.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., ... & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature, 367(6464), 645-648.

Li, D., Gong, L., Lin, H., Yao, S., Yin, Y., Zhou, Z., ... & Huang, Z. (2022). Hyaluronic Acid-Coated Bovine Milk Exosomes for Achieving Tumor-Specific Intracellular Delivery of miRNA-204. Cells, 11(19), 3065.

Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. Signal transduction and targeted therapy, 5(1), 1-23.

Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene, 27(48), 6194-6206.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Li, L., & Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. Annual review of cell and developmental biology, 21(1), 605-631

Li, Q., Chen, C., Kapadia, A., Zhou, Q., Harper, M. K., Schaack, J., & Labarbera, D. V. (2011). 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: high-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. Journal of biomolecular screening, 16(2), 141-154. https://doi.org/10.1177/1087057110392995.

Li, W., Ma, H., Zhang, J., Zhu, L., Wang, C., & Yang, Y. (2017). Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. Scientific reports, 7(1), 1-15.

Li, Y., Wicha, M. S., Schwartz, S. J., & Sun, D. (2011). Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. The Journal of nutritional biochemistry, 22(9), 799-806.

Lin, S., Sun, J. G., Wu, J. B., Long, H. X., Zhu, C. H., Xiang, T., ... & Chen, Z. T. (2012). Aberrant microRNAs expression in CD133+/CD326+ human lung adenocarcinoma initiating cells from A549. Molecules and cells, 33(3), 277-283.

Lindvall, C., Bu, W., Williams, B. O., & Li, Y. (2007). Wnt signaling, stem cells, and the cellular origin of breast cancer. Stem cell reviews, 3(2), 157-168.

Liu, H., Shen, M., Zhao, D., Ru, D., Duan, Y., Ding, C., & Li, H. (2019). The effect of triptolide-loaded exosomes on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer SKOV3 cells. BioMed research international, 2019.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Liu, J., & Guo, B. (2020). RNA-based therapeutics for colorectal cancer: Updates and future directions. Pharmacological research, 152, 104550.

Logozzi, M., Mizzoni, D., Angelini, D. F., Di Raimo, R., Falchi, M., Battistini, L., & Fais, S. (2018). Microenvironmental pH and exosome levels interplay in human cancer cell lines of different histotypes. Cancers, 10(10), 370.

Ludwig, N., Szczepanski, M. J., Gluszko, A., Szafarowski, T., Azambuja, J. H., Dolg, L., ... & Zimmerer, R. M. (2019). CD44 (+) tumor cells promote early angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Letters, 467, 85-95. https://doi: 10.1016/ j.canlet.2019.10.010

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... & Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell, 133(4), 704-715. https://doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027

Marumoto, T., Hirota, T., Morisaki, T., Kunitoku, N., Zhang, D., Ichikawa, Y., ... & Saya, H. (2002). Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. Genes to Cells, 7(11), 1173-1182.

Masciale, V., Grisendi, G., Banchelli, F., D'Amico, R., Maiorana, A., Sighinolfi, P., ... & Aramini, B. (2020). CD44+/EPCAM+ cells detect a subpopulation of ALDHhigh cells in human non-small cell lung cancer: A chance for targeting cancer stem cells?. Oncotarget, 11(17), 1545. https://doi: 10.18632/oncotarget.27568

Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A. R., Molaei, F., & Alahari, S. K. (2019). Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. Molecular cancer, 18(1), 1-14..

Matsui, W. H. (2016). Cancer stem cell signaling pathways. Medicine, 95(Suppl 1).

Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 23(1), 74-88.

Mauter, M. S., Zucker, I., Perreault, F., Werber, J. R., Kim, J. H., & Elimelech, M. (2018). The role of nanotechnology in tackling global water challenges. Nature Sustainability, 1(4), 166-175.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Mauter, M. S., Zucker, I., Perreault, F., Werber, J. R., Kim, J., & Elimelech, M. (2018). The Role of Nanotechnology in Tackling Global Water Challenges, Nat. Sustainability, 1, 166. https://doi: 10.1038/s41893-018-0046-8.

McAndrews, K. M., & Kalluri, R. (2019). Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. Molecular cancer, 18(1), 1-11.

Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., Fernandez, A.F., Gammon, S.T., Kaye, J., LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., 2015. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. Nature 523, 177-182. 10.1038/nature14581

Mo, W., & Zhang, J. T. (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. International journal of biochemistry and molecular biology, 3(1), 1.

Mohamed, L. M. K., Farag, D. B., Beherei, H., & AbuBakr, N. (2022). The Anticancer Effect of Magnetic Selenium-Based Nanocomposites on Tongue Carcinoma Stem Cells (In Vitro Study). BioNanoScience, 12(1), 1-12.

Mohr, L., Carceles-Cordon, M., Woo, J., Cordon-Cardo, C., Domingo-Domenech, J., & Rodriguez-Bravo, V. (2017). Generation of prostate cancer cell models of resistance to the anti-mitotic agent Docetaxel. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (127), e56327.

Molinari, M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. Cell proliferation, 33(5), 261-274.

Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annual review of cell and developmental biology, 13, 261.

Moscardini, A., Di Pietro, S., Signore, G., Parlanti, P., Santi, M., Gemmi, M., & Cappello, V. (2020). Uranium-free X solution: A new generation contrast agent for biological samples ultrastructure. Scientific reports, 10(1), 1-11.

Murayama, T., Nakaoku, T., Enari, M., Nishimura, T., Tominaga, K., Nakata, A., ... & Gotoh, N. (2016). Oncogenic Fusion Gene CD74-NRG1 Confers Cancer Stem Cell–like Properties in Lung Cancer through a IGF2 Autocrine/Paracrine CircuitCD74-NRG1 Fusion Gene Product Confers Cancer Stem Cell Properties. Cancer research, 76(4), 974-983. https://doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2135

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Najafi, M., Mortezaee, K., & Majidpoor, J. (2019). Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. Life sciences, 234, 116781.

Nakagawa, Y., Abe, S., Kurata, M., Hasegawa, M., Yamamoto, K., Inoue, M., ... & Kitagawa, M. (2006). IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. American journal of hematology, 81(11), 824-831.

Naseem, T., & Durrani, T. (2021). The role of some important metal oxide nanoparticles for wastewater and antibacterial applications: a review. Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 3, 59-75.

Naseem, T., & Durrani, T. (2021). The role of some important metal oxide nanoparticles for wastewater and antibacterial applications: a review. Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 3, 59-75. https://doi:10.1016/j.enceco.2020.12.001

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID: 60750, Gemcitabine. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gemcitabine.

Navarro, G., Sawant, R. R., Biswas, S., Essex, S., Tros de Ilarduya, C., & Torchilin, V. P. (2012). P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells. Nanomedicine, 7(1), 65-78.

Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., ... & Travis, W. D. (2021). The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. Journal of Thoracic Oncology.

Norberg, E., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2010). Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). Biochemical and biophysical research communications, 396(1), 95-100.

Odoux, C., Fohrer, H., Hoppo, T., Guzik, L., Stolz, D. B., Lewis, D. W., ... & Lagasse, E. (2008). A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. Cancer research, 68(17), 6932-6941

Olejarz, W. et al., 2020, Tumor-Derived Exosomes in Immunosuppression and Immunotherapy, Journal of Immunology Research., 2020, 1-11.

Onsun N. (2016) Siklospori. Turkderm Arch Turk Dermatol Venerology 50 (Suppl 1):26-8

Oskuee, R. K., & Jaafari, M. R. (2020). Delivery of LNA-antimiR-142-3p by mesenchymal stem cells-derived exosomes to breast cancer stem cells reduces tumorigenicity. Stem cell reviews and reports, 16(3), 541-556.

Ouhtit, A., Thouta, R., Zayed, H., Gaur, R. L., Fernando, A., Rahman, M., & Welsh, D. A. (2020). CD44 mediates stem cell mobilization to damaged lung via its novel transcriptional targets, Cortactin and Survivin. International journal of medical sciences, 17(1), 103. https://doi: 10.7150/ijms.33125

Özen, A. (2014). Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı.

Pallis, M., & Russell, N. (2004). Strategies for overcoming p-glycoprotein-mediated drug resistance in acute myeloblastic leukaemia. Leukemia, 18(12), 1927-1930.

Papaliagkas, V., Anogianaki, A., Anogianakis, G., & Ilonidis, G. (2007). The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. Hippokratia, 11(3), 108.

Paskeh, M. D. A., Saebfar, H., Mahabady, M. K., Orouei, S., Hushmandi, K., Entezari, M., ... & Samarghandian, S. (2022). Overcoming doxorubicin resistance in cancer: siRNA-loaded nanoarchitectures for cancer gene therapy. *Life Sciences*, 120463.

Patrawala, L., Calhoun-Davis, T., Schneider-Broussard, R., & Tang, D. G. (2007). Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+ α2β1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells. Cancer research, 67(14), 6796-6805.

Pece, S., Tosoni, D., Confalonieri, S., Mazzarol, G., Vecchi, M., Ronzoni, S., ... & Di Fiore, P. P. (2010). Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. Cell, 140(1), 62-73.

Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., ... & Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(14), 6328-6333.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Peitzsch, C., Kurth, I., Kunz-Schughart, L., Baumann, M., & Dubrovska, A. (2013). Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. Radiotherapy and Oncology, 108(3), 378-387.

Pierce, G. B., & Wallace, C. (1971). Differentiation of malignant to benign cells. Cancer research, 31(2), 127-134.

Pietanza, M. C., Krug, L. M., Wu, A. J., Kris, M. G., Rudin, C. M., & Travis, W. D. (2015). Small cell and neuroendocrine tumors of the lung. In DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology: Tenth Edition. Wolters Kluwer Health Adis (ESP).Pines, J., & Hunter, T. (1991, January). Human cell division: the involvement of cyclins A and B1, and multiple cdc2s. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 56, pp. 449-463). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 4(5), a008052.

Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., ... & Daidone, M. G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer research, 65(13), 5506-5511.

Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. Journal of biological Chemistry, 284(33), 21777-21781.

Pore, M. M., Hiltermann, T. J. N., & Kruyt, F. A. (2013). Targeting apoptosis pathways in lung cancer. Cancer letters, 332(2), 359-368..

Poulsom, R., Alison, M. R., Forbes, S. J., & Wright, N. A. (2002). Adult stem cell plasticity. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 197(4), 441-456.

Prabavathy, D., Swarnalatha, Y., & Ramadoss, N. (2018). Lung cancer stem cells—origin, characteristics and therapy. Stem cell investigation, 5.

Pullan, J. E., Confeld, M. I., Osborn, J. K., Kim, J., Sarkar, K., & Mallik, S. (2019). Exosomes as drug carriers for cancer therapy. Molecular pharmaceutics, 16(5), 1789-1798.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Qing, K., Jin, Z., Xu, Z., Wang, W., Li, X., Zhang, Y., ... & Li, J. (2022). Dysregulated MDR1 by PRDM1/Blimp1 Is Involved in the Doxorubicin Resistance of Non-Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Chemotherapy*, *67*(1), 12-23.

Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. Leukemia, 20(9), 1487-1495.

Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Solomon, F. P. (2015). 3D cell culture systems: advantages and applications. Journal of cellular physiology, 230(1), 16-26.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. nature, 414(6859), 105-111.

Roberts, E. C., Shapiro, P. S., Nahreini, T. S., Pages, G., Pouyssegur, J., & Ahn, N. G. (2002). Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. Molecular and cellular biology, 22(20), 7226-7241.

Roudi, R., Madjd, Z., Ebrahimi, M., Samani, F., & Samadikuchaksaraei, A. (2014). CD44 and CD24 cannot act as cancer stem cell markers in human lung adenocarcinoma cell line A549. Cellular and Molecular Biology Letters, 19(1), 23-36.

Roudi, R., Madjd, Z., Korourian, A., Mehrazma, M., Molanae, S., Sabet, M. N., & Shariftabrizi, A. (2014). Clinical significance of putative cancer stem cell marker CD44 in different histological subtypes of lung cancer. Cancer biomarkers, 14(6), 457-467. https://doi: 10.3233/cbm-140424

Roy, S., Lu, K., Nayak, M. K., Bhuniya, A., Ghosh, T., Kundu, S., ... & Basu, S. (2017). Activation of D2 dopamine receptors in CD133+ ve cancer stem cells in non-small cell lung carcinoma inhibits proliferation, clonogenic ability, and invasiveness of these cells. Journal of Biological Chemistry, 292(2), 435-445. https://doi: 10.1074/ jbc.M116.748970

S Steelman, L., Fitzgerald, T., Lertpiriyapong, K., Cocco, L., Y Follo, M., M Martelli, A., ... & A McCubrey, J. (2016). Critical roles of EGFR family members in breast cancer and breast cancer stem cells: targets for therapy. Current Pharmaceutical Design, 22(16), 2358-2388.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology. (10th Edition). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2015; 42: 536-555.

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature., 391: 96–9.

Sancho, P., Barneda, D., & Heeschen, C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. British journal of cancer, 114(12), 1305-1312.

Sandoval, M. A., Sloat, B. R., Lansakara-P, D. S., Kumar, A., Rodriguez, B. L., Kiguchi, K., ... & Cui, Z. (2012). EGFR-targeted stearoyl gemcitabine nanoparticles show enhanced anti-tumor activity. Journal of controlled release,157(2), 287-296.

Satar, N. A., Fakiruddin, K. S., Lim, M. N., Mok, P. L., Zakaria, N., Fakharuzi, N. A., ... & Baharuddin, P. (2018). Novel triple-positive markers identified in human non-small cell lung cancer cell line with chemotherapy-resistant and putative cancer stem cell characteristics. Oncology reports, 40(2), 669-681. https://doi: 10.3892/or.2018.6461

Scales, S. J., & de Sauvage, F. J (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. Trends in pharmacological sciences, 30(6)., 303-312.

Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 99(2), 507-512.

Schatton, T., Murphy, G. F., Frank, N. Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., ... & Frank, M. H. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. Nature, 451(7176), 345-349.

Sell, S. (2009). History of cancer stem cells. In Regulatory networks in stem cells (pp. 495-503). Humana Press.

Senderowicz, A. M., & Sausville, E. A. (2000). Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. Journal of the National Cancer Institute, 92(5), 376-387.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Seydel, Ş., and Aksoy, K. (2012). Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Mechanisms. Archives Medical Review Journal, 21(4), 221-235.

Shah, M. A., & Schwartz, G. K. (2001). Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. Clinical cancer research, 7(8), 2168-2181.

Shahriyari, L., & Komarova, N. L. (2013). Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer?. PloS one, 8(10), e76195.

Sharma, P., Diergaarde, B., Ferrone, S., Kirkwood, J. M., & Whiteside, T. L. (2020). Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. Scientific reports, 10(1), 1-11.

Shehzad, A., Ravinayagam, V., AlRumaih, H., Aljafary, M., Almohazey, D., Almofty, S., ... & Al-Suhaimi, E. A. (2019). Application of three-dimensional (3D) tumor cell culture systems and mechanism of drug resistance. Current Pharmaceutical Design, 25(34), 3599-3607

Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. Science, 274(5293), 1672-1677.

Sherr, C. J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer research, 60(14), 3689-3695.

Shipitsin, M., Campbell, L. L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., ... & Polyak, K. (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. Cancer cell, 11(3), 259-273.

Skog, J., Würdinger, T., Van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., ... & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nature cell biology, 10(12), 1470-1476

Smyth, M. J., Krasovskis, E., Sutton, V. R., & Johnstone, R. W. (1998). The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(12), 7024-7029.

Sneath, R. J., & Mangham, D. C. (1998). The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. Molecular pathology, 51(4), 191

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Soltanian, S., & Matin, M. M. (2011). Cancer stem cells and cancer therapy. Tumor Biology, 32(3), 425-440.

Son, M. J., Woolard, K., Nam, D. H., Lee, J., & Fine, H. A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. Cell stem cell, 4(5), 440-452.

Strambeanu, N., Demetrovici, L., Dragos, D., & Lungu, M. (2015). Nanoparticles: Definition, classification and general physical properties. In Nanoparticles' promises and risks (pp. 3-8). Springer, Cham.

Suda, K., Murakami, I., Yu, H., Kim, J., Tan, A. C., Mizuuchi, H., ... & Hirsch, F. R. (2018). CD44 facilitates epithelial-to-mesenchymal transition phenotypic change at acquisition of resistance to EGFR kinase inhibitors in lung cancer. Molecular cancer therapeutics, 17(10), 2257-2265. https://doi: 10.1158/1535-7163.Mct-17-1279

Sun, D., Wu, Y., Zhang, S., Han, Y., Shen, J., Zheng, W., ... & Ding, C. (2021). Distinct roles of miR-34 family members on suppression of lung squamous cell carcinoma. Biomedicine & Pharmacotherapy, 142, 111967. https://doi: 10.1016/j.biopha.2021.111967

Sundarraj, S., Thangam, R., Sujitha, M. V., Vimala, K., & Kannan, S. (2014). Ligand-conjugated mesoporous silica nanorattles based on enzyme targeted prodrug delivery system for effective lung cancer therapy. Toxicology and applied pharmacology, 275(3), 232-243. https://doi: 10.1016/j.taap.2014.01.012.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 71(3), 209-249.

Sung, J. M., Cho, H. J., Yi, H., Lee, C. H., Kim, H. S., Kim, D. K., ... & Shin, H. C. (2008). Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells. Biochemical and biophysical research communications, 371(1), 163-167.

Susa, M., Iyer, A. K., Ryu, K., Choy, E., Hornicek, F. J., Mankin, H., . . . Duan, Z. (2010). Inhibition of ABCB1 (MDR1) expression by an siRNA nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma. PloS one, 5(5), e10764.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H., & Linnenbach, A. J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(17), 6833-6837. https://doi: 10.1073/pnas.87.17.6833

Szotek, P. P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P. T., Dinulescu, D. M., Connolly, D., Foster, R., ... & Donahoe, P. K. (2006). Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(30), 11154-11159.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. cell, 131(5), 861-872

Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M. A., & Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. Oncogene, 20(2), 167-177.

Tang, D. G. (2012). Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. Cell research, 22(3), 457-472.

Tang, Y., Hou, J., Li, G., Song, Z., Li, X., Yang, C., ... & Xu, Y. (2014). ABCG2 regulates the pattern of self-renewing divisions in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines. Oncology Reports, 32(5), 2168-2174.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. science, 282(5391), 1145-1147.

Thottassery, J. V., Zambetti, G. P., Arimori, K., Schuetz, E. G., & Schuetz, J. D. (1997). p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(20), 11037-11042. https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.11037

Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiation research, 14(2), 213-222.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Timoszyk, A., Niedbach, J., Śliżewska, P., Mirończyk, A., & Kozioł, J. J. (2017). Eco-Friendly and temperature dependent biosynthesis of gold nanoparticles using the bacterium Pseudomonas aeruginosa: characterization and antibacterial activity. In Journal of Nano Research (Vol. 48, pp. 114-124). Trans Tech Publications Ltd.

Toschi, L., & Cappuzzo, F. (2009). Gemcitabine for the treatment of advanced nonsmall cell lung cancer. OncoTargets and therapy, 209-217

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H., Beasley, M. B., ... & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. Journal of thoracic oncology, 10(9), 1243-1260. https://doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H., Beasley, M. B., ... & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. Journal of thoracic oncology, 10(9), 1243-1260.

Tripathi, A., & Misra, K. (2016). Inhibition of P-glycoprotein mediated efflux of paclitaxel by coumarin derivatives in cancer stem cells: an in silico approach. Combinatorial chemistry & high throughput screening, 19(6), 497-506.

Tu, Z., Xie, S., Xiong, M., Liu, Y., Yang, X., Tembo, K. M., ... & Zhang, Q. (2017). CXCR4 is involved in CD133-induced EMT in non-small cell lung cancer. International Journal of Oncology, 50(2), 505-514. https://doi: 10.3892/ijo.2016.3812

Ünsal M, editör. Akciğer Kanseri. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020:p.1-5.

Venezia, T. A., Merchant, A. A., Ramos, C. A., Whitehouse, N. L., Young, A. S., Shaw, C. A., & Goodell, M. A. (2004). Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. PLoS biology, 2(10), e301.

Vercammen, D., Steemans, M., and Denecker, G. (2001). Death receptorinduced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. Cell Death Differ ,(8),829–840

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Visca, P., Del Nonno, F., Botti, C., Marandino, F., Sebastiani, V., Di Tondo, U., ... & Alo, P. L. (2002). Role and prognostic significance of CD44s expression in colorectal cancer. Anticancer research, 22(5), 2671-2675

Waghray, D., & Zhang, Q. (2017). Inhibit or evade multidrug resistance P-glycoprotein in cancer treatment: Miniperspective. Journal of medicinal chemistry, 61(12), 5108-5121.

Wang, C., Chen, L., Huang, Y., Li, K., Jinye, A., Fan, T., ... & Liu, Y. (2019). Exosome-delivered TRPP2 siRNA inhibits the epithelial-mesenchymal transition of FaDu cells. *Oncology Letters*, *17*(2), 1953-1961.

Wang, C., Li, Z., Xu, P., Xu, L., Han, S., & Sun, Y. (2022). Combination of polythyleneimine regulating autophagy prodrug and Mdr1 siRNA for tumor multidrug resistance. Journal of Nanobiotechnology, 20(1), 1-19.

Wang, F., Sun, Y., Huang, X., Qiao, C., Zhang, W., Liu, P., & Wang, M. (2021). Sulforaphane inhibits self-renewal of lung cancer stem cells through the modulation of sonic Hedgehog signaling pathway and polyhomeotic homolog 3. AMB Express, 11(1), 1-10

Wang, J., Wang, C., Meng, Q., Li, S., Sun, X., Bo, Y., & Yao, W. (2012). siRNA targeting Notch-1 decreases glioma stem cell proliferation and tumor growth. Molecular biology reports, 39(3), 2497-2503.

Wang, K., Wu, X., Wang, J., & Huang, J. (2013). Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. International Journal of Nanomedicine, 8, 899.

Wang, Y., Zhang, Y., Cai, G., & Li, Q. (2020). Exosomes as actively targeted nanocarriers for cancer therapy. International journal of nanomedicine, 15, 4257.

Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., & Huttner, W. B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(23), 12425-12430. https://doi: 10.1073/ pnas.94.23.12425

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Wen, G. M., Mou, F. F., Hou, W., Wang, D., & Xia, P. (2019). Integrative analysis of CD133 mRNA in human cancers based on data mining. Stem Cell Reviews and Reports, 15(1), 23-34. https://doi: 10.1007/s12015-018-9865-2

Weng, K. F., Hsieh, P. T., Huang, H. I., & Shih, S. R. (2015). Mammalian RNA virus-derived small RNA: biogenesis and functional activity. Microbes and Infection, 17(8), 557-563.

Weng, Y., Li, C., Yang, T., Hu, B., Zhang, M., Guo, S., ... & Huang, Y. (2020). The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. Biotechnology advances, 40, 107534.

Weng, Y., Xiao, H., Zhang, J., Liang, X. J., & Huang, Y. (2019). RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. Biotechnology advances, 37(5), 801-825.

Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. The Journal of pathology, 226(2), 352-364.

Wilson, L. L., Lettenmaier, D. P., & Skyllingstad, E. (1992). A hierarchical stochastic model of large-scale atmospheric circulation patterns and multiple station daily precipitation. Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 97(D3), 2791-2809.

Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 30:87.

Xu, R., Simpson, R.J., Greening, D.W., 2017. A protocol for isolation and proteomic characterization of distinct extracellular vesicle subtypes by sequential centrifugal ultrafiltration, Exosomes and Microvesicles. Springer, pp. 91-116. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.414862

Xunian, Z., & Kalluri, R. (2020). Biology and therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes. Cancer Science, 111(9), 3100-3110.

Yamashita, T., Takahashi, Y., & Takakura, Y. (2018). Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 41(6), 835-842.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Yang, Z., Xie, J., Zhu, J., Kang, C., Chiang, C., Wang, X., ... & Lee, L. J. (2016). Functional exosome-mimic for delivery of siRNA to cancer: in vitro and in vivo evaluation. Journal of Controlled Release, 243, 160-171.

Yhee, J. Y., Song, S., Lee, S. J., Park, S. G., Kim, K. S., Kim, M. G., ... & Kim, K. (2015). Cancer-targeted MDR-1 siRNA delivery using self-cross-linked glycol chitosan nanoparticles to overcome drug resistance. Journal of Controlled Release, 198, 1-9.

Yin, J., Zhang, H., Wu, X., Zhang, Y., Li, J., Shen, J., ... & Li, M. (2020). CD44 inhibition attenuates EGFR signaling and enhances cisplatin sensitivity in human EGFR wild-type non-small-cell lung cancer cells. International journal of molecular medicine, 45(6), 1783-1792. https://doi: 10.3892/ijmm.2020.4562

Yin, X., Hou, T., Huang, B., Yang, L., & Li, F. (2019). Aptamer recognition-trigged label-free homogeneous electrochemical strategy for an ultrasensitive cancer-derived exosome assay. Chemical Communications, 55(91), 13705-13708.

Yin, Y., Cao, L. Y., Wu, W. Q., Li, H., Jiang, Y., & Zhang, H. F. (2010). Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells. World Journal of Gastroenterology: WJG, 16(9), 1086.

Yogosawa, S., & Yoshida, K. (2018). Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis. Cancer science, 109(11), 3376-3382.

Yu, C., Yao, Z., Jiang, Y., & Keller, E. T. (2012). Prostate cancer stem cell biology. Minerva urologica e nefrologica, 64(1), 19..

Yuan, A., Farber, E. L., Rapoport, A. L., Tejada, D., Deniskin, R., Akhmedov, N. B., & Farber, D. B. (2009). Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. PloS one, 4(3), e4722

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. Stem cell research & therapy, 10(1), 1-22.

Zare, M., Pemmada, R., Madhavan, M., Shailaja, A., Ramakrishna, S., Kandiyil, S. P., ... & Thomas, V. (2022). Encapsulation of miRNA and siRNA into Nanomaterials for Cancer Therapeutics. Pharmaceutics, 14(8), 1620.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Zhan Q, Wang C, Ngai S.(2013) Ovarian Cancer Stem Cells: A New Target for Cancer Therapy. BioMed Research International 2013;10:1155-916819.

Zhang, D., Lee, H., Wang, X., Rai, A., Groot, M., & Jin, Y. (2018). Exosome-mediated small RNA delivery: a novel therapeutic approach for inflammatory lung responses. *Molecular therapy*, *26*(9), 2119-2130.

Zhang, W., Li, C., Baguley, B. C., Zhou, F., Zhou, W., Shaw, J. P., ... & Liu, J. (2016). Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. Analytical biochemistry, 515, 47-54.

Zhao, X., Wu, D., Ma, X., Wang, J., Hou, W., & Zhang, W. (2020). Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake. Biomedicine & Pharmacotherapy, 128, 110237.

Zheng, M. et al., 2019, Harnessing Exosomes for the Development of Brain Drug Delivery Systems, Bioconjugate Chemistry, 30(4), pp. 994–1005.

Zheng, W., Cao, C., Liu, Y., Yu, Q., Zheng, C., Sun, D., ... & Liu, J. (2015). Multifunctional polyamidoamine-modified selenium nanoparticles dual-delivering siRNA and cisplatin to A549/DDP cells for reversal multidrug resistance. *Acta biomaterialia*, *11*, 368-380.

Zheng, Y., Wang, L., Yin, L., Yao, Z., Tong, R., Xue, J., & Lu, Y. (2022). Lung cancer stem cell markers as therapeutic targets: an update on signaling pathways and therapies. Frontiers in Oncology, 12.

Zhou, H. M., Zhang, J. G., Zhang, X., & Li, Q. (2021). Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: Mechanism, signaling, and prospective agents. Signal transduction and targeted therapy, 6(1), 1-17.

Zhou, N., Wang, H., Liu, H., Xue, H., Lin, F., Meng, X., ... & Qian, H. (2015). MTA1-upregulated EpCAM is associated with metastatic behaviors and poor prognosis in lung cancer. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 34(1), 1-10. https://doi: 10.1186/s13046-015-0263-1

Zhou, W., Ke, S. Q., Huang, Z., Flavahan, W., Fang, X., Paul, J., ... & Bao, S. (2015). Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. Nature cell biology, 17(2), 170-182.