

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

STAT5 İFADESİ ARTTIRILAN RENAL HÜCRELİ KARSİNOMADA
ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN YAĞ ASİT METABOLİZMASI
İLE İLİŞKİLİ HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Simay METİN

1700002574

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI

MAYIS 2024

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

STAT5 İFADESİ ARTTIRILAN RENAL HÜCRELİ KARSİNOMADA
ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN YAĞ ASİT METABOLİZMASI
İLE İLİŞKİLİ HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Simay METİN

1700002574

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI

Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Öykü GÖNÜL GEYİK

MAYIS 2024

ÖNSÖZ

Beni gönülden destekleyerek cesaretlendiren, hem eğitimimde hem de özel hayatımda yolumu aydınlatan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI'na

Çalışmalarımda tecrübelerini esirgemeyip bana zaman ayıran Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ-KILBAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN-ŞAHİN'e

Hayatım boyunca maddi-manevi desteğini esirgemeyen, benim için minnettarlığımı kelimelerle ifade edemeyeceğim büyüklükte emek gösteren, onun gibi biri olabilme hayaliyle büyüdüğüm dayım Sayın Prof. Sefa ÇELİKSAP'a

Eğitimimde desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Mustafa GÜRGÜLER ve Ayhan SEZER'e

Küçük yaşta biyolojiye merak duymamı sağlayarak tüm yoğunluklarına rağmen her sorumu cevaplayan Sayın Uzm. Dr. S. Tolga DERİCİ ve Dr. F. Yeşim DERİCİ'ye
Zor zamanlarımda yüzümü güldüren çok değerli dostlarım Melih GÖKDEMİR, Gamze Nur ÇETİN, Dilara KAZANCI, Esra EŞİYOK ve Meltem DEMİREL'e
Laboratuvar çalışmalarımı sonsuz destekleri için Mustafa ATAKAN, Ela GÜNDÜZ, Buket ÖZCAN, Kübranur BAYRAKTAROĞLU'na

Büyük fedakarlıklarla bugünlere gelmemi sağlayan, hayatım boyunca sevgisini ve desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen kıymetli annem Sena METİN'e; kültürü ve birikimiyle bana örnek olan babam Ergin METİN'e; önüme çıkan her engeli yıkabileceğim gücü bulmamı sağlayan ve asla yalnız olmadığımı hissettiren kardeşim Mehmet Sunay METİN'e; bana okuma aşkını aşılayan dedem Nihat ÇELİKSAP'a; emekleri için anneannem Gülgün ÇELİKSAP'a ve teyzem Ayşe YAPICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamı Lisansüstü Tez Projesi Bilimsel Araştırma Projesi (Proje no: BAP2304) olarak destekleyen İstanbul Kültür Üniversitesi Teknoloji Proje Destek Birimi'ne teşekkür ederim.

Çalışmamı kıymetli annem Sena METİN'e ithaf ediyorum.

Mayıs, 2024

Ayşe Simay METİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMA LİSTESİ	vi
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Böbrek	3
2.1.1. Nefron Yapısı ve İşlevi	5
2.2. Böbrek Kanseri.....	7
2.2.1. Böbrek Kanseri Alt Tipleri	9
2.2.2. Böbrek Kanserlerinde Diğer Kalıtsal Risk Faktörleri.....	29
2.2.3. Böbrek Kanserinde Güncel Tedavi Yöntemleri.....	42
2.3. Renal Hücreli Karsinomada JAK/STAT Sinyal Yolağı	46
2.3.1 JAK/STAT Sinyal Yolağı.....	46
2.3.2. STAT5 Proteini İzofomları ve Fizyolojik Rollerini	49
2.3.3. STAT5'in Çeşitli Kanserlerdeki Rolü	50
2.4. Renal Hücreli Karsinomada Yağ Asit Metabolizması.....	53
2.5. Mikro RNA	58
2.5.1. miRNA Biyogenezi.....	58
2.5.2. miR-33a	58
2.6. Otofaji.....	59
2.6.1. Makrotofaji	60

2.6.2. Mikrootofaji	62
2.6.3. Şaperon Aracılı Otofaji	63
2.7. Apoptoz.....	63
2.7.1. Ekstrinsik Yolak	64
2.7.2. İntrinsik Yolak	65
2.8. Nanoterapötiklerin Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	65
2.8.1. Nanopartiküller ve Sentez Yöntemleri	67
2.8.2. Nanopartiküllerin Hücresel Hedefleme Mekanizmaları	70
2.8.3. Nanopartikül Çeşitleri.....	76
2.8.4. Çinko Oksit Nanopartikülleri.....	97
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	105
3.1. MATERYALLER	105
3.1.1. Kullanılan Cihazların Listesi	105
3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi.....	105
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	105
3.1.4. Kullanılan Tamponların İçeriği	105
3.1.5. Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri.....	105
3.1.6. Kullanılan Antikor, miRNA ve Plazmidler	106
3.2. YÖNTEMLER.....	106
3.2.1. Hücre Kültürü	106
3.2.2. ZnO NP'nin Hücre Canlılığı, Hücre Proliferasyonu ve Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	108
3.2.3. ZnO NP'nin Hücre Ölümüne Etkisinin Belirlenmesi	111
3.2.4. ZnO NP'nin Renal Hücreli Karsinoma Hücre Hatlarında Protein Ekspresyonuna Etkisinin Belirlenmesi	111
3.2.5. ZnO NP'nin Yağ Asit Metabolizmasına Etkisinin İncelenmesi.....	115
3.2.6. ZnO NP'nin Otofajik Parametrelere Etkisinin İncelenmesi	116

3.2.7. STAT5B ve GFP-LC3 Plazmitlerinin Eldesi	117
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	117
4. SONUÇLAR	119
4.1. RCC Hücrelerinde STAT5 İfadesinin Arttırılması.....	119
4.2. ZnO NP'nin Hücre Döngüsü Regülasyonu ve Hücre Sağkalım Mekanizmaları Üzerindeki Etkisinin Anlaşılması	121
4.2.1. ZnO NP Uygulaması Hücre Canlılığını Doza Bağımlı Olarak Azaltmaktadır	121
4.2.2. ZnO NP Uygulaması Hücre Proliferasyonunu Zamana Bağlı Olarak Azaltmaktadır.....	124
4.2.2. RCC Hücrelerinde ZnO NP uygulaması sonrası Hücre Döngüsü G2/M Fazında tutulu kalmıştır	131
4.2.4. ZnO NP Uygulaması Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP) Kaybına Neden Olmuştur.....	136
4.3. ZnO NP'nin Yağ Asidi Metabolizmasının Üzerindeki Etkisinin Anlaşılması	141
4.3.1. STAT5 İfadesinin Artışı ve ZnO NP Uygulaması RCC Hücrelerinde Lipit Birikimini Modüle Etmiştir.	141
4.3.2. RCC Hücrelerinde miR-33a'nın Hücre İçi Ekspresyon Seviyelerinin Tespiti	143
4.3.3. ZnO NP, Yağ Asidi Sentaz Metabolizmasının Düzenlenmesi Üzerinde Çeşitli Etkilere Neden Olmuştur.....	144
4.4. ZnO NP Uygulaması RCC Hücrelerinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşumunu İndüklemiştir	149
4.5. ZnO NP Uygulamasının RCC Hücrelerine Apoptotik Etkisinin Araştırılması	152
4.5.1. Annexin V/PI Boyama ile Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi ...	152
4.5.2. ZnO NP Uygulamasının Apoptotik Protein İfadelerine Etkisi	155
4.4. ZnO NP'nin RCC Hücrelerinde Otofajik Parametrelere Etkisi	157

4.4.1. ZnO NP Uygulaması RCC Hücrelerinde Asidik Vakuollerin Artışına Neden Olmaktadır.....	157
4.4.2. ZnO NP Uygulamasının RCC Hücrelerinde Otofaji Proteinlerine Etkisi	162
4.4.3. ZnO NP Uygulaması RCC Hücrelerinde LC3 A/B İfadesinde Artışa Neden Olmuştur	164
5. TARTIŞMA	171
6. KAYNAKÇA	192
7. EKLER.....	216
7.1. EK A: Cihaz Listesi	216
7.2. EK B: Hücre Kültürü Donanım Listesi.....	218
7.3. EK C: Kimyasal Listesi Tablo.....	219
7.4. EK D: Kullanılan Tamponların İçeriği	222

KISALTMA LİSTESİ

BHD : *Birt-Hogg-Dubé*

BMI : Vücut kitle indeksi

ccRCC : Berrak hücreli renal hücreli karsinoma

cDNA: Komplementer DNA

cdRCC : Toplama kanalı karsinomu

CMA : Şaperon aracılı otofaji

CNT: Karbon nanotüpler

DAPI : 4',6-diamidino-2-fenilindol

DiOC₆ : 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide

DNA : Deoksiribonükleik asit

DOX : Doksorubisin

EGFR: Epitelyal büyüme reseptörü

EMA : Epitelyal membran antijeni

EMT : Epitelyal mezenkimal geçiş

EPR : Geçirgenlik ve tutma etkisi

ER : Endoplazmik retikulum

EV: Ekstrasellüler vesikül

FBS: Fetal sığır serumu

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FR: Folat reseptörü

HDL : Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HIF α : Hipoksiyle indüklenebilir faktör alfa

IFN : İnterferon

IL : İnterlökin

JAK : Janus kinaz

LDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein

mAb : Monoklonal antikor

miRNA : Mikro RNA

MNP: Metalik nanopartiküller

mRNA : Mesajcıl RNA

MSN: Mezoporöz silika nanoparçacıkları

NGS : Yeni nesil sekanslama
NP : Nanopartikül
PAMAM : Poliamidoamin
PDGF: Platelet türevli büyüme faktörü
PEG : Polietilen glikol
PI: Propidium iyodür
PLL : Poli(L-lisin)
PPI : Poli(propilenimin)
pRCC : Papiller hücreli renal hücreli karsinoma
PTX: Paklitaksel
RCC : Renal hücreli karsinoma
RES : Retikuloendotelyal sistem
RMC: Renal medüller karsinom
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Reaktif oksijen türleri
SLN: Solid lipid nanopartiküller
STAT5: Transkripsiyon sinyal dönüştürücü ve aktivatörü 5
TCE: Trikloretilen
TGF: Tümör büyüme faktörü
TNF: Tümör nekroz faktörü
VEGF: Vasküler endotelyal faktör
VHL: *von Hippel-Lindau*
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
ZnO NP: Çinko oksit nanopartikülleri

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
L	: Litre
ml	: Mililitre
g	: Gram
mg	: Miligram
μ	: Mikro
μl	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
%	: Yüzde
mm	: Milimetre
V	: Volt
A	: Amper
nM	: Manomolar
μM	: Mikromolar
kDa	: Kilodalton

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. İnsan böbreğinin yapısı (Dikey kesit) (Tanner, 2009).	4
Şekil 2. 2. Nefronun yapısı (A), Glomerulus ve Bowman kapsülü ilişkisi (B) (Rashid ve Schwartz, 2012).	6
Şekil 2. 3. RCC'nin evreleri (Hsieh vd., 2017).	8
Şekil 2. 4. Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinoma.	12
Şekil 2. 5. Normal oksijen seviyelerinde ve hipoksik koşullarda VHL proteininin hücredeki işlevi (Clark, 2009).	16
Şekil 2. 6. Papiller renal hücreli karsinoma	18
Şekil 2. 7. Kromofob RCC.	20
Şekil 2. 8. Onkositoma.	23
Şekil 2. 9. Toplama kanalı karsinomu.	25
Şekil 2. 10. RCC'den sorumlu moleküler yollar ve tedavi olanakları	44
Şekil 2. 11. JAK/STAT sinyal yolağının aktivasyonu.	48
Şekil 2. 12. (A) Kromozom 17'de STAT5'in lokalizasyonu ve STAT5 izoformlarının yapısı	49
Şekil 2. 13. Hücrede STAT5 mutasyonu ya da STAT5 ekspresyonunda artış mekanizması.	52
Şekil 2. 14. STAT5'in hücre ölüm yollarıyla ilişkisi.	53
Şekil 2. 15. Renal proksimal tübül hücrelerinde obeziteye bağlı lipid metabolizmasındaki bozukluklarının ccRCC'ye katkıda bulunabileceği potansiyel mekanizmalar.	56
Şekil 2. 16. Memelilerde görülen otofaji tipleri.	60
Şekil 2. 17. Makrotofajinin morfolojisi.	62
Şekil 2. 18. Apoptoz yolları.	64
Şekil 2. 19. Nanomateryallerin sınıflandırılması	69
Şekil 2. 20. NP'lerin sentez yöntemleri	69
Şekil 2. 21. Nanopartiküller ile kanser hücrelerinin pasif olarak hedeflenmesi	72
Şekil 2. 22. Nanopartiküller ile kanser hücrelerinin aktif olarak hedeflenmesi.	74
Şekil 2. 23. (A) Nanosfer ve nanokapsül polimerik NP'lerinin yapıları ve kanser tedavisinde kullanılan biyolojik olarak parçalanabilen doğal ve sentetik polimerler	79
Şekil 2. 24. Dendrimer yapısı.	82

Şekil 2. 25. Lipozomal ilaç taşıma sistemi.....	87
Şekil 2. 26. Karbon nanopartikül tipleri.....	90
Şekil 2. 27. Kanser tanı ve tedavisinde kullanılan manyetik nanopartiküllerin çok fonksiyonlu özellikleri	94
Şekil 2. 28. Metalik nanopartikül tipleri ve uygulamaları.	95
Şekil 2. 29. ZnO NP etki mekanizmaları.	99
Şekil 2. 30. ZnO NP'nin sitotoksisite mekanizması.	100
Şekil 4. 1. Farklı kitlerle izole edilmiş STAT5B plazmitlerinin %1 agaroz jeldeki görüntüleri.	119
Şekil 4. 2. RCC ve HEK-293 hücre hatlarında transfeksiyon sonrası STAT5 ekspresyonlarının gösterilmesi.....	120
Şekil 4. 3. STAT5 ekspresyonları arttırılan RCC hücrelerinde morfolojik değişimlerin ışık mikroskopuyla gösterilmesi.	121
Şekil 4. 4. Normal ve STAT5+ RCC hücrelerinde ZnO NP uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkisi.	123
Şekil 4. 5. ZnO NP uygulamalarının A-498 ve STAT5+ A-498 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi.	125
Şekil 4. 6. ZnO NP'nin A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde hücre morfolojisine zamana bağlı olarak etkisi.....	126
Şekil 4. 7. ZnO NP uygulamalarının Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi..	127
Şekil 4. 8. ZnO NP'nin Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde hücre morfolojisine zamana bağlı olarak etkisi.....	128
Şekil 4. 9. ZnO NP uygulamalarının HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi.....	129
Şekil 4. 10. ZnO NP'nin HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde hücre morfolojisine zamana bağlı olarak etkisi.	130
Şekil 4. 11. A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre döngüsü faz dağılımı üzerine etkisinin analizi.....	131
Şekil 4. 12. Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre döngüsü faz dağılımı üzerine etkisinin analizi.....	132
Şekil 4. 13. HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre döngüsü faz dağılımı üzerine etkisinin analizi.	133

Şekil 4. 14. ZnO NP uygulamasının normal ve STAT5+ RCC ve HEK-293 hücrelerinde koloni oluşturma kabiliyeti üzerine etkisinin analizi.	135
Şekil 4. 15. A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisi.	137
Şekil 4. 16. Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisi.	138
Şekil 4. 17. HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisi.	140
Şekil 4. 18. A-498 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin nötral lipid tanecikleri birikimi üzerine etkisi.....	141
Şekil 4. 19. Caki-1 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin nötral lipid tanecikleri birikimi üzerine etkisi.....	142
Şekil 4. 20. HEK-293 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin nötral lipid tanecikleri birikimi üzerine etkisi.....	143
Şekil 4. 21. ZnO NP'nin yağ asit sentezi ile ilgili enzimlerin ekspresyonlarına etkisi	146
Şekil 4. 22. ZnO NP'nin yağ asit sentezi ile ilgili enzimlerin ekspresyonlarına etkisi.	147
Şekil 4. 23. ZnO NP'nin yağ asit sentezi ile ilgili enzimlerin ekspresyonlarına etkisi	149
Şekil 4. 24. ZnO NP uygulamasının miR-33a ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi.	144
Şekil 4. 25. A-498 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin ROS üretimi üzerine etkisi.	150
Şekil 4. 26. Caki-1 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin ROS üretimi üzerine etkisi.	151
Şekil 4. 27. HEK-293 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin ROS üretimi üzerine etkisi.....	152
Şekil 4. 28. A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisinin analizi.	153
Şekil 4. 29. Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisinin analizi.	154

Şekil 4. 30. HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisinin analizi..	155
Şekil 4. 31. ZnO NP'nin apoptotik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi.	156
Şekil 4. 32. ZnO NP'nin apoptotik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi	156
Şekil 4. 33. ZnO NP'nin apoptotik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi	157
Şekil 4. 34. ZnO NP'nin (A) A-498 ve (B) STAT5+ A-498 hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi.	158
Şekil 4. 35. ZnO NP'nin Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi.	160
Şekil 4. 36. ZnO NP'nin HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi.	161
Şekil 4. 37. ZnO NP'nin otofajik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi.	162
Şekil 4. 38. ZnO NP'nin otofajik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi.	163
Şekil 4. 39. ZnO NP'nin otofajik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi.	164
Şekil 4. 40. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine etkisi.	165
Şekil 4. 41. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine etkisinin akış sitometrisi analiziyle gösterilmesi.	166
Şekil 4. 42. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine etkisi.	167
Şekil 4. 43. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerine etkisinin akış sitometrisi analiziyle gösterilmesi.	168
Şekil 4. 44. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerine etkisi.	169
Şekil 4. 45. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerine etkisinin akış sitometrisi analiziyle gösterilmesi...	170

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. RCC alt tiplerine ait temel özellikler (Shuch vd., 2014).	10
Tablo 2. 2. RCC’de metilasyon ile epigenetik modifikasyona uğradığı bilinen genlerin listesi (Shenoy vd., 2015).....	40
Tablo 2. 3. Onaylanmış ajanların bazı yan etkileri yaşam kalitesine etkisi (Hsieh vd., 2017).	46
Tablo 2. 4. STAT5’in çeşitli kanserlerdeki onkogen ya da tümör baskılayıcı rolü (Halim vd., 2020).....	51
Tablo 2. 5. RCC’de lipid metabolizmasında görevli proteinlerin ekspresyon profillerindeki değişiklikler (Temiz, 2024).....	57
Tablo 2. 6. FDA tarafından kullanımları onaylanmış bazı nanoterapötikler (Gavas vd., 2021; Wiesmann vd., 2020).	67
Tablo 2. 7. Ekstrasellüler vesiküllerin kanser tedavisinde kullanımı (Cheng vd., 2021).	86
Tablo 2. 8. ZnO NP’nin mitokondriyal yollara etkisi (Patron-Romero vd., 2022).	101
Tablo 2. 9. Çeşitli ZnO NP formülasyonlarının hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerindeki rolü (Anjum vd., 2021 ve ATCC).....	103
Tablo 3. 1. Kullanılan RCC ve HEK-293 hücre hatlarına ilişkin karakteristik özellikler (ATCC, CLS).	105
Tablo 3. 2. Çalışmaya Yönelik Oluşturulan Deney Grubu	111
Tablo 7. 1 Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar	216
Tablo 7. 2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi.....	218
Tablo 7. 3.1. Kullanılan Kimyasalların Listesi	219

ÖZET

Böbrek kanserinin en yaygın ve ölümcül tipi olan renal hücreli karsinoma (RCC) sıklıkla metastatik durumda tespit edilmekte ve mevcut terapötiklere karşı direnç geliştirerek sağkalım oranını azaltmaktadır. Bir transkripsiyon faktörü olan STAT5 ifadelerindeki artışın farklı kanser dokularında apoptozun inhibisyonuna neden olduğu, proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu arttırarak hücre sağkalımıyla birlikte tümör büyümesini teşvik ettiği ve kanser hücrelerinde ilaç direnci gelişimini indüklediği bilinmektedir. Çeşitli sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla kanser hücrelerinin günümüzde kullanılan geleneksel tedavilere karşı direnç geliştirmesi nanopartiküller gibi yeni nesil tedavi yöntemlerinin araştırılmasını gerektirmektedir. Bununla birlikte günümüzde nanopartikül araştırmaları sıklıkla kanser hücrelerine seçici toksisite gösterecek ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine odaklanmıştır. İlaç taşıyıcı sistemlerde avantajlı yapısı sebebiyle yer alan, metal oksit nanopartiküller arasında en düşük sitotoksositeye sahip ve günümüzde kozmetik sektöründe de sıklıkla kullanılan biyouyumluluğu yüksek, anti-enflamatuar, antimikrobiyal, anti-karsinojen, yara iyileşmesi gibi çoklu düzenleyici fonksiyonlar sergileyebilen çinko oksit nanopartikülleri (ZnO NP) kanser tedavisinde umut vadetmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, aktivasyonu kanser hücrelerinde sağkalımı teşvik eden STAT5'in ifadesi RCC hücre hatlarında arttırılarak (STAT5+) daha agresif karakterdeki stabil hücre hatları oluşturulmuş ve çeşitli kanser tiplerinde anti-kanser etki gösteren ZnO NP'nin RCC hücrelerine etkisi hücre canlılığı, proliferasyonu ve koloni oluşturma potansiyelleri açısından incelenmiştir. STAT5 ifadesindeki artış RCC hücrelerinde ZnO NP'ye karşı direnç geliştirilmesine neden olmuştur. Çeşitli sinyal yollarının aktivasyonlarının yanı sıra, RCC gelişiminin sebepleri incelendiğinde birincil faktör obeziteye bağlı olarak yağ asit metabolizmasının disregülasyonudur. Bu nedenle tez çalışmasında STAT5 ifadesindeki artışın ve ZnO NP'nin RCC hücrelerine etkisi yağ asit metabolizması aracılı olarak incelenmiştir. Ayrıca normal ve STAT5+ RCC hücrelerinde ZnO NP uygulamalarıyla birlikte, yağ asit metabolizmasının önemli bir regülatörü olan miR-33a'nın etkileri analiz edilmiştir. ZnO NP ve miR-33a uygulamaları RCC hücrelerinde değişken etkiler yaratırken STAT5 ifadesindeki artış yağ asit metabolizmasıyla ilişkili proteinlerin ifadelerini ve hücre içi nötral lipid damlacıkları birikimini teşvik etmiştir. RCC hücrelerinde ROS'un artmasını

indükleyerek seçici sitotoksosite nedeniyle ZnO NP'nin özellikle otofaji aracılı olmak üzere hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. ZnO NP'nin kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyebileceğini ve ölümünü indükleyebileceği gösteren sonuçlar, ZnO NP nin umut verici bir antikanser ajanı olacağını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Renal hücreli karsinoma, STAT5, çinko oksit nanopartikülleri, yağ asit metabolizması, miR-33a*



ABSTRACT

Renal cell carcinoma (RCC), the most common and deadly type of kidney cancer, is often diagnosed in a metastatic state and reduces the survival rate by developing resistance to existing therapeutics. It is known that an increase in the expression of STAT5, a transcription factor, causes the inhibition of apoptosis in different cancer tissues, promotes tumor growth along with cell survival by increasing proliferation, migration and invasion, and induces the development of drug resistance in cancer cells. The fact that cancer cells develop resistance to conventional treatments used today through the activation of various signaling pathways requires the investigation of new generation treatment methods such as nanoparticles. However, today nanoparticle research is often focused on the development of drug carrier systems that will exhibit selective toxicity to cancer cells. Zinc oxide nanoparticles, which are used in drug carrier systems due to their advantageous structure, have the lowest cytotoxicity among metal oxide nanoparticles and are frequently used in the cosmetics industry today. Zinc oxide nanoparticles, which show the highest biocompatibility among metal oxide nanoparticles and can exhibit multiple regulatory functions such as anti-inflammatory, antimicrobial, anti-carcinogenic and wound healing, are promising in cancer treatment. Therefore, in this thesis study, the expression of STAT5, whose activation promotes survival in cancer cells, was increased in RCC cell lines, creating stable cell lines with a more aggressive character (STAT5+), and the effect of ZnO NP, which has an anti-cancer effect on various types of cancer, on RCC cells was studied in terms of cell viability, proliferation and colony-forming potentials. An increase in STAT5 expression has led to the development of resistance to ZnO NP in RCC cells. In addition to activations of various signaling pathways, the primary factor when examining the causes of RCC development is dysregulation of fatty acid metabolism due to obesity. Therefore, the effect of an increase in STAT5 expression and ZnO NP on RCC cells was studied in the thesis study through fatty acid metabolism. In addition, the effects of miR-33a, an important regulator of fatty acid metabolism, along with the application of ZnO NP in normal and STAT5+ RCC cells, were analyzed. Applications of ZnO NP and miR-33a produced variable effects in RCC cells, while an increase in STAT5 expression promoted the expression of proteins associated with fatty acid metabolism and intracellular accumulation of neutral lipid

droplets. It has been shown that ZnO NP causes cell death, especially autophagy-mediated, due to selective cytotoxicity by inducing increased ROS in RCC cells. The results showing that ZnO nanoparticles can selectively target cancer cells and induce their death suggest that ZnO NP will be a promising anticancer agent.

Keywords: *Renal cell carcinoma, STAT5, zinc oxide nanoparticles, fatty acid metabolism, miR-33a*



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Renal hücreli karsinoma (RCC) dünya genelinde kanser türleri arasında 15. sırada yer almaktadır. Prostat ve mesane tümörlerinden sonra en sık görülen ürolojik kanser tipi olan RCC'nin en sık görülen alt tipi berrak hücreli RCC'dir (ccRCC). Diğer alt tipleri ile kıyaslandığında ccRCC, en düşük sağkalıma ve en yüksek insidansa sahiptir. Sıklıkla metastatik durumda teşhis edilen ccRCC mevcut terapötiklere karşı direnç geliştirerek sağkalım oranını azaltmaktadır.

Obezite RCC'nin en önemli risk faktörüdür. Yağ dokusunun artışıyla karakterize olan obezite, sağlıklı hücrelere göre lipid metabolizmasındaki değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. Yağ asit metabolizması regülasyonundaki değişiklikler, sentezlenen fosfolipitlerin yeni hücre zarları oluşturmasıyla tümör gelişiminin artmasına ve pro-onkogenik sinyallerle tümör mikroçevresi oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bu nedenle yağ asidi metabolizması yollarındaki değişiklikler RCC'nin gelişiminde önemli bir role sahiptir. Ayrıca lipid metabolizmasının önemli regülatörlerinden olan mikro RNA'lar ilerleyen çalışmalarla birlikte kanser tanı ve tedavisinde önem kazanmıştır. Lipid metabolizmasının önemli bir regülatörü olarak görev alan miR-33a'nın kolesterol homeostazının korunmasını sağladığı ve ek olarak yağ asidi metabolizmasıyla birlikte insülin sinyalinin de bir düzenleyicisi olduğunu gösterilmiştir.

Tümörigenez için gerekli bir eleman olan ve transkripsiyon faktörü olarak davranan büyüme faktörleri ile aktive edilen sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 5 (STAT5) ekspresyonundaki artışın hücre ölüm yollarının inhibisyonuna neden olduğu, hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu artırarak tümör büyümesini teşvik ettiği belirlenmiştir. Kötü prognoz ile ilişkilendirilen STAT5'in çeşitli kanser tiplerinde yüksek oranda ifade edilmesi hücrelere daha agresif bir karakter kazandırmaktadır.

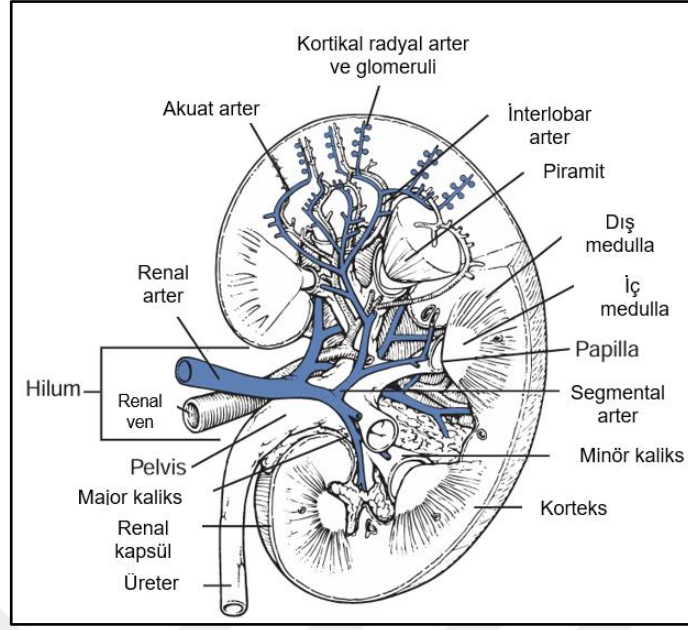
Agresif RCC, geleneksel terapilere karşı hızlı şekilde çoklu direnç geliştirdiğinden ve bu şekilde birçok tedavi yönteminin olanaksız kalmasına neden olduğundan kanser tedavisinde bir devrim niteliği taşıyan nanopartiküller tedavide umut vadetmektedir. Yüksek biyouyumluluklarıyla birlikte anti kanser ve antienflamatuar etkiler gösteren çinko oksit nanopartikülleri (ZnO NP) en umut vadecici metal oksit nanopartiküller olarak kabul edilmektedir.

Mevcut veriler RCC alt tiplerinde yağ asidi metabolizması yollarında farklılıklar olabileceğini gösterdiğinden bu tez çalışmasında primer A-498 ve metastatik Caki-1 RCC hücre hatları ve HEK-293 insan embriyonik böbrek hücre hattı kullanılmıştır. Her hücre hattında STAT5 ifadesi en az iki kat arttırılarak hücreler daha agresif hale getirilmiştir ve böylece *in vivo* ortamın mimik edilmesi amaçlanmıştır. Normal ve STAT5 ifadesi arttırılan hücre hatlarına hücre canlılığını, proliferasyonunu ve koloni oluşum potansiyellerini baskılayan ZnO NP uygulanmıştır. STAT5 modülasyonu ve ZnO NP uygulamalarıyla yağ asit metabolizması arasındaki ilişkinin miR-33a aracılı olarak incelenmesinin yanı sıra bu uygulamaların yağ asit metabolizması aracılı otofaji ve apoptoz hücre ölüm yollarını nasıl etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek

Böbrekler, hücre dışı sıvının bileşimini ve hacmini düzenlemede baskın rol oynayan organlardır. Sağlıklı bir yetişkin insanda bir çift şeklinde bulunan vücut ağırlığının %0,5'ini oluşturan böbreklerin her biri yaklaşık 10-180 g ağırlığında olup kabaca yumruk büyüklüğündedir. Yeni doğan bir bebekte böbrekler yaklaşık 4-5 cm boyutlarında olup ergenlik döneminde yaklaşık 12 cm'e ulaşır. Yetişkinliğe ulaşıldığında böbreklerde büyüme yılda 2-3 mm olacak kadar yavaşlamaktadır. Böbrekler, karın retroperitoneal bölgesinde T12'den L3 vertebral seviyesine kadar bulunmaktadır ve karaciğerin konumu nedeniyle sağ böbrek soldan biraz daha kaudaldır (Tanner, 2009; Balzer vd., 2022; Rashid ve Schwartz, 2012). Ayrıca sol böbrek sağ böbrekten biraz daha büyüktür (Sağ böbrek boyu $ort \pm std.sapma$ 10.40 ± 0.90 ; sol böbrek boyu 10.50 ± 0.90) (Maurya vd., 2018; Rashid ve Schwartz, 2012). Böbrekten dikey bir kesit alınırsa dışta korteks ve içte medulla denilen iki farklı kısım göze çarpar (Şekil 2.1). Tipik olarak kırmızımsı kahverengi renge sahip olan korteks yapısı granüllü bir görünüme sahiptir. Daha sonra bahsedilecek olan nefronun yapısında yer alan glomerüller, tübüller ve kortikal toplama alanları korteks bölgesinde lokalize olmaktadır. Korteks ile karşılaştırıldığında medulla bölgesi daha açık renklidir ve Henle kulbu, medullar toplama kanallarını ve medulla kan damarlarını içerir. Medulladaki bu yapılar paralel şekilde düzenlendiğinden doku çıplak gözle bakıldığında çizgili bir yapıda gözükmektedir. Korteks ve medulla arasında anatomik farklılıkların yanı sıra su homeostazının sağlanması için sodyum ve üre konsantrasyonlarında da büyük farklılıklar görülmektedir ayrıca bazal koşullar altında bile medullar bölge hipoksiktir. Bununla birlikte medulla, kortekse yakın dış medulla ve kortekse uzak iç medulla olarak ikiye ayrılmaktadır (Tanner, 2009; Rashid ve Schwartz, 2012; Balzer vd., 2022).



Şekil 2. 1. İnsan böbreğinin yapısı (Dikey kesit) (Tanner, 2009).

İnsan böbreği anatomik olarak 8 ila 10 lob halinde düzenlenmiştir. Her bir lob medullar doku ile birlikte doku kenarlarını örten kortikal alandan oluşmaktadır. Medullar alanların uç kısımlarında renal papilla denilen piramitsi yapılar oluşur ve her papilla idrarı küçük kaliks (*calyx*) alanlarına boşaltır. Küçük kaliks (*minor calyx*) alanları birleşerek daha büyük kaliks (*major calyx*) yapılarının oluşmasını sağlar. İdrar, bu alanlardan geçerek renal pelvis alanına geçer. Daha sonra peristaltik hareketler yardımıyla üreterlere ve mesaneye geçen idrar mesane boşalınca kadar itilir. Bununla birlikte her böbrekte üreterin, kan damarlarının, sinirlerin ve lenfatik damarların böbreğe girdiği veya böbrekten çıktığı *hilum* adı verilen bölgeler bulunmaktadır (Maurya vd., 2018; Tanner, 2009).

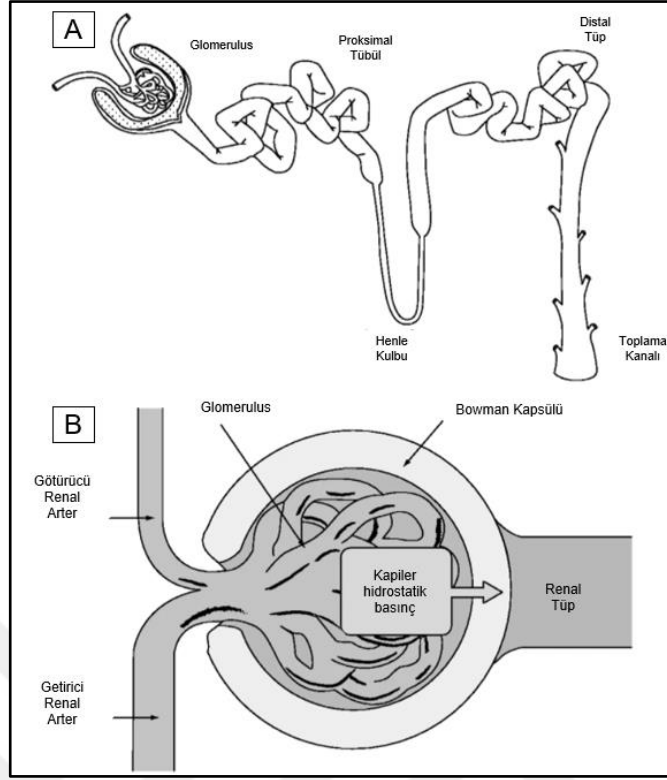
Böbreklerin temel işlevi idrar ile uygun miktarda birçok maddeyi dışarı atarak stabil bir iç ortamın korunmasını sağlamaktır. Dengeli bir ortamın sağlanabilmesi için idrar vasıtası ile dışarı atılan ürünler çeşitli yabancı ve toksik maddeler olabileceği gibi besin içerikleri ve çeşitli metabolik faaliyetlerin ürünleri de olabilir. Homeostazisin korunmasının dışında böbrekler aşağıda maddeler halinde sunulan işlevleri de yerine getirmektedir:

1. Böbrekler ozmotik olarak seyreltik veya konsantre idrarı dışarı atarak vücut sıvılarının ozmotik basıncını düzenlemektedirler.
2. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , bikarbonat (HCO_3^-), fosfat ve sülfat dahil olmak üzere kan plazmasındaki çok sayıda iyon konsantrasyonlarını düzenlemektedirler.

3. Asit-baz dengesinin sağlanması için H^+ ve HCO_3^- salgılarını düzenlerler.
4. Na^+ ve su atılımını kontrol ederek ekstremler sıvının hacmini düzenlerler.
5. Na^+ atılımını ayarlayarak ve kan basıncını etkileyebilecek çeşitli maddeler (örneğin renin) üreterek arteriyel kan basıncını düzenlemeye yardımcı olurlar.
6. Üre (insanlarda protein metabolizmasının ana azot içeren son ürünü), ürik asit (pürin metabolizmasının bir son ürünü) ve kreatinin (kas metabolizmasının bir son ürünü) dahil olmak üzere metabolizmanın atık ürünlerini ortadan kaldırır.
7. Birçok ilacı (örneğin penisilin) ve yabancı veya toksik bileşikleri uzaklaştırır.
8. Eritropoietin ve 1,25-dihidroksivitamin D3 dahil olmak üzere belirli hormonların ana üretim bölgeleri olarak işlev görürler.
9. İnsülin, glukagon ve paratiroid hormonu dahil olmak üzere çeşitli polipeptid hormonlarının bozunumunu sağlarlar.
10. Asit-baz dengesinde rol oynayan amonyağın sentezini sağlarlar.
11. Araşidonik asit türevleri (prostaglandinler, tromboksan A2) ve kallikrein (kininlerin üretilmesiyle sonuçlanan proteolitik bir enzim) dahil olmak üzere böbrek kan akışını ve Na^+ atılımını etkileyen maddeleri sentezlerler (Tanner, 2009).

2.1.1. Nefron Yapısı ve İşlevi

Glomerulus ve tübül yapılarından oluşan, böbreklerin fonksiyonel birimi nefron olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.2-A).



Şekil 2. 2. Nefronun yapısı (A), Glomerulus ve Bowman kapsülü ilişkisi (B) (Rashid ve Schwartz, 2012).

Kılcal damarlardan oluşan glomerulus bir filtre görevi görmekle birlikte bu kılcal damarlara bir yatak oluşturan *Bowman* kapsülü ile çevrelenmiştir. *Afferent arterior* olarak adlandırılan getirici atar damar ile gelen kan, *Bowman* kapsülü ile çevrelenmiş glomerulus kılcal kan damarı yumağına doğru akmaktadır. *Bowman* kapsülü büyük ve negatif yüklü moleküllerin kaybını önlemek amacıyla hem boyut hem de yük korunumu için bir bariyer görevi görerek kılcal damar yumağında ultra filtrasyon sağlamaktadır (Şekil 2.2-B). Glomerulus kılcal damar yumağındaki kan *efferent arteriol* (götürücü atar damar) ile sistemik dolaşıma geri dönmektedir. Nefronda bulunan tübül kısmı ise proksimal tübül, Henle kulbu, distal tübül ve toplama kanalı olarak sınıflandırılmaktadır. *Bowman* kapsülünden geçen ultrafiltrat, tübüllerde idrar üretmek üzere düzenlenmiş bir işlemle modifiye edilmektedir.

Ultrafiltrat tübülün her bölümünde çeşitli proseslere tabi tutularak değiştirilmektedir. Tübül olarak adlandırılan her segmentin kendine özgü bir özelliği bulunmaktadır. Böylece ultrafiltrat modifiye edilerek idrara dönüştürülür. Başlangıçta osmolalite ve elektrolit içeriği açısından plazmaya benzeyen ultrafiltrat, tübül içine geçtiğinde çeşitli maddeler yeniden emilir ve bu aşama yeniden emilim olarak adlandırılır. Bir maddenin

yeniden emilebilmesi için ya tübülü kaplayan hücrelerden geçmesi ya da hücreler arasından geçmesi gerekmektedir. Daha sonra salgı aşaması ile ultrafiltrata çeşitli maddeler eklenir. Boşaltım olarak adlandırılan aşamada ise, oluşan idrarın uzaklaştırılarak su ve çözünenlerin vücuttan atılması sağlanır.

Proksimal tübül, filtrelenmiş bikarbonat, protein, glikoz ve elektrolitlerin çoğuna ek olarak filtrelenmiş sodyum ve suyun büyük kısmının yeniden emilmesinden sorumludur. Nefronun bir sonraki bölümündeki Henle kulbunda, sodyum klorür fazla suda yeniden emilmektedir. Böylece hipotonik bir idrar oluşumu sağlanmaktadır. Distal tübül, paratiroid hormonu ve kalsiyum atılımının önemli bir bölgesidir. Toplayıcı tübül (*collecting duct*) ise, vazopressin (ADH) aracılı olarak suyun geri emilimi sağlamanın yanı sıra aldosteron aracılı proton, potasyum ve sodyum geri emilimini de sağlayarak idrardaki son ayarlamalardan sorumlu olan bölgedir (Tanner, 2009; Rashid ve Schwartz, 2012).

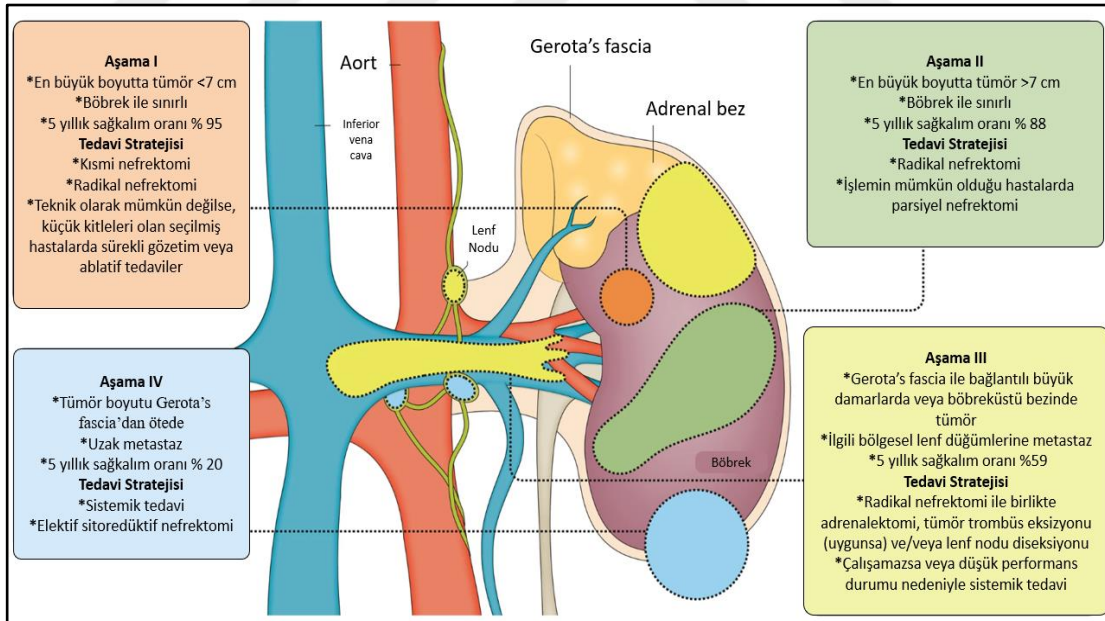
2.2. Böbrek Kanseri

Dünya çapında tüm kanser tipleri arasında böbrek kanseri ya da renal hücreli karsinoma (RCC) kanser teşhisi ve kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. RCC'nin gelişmiş ülkelerde insidansı daha yüksek olup yılda yaklaşık 295.000 yeni RCC vakası teşhis edilmekte ve 134.000 ölüm kaydedilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 63.000 yeni vaka ve 14.000 ölüme neden olan RCC; Avrupa ülkelerinde yıllık 84.000 yeni vaka ve 35.000 ölümden sorumludur. Erkeklerde görülme oranı kadınlara oranla daha yüksektir (yeni teşhislerde 2:1 oranda). Ayrıca RCC'li hastaların ortalama yaşı 64'tür. RCC daha genç hastalarda (≤ 46 yaş) teşhis edildiğinde hastalığın sıklıkla kalıtsal bir nedenden kaynaklandığı tespit edilmiştir. 2003-2007 yılları arasında dünya çapında gerçekleştirilen araştırmalar en yüksek yeni vaka oranının Çek Cumhuriyeti'nde bulunduğunu göstermiştir. RCC'nin görülme sıklığı Baltık ve Doğu Avrupa ülkelerinde çok yüksektir ve insidans oranları her geçen gün artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ölüm oranları ise çoğu popülasyonda sabit kalmış ya da azalmıştır. Bunun nedeni gelişmiş ülkelerde tıp alanındaki güncel gelişmeler sonucu abdominal görüntüleme sistemlerinin kullanılmasının artması ve küçük böbrek kitlelerinin (≤ 4 cm) metastaz aşamasına geçmeden erken evrelerde tesadüfi olarak tespit edilmesidir. RCC'nin tespiti sıklıkla uzak metastaz aşamasında gerçekleşmektedir çünkü tümör

nispeten büyüyene kadar genel semptomlar (ağrı, hematüri vb.) kendini göstermemektedir (Wilson ve Cho, 2016; Hsieh vd., 2017).

Sıklıkla hastalar lateral abdomen bölgesinde ağrı, hematüri ve karın kitlesi ile bir hekime başvurmakta ve görüntüleme yöntemleri ile (ultrasonografi ve abdominal BT) tanı koyulmaktadır. Ancak RCC alt tiplerine göre radyografik görünümüler birbirinden farklılık gösterebilmektedir. Radyolojik tekniklerin yanı sıra paraneoplastik sendromlar olarak adlandırılan, tümör hücreleri tarafından salgılanan hormonların veya sitokinlerin neden olduğu semptomlar veya tümöre karşı bir bağışıklık tepkisinin oluşması da RCC tanısı konmasında etkindir. Paraneoplastik sendromlar hiperkalsemi, ateş ve eritrositoz ile tespit edilmektedir.

RCC’de evrelendirme tümörün boyutu, böbrek dışındaki invazyon derecesi, lenf nodlarına tutulumu ve uzak organlara metastaz yapıp yapmamasına göre görüntüleme yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 3). Bununla birlikte hemoglobin seviyeleri, lökosit ve trombosit sayıları, serumdaki kalsiyum ve laktat dehidrojenaz seviyelerini içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan daha ileri laboratuvar testleri de incelenmektedir (Hsieh vd., 2017).



Şekil 2. 3. RCC'nin evreleri (Hsieh vd., 2017).

Dünya çapında prostat ve mesane tümörlerinden sonra en sık görülen 3. kanser tipi olan RCC, renal tübüler epitel hücrelerinden köken alan heterojen bir kanser grubunu kapsamaktadır (Gürsoy vd., 2020). Bu nedenle 1900'lerin sonlarından itibaren böbrek tümörleri üzerinde gerçekleştirilen araştırmalarla birlikte günümüzde RCC'den

sorumlu genlerin ve sinyal yollarının analizi sonucu hastalığın histopatolojik ve moleküler karakterizasyonundaki kilit gelişmeler RCC'nin sınıflandırmasında ve buna bağlı olarak tedavi planlamalarında büyük revizyonlara yol açmıştır (Shuch vd., 2014; Wilson ve Cho, 2016).

2.2.1. Böbrek Kanseri Alt Tipleri

RCC'nin alt tiplerinden her biri farklı histolojik özelliklere, ayırt edici genetik ve moleküler değişikliklere, farklı klinik seyirlere ve farklı tedavi yanıtlarına sahiptir. RCC'nin sınıflandırılması ve karakterizasyonu açısından gelişmelerin çoğu son 40 yıl içerisinde gerçekleşmiştir (Hsieh vd., 2017). RCC sıklıkla böbreğin en küçük çalışma birimi olan nefronlardan kaynaklanıyor gibi görünse de her alt tipin nefronun farklı bir bölgesinden köken alarak ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte birçok RCC tipinde sitogenetik değişikliklerle birlikte somatik mutasyonlar da mevcuttur (Tablo 2.1). Bu nedenle sıklıkla her RCC alt tipinin tedaviye verdiği yanıt birbirinden farklılık göstermektedir (Shuch vd., 2014). RCC tipleri köken aldıkları nefron bölgesi, gösterdikleri hücresel ve patolojik özellikler ve genetik bozukluklar dışında insidansları açısından da birbirinden ayrılmaktadır. RCC'nin en sık görülen tipleri arasında berrak hücreli renal hücreli karsinoma (ccRCC) yaklaşık olarak %85 insidansa sahipken, papiller RCC (pRCC) %15, onkositoma ve kromofob RCC %5 insidans oranına sahiptir. Birbirlerinden histolojik ve genetik özellikler bakımından ayrılan medullar RCC ve toplama kanalında görülen RCC tiplerinin ise insidansları %1'den azdır. Medullar RCC, papiller RCC'nin daha agresif bir varyantı olarak görülmektedir (Linehan vd., 2003).

Tablo 2. 1. RCC alt tiplerine ait temel özellikler (Shuch vd., 2014).

Tümör tipi	Alt tipi	Gross patoloji	Mikroskopik özellikler		Somatik değişiklik	Sitogenetik değişiklikler
Berrak hücreli	-	Sarı renkli, iyi sınırlandırılmış ve farklı kanama-nekroz alanlarına sahip olabilir	Lipit ve glikojen birikimine bağlı olarak bol miktarda berrak sitoplazma		<i>VHL, PBRM1, SETD2, BAP1, JARID1A, mTOR, PI3K</i>	3p (%90), 14q, 8p ve 9p; 5q ve 12q'da artış
Papiller	1	Karışık kistik/katı kıvamda. Papiller RCC lezyonları genellikle kırmızımsı kahverengidir ve sıklıkla iyi sınırlandırılmış bir psödokapsül e sahiptir	Papiller veya tübülöpapiller mimari. Kalsifikasyonlar, nekroz ve köpüklü makrofaj infiltrasyonu	Tip 1: Berrak sitoplazmalı ince, bazofilik papillalar	<i>MET, NRF2, CUL3</i>	7q, 8q, 12q, 16p, 17, 20'de artış; 9p'de kayıp. Tip 2'de 8q'da artış, 1p ve 9p'de kayıp
	2			Tip 2: Heterojen, daha kalın papillalar ve eozinofilik sitoplazma		
Kromofob	Klasik	Arada sırada merkezi yara izi olan büyük, iyi sınırlandırılmış, ten rengi-kahverengi tümör	Belirgin hücre sınırları ve hacimli bir sitoplazma, perinükleer morfoloji, binükleasyon. Soluk sitoplazma, ince eozinofilik granüllü büyük tümör hücreleri		<i>TP53</i>	1, 2, 6, 10, 13 ve 17. Kromozomlarda kayıp
	Eozonofilik					
Onkositoma	-	Maun rengi, iyi sınırlandırılmış, ara sıra merkezi yara izi ve nadiren nekrozlu	Bol eozinofilik sitoplazmalı ve düzgün, yuvarlak çekirdekli poligonal hücre		Mitokondriyal kompleks I genleri	1p'de kayıp; Y kromozomunda kayıp, sıklıkla normal karyotip
Toplama Kanalı	-	Kısmen kistik, beyaz gri görünümlüdür ve sıklıkla renal sinüse invazyon gösterir	Tübülöpapiller patern, genellikle hobnail görünümü, müsinöz materyal varlığı, sütunlu patern alan hücrelerle desmoplastik stroma		Bilinmiyor	8p, 16p, 1p ve 9p'de kayıp; 13q'da kazanç
Medullar	-	Ten rengi, kötü kapsül, geniş kanama ve nekroz	Kötü farklılaşmış, eozinofilik hücreler; inflamatuvar infiltratif hücreler; yaygın tabaka benzeri veya retiküler model		Bilinmiyor	İyi tanımlanmamış

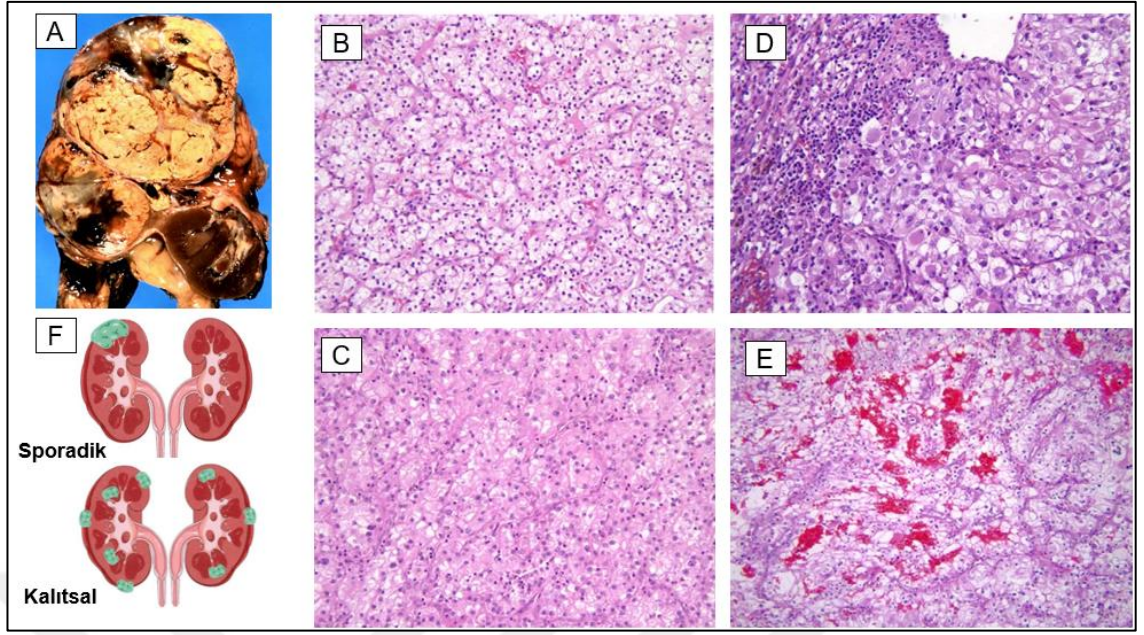
Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinoma

Görülme Sıklığı

RCC ile ilgili literatürün büyük bir kısmı berrak hücreli RCC (*clear cell renal cell carcinoma*; ccRCC) ile ilişkilidir çünkü cerrahi müdahale edilmiş epitelyal böbrek tümörlerinin yaklaşık %70'i ccRCC'dir. Diğer RCC tipleri ile kıyaslandığında görülme sıklığı en yüksek olan RCC tipidir. Bununla birlikte yapılan son çalışmalar görülme sıklığının günümüzde artış gösterdiğini belirtmektedir. Çoğu ccRCC vakası 40 yaş üzeri yetişkinlerde görülmektedir. Ancak çocuklar da dahil olmak üzere 40 yaş altı bireylerde de görülebilmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülür (1,5:1 oran). Ayrıca Kuzey Amerika'da siyah tenli bireylerde görülme sıklığı beyaz tenli bireylere oranla daha yüksektir (Grignon ve Che, 2005).

Patolojisi ve Mikroskopik Özellikleri

Patolojik incelemelerde ccRCC, tümördeki bol miktarda lipidin birikimi nedeniyle karakteristik olarak parlak sarı renktedir ancak kanama, nekroz ve fibroz nedeniyle alacalı görünüm de gösterebilir (Şekil 2.4-A). Tümörlerin yaklaşık %15'inde kalsifikasyon meydana geldiği gibi ilerleyen aşamalarda eritrositlerin tümör dokusuna ekstrasvazasyonu da gözlemlenebilir (Şekil 2.1-E). Neoplazmin boyutu ve ağırlığı değişkendir. Birkaç milimetre büyüklükte görülebileceği gibi ağırlığı birkaç kilograma kadar değişkenlik gösterebilir. Bu aşamada tümörün metastatik olup olmaması boyutu ve ağırlığı üzerindeki en büyük belirleyici etmendir.



Şekil 2. 4. Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinoma. (A) Gross patoloji görüntüsü. (B) Berrak sitoplazmik içerik ile mikroskopik görüntü. (C) Granüler eozinofilik sitoplazmaya ve grade 3 makronükleoliler ile mikroskopik görüntü. (D) Rabdoid benzeri bir morfoloji gösteren yüksek dereceli (nükleer derece 3) ccRCC. (E) ccRCC’de eritrositlerin ekstrasvazasyonu. (F) Sporadik ve kalıtsal ccRCC tipleri (Grignon ve Che, 2005; Linehan vd., 2003).

ccRCC sıklıkla nefronun proksimal tübül bölgesinden köken almaktadır. Mikroskopik incelemelerde ccRCC’de hücre sınırlarının belirgin olduğu ve sitoplazmik içeriğin şeffaf/berrak olduğu tanımlanmıştır (Şekil 2.4-B). Sitoplazmada değişken miktarlarda glikojen ve lipit bulunmakla birlikte bazı hücrelerde nükleus çevresinde ince taneli eozinofilik materyaller gözlemlenmiştir ve bu durum yüksek nükleer grade ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.4-C). Bununla birlikte eozinofilik materyallerin bol miktarda bulunduğu sitoplazmik içeriğe ve eksantrik nükleuslu (hücrenin bir tarafına doğru çekilmiş şekilde) hücrelerin bulunduğu büyük hücreli ccRCC tipleri de mevcuttur (Şekil 2.4-D). Bu şekilde patoloji gösteren hücrelerde sitokeratin, vimentin ve epitelyal membran antijeni (EMA) eksprese etmektedirler. Benzeri patolojik özellikler gösteren hücreler kromofob ve papiller RCC tiplerinde de gözlemlenebilmektedir. Ancak ccRCC’de hastalığın tanısında önem arz eden düşük molekül ağırlıklı sitokeratinlerin (CK8, CK18, CK19) ve vimentinin karakteristik olarak ko-eksprese edildiği belirlenmiştir. Moleküler ağırlığı yüksek CK14 ve 34 β E12 gibi sitokeratinlerin nadiren eksprese edildiği tespit edilmiştir. Çoğu vakada EMA ve CD10 ifadesi görülürken, daha az vakada α 1-antikimotripsin, α 1-antitripsin ve CD68

ifadesi gözlemlenmiştir. Diğer bazı kanser tiplerinin tanı ve takibinde önemli bir belirteç olan karsinoembriyonik antijen (CEA), α -fetoprotein, plasental alkalın fosfataz ve S-100 proteininin ekspresyonları nadiren gözlemlenmektedir. Ayrıca renal nefronun distal kıvrımlı tübülünde eksprese edilen sitozolik kalsiyum bağlayıcı bir protein olan parvalbuminin ekspresyonu kromofob RCC ve onkositomalarda görülürken ccRCC'de gözlemlenmez (Calio vd., 2021; Grignon ve Che, 2005). Ayrıca bir tümör baskılayıcı olarak görev alan ve RCC hücrelerinde apoptozu indüklediği tespit edilen β -defensin-1'in ekspresyonunun ccRCC'lerin %90'ında azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Sun vd., 2006; Grignon ve Che, 2005).

Nükleus açısından incelendiğinde tüm ccRCC hücrelerinde nükleuslar düzenli, yuvarlak ve oval olma eğilimindedir. Nükleer özelliklerin ccRCC hücrelerinin davranışlarında önemli bir belirleyici olduğu tanımlanmıştır ancak tek bir tümörde nükleuslarda önemli bir heterojenlik gözlemlenebilmektedir. Bazı tümörlerde mitokondri miktarı ise boldur ve boyutları büyük pleomorfik yapıdadır (Grignon ve Che, 2005).

Mitotik aktivite açısından incelendiğinde 1. ve 2. derece tümörlerde mitotik aktivite yoktur veya nadir olarak gözlemlenmektedir. Mitoz genellikle 3. ve 4. derece vakalarda kolayca tanımlanmaktadır. Tümörlerin çoğu tanımlandığında nükleer derece 2 ve 3'tür. Derece 1 tümörler çok nadirdir (<%5) ve derece 4 tümörler vakaların yaklaşık %5 ila %10'unu oluşturmaktadır (Grignon ve Che, 2005).

Kalıtımı

Diğer kanser tiplerinde olduğu gibi ccRCC'de sporadik (kalıtsal olmayan) ya da kalıtsal olarak ortaya çıkabilmektedir. Sporadik ccRCC tek lezyon olarak ortaya çıkma eğilimindeyken herediter ccRCC formları bilateral ve multifokal özellik gösterebilmektedir (Şekil 2.4-F). RCC tipleri birbirlerinden histolojik olarak ayrıldığı gibi kalıtsal özellikler bakımından da farklılıklar göstermektedir. Yani her kalıtsal RCC tipi farklı bir histolojik tipteki RCC ile ilişkilidir. ccRCC'lerin %96'sı özellikle 3p25'te lokalize olan *VHL* geninin (*von Hippel-Lindau* tümör baskılayıcı) ve 3p14'te lokalize olan *FHIT* geninin (*Fragile histidine triad diadenosine triphosphatase*) delesyonu halinde kendini göstermektedir. Kalıtsal olarak ccRCC'lerin %90'ından fazlasında 3. kromozomun kısa kolunda (3p) sitogenetik anormallikler görülmektedir. Kromozomun bu bölgesindeki delesyonlar, translokasyonlar ve hatta tüm kısa kolun kaybı sonucunda ccRCC ortaya çıkmaktadır (Grignon ve Che, 2005). Sporadik

ccRCC'de *VHL* genindeki mutasyonların %50'si çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonuyken, geri kalanı yanlış anlam (*missense*) mutasyondur (Clark, 2009).

Sporadik ccRCC sıklıkla *VHL* genindeki çeşitli kalıtsal değişiklikler ile ortaya çıkan *VHL* hastalığıyla ilişkilendirilmektedir. *VHL*, bilateral multifokal RCC, adrenal bezlerden köken alan bilateral multifokal feokromositoma, pankreatik ya da malignant nöroendokrin tümörler, kistler, epididimal kistadenom, serebellar ve spinal hemanjiom, retinal anjiomalar ve iç kulakta endolenfatik kese tümörleri için önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir. *VHL*'de görülen böbrek tümörleri çoğunlukla ccRCC tipindedir ve *VHL* hastalığına sahip bireylerin %35 ila %45'inde ccRCC gözlemlenmektedir. Böbrek tümörleri en sık *VHL* geninin kısmi olarak silinmesi veya *VHL* proteinini kısıltacak formdaki mutasyonlara sahip hastalarda görülmektedir. Genellikle erken başlangıçlı ve ergenlik dönemindeki bireylerde ortaya çıkan böbrek tümörleri malign ve metastatik özellikle göstermektedir. Eğer tedavi edilmezse hastaların yaklaşık %40'ı ilerleyen ccRCC sebebiyle hayatını kaybetmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar *VHL* hastalığına sahip bireylerin akrabalarının %39 ila %75'inde *VHL* geninde germline mutasyonlara sahip olduklarını göstermiştir (Linehan vd., 2003). Bu gende, ccRCC ve *VHL* hastalığına sebebiyet verecek mutasyonlar gözlemlendiği gibi, herhangi bir mutasyonun gözlemlenmediği durumlarda bile anormal promotör hiper-metilasyonu, düşük veya eksik protein seviyelerine yol açan diğer sapmaların olabileceği belirlenmiştir (Clark vd., 2009).

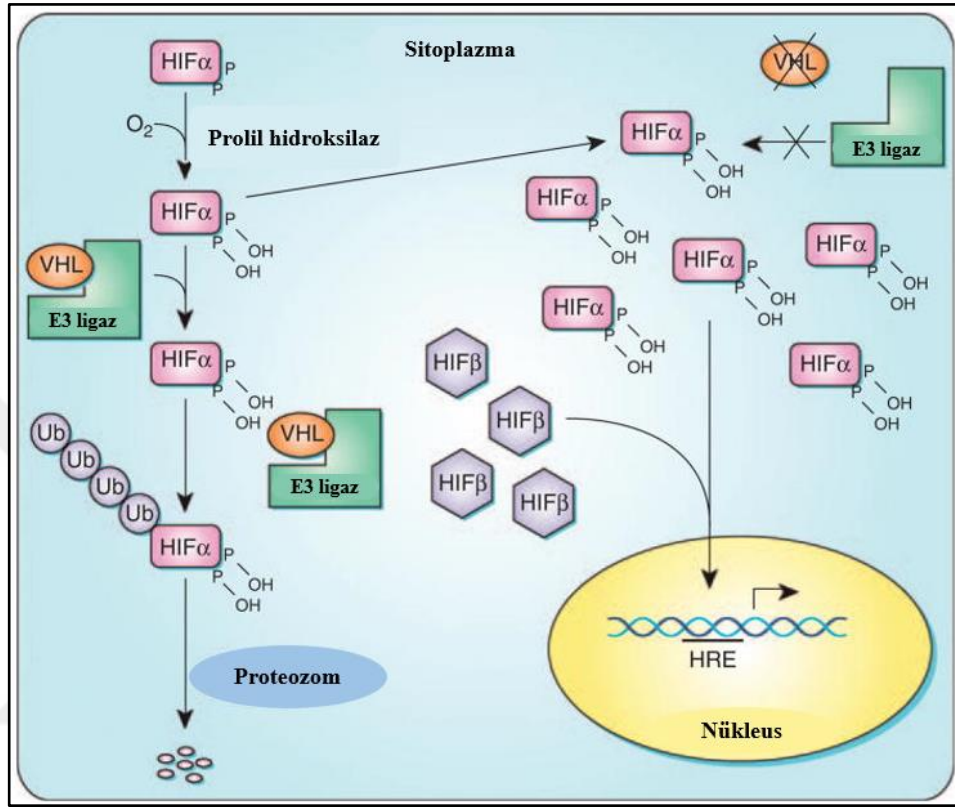
Knudson Hipotezi göz önüne alındığında bir tümör baskılayıcı genin her iki alelinde de mutasyon meydana geldiğinde, hücre döngüsü kontrol noktalarında bozukluklar meydana gelmektedir. Kalıtsal *VHL* ile ilişkili tümörlerde ise *VHL* geninin bir kopyası mutasyona uğramışken, diğer kopya çoğunlukla genin silinmesiyle inaktive edilmektedir. Sporadik durumda ise *VHL* geninin bir kopyasının inaktivasyonu gerçekleşmektedir. Benzer şekilde ccRCC hastalarının çoğunluğunda da *VHL* geninin bir kopyasındaki mutasyon ile birlikte inaktivasyon sağlanmakta ve diğer kopyasında delesyon görülmektedir. Bu nedenle *VHL* geni, Knudson hipotezine uygun olarak iki vuruşlu modele uymaktadır. Ayrıca *VHL* geninin tümör baskılayıcı rolünün kanıtlanması amacıyla gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalarda her iki *VHL* alelinin de işlev kaybına uğramasının (*VHL* *-/-*) bağışıklık sistemi baskılanmış (*nude*) fare modellerinde tümör oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. *VHL* geninin normal bir kopyası (*wt*) verildiğinde ise *nude* farelerde tümör oluşumu gözlemlenmemiştir.

Böylelikle *VHL* geninin tümör baskılayıcı olduğu ve bu gende meydana gelen işlev kaybının kanserde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Linehan vd., 2003).

VHL hastalığı olan çok sayıdaki akraba grupları arasında yapılan çalışmalar, *VHL* geninin 3p kromozomu üzerindeki lokalizasyonun belirlenmesine katkı sağlamış ve daha sonra genin işlevleri tanımlanmıştır. Normalde *VHL*'nin işlevi, hücrenin mikro ortamdaki oksijen mevcudiyetine tepkisini düzenlemektir. *VHL*, hücre sitoplazmasında E3 ligaz kompleksinin bir parçası olarak elongin B, elongin C, cullin2 ve Rbx gibi diğer proteinler ile birlikte kompleks halinde bulunmaktadır. Bu kompleks, proteinleri ubiquitinleyerek işaretlemekte ve bu sayede proteozomal kompleks aracılığıyla parçalanmaları sağlanmaktadır. Normal lokal oksijen seviyelerinin varlığında, hipoksi ile indüklenebilir faktör alfa ($HIF\alpha$) olarak adlandırılan düzenleyici bir molekül, bir dizi prolin hidroksilaz tarafından hidroksile edilir. Bu prolin rezidülerinde bir hidroksil grubunun varlığı, $HIF\alpha$ 'nın, ağırlıklı olarak *VHL* proteininin aracılık ettiği E3 ligaz enzim kompleksine bağlanmasına izin verir. $HIF\alpha$ 'nın *VHL*'ye ve E3 ligaz kompleksine bağlanması, proteozomal kompleks tarafından parçalanması için işaretlenmesine neden olur. Bu nedenle, normal lokal oksijen seviyelerine sahip koşullarda, hücrede $HIF\alpha$ seviyeleri düşük tutulmaktadır. Hipoksi sırasında ise $HIF\alpha$ hidroksile edilmez ve bu nedenle *VHL* proteinine bağlanamaz ve sonuç olarak proteozomal kompleks tarafından degrade edilemez. Böylece hipoksi drumuna yanıt olarak, hücrede $HIF\alpha$ seviyeleri yükselir ve $HIF\beta$ 'ya bağlanır. $HIF\alpha/\beta$ heterokompleksi daha sonra nükleusa geç ederek hücrenin hipoksiye tepkisinde önemli olan genlerin promotörlerindeki spesifik hipoksi yanıt elemanlarına bağlanabilir (Şekil 2.5). $HIF\alpha/\beta$ kompleksinin, hipoksiye yanıt veren genlerin promotöründeki hipoksi yanıt elemanlarına bağlanması, bu genlerin mRNA ve protein seviyelerinde artışa neden olur. $HIF\alpha$ tarafından yukarı regüle edilen kritik genler arasında vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü alfa ($TGF\alpha$), karbonik anhidraz IX (CA-IX), eritropoietin ve glikoz taşıyıcı 1 (GLUT-1) gibi proteinler bulunur (Shuch vd., 2014; Clark, 2009).

VHL proteini ya bir mutasyon nedeniyle işlev göremediğinde ya da hücrede anormal derecede düşük/yok olduğunda (promotör hipermetilasyonu gibi nedenlerle), hücredeki oksijen seviyelerinden bağımsız olarak, $HIF\alpha$ E3 ligaz'a bağlanamaz ve dolayısıyla degrade edilemez. Böylece $HIF\alpha$ hücre içinde normalden çok daha yüksek

bir seviye bulunur. Yüksek HIF α seviyeleri sebebiyle HIF α / β kompleksi nükleusa göç ettiğinde, normalden daha yüksek seviyelerde VEGF, PDGF ve TGF α gibi hipoksi yanıt elementlerinin ifadesi gerçekleşir. Bu genlerin anormal derece yüksek ifadesi ise ccRCC'nin gelişmesine yol açar (Clark, 2009).



Şekil 2. 5. Normal oksijen seviyelerinde (solda) ve hipoksik koşullarda (sağda) VHL proteininin hücredeki işlevi (Clark, 2009).

VHL geninin diğer RCC tipleriyle ilişkisi araştırıldığında, çalışmalar *VHL* genindeki mutasyonların ccRCC hastalarında görüldüğünü ancak pRCC hastalarında bu gende herhangi bir kalıtsal değişikliğe rastlanmadığını göstermektedir (Linehan vd., 2003).

Papiller Renal Hücreli Karsinoma

ccRCC dışındaki RCC tipleri berrak hücreli olmayan RCC (nccRCC) olarak adlandırılmaktadır. nccRCC, başlıca papiller (pRCC), kromofob, toplama kanalı, medüller ve henüz sınıflandırılmamış RCC alt tiplerinden oluşmaktadır.

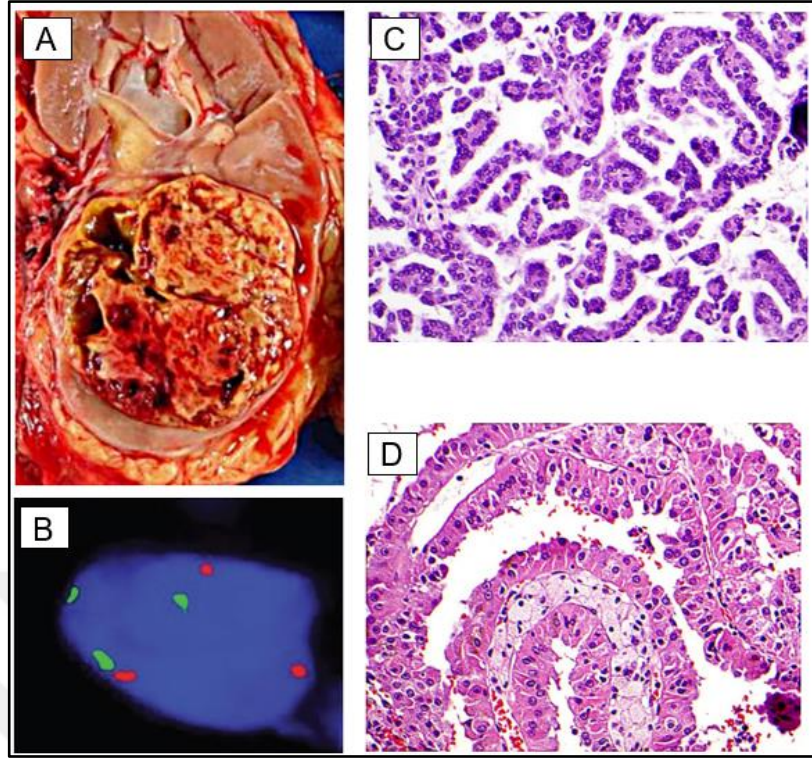
Görülme Sıklığı

Böbrek kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturan pRCC, en yaygın nccRCC tipidir. pRCC en sık 50-70 yaşları arasında teşhis edilir ve erkeklerde daha sık görülür. Ayrıca pRCC'nin görülme sıklığı siyah tenli insanlarda beyaz tenlilere oranla 3 kat daha fazladır. Bu tümörler genellikle radyolojik olarak kalsifikasyon ile karakterize edilir

ve doğası gereği sıklıkla multifokaldır (Chawla vd., 2023). Organ sınırlı evrede ccRCC ile karşılaştırıldığında daha iyi prognoza sahip olduğu savunulsa da metastatik durumda pRCC histolojisinin ccRCC'ye kıyasla daha kötü prognoz ve düşük sağkalım gösterdiği bildirilmektedir (Chawla vd., 2023; Angori vd., 2022). Temel olarak pRCC tip 1 ve tip 2 olarak iki alt sınıfa ayrılmıştır. Tip 1 pRCC daha yaygın görülse de proliferasyonu yavaştır. Tip 2 pRCC daha agresiftir ve daha hızlı ilerleme göstermektedir (Ulusal Kanser Enstitüsü, 2020).

Patolojisi ve Mikroskopik Özellikleri

pRCC hastalarından cerrahi işlemle alınan tümör dokusu incelendiğinde tümör fibröz bir psödokapsül ile iyi sınırlandırılmıştır. Genellikle ten rengi veya kahverengi görünen doku, kanama olduğunda tamamen kahverengi renkte veya yoğun nekrotik olduğunda sarı renkte bulunabilir (Şekil 2.6-A). Yapılan histolojik çalışmalar pRCC'nin iki farklı patern gösterdiğini olduğunu tanımlasa da son yıllarda ortaya çıkan veriler ek alt tiplerin de tanımlanmasını sağlamıştır. Ancak araştırmalar sıklıkla temel iki alt tip pRCC üzerine yoğunlaşmaktadır. Tip 1 pRCC, oval çekirdekli ve yetersiz bazofilik sitoplazmalı tek bir katmandaki hücrelerle karakterize edilmektedir. Lipit yüklü makrofajlar tipik olarak neoplastik hücrelerle kaplı papiller yapıların fibrovasküler çekirdeklerinde görülür. Bu durum pRCC'nin doğru teşhisi için yardımcı olan bir özelliktir. Neoplastik hücreler, tip 1 pRCC'deki gibi tek katmanlı çekirdeklere sahip yetersiz amfofilik sitoplazmaya (Şekil 2.6-C) ya da tip 2 pRCC'deki gibi psödostratifiye nükleuslara sahip bol yoğun eozinofilik sitoplazmaya (Şekil 2.6-D) sahip olabilir (Özcan vd., 2014). İmmünohistokimyasal analizlerde, tip 1 pRCC'de CK7, MUC1 ve vimentin ifadelerinin fazla olduğu belirlenmiştir. CK20 ve E-kaderin ifadeleri tip 2 pRCC'de daha sık görülmektedir. Moleküler çalışmalar, tip 2 pRCC'nin farklı moleküler profillere sahip birkaç farklı varyanttan oluşabileceğini göstermiştir. Daha önce tip 2 olarak kabul edilen birkaç pRCC alt tipi, 2016'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kalıtsal leiomyomatoz ve renal hücreli kanser (HLRCC) olmak üzere farklı RCC tipleri olarak sınıflandırılmıştır (Chawla vd., 2023; Angori vd., 2022).



Şekil 2. 6. Papiller renal hücreli karsinoma (A) Gross patoloji görüntüsü. (B) Floresan in situ hibridizasyon ile trizomi 7 ve trizomi 17 gösterimi. (C) Mikroskopik tip 1 pRCC ve (D) Tip 2 pRCC görüntüleri (Özcan vd., 2014).

İlişkili Genler ve Kalıtımı

Kanser Genom Atlası Veri Tabanı'na (TCGA) göre tip 1 pRCC büyük ölçüde mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) yolundaki değişikliklerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte tip 1 pRCC daha düşük gradede olma eğilimindedir ve 7p ve 17p'de daha yüksek kromozomal kazanç oranları göstermektedir (Trizomi) (Şekil 2.6-B). Tip 2 pRCC'nin ise öncelikle, daha az kopya numarası değişikliği geçiren ve özellikle kromozom 9p'de çoklu kayıplarla kendini gösteren iki farklı alt tipi olduğu tanımlanmıştır. Çoklu kromozom kayıplarına sahip alt tip, benzerlerine göre daha kötü sağkalıma gösterse de incelenen doku örneklerinin %97'si metastatik değildir (Chawla vd., 2023). Bununla birlikte tip2 pRCC'de kromozom 12, 16 ve 20'de çoklu kromozomal kazanımlar görülebilir. TCGA, farklı kopya numarası değişiklik düzenine sahip üç pRCC alt grubunu tanımlamıştır. Birinci alt grubu oluşturan düşük dereceli tümörlerde, ağırlıklı olarak 7, 12, 16, 17 ve 20. kromozomlarda kazanç gözlemlenirken, diğer iki alt grup tamamen farklı davranmaktadır. Bir grup sadece birkaç değişiklik gösterse de, diğeri yüksek genom kararsızlığı ve zayıf sağkalımla

ilişkili kromozom 9p kaybı ile karakterizedir. Birkaç vakada, kromozom 1, 2 ve 3'ün kromozom içi yeniden düzenlemeler de tanımlanmıştır (Angori vd., 2022).

Yeni nesil sekanslama (NGS) ile %61'i metastatik 169 pRCC hasta örneği ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise Tip 1 pRCC'li 39 hastanın 33'ünde (%85) ve tip 2 pRCC'li 108 hastanın 7'sinde (%6) MET değişiklikleri görülmüştür. Bununla birlikte pRCC tümörlerinin proksimal tübül hücrelerinden köken alabileceği gibi toplama kanalı hücrelerinden de köken alabileceği gösterilmiştir. Proksimal tübül kökenli pRCC Notch ve mTOR sinyal yollarıyla ilişkilendirilirken, toplama kanalı hücrelerinden köken alan pRCC tümörlerinde interferon sinyali ve inflamasyon yollarında görevli proteinlerin ekspresyonlarında artışın meydana geldiği tespit edilmiştir. pRCC'nin ccRCC'ye oranla daha agresif olma nedeni bu yollardaki değişimlerden kaynaklanıyor olabilir (Chawla vd., 2023).

Son zamanlarda, pRCC'de birkaç genin mutasyona uğradığı bulunmuştur. Proto-onkogen *MET* genindeki germline veya somatik mutasyonlar esas olarak tip 1 pRCC'de görülmektedir. *CDKN2A*'nın mutasyonları veya promotör hipermetilasyonu, agresif pRCC ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. p16'yı kodlayan *CDKN2A* kaybı, hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır. Ek olarak, kromozom modifikasyonunda görevli olan *SETD2*, *BAP-1* ve *PBRM1* genlerindeki mutasyonlar da pRCC'de tanımlanmıştır. Diğer yaygın mutasyona uğramış genler arasında kromatin modifikasyonu, hücre döngüsü ve metabolizmasında rol oynayan *FAT1*, *FLCN*, *TERT*, *NF2*, *NFE2L2*, *STAG2* ve *TP53* bulunur. pRCC'de mutasyona uğramış genlerin çoğu Hippo, mTOR ve p53 ile ilişkilidir. Hippo sinyal yolağındaki YAP1 inhibe edilerek hücre proliferasyonu baskılanabilir. pRCC'de NF2'nin kaybı YAP1'in aşırı aktivasyonuna neden olarak anormal hücre büyümesine neden olur. Hücre bölünmesi, proliferasyonu, apoptoz ve strese yanıt için önemli sinyal yolları olan mTOR ve p53 yollarında önemli proteinleri kodlayan *mTOR*, *PIK3CA*, *PTEN* veya *FBXW7*, *RB1* ve *TP53* genlerindeki değişimler pRCC hastalarında sağkalım ile yakından ilişkilidir. TCGA verilerine göre transkripsiyonel analizler sonucu Nrf2-ARE yolağındaki aşırı aktivasyon pRCC agresivite ile yakından ilişkilidir. Ayrıca Cdr2'nin yüksek ifadesi pRCC'de biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (Angori vd., 2022).

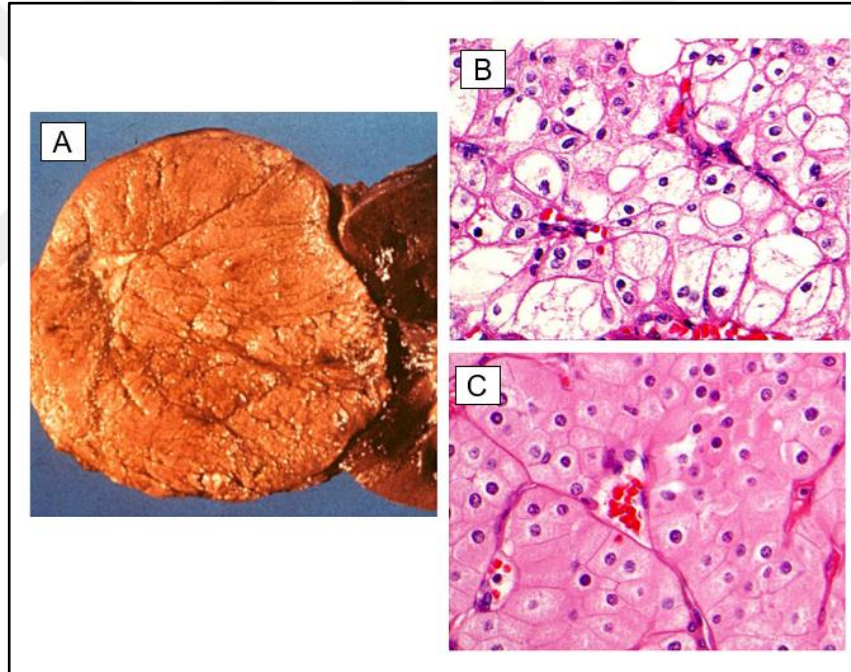
Kromofob Renal Hücreli Karsinoma

Görülme Sıklığı

Kromofob RCC, tüm RCC vakalarının yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Diğer RCC tiplerine kıyasla klinik seyri daha iyidir. Kromofob RCC'nin diğer RCC alt tiplerinin aksine cinsiyete bağımlılığı yoktur, kadın ve erkeklerde eşit oranda dağılım gösterir. ccRCC'ye kıyasla daha genç bireylerde görülür Yaş ortalaması 55'tir ancak 27 ile 86 yaşları arasında da görülebilir (Nagashima vd., 2013; Özcan vd., 2014).

Patolojisi ve Mikroskopik Özellikleri

Kromofob RCC'nin toplama kanalının interkalasyon hücrelerinden kökenlendiği düşünülmektedir. Tümör genellikle onu çevreleyen parankimden iyi bir şekilde ayrılır ve bej renkli büyük homojen bir kütle oluşturur. Nekroz veya kanama azdır (Şekil 2.7-A).



Şekil 2. 7. Kromofob RCC. (A) Gross patolojik görüntüsü (B) Tipik kromofob RCC (C) Eozinofilik kromofob RCC (Özcan vd., 2014)

Kromofob RCC, flokülen sitoplazmalı, bol miktarda oval mikro vesiküller içeren ve belirgin hücre sınırına sahip soluk büyük hücrelerle karakterizedir. Tümör hücreleri büyük boyutlu ve çokgen şeklindedir. Sitoplazmik ayrımlar çokgen şekillidir ve 'bitki hücresi benzeri' bir görünüm sağlamaktadır (Şekil 2.7-B). Nükleuslar, genellikle rasinoid olarak adlandırılan konfigürasyonda düzensizdir. Kromofob RCC'nin tipik varyantında karakteristik olarak belirgin hücre sınırlarına, az miktarda eozinofilik ve

berrak sitoplazmaya sahiptir (Şekil 2.7-C). Ancak bazen tümörün çok küçük bir kısmı eozinofilik özellik gösterebilir. Eozinofilik varyantta tümörün iç içe geçmiş bir morfolojisi vardır. Neoplastik hücreler, ince taneli eozinofilik sitoplazmalıdır, bol miktarda mitokondri bulundurur ve hücre boyutları tipik kromofobik RCC'den daha küçüktür. Bu özelliklerden bazıları onkositomayı andırdığından sıklıkla eozinofilik varyant ile onkositomayı ayırt edebilmek zordur. Eozinofilik varyant, tipik kromofob RCC'den daha iyi klinik sonuçlara sahiptir (Özcan vd., 2014). Tüm kromofob RCC vakalarının yaklaşık %8'inde sıklıkla p53 mutasyonları ve agresivite ile ilişkilendirilen sarkomatoid transformasyon görülmektedir ve bu durum agresif klinik sonuçlarla ilişkilidir (Özcan vd., 2014; Bildirici vd., 1999).

İmmünohistokimyasal açıdan hücreler CK7, böbreğe özgü kaderin, sitoplazmik CD117 (c-kit) ve EMA için pozitiflik gösterir. Ancak vimentin negatiftir (Nagashima vd., 2013; Özcan vd., 2014).

İlişkili Genler ve Kalıtımı

Kromofob RCC'de, en sık kromozom 1 ve Y'de olmak üzere kromozom 2, 6, 10, 13, 17, ve 21'de çoklu genetik kayıplar gözlemlenir. Kromozom 1, 2, 6, 10 ve 17'nin genetik kayıpları hem eozinofilik hem de tipik varyantlarda en yaygın olanlardır. Kromozom 1'de onkositoma vakalarında da kayıplar meydana gelebilir ancak 2, 6, 10 ve 17 numaralı kromozom kayıpları saptanmamıştır. Sporadik kromofob RCC'ye özgü gen/genlerin mutasyonu bilinmemektedir. Ancak *Birt-Hogg-Dube*' sendromu (BHD) ile ilişkili folikülin (*FLCN*) geninde mutasyonun, kalıtsal kromofobik RCC'nin gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. *FLCN* geni 17p11.2'de lokalize olmaktadır ve mutasyonu cilt tümörleri (fibrofollikülomlar, trikodiskomlar ve akrokordonlar), akciğer kistleri, spontan pnömotoraks, kolonik tümörler, medüller tiroid karsinomu, lipomlar ve böbrek tümörleri (genellikle bilateral ve multifokal) dahil olmak üzere çeşitli organların lezyonları ile karakterize olan BHD hastalığıyla ilişkilendirilir. BHD ile birlikte ortaya çıkan böbrek tümörlerinin genel prevalansı %34'tür.

Normalde *FLCN* geni, bir tümör baskılayıcı olarak görev alan, ERK ve AKT/mTOR yollarını negatif olarak düzenleyen FLCN proteinini eksprese eder. BHD sendromunda, genellikle *FLCN* geninin çerçeve kayması ve anlamsız (*nonsense*) mutasyona uğradığı görülür. Bu mutasyonlar sonucunda protein işlevini yerine getiremeyecek şekilde kesilir ve onkojenik yolların yukarı regülasyonu görülür (Nagashima vd., 2013; Özcan vd., 2014).

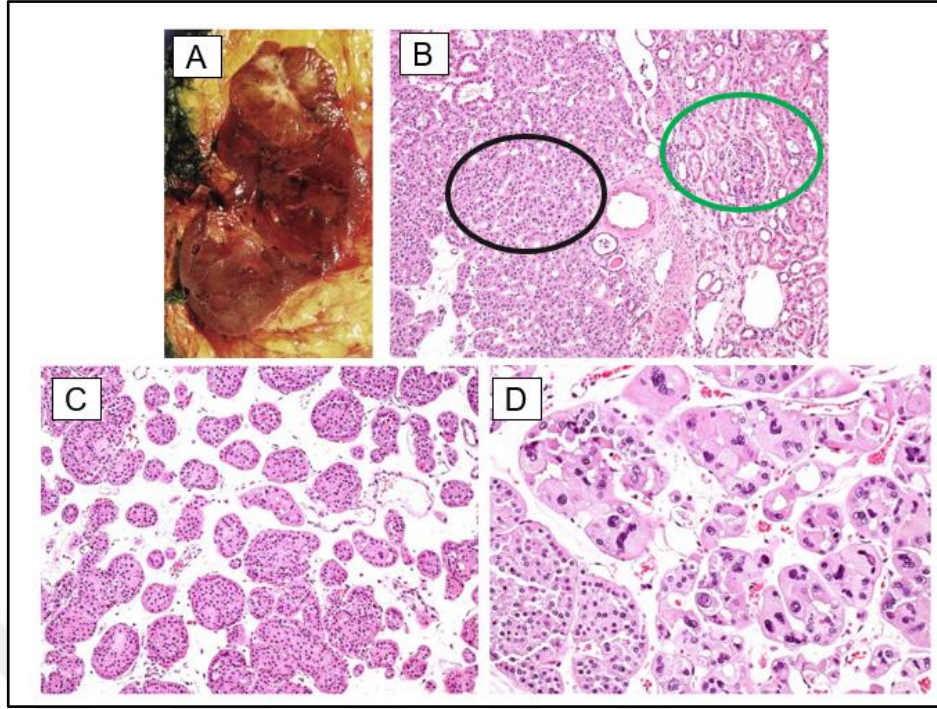
Onkositoma

Görölme Sıklığı

Böbrek onkositomları, böbrek neoplazmalarının yüzde 3 ila 7'sini oluşturan yaygın iyi huylu böbrek neoplazmalarıdır. Genellikle 50 yaşından büyük yetişkinlerde görölürken pediatrik popölasyonda nadiren görölmemektedir. Tanısı sıklıkla tesadüfen koyulur. Prognosu çok iyi olan onkositoma agresif bir klinik seyir göstermez ancak bazen karaciğer ve kemiğe metastaz göröllebilir. Eğer metastaz yoksa tedavisinde sıklıkla cerrahi yöntemler gerçekleştirilir. Erkeklerde görölme sıklığı daha yüksektir. Vakaların yaklaşık %10'u diğler böbrek tümörleriyle veya BHD sendromuyla ilişkilidir (Williams ve Lynch, 2023; Özcan vd., 2014).

Patoloji ve Mikroskopik Özellikleri

Onkositomlar, merkezi bir skar taşıyan, iyi sınırlandırılmış, kahverengi veya maun renkli kitlelerdir (Şekil 2.8-A). Merkezi skar, böbrek onkositomunun karakteristiğidir ancak her zaman mevcut değildir. Büyük ölçüde, onkositoma bazen perinefrik yağ ile etkileşime girebilir. Bu durumda yağ dokusunda herhangi bir stromal reaksiyon veya tepki gözlemlenmez ve hastalığın seyrinde değişime neden olmaz. Benzer şekilde, tümörlerin küçük bir kısmı vasküler invazyona sahip olabilir (Williams ve Lynch, 2023).



Şekil 2. 8. Onkositoma. (A) Gross patoloji görüntüsü. (B) Yeşil ile işaretli alanda sağlıklı böbrek hücreleri ve siyah ile işaretli alanda onkositoma görüntüsü. (C) Granüler eozinofilik sitoplazma içeren onkositoma. (D) Mitotik figür bulunmayan onkositoma yapısı (Özcan vd., 2014).

Mikroskopik olarak, böbrek onkositomaları iyi sınırlanmış görünmektedir. Tümör dokusu sınırlı bir yayılım gösterir ve çevredeki böbrek parankimine infiltrasyon sıklıkla gerçekleşmez ancak çok nadiren görülebilir (Şekil 2.8-B) (Özcan vd., 2014). Onkositomalar, bol granüler eozinofilik sitoplazmaya sahip yuvarlaktan poligonal hücrelere kadar uzanan yuvalar ve boru şeklindeki yapılardan oluşur (Şekil 2.8-C). Hücreler, belirgin merkezi nükleollere ve tek tip nükleuslara sahiptir. Stroma ödemli, miksomatöz veya hyalinizedir. Ayrıca doku mimarisinde kompaktlaşma, katı, fokal nadir papiller yapılar ve kistik boşluklar bulunabilir. Eğer dokuda yetersiz sitoplazmaya sahip alanlar varsa bu küçük hücreli onkositoma olarak adlandırılır. Onkositomda pleomorfik nükleuslar gözlemlenir ve mitoz oldukça nadirdir, birden fazla mitotik figür bulunmamaktadır (Şekil 2.8.D). İmmünohistokimyasal analizlerde onkositomalar fokal olarak sitokeratin 7 (CK7) ve membranöz olarak CD117 açısından pozitif boyama gösterirler (Williams ve Lynch, 2023).

İlişkili Genler ve Kalıtımı

Onkositomlar genellikle karyotip analizinde genetik anormallikler göstermektedirler. Ancak sorumlu gen mutasyonları aydınlatılmamıştır. Sıklıkla kısmen veya tamamen kromozom 1p ve X/Y kromozomlarının kaybı, çok nadir kromozom 11'deki

değişiklikler ve kromozom 14'te kayıplar ya da nadiren kromozom 12'de kazanımlar gibi çeşitli kromozomal değişiklikler gözlemlenmektedir. Bu kromozomal anormallikler, sporadik tümörlerde ailesel tümörlere göre daha sık görülmektedir. Renal onkositomaların, kromozomal anormalliklerin birikmesinden sonra interkalasyonlu epitel hücrelerinin patolojik neoplastik büyümesinden kaynaklandığına inanılmaktadır (Williams ve Lynch, 2023).

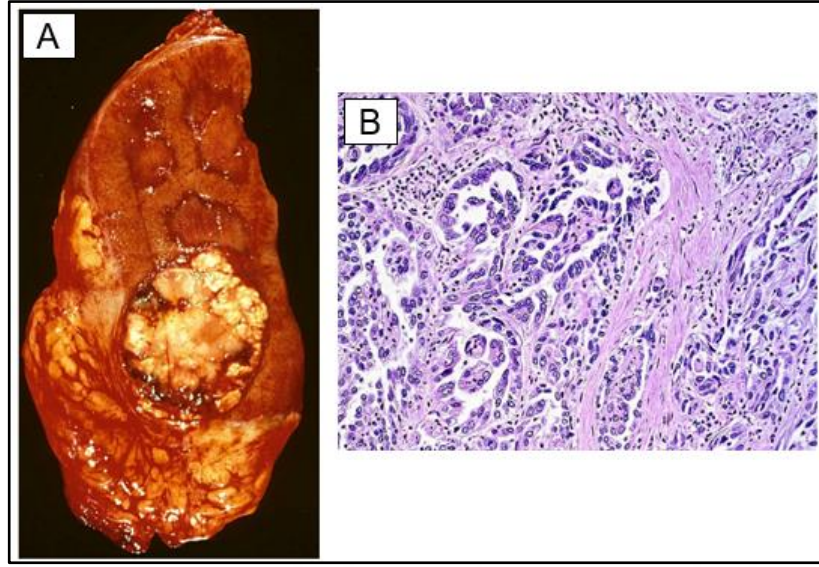
Toplama Kanalı Karsinomu

Görülme Sıklığı

Bellini kanalı karsinomu olarak da adlandırılan toplama kanalı karsinomu (cdRCC), böbrek medullasında merkezi bir konuma sahiptir ve RCC'lerin yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. Sıklıkla toplama kanalının ana hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülür (2:1). Ortalama 55 olmak üzere 13 ila 83 yaş aralığında görülebilir. RCC'nin en agresif tipidir ve vakaların yaklaşık %50'sine ileri metastatik evrede tanı koyulur (Özcan vd., 2014). ccRCC ile kıyaslandığında Afro-Amerikan nüfusta cdRCC daha sık görülmektedir (Suarez vd., 2022).

Patoloji ve Mikroskopik Özellikleri

Toplama kanalı karsinomu tipik olarak sert, beyaz veya gri-beyaz renkli, büyük bir kesim yüzeyi ve infiltratif bir büyüme paterni göstermektedir (Şekil 2.9-A). Tümör küçük ve renal medulla ile sınırlı olsa bile, infiltratif multinodüler bir büyüme paterni sıklıkla görülür. Mikroskopik olarak, tümör karışık infiltratif tübüler, iç içe geçmiş, glandüler veya papiller mimariler gösterir. Tümörün infiltratif alanları genellikle belirgin stromal desmoplazi ile ilişkilidir (Şekil 2.9-B). Bununla birlikte tümöre daha agresif özellik katan sarkomatoid değişiklikler tanımlanmıştır. Diğer RCC alt tiplerinin aksine, lümen ve intrasitoplazmik müsin oldukça yaygındır ve bu durum tanı koyulması açısından faydalıdır.



Şekil 2. 9. Toplama kanalı karsinomu (A) Gross patoloji. (B) Mikroskopik görüntü (Özcan vd., 2014).

İlişkili Genler ve Kalıtımı

Toplama kanalı karsinomunda sitogenetik ve moleküler bulgular sınırlıdır çünkü oldukça nadir görülür. Görülen vakalarda kromozom kayıpları gözlemlenmiştir. Kromozom 2, 6, 10, 13, 14, 15, ve 22’de monozomi; 1q, 6p, 8p, 13q ve 21q kromozomal kollarında alelik kayıp ve tümör baskılayıcı gen içeren kromozom 1’de (1q32.1-32.2) minimal delesyon belirlenmiştir. Toplama kanalı karsinomunda kromozom kolu 8p’nin kaybı, ccRCC’de olduğu gibi kötü prognoz ile ilişkilidir (Özcan vd., 2014).

Renal Medullar Karsinom

Görülme Sıklığı

Renal medüller karsinom (RMC), tüm renal neoplazmların yaklaşık %1’inden azını oluşturan çok nadir bir malignitedir. RMC oldukça agresif bir davranış sergiler ve genellikle 10 ila 40 yaş arasındaki erkeklerde görülür. Hastaların çoğu bu yaş aralığındaki Afro-Amerikan erkeklerdir. RMC, hastaların %75’inden fazlasının sağ böbreğinde görülür. Tümör çok agresif olduğundan hastalığın prognozu oldukça kötüdür ve geleneksel kemoterapiye karşı dirençlidir. Tanı sonrası sağkalım süresi yaklaşık 4 aydır (Çalışkan vd., 2015). Kemoterapi ve cerrahi yaklaşımlar uygulansa bile, ortalama sağkalım süresi yaklaşık 13 aydır. RMC’nin orak hücreli anemi sonucu oluşan bir nefropati olduğu bildirilmiştir. Orak hücreli aneminin bir sonucu olarak kronik medüller hipoksi tarafından indüklenerek RMC’nin ortaya çıktığı tahmin

edilmektedir ancak mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (Beckermann vd., 2017).

Patoloji ve Mikroskopik Özellikleri

RMC'nin köken aldığı renal hücre tipi bilinmemektedir ancak renal papilla veya kaliseal epitelden kaynaklandığı düşünülmektedir. Patolojik incelemeler sonucunda RMC'nin renal pelvisten uzanan infiltratif bir tümör olduğu ve genellikle retiküler bir büyüme paterni gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca adenoid kistik bileşenlerle birlikte nötrofil infiltrasyonuna sahip zayıf derece farklılaşmış hücre tabakaları immünohistokimyasal analizlerde tespit edilmiştir (Beckermann vd., 2017).

İlişkili Genler ve Kalıtımı

RMC'de en önemli bulgulardan biri, kromatin yeniden şekillenmesinin ve transkripsiyonel aktivitenin modülasyonunun kilit bir aracı olan SWI/SNF kompleksindeki SMARCB1/INI1 kaybıdır. SMARCB1/INI1'in bialelik kaybı, birkaç çocukluk çağı böbrek tümörü ayırt edici bir özelliktir. Ek olarak neoplazmlarda NGS ile SWI/SNF kompleksinin çeşitli alt birimlerinin bialelik, heterozigotluk kaybını veya yüksek mutasyon sıklığı gösterilmiştir. Bu durum SWI/SNF kompleksinin bir tümör baskılayıcı rolü olduğunu düşündürmektedir. SWI/SNF aktivitesinin kaybı, RMC'nin patogenezi için önemli bir adım olabilir ancak tek başına dönüşüm için yeterli olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır. Bu genomik değişiklik hastalığın tanımlayıcı bir özelliği olarak göz önüne alındığında, SMARCB1/INI1 kaybı bu kanserin önemli bir özelliğidir (Beckermann vd., 2017).

Böbrek Kanseriinde Çevresel Risk Faktörleri

RCC gelişimi için en iyi belirlenmiş risk faktörü sigara kullanımıdır. Sigara içmenin hipoksik koşullara neden olduğu ve sonuçta RCC'ye katkıda bulunan hücresel yolların aktivasyonuna yol açtığı varsayılmaktadır. Yapılan kohort çalışmaları sigara içmeyen kontrollere oranla sigara içen bireylerin RCC geliştirme olasılığı erkeklerde %54, kadınlarda %22 artış göstermiştir. Ayrıca RCC gelişim riski sigara kullanım dozuna bağlı olarak artış göstermiştir. Uzun süreli (10 yıl) sigarayı bırakma durumunda ise durum tersine çevrilebilmiştir. 35 ila 49 yaşları arasındaki bireylerle gerçekleştirilen bir çalışmada ise sigara içenlerin kontrol grubuna oranla RCC geliştirme riski 2 kat artış göstermiştir. Ayrıca Afro-Amerikan bireylerin bu duruma daha yatkın oldukları gösterilmiştir. Ayrıca sigara kullanmayan ancak dumanına uzun

süre (20 yıl) maruz kalan bireyler ile gerçekleştirilen çalışmalarda RCC geliştirme riski 2 ila 4 kat arasında artmıştır (Navai ve Wood, 2012; Hsieh vd., 2017).

Diğer bir risk faktörü ise hipertansiyondur. Hipertansiyon hastalarının kullandığı antihipertansiflerin RCC gelişiminde rol oynadığını öne sürülmüştür. Özellikle, RCC'lerin çoğunluğunun ortaya çıktığı yer olan proksimal tübül üzerinde etkili olan diüretiklerin hastalığın gelişiminde potansiyel bir etken madde olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan analizler sonucunda bireylerde artan kan basıncı ve antihipertansif kullanımıyla beraber RCC geliştirme riski doza bağımlı şekilde artmıştır. Avrupa'da gerçekleştirilen bir araştırma yüksek riskli hipertansiyon hastalarında (sistolik kan basıncı ≥ 160 'a karşı <120) RCC gelişme olasılığının 2,4 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte kan basıncının düzenli olarak düşürülmesinin zamanla RCC riskini azalabileceği gösterilmiştir (Navai ve Wood, 2012).

Hipertansiyon gibi durumlarda kullanılan antihipertansiflerin yanı sıra ağrı kesiciler (analjezikler) de RCC'deki rolleri açısından incelenmiş ancak aralarında kesin bir bağlantı bulunamamıştır. Daha önce renal hücreli pelvik geçişli karsinom ile fenasetin kullanımı arasında bir bağlantı bulunsa da RCC'de böyle bir rolü belirlenememiştir (Navai ve Wood, 2012; Semenza vd., 2001). Aspirin kullanımının beş çalışmadan birinde artmış RCC riski ile ilişkili olduğu belirlenmiş, buna karşılık, parasetamole maruz kalmanın RCC riskinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Statinlerin RCC riskini önemli ölçüde azalttığı (%48) bildirilmiştir (Hsieh vd., 2017).

Dünya çapında obezitedeki artışa benzer şekilde, RCC tanısında küresel olarak net bir yükseliş eğilimi olmuştur. Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu, vücut ağırlığı arttıkça göreceli olarak RCC riskinin arttığını göstermiştir. Vücut kitle indeksinin (BMI) düşük olduğu Asya'da RCC insidansının da düşük olmasıyla, BMI artışının RCC ile arasındaki doğrusal artış ilişkisi doğrulanmıştır. En belirgin artış riski obez hastalarda görülmesine rağmen (BMI ≥ 30 , risk oranı: 2,5), fazla kilolu olanlar da yüksek RCC oranları sergilerler (BMI 25-30, risk oranı: 1,5). Ayrıca RCC riski geliştirmede obeziteden, kadınların erkeklere göre daha fazla etkilendiği görülmektedir (Hsieh vd., 2017). BMI'daki her 5 puanlık artış için sırasıyla erkekler ve kadınlar için göreceli riskte 1,24 ve 1,34 artış gözlemlenmiştir. Hem obez hem de hipertansiyon hastası bireylerde artan RCC riskinin altında yatan mekanizmalar moleküler açıdan araştırıldığında lipid peroksidasyonunun önemli bir rol oynadığı

belirlenmiş ve *in vivo* çalışmalarla bu veriler desteklenmiştir. Lipit peroksidasyonunun yanı sıra hormonal değişikliklerin ve diyabetin RCC için önemli birer risk faktörü olabileceği bilinmektedir (Navai ve Wood, 2012).

RCC riskini obezite kadar beslenme tipi de etkilemektedir. Yüksek meyve ve sebze alımının RCC riskini %32 azalttığı gösterilmiştir ancak daha fazla veriye ihtiyaç vardır. Bununla birlikte kadın ve erkeklerde hafif (0-5 g/gün), orta (15-30 g/gün) ve yüksek (> 30 g/gün) alkol tüketimi göreceli RCC riskini 0,75'ten 0,71'e düşürmüştür. Diyetle glisemik indeks yükünün artışı göreceli RCC riskini 2,56 arttırmaktadır. RCC geliştirme riskini glisemik indeks sigara kullanımıyla aynı oranda etkilemektedir (Navai ve Wood, 2012).

Diğer bir taraftan mesleki faktörler ile RCC riski arasında yapılan çalışmalar mevcuttur. Bunlardan biri asbeste maruz kalmaktır. Asbeste maruz kalma süresinin RCC riskinde artışa neden olduğu bildirilse de (risk oranı 1,4) daha sonra yapılan analizler RCC gelişiminde asbestin rolünün çok yüksek olmadığını göstermiştir. Metal yağ çözücü olarak kullanılan Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından olası bir insan kanserojen olarak kabul edilen trikloretilene (TCE) çevrede ve endüstride maruz kalma riski yüksektir. Almanya'daki fabrika işçileri ile gerçekleştirilen bir çalışmada TCE'ye maruz kalan bireylerde RCC riskinin 8 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Daha sonra başka bir çalışma ile doza bağımlı olarak bu oranın artabileceğini gösteren çalışmalar gerçekleştirilmiştir. TCE'nin *VHL* geninde mutasyona neden olduğu bir çalışmayla gösterilmiş (Brauch vd., 2004) ancak daha sonra yüksek oranda TCE'ye maruz kalan kişilerde *VHL* geni incelenmiş ancak herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir. Bu nedenle TCE ile RCC arasındaki bağlantının aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Navai ve Wood, 2012).

TCE dışında, kurşun, arsenik, pestisitler, benzen gibi birçok kimyasala maruz kalmanın RCC için risk faktörü oluşturmada etkili olabileceği öne sürülmüştür. Krom bileşikleri, inorganik asitler, kauçuk, ozon, hidrojen sülfür, fosforik asit, havacılıkta kullanılan yakıtlar ve ultraviyole radyasyon dahil olmak üzere birçok maddede RCC oluşumu için bir risk görülmüştür. Ayrıca kömür katranı, asfalt, benzidin, zift, mineral yağlar, vinil klorür ve hardal gazın maruz kalan kişilerde artan RCC riski tespit edilmiştir. Bununla birlikte A ve E vitamini sentezi gerçekleştirilen endüstriyel

çalışmalarda görev alan işçilerde RCC riskinde artış gözlemlenmiştir (Navai ve Wood, 2012).

2.2.2. Böbrek Kanserlerinde Diğerk Kaıtsal Risk Faktörleri

RCC tipiyle direkt olarak ilişkilendirilen genler daha önceki bölümlerde incelenmiş olup bu bölümde henüz herhangi bir RCC alt tipi ile tam olarak ilişkilendirilmemiş ancak epigenetik modifikasyonları RCC oluşumunda etkili olan genler incelenmiştir. Epigenetik modifikasyonlar, sitozinlerin metilasyonu yoluyla DNA bazlarının kimyasal modifikasyonunu, histon protein modifikasyonunu veya kodlamayan RNA'lar tarafından düzenlenmesini içerebilir. DNA metilasyonunun RCC'deki rolü, son on yılda aktif bir araştırma alanı olmuştur ve bu kanserde DNA metilasyonu ile epigenetik olarak değıştirilen çeşitli genler, hipometile edici ajanlardan tarafından hedeflenerek gelecekte tedavi stratejilerine ışık tutmaktadır (Tablo 2.2) (Shenoy vd., 2015).

***SFRP1* geni**

Hücre büyümesini ve neovaskülarizasyonu kontrol eden bir WnT antagonisti olan SFRP1 proteinini (*secreted frizzled-related protein 1*) kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. *SFRP1* geninin epigenetik olarak susturulması, kronik inflamasyonla ilişkili premalign dokularda veya insan kanserinde meydana gelmektedir. ccRCC doku örnekleriyle gerçekteştirilen çalışmalarda bu gen 10 tümör doku örneğinin 8'inde hipermetile haldedir (Shenoy vd., 2015). Metastatik RCC'de ise, *SFRP1* hipometilasyonu SFRP1 ekspresyonunu artırır ve histon modifikasyonlarını aktive eder. SFRP1 proteininin aşırı ifadesi, hücre hatlarında invazivlik ile ilgilidir (Cheng vd., 2020).

***Rap1GAP* geni**

Bu gen tümör büyümesi, invazyonu ve metastazında rol oynayan bir protein olan Rap'ı etkisiz hale getiren Rap1GAP proteinini kodlamaktadır. Rap1Gap promotörünün, RCC hücre hatlarında hipermetile durumda olduğu belirlenmiştir (Shenoy vd., 2015). RCC hücrelerinde düşük Rap1GAP ekspresyon seviyelerinin, kısmen promotör hipermetilasyonundan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte RCC hücre hatlarında Rap1GAP ekspresyon seviyeleriyle invazyonun ters ilişkili olduğu ancak bu durumun migrasyonu etkilemediğı belirlenmiştir (Kim vd., 2012).

KILLIN geni

KILLIN geni, hücre döngüsünün durmasında rol oynar ve p53 tarafından düzenlenir. DNA sentezini *in vitro* inhibe eden ve S fazının durmasına neden olan küçük bir nükleer DNA bağlayıcı proteini kodlar. Germline, somatik ve RCC hücrelerinde *KILLIN* metilasyonunu ve ekspresyonunu belirlemek için yapılan bir çalışmada, 41 ccRCC hastasından 23'ü (%56) *KILLIN* promotörünün germline metilasyonunu sergilerken, 50 kontrolden hiçbiri metilasyon göstermemiştir (p <0.0001). 19 primer ve 1 metastatik ccRCC örneği incelendiğinde, 19 örnekte (%95) *KILLIN* geninin promotör bölgesinde hipermetilasyon tespit edilmiştir. Sekiz RCC (RC-6, RC-9, RC-13, RC-45, 786-O, ACHN, Caki-1 ve Caki-2) ve HEK-293T hücre hatlarında *KILLIN* promotörü metilasyon açısından incelenmiştir. HEK293T promotörü tanımlanan dört CpG bölgesinden en az birinde metilasyon göstermiştir. Sekiz RCC hücre hatlarının tümünde *KILLIN* ekspresyonunda belirgin bir azalma vardır (Shenoy vd., 2015).

WIF-1 geni

Wnt (*Wingless type*) inhibitör faktörü-1, Wnt proteinine bağlanan salgılanmış bir glikoprotein antagonistidir. Wnt proteinlerinin hücre çoğalmasında ve onkogeneizde rolü olduğu bilinmektedir. Wnt antagonistleri, SFRP ve Dkk (*Dickkopf*) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. SFRP grubu, (SFRP-1, SFRP-2, SFRP-3, SFRP-4, SFRP-5, WIF-1 ve Cerberus) doğrudan Wnt'ye bağlanır ve Wnt sinyalini inhibe ederler. Dkk ailesi proteinleri, Wnt yolunu inhibe etmek için Wnt reseptör kompleksinin bir bileşenine bağlanır. WIF-1 geninin çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı rolü olduğu bildirilmiştir. Caki-2, ACHN ve A-498 RCC hücre hatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada WIF-1 geni promotör bölgesinde yoğun olarak metillenme mevcutken, normal böbrek hücrelerinde bu genin metillenmediği belirlenmiştir (Shenoy vd., 2015). Ayrıca transfeksiyonla WIF-1 ifadesi arttırılmış hücre hatlarında, apoptoz indüklenmiş, *in vivo* tümör büyümesi baskılanmış, hücre proliferasyonunda ve koloni oluşturma potansiyelinde belirgin bir inhibisyon gözlemlenmiştir. Bu nedenle RCC'de tümör baskılayıcı bir gen olarak ele alınmaktadır (Kawakami vd., 2009).

DKK1 geni

Dickkopf ile ilişkili protein adı verilen bir proteini kodlayan *DKK1*, insan kanserlerinin baskılanmasında rolü olan, doğrudan bir Wnt inhibitörüdür. RCC hücre hatları (A-498 ve 769-P) ve normal böbrek hücre hattı (HK2) ile yapılan bir analizde, RCC hatlarında *DKK1* promotörünün hipermetile olduğu, normal böbrek hücre hattında ise metilasyon

olmadığı ortaya çıkmıştır. RCC doku örnekleriyle gerçekleştirilen bir çalışmada ise kontrole oranla DKK1 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Shenoy vd., 2015). Metilasyondaki artış ise, primer RCC dokularında daha yüksek patolojik aşamalarla ilişki göstermektedir. Hücrelerde *DKK1* ekspresyonu transfeksiyonla arttırıldığında ise apoptozda artış, proliferasyon ve invazyonda azalma meydana gelmiştir. Ayrıca DKK1 ifadesi arttırılmış RCC hücreleri aktarılmış bağışıklık sistemi baskılanmış *nude* fare modellerinde tümör büyümesi baskılanmıştır (Hirata vd., 2011).

SFRP2 geni

Wnt antagonisti olarak görev yapan bir tümör baskılayıcı gen olan SFRP2 ekspresyonunun RCC hasta dokularıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ekspresyonunun neredeyse hiç olmadığı ancak sağlıklı dokularda %70 oranında arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde RCC hücre hatlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarda da normal hücrelere kıyasla SFRP2 ekspresyonu transkripsiyonel olarak daha azdır. Sağlıklı hücrelerde SFRP2'nin promotör bölgesinde metilasyon olmadığı ancak RCC hücre hatlarında yüksek miktarda metilasyon olduğu belirlenmiştir (Shenoy vd., 2015). Diğer bir taraftan RCC hücre hatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada SFRP2 geni ekspresyonu arttırıldığında hücrelerde proliferasyonun arttığı ve bu durumun *in vivo*'da da benzer etki gösterdiği belirtilmiştir (Yamamura vd., 2010).

SFRP5 geni

Bu gen, Wnt sinyal iletim yolunun negatif modülatörleri olarak tanımlanan SFRP glikoprotein ailesinin bir üyesi olan SFRP-5'i kodlamaktadır. *SFRP1* ve *SFRP2*'nin RCC'de epigenetik olarak düzenlendiği gösterilmiştir. RCC hücre hatlarında (A-498, ACHN, Caki-1, Caki-2) ve ccRCC doku örneklerinde SFRP-5 promotorunda yoğun metilasyonu olduğu tanımlanmıştır. Normal hücre hattı ve sağlıklı doku örneklerinde bu bölgede metilasyon mevcut değildir. Ayrıca SFRP-5 mRNA ekspresyonunun RCC hücre hatlarında normal böbrek hücrelerine kıyasla anlamlı derecede azaldığı ($p < 0,01$) belirlenmiştir (Shenoy vd., 2015).

miR-9-1 ve miR-9-3 genleri

miR-9-1, miR-9-2 ve miR-9-3 genleri sırasıyla 1, 5 ve 15 kromozomlarında bulunmaktadır. ccRCC doku ve normal doku örneklerinde miR-9-1 ve miR-9-3'ün metilasyon durumu üzerine yapılan bir çalışmada, normal dokuya kıyasla RCC'de her ikisi için de anlamlı olarak daha yüksek metilasyon seviyeleri (miR-9-1 için

p=0,00021 ve miR-9-3 için p=0,000074) saptanmıştır. Ayrıca, ileri evre tümör örneklerinde hem miR-9-1 (p=0,024) hem de miR-9-3 (p=0,040) için önemli derecede artmış metilasyon eğilimi bulunmuştur. Metastatik nüks taşıyan ve nüks olmayan ccRCC'li hastalarda miR-9 genlerinin metilasyon durumunun rolü incelendiğinde, nüks izlenen hastalarda metilasyon artmıştır. Ayrıca nüks görülmeyen grupta bulunup, miR-9-1 ve miR-9-3 metilasyon seviyeleri yüksek olan hastalarda sağkalım süresinde azalma meydana gelmiştir (Shenoy vd., 2015).

***GREM1* geni**

Bu gen TGF- β sinyal yolundaki bir inhibitör olan Gremlin 1 proteinini eksprese etmektedir. GREM 1, kemik morfogenetik proteinleri (BMP) 2, 4 ve 7'ye karşı bir antagonist olan salgılanan bir glikoproteindir. Bu antagonistik etki, ligandların reseptörlerine bağlanmasını önler, böylece *downstream* TGF- β sinyalini inhibe eder. RCC hücre hatlarında ve tümör örneklerinde *GREM1* geni promotorunda çok yüksek derecede metilasyon ortaya çıkarmıştır (Shenoy vd., 2015). ccRCC hasta örnekleriyle gerçekleştirilen analizlerde *GREM1* geninde metilasyon, artmış malignite ve aktif anjiyogenez ile korelasyon göstermektedir (Vlodrop vd., 2010).

***BTG3* geni**

BTG3 geni anti-proliferatif aktiviteye sahip gibi görünen yapısal olarak ilişkili bir protein ailesi olan BTG/Tob ailesinin bir proteinini kodlar. BTG3'ün, hücre döngüsünün negatif regülasyonuna neden olan E2F1 üzerindeki inhibitör aktivitesi yoluyla aday bir tümör baskılayıcı gen olduğu gösterilmiştir. Bu genin metilasyon durumu sağlıklı ve RCC hücre hatlarında ve dokularda incelenmiştir. RCC hücre hatlarında promotör bölge, normal hücrelere kıyasla tamamen metillenmiştir. Tümör doku örneklerinde de benzer şekilde normal doku örneklerine kıyasla hipermetilasyon belirlenmiştir. Bununla birlikte RCC hücrelerinde BTG3 ekspresyonu daha düşüktür (Shenoy vd., 2015).

***XAF-1* geni**

XAF-1 geni, apoptoz inhibitörü (IAP) protein ailesinin bir antagonisti olan bir proteini eksprese eder. IAP proteinleri, apoptoz sırasında aktif olan kaspazların inaktivasyonunu sağlamaktadır. *XAF-1* tarafından eksprese edilen protein ise IAP'leri inhibe ederek kontrolsüz hücre bölünmesinin önlenmesine yardımcı olur. RCC hücrelerine *XAF-1* genine spesifik siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildiğinde IFN aracılı apoptozun azaldığı tespit edilmiştir (Shenoy vd., 2015). Diğer bir taraftan XAF1

ekspresyonunda azalma, ccRCC'nin ilerlemesinde rol oynamaktadır (Kempkensteffen vd., 2009).

APAF-1 geni

Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (*APAF-1*) geni, apoptoz düzenleyici ağda yer alan 12q23'te lokalize olan p53 hedefli bir gendir. Apoptoza yol açan kaspaz kaskadını uyaran kaspaz 9'un aktivasyonunda rol oynar. *APAF-1*'in inaktivasyonu, apoptozun başlatılamaması ve kontrolsüz hücre büyümesiyle sonuçlanabilir. RCC hücrelerinde normal hücrelere kıyasla APAF-1 geninde metilasyon sıklığının daha fazla olduğu ve bu genin ekspresyonunun tümör doku örneklerinde çok düşük olduğu bildirilmiştir (Shenoy vd., 2015).

DAPK-1 geni

Ölümle ilişkili protein kinaz 1 (*DAPK-1*) geni, sağkalım, apoptoz ve otofajinin hücre sinyal yollarında rol oynayan bir kalmodulin bağımlı serin/treonin kinazı kodlar. Bu, IFN- γ 'nın neden olduğu apoptozun aracısı olarak görev yapan aday bir tümör baskılayıcı gendir ve ekspresyon kaybı çeşitli tümör tipleriyle ilişkilendirilmiştir. Kanser gelişimi sırasında kanser öncesi hücreleri ortadan kaldırmak için tasarlanmış p19ARF/p53'e bağımlı apoptotik kontrol noktasını aktive ederek onkogen kaynaklı dönüşümü önlediği rapor edilmiştir. *DAPK-1* geninde metilasyon sıklığının RCC doku örneklerinde %33, normal dokularda ise %5 olduğu tespit edilmiştir (Shenoy vd., 2015). Ayrıca DAPK-1 ekspresyonunun düşük olması ccRCC'de kötü prognoz ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir (Song vd., 2021).

Nbk/Bik geni

Doğal öldürücü gen (*natural born killer, Nbk*) pro-apoptotik özelliklere sahip, yalnızca dokuya özgü BH3 proteinini kodlamaktadır. Proapoptotik aktivitesinin Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan Bax'a bağlı olduğu bilinmektedir. Sağlıklı böbrek dokusunda Nbk ekspresyonu yüksekken, RCC dokularında düşüktür (Shenoy vd., 2015).

HOXB13 geni

Homeobox 13 geni *homeobox* gen ailesine ait bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. *Homeobox*, anatomik gelişim modelinden sorumlu olan genlerde bulunan bir DNA dizisidir. Protein olarak ifade edildiklerinde DNA'ya bağlanabilen ve diğer genlerin basamaklarını etkinleştirebilen homeodomainleri kodlarlar. *HOXB13* geninin primer böbrek tümörlerinde daha yüksek oranda metillendiği belirlenmiştir. İncelenen 56 primer RCC tümör örneğinin 17'sinde (%30) *HOXB13*'ün tümöre spesifik

metilasyonu görülmüş ve bitişik normal böbrek dokusu örneklerinde bu durum gözlemlenmemiştir. RCC hücre hatlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarda ise 15 hücre hattından 11'inde (%73) *HOXB13*'ün anormal metilasyonu gösterilmiştir. *HOXB13* metilasyonunun tümör derecesi, evresi, boyutu ve mikro damar invazyonu ile anlamlı derecede korelasyon gösterdiği kaydedilmiştir (Shenoy vd., 2015).

***DAL1/4.1B* geni**

DAL1 geni tümör baskılayıcı bir proteine bağlanan aktin bağlayıcı proteini kodlamaktadır. RCC hücre hatlarında incelendiğinde 19 hücre hattının 10'unda (%53) *DAL1* mRNA ekspresyonu olmadığı tespit edilmiştir. RCC hastalarından alınan cerrahi doku örneklerinde de benzer şekilde *DAL1* ekspresyonu normal dokulara oranla azalmıştır ya da yoktur. Ayrıca *DAL1* geni promotor bölgesindeki metilasyonunun ccRCC hastalarında metastatik nüks için bağımsız bir prognostik faktör olduğu bulundu (Shenoy vd., 2015).

***SPINT2/HAI2* geni**

SPINT2 geni, çeşitli serin proteazları inhibe eden bir transmembran proteinini kodlar. *SPINT2* proteini, hepatosit büyüme faktörü (HGF) aktivatörünü inhibe ederek aktif HGF oluşumunu engeller. Aktif HGF, MET'in aktive edilmesinde önemli bir role sahiptir ve bu da RCC büyümesini ve metastazı teşvik eden Ras/MAPK ve PI3K/AKT efektör yollarını aktive eder. İncelenen 102 RCC örneğinden 34'ü ve 38 sağlıklı böbrek örneğinden yalnızca 2'si promotör bölge metilasyonunu göstermiştir (Shenoy vd., 2015).

***Gama(γ)-katenin/JUP* geni**

JUP olarak da bilinen γ -katenin, bir hücre adezyon proteinidir. Bu protein desmozomların ve ara bağlantıların ortak bir bileşenidir. γ -katenin gibi hücre adezyon proteinlerinin fonksiyon kaybının, kanserlerde daha kötü prognozla ilişkili olarak tümör hücreleri arasındaki hücreler arası etkileşimi bozduğu rapor edilmiştir. RCC hücre hatları ve doku örneklerinde, kontrole oranla γ -katenin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Shenoy vd., 2015).

***TCF21* geni**

TCF21 geni, birçok kanserde epigenetik olarak inaktive edilen aday bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır. *TCF21*'in metilasyon durumunun, sağlıklı doku örnekleriyle karşılaştırıldığında ccRCC örneklerinde çok yüksek olduğu bulunmuştur (Shenoy vd., 2015). Ayrıca *TCF21* ekspresyonunun düşük olması düşük sağkalım ile

ilişkilendirilmiştir (Ye vd., 2012). Yapılan analizlerde idrardan RCC tespiti için TCF21 proteininin bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ve metilasyon durumunun hastalığın progresyonu ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir (Xin vd., 2016).

***PCDH17* geni**

PCDH17, kesin mekanizması açıkça tanımlanmamış olmasına rağmen hücre adezyonu, sinyal iletimi ve büyüme kontrol fonksiyonlarından dolayı tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip olduğuna inanılan bir protokaderini kodlamaktadır. Ürolojik kanserler açısından değerlendirildiğinde PCDH17 promoter bölgesinin mesane kanseri örneklerinin %48'inde, RCC örneklerinin %61'inde ve prostat kanseri örneklerinin %60'ında hipermetile olduğu belirlenmiştir (Shenoy vd., 2015).

***HIC1* geni**

Bu gen, transkripsiyonel baskılayıcı olarak işlev gören bir proteinini kodlamaktadır. Genin, p53 ve E2F1 ile birlikte DNA hasarı yanıtlarını düzenleyen karmaşık düzenleyici döngülere katıldığı gösterilmiştir. HIC1 fonksiyonunun kaybı, çeşitli tümörlerin ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmiştir. RCC'de nüks gerçekleşmeden sağkalım oranının *HIC1* geni CpG adacıklarındaki hipermetilasyonla ilişki gösterdiği tespit edilmiştir (Shenoy vd., 2015).

***LRRC3B* geni**

LRRC3B geni, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş, lösün açısından zengin tekrar içeren bir proteindir ancak biyolojik önemi büyük ölçüde bilinmemektedir. İnsan genomunun 2000'den fazla LRR içeren proteine sahip olduğu ve bunların bitki ve hayvan bağışıklığı, hormon-reseptör etkileşimleri, hücre yapışması, sinyal iletimi, gen ifadesinin düzenlenmesi ve apoptoz gibi birçok önemli sürece katıldıkları öne sürülmüştür *LRRC3B*'nin çeşitli kanserlerde ekspresyonunun azaldığı ve bu genin karsinogenezde rol aldığı bildirilmiştir. RCC'deki rolü üzerine yapılan bir çalışmada, incelenen böbrek kanseri örneklerinin %57'si hipermetilasyon ve/veya delesyon göstermiştir. *LRRC3B* ekspresyonunun RCC'nin 1 ve 2. aşamalarında neredeyse değişmediği ancak 3. aşamada 2 ila 6 kat azaldığını ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca in vitro analizlerde bu genin hücre proliferasyonunu inhibe edici bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle tümör baskılayıcı bir gen olmaya adaydır (Shenoy vd., 2015).

GATA5 geni

GATA5, çeşitli kanserlerde ekspresyonu azalan bir tümör baskılayıcı gendir. ccRCC'de artan *GATA5* metilasyonu metastaz ($p=0,005$) ve sağkalımın azalması ($p=0,005$) ile korelasyon göstermektedir (Shenoy vd., 2015). Bununla birlikte *GATA5* geni CpG adacıklarında meydana gelen metilasyonların RCC progresyonunun analizinde potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Peters vd., 2012).

RASSF1 geni

Tümör baskılayıcı bir özellik gösteren *RASSF1* geni, alternatif *splicing* ve promotor kullanımı nedeniyle birçok izoforma sahiptir ancak daha uzun izoform olan *RASSF1A*'nın epigenetik susturulması özellikle kanserle ilişki göstermektedir. *RASSF1A* işlevsel olarak hücre döngüsünün kontrolünde, mikrotübül stabilizasyonunda, hücre adezyonunda, hareketlilikte ve apoptozda rol oynamaktadır. pRCC dokuları sağlıklı doku örnekleri ile karşılaştırıldığında *RASSF1A* promotorunda metilasyonun arttığı belirlenmiştir (pRCC'de 2,11 iken; sağlıklı dokularda 0,61 $p<0,001$). *RASSF1A* promotorunun metilasyon düzeyi, evre 3 ve 4 RCC'li hastalarda, evre 1 ve 2'deki hastalara göre daha fazladır ($p=0,043$). Daha yüksek metilasyon seviyesi, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir ($p=0,0053$)., *RASSF1A*'nın diğer RCC türleriyle karşılaştırıldığında pRCC'de önemli ölçüde daha yüksek metilasyon yüzdesine sahip olduğu gözlenmiştir (Shenoy vd., 2015).

UNC5C geni

UNC5C gen ürünü, Netrin-1 reseptörlerinden biri olarak görev yapar ve Netrin-1 ligandının yokluğunda apoptozu indüklemeye yeteneğine sahiptir. *UNC5C*, RCC'lerin çoğunun kaynaklandığı böbreğin proksimal tübülünde eksprese edilir. Beş RCC hücre hattıyla gerçekleştirilen bir çalışmada (786-O, Os-RC-2, A498, ACHN, Caki-1) Caki-1 hücre hattında *UNC5C*'nin çok az eksprese edilirken diğer dört hücre hattında tespit edilemeyecek kadar düşük seviyede bulunduğu belirlenmiştir. 786-O ve Os-RC2 hücre hatlarında *UNC5C*'nin hipermetillendiği bulunmuştur. Doku örnekleri analiz edildiğinde ise RCC'de normal dokuya kıyasla *UNC5C*'nin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca normal dokularda metilasyon bulunmazken RCC örneklerinde promotör bölgede hipermetilasyon tespit edilmiştir (Shenoy vd., 2015).

KRT19 geni

KRT19 geni, protein sitokeratin (CK) 19'u kodlar. Akt sinyali negatif olarak düzenleyen potansiyel bir tümör baskılayıcıdır. Normal böbrek dokusunda CK19, distal tübüller ve toplama kanalı hücreleri tarafından eksprese edilir. *KRT19*'un metilasyonu ve ekspresyon seviyeleri için RCC hücre hatları 769-P, 786-O, Caki-1, Caki-2, A-498, ACHN ve 112 RCC hasta örnekleri üzerinde bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Promoter metilasyonu ve mRNA bağıl ekspresyon seviyeleri, 769-P, Caki-1, Caki-2, A-498 ve ACHN'de istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) ters orantı göstermiştir. 112 RCC doku örneğinin 23'ünde *KRT19* hipermetilasyonu gözlemlenmiştir (52 ccRCC'den 9'unda; 22 pRCC'den 6'sında; 22 kromofob RCC'den 2'sinde ve 16 onkositomadan 6'sında) (Shenoy vd., 2015).

GATA3 geni

Bu gen tarafından kodlanan GATA3 proteini, Th2 (T helper 2 hücreleri) gelişimini ve fonksiyonunu düzenlemede rol oynamaktadır. İnsan böbrek embriyogenezi sırasında seçici olarak eksprese edilmektedir. GATA3 ekspresyonunun ccRCC'nin tüm aşamalarında ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. *GATA3* gen promotorunun, tümör örneklerinde güçlü bir şekilde metillendiği bulunmuştur (Shenoy vd., 2015).

TIMP3 geni

Bu genin ürünü MMP inhibitörlerinin bir üyesidir ve VEGFR-2 için fizyolojik bir antagonisttir. VEGF sinyali, çoğu ccRCC tümöründe oldukça artar. Bununla birlikte yüksek dereceli tümör örneklerinde TIMP3 mRNA ekspresyonunun önemli derecede düşük olduğu belirtilmiştir (Masson vd., 2010). ccRCC için nefrektomi uygulanan 105 hasta üzerinde yapılan bir araştırmada ise, normal böbrek dokusuna kıyasla 105 hastanın 100'ünün TIMP3 ekspresyonunu azalttığını ortaya koymuştur. 12 RCC hücre hattının 4'ünde (%33), 36 tümör örneğinin 28'inde (%78) ve 27 sağlıklı doku örneğinin hiçbirinde TIMP3 geni promotör bölgesinde hipermetilasyon tespit edilmiştir (Shenoy vd., 2015).

TU3A geni

TU3A, aday bir tümör baskılayıcı gendir. Caki-1, ACHN ve NC65'in hücre hatları incelendiğinde ACHN'nin düşük *TU3A* ekspresyonuna sahip olduğunu, diğer ikisinin ise herhangi bir ekspresyon göstermediği belirlenmiştir. *TU3A*, ccRCC vakalarının %42'sinde ve pRCC'nin %25'inde metilasyona uğramıştır. Ayrıca *TU3A*

promotörünün hipermetilasyonunun ileri tümör evresi ve hastalığa özgü zayıf sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bulunmuştur (Shenoy vd., 2015).

DLK1 geni

DLK1 (14q32), paternal olarak eksprese edilen ve adipositler de dahil olmak üzere birçok hücre tipinin farklılaşmasında yer alan bir transmembran proteinini kodlayan bir gendir. RCC'lerde 14q32'de yaygın delesyonlar dikkat çekmektedir. RCC tümörlerinin oluşumunda *DLK1*'in rol oynadığını öne sürülmüştür. 50 primer ccRCC dokusuyla gerçekleştirilen bir çalışmada ccRCC örneklerinin 39'unda (%78) *DLK1* ekspresyonu kaybı olduğu, buna karşın *DLK1* ekspresyonunun her normal böbrek dokusunda korunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan immünohistokimyasal analizler sonucunda *DLK1* proteininin RCC'lerin köken aldığı renal tübüler hücrelerde eksprese edildiği ortaya çıkmıştır. *DLK1*'in ekspresyonunun transfeksiyonla artırıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, apoptozda artış meydana geldiğini göstermiştir. Bu da *DLK1*'in tümör baskılayıcı aktivitesi bulunduğunu göstermektedir (Shenoy vd., 2015).

Konneksin 32 (Cx32) geni

Cx32 geni, hücreler arasında iyonların ve küçük moleküllerin transferini kolaylaştıran kanalların bir parçasını oluşturan bir *gap junction* proteinini kodlar. Hemodiyaliz hastalarında gerçekleştirilen çalışmalarda konneksin 32'nin RCC'ye karşı tümör baskılayıcı bir rolü olduğu bildirilmiştir (Shenoy vd., 2015).

ECAD geni

ECAD geni, kalsiyuma bağımlı bir hücre-hücre adezyon glikoproteinini lan E-kaderini kodlar. Gendeki fonksiyon kaybı çeşitli kanserlerde artan proliferasyon, invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. *ECAD* gen promotör metilasyonu ile tümör gradesi arasında korelasyon gözlemlenmiştir. *ECAD* geni promotorunda grade 3 RCC tümörlerinde %100, grade 2 ve 1'de %57 metilasyon belirlenmiştir. 769-P, 786-O, Caki-1 ve Caki-2 hücre hatlarının, *ECAD* geni promotorlarındaki CpG adacıklarının çoğunda, normal böbrek hücrelerine kıyasla daha yüksek derecede metilasyon saptanmıştır (Shenoy vd., 2015).

HOXA5 geni

Bu gen, gen ifadesini, morfogenezi ve farklılaşmayı kontrol eden bir DNA bağlama transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Protein, bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün ifadesini artırır ve metilasyon yoluyla epigenetik susturulması bu nedenle tümör

oluşumunda önemli bir rol oynayabilir. ccRCC doku örneklerinde HOXA5'in yüksek metilasyonu yüksek Fuhrman nükleer grade ile korelasyon göstermektedir. *HOXA5* geninin metilasyon oranı RCC dokularında %51,6 iken normal dokuda %21'dir. Ancak *HOXA5* metilasyon durumu ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Shenoy vd., 2015).

***MSH2* geni**

DNA *mismatch* onarım proteini MSH2'yi kodlayan bu gende metilasyon oranı kanser dokusunda %54,8 iken normal dokuda %26,'dir. MSH2 metilasyon durumu ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Shenoy vd., 2015).

***FHIT* geni**

ccRCC'de VHL genindeki mutasyonların yanı sıra *FHIT* geninde yer alan mutasyonların da katkısı olabilir. *FHIT* geni, pürin metabolizmasında rol oynayan bir diadenozin 5',5'''-P1,P3-trifosfat hidrolazı kodlamaktadır. Genin, çeşitli kanserlerde büyüme inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu yoluyla bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket ettiği bildirilmiştir. *In vivo*'da gerçekleştirilen çalışmalarda re-ekspresyonun tümör baskılayıcı etkiye sahip olduğu belirlenen *FHIT* geninin kaybı, birçok tümör tipinde ortak olmakla birlikte promotör metilasyonu hem ccRCC'de hem de pRCC'de yaygın olarak gözlemlenebilir (Shenoy vd., 2015).

***UQCRH* geni**

UQCRH, mitokondriyal *hinge* proteinini kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. ccRCC tümörlerinin %36'sında hipermetile olduğu ve baskılandığı tespit edilmiştir (Shenoy vd., 2015). Bununla birlikte ccRCC hastalarında daha kısa sağkalımının düşük *UQCRH* ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Luo vd., 2020).

***DACH1* geni**

DACH1 siklin D1 ekspresyonunu inhibe eden bir tümör baskılayıcıdır ve RCC'de hipermetilasyon yoluyla baskılandığı bilinmektedir (Chu vd., 2014; Shenoy vd., 2015).

Tablo 2. 2. RCC’de metilasyon ile epigenetik modifikasyona uğradığı bilinen genlerin listesi (Shenoy vd., 2015)

Gen	Fonksiyon	RCC’de normal dokuya kıyasla promotör metilasyonu	RCC’de normal dokuya göre gen ekspresyonu	Hipometilasyon ajanının gen ekspresyonu üzerine etkisi
TCF-21	Farklılaşmanın spesifikasyonunda yer alan tümör baskılayıcı gen	↑↑	↓	↑
PCDH17	Kalsiyuma bağımlı hücre adezyonunda rol oynayan tümör baskılayıcı gen	↑↑	↓	?
LRRC3B	Hücre adezyonu ve apoptozda rol oynayan tümör baskılayıcı gen	↑↑	↓	?
SFRP1	Wnt antagonisti tümör baskılayıcı	↑↑↑	↓↓	?
RAP1GAP	Tümör baskılayıcı (Rap aracılı invazyonu ve metastazı etkisiz hale getirir)	↑↑	↓	↑
RASSF1	Tümör baskılayıcı (hücre döngüsü kontrolü, mikrotübül stabilizasyonu)	↑↑↑	↓↓	↑↑
UNC5C	Tümör baskılayıcı (apoptoz indüksiyonu)	↑↑	↓↓	↑↑
KILLIN	Tümör baskılayıcı (hücre döngüsü durması, p53 tarafından düzenlenir)	↑↑↑	↓↓	↑↑
KRT19	Miyofibrillerin organizasyonu ve epitel hücrelerinin yapısal bütünlüğünün korunması	↑↑	↓↓	↑↑
HOXA5	Tümör baskılayıcı (p53’ün <i>up</i> -regülasyonu)	↑	?	?
MSH-2	DNA <i>mismatch</i> onarımı	↑	↓	↑
miR-9-1 ve miR-9-3	Gen transkripsiyonu ve translasyonunun hedefli baskılanması	↑	↓	?
DKK	Tümör baskılayıcı Wnt doğrudan inhibitörü	↑↑	↓	↑(Genin transfeksiyonu hücre proliferasyonunu ve invazyonu engeller ve apoptozu artırır)
SFRP5	Tümör baskılayıcı Wnt antagonisti	↑↑↑	↓↓	↑↑(Gen transfeksiyonu, yüzeyden bağımsız koloni oluşum kabiliyetini ve invazyonu engeller ve apoptozu artırır)

Tablo 2.2. RCC’de metilasyon ile motive edildiği bilinen genlerin listesi (devamı)

Gen	Fonksiyon	RCC’de normal dokuya kıyasla promotör metilasyonu	RCC’de normal dokuya göre gen ekspresyonu	Hipometilasyon ajanının gen ekspresyonu üzerine etkisi
GATA-3	TBRIII sinyali. Hücre proliferasyonunun inhibitörü	↑↑↑	↓↓	↑↑
TIMP-3	VEGF-3 antagonisti, MMP inhibitörü	↑↑	↓↓	?
GREM-1	TGF-β sinyalinin inhibisyonu	↑↑	↓↓	↑↑
WIF-1	Wnt antagonisti	↑↑↑	↓↓	↑↑(Gen transfeksiyonu hücre canlılığını azalttı, koloni oluşumunu baskıladı ve apoptozu artırdı)
UCHL1	Proteinlerin übikütinasyonu	↑↑	↓	↑
BTG3	E2F1 inhibisyonu → hücre döngüsünün negatif düzenlenmesi	↑↑↑	↓↓	↑↑
TU3A	Tümör baskılayıcı, mekanizması bilinmiyor	↑↑	↓	↑
14-3-3 sigma	DNA onarımı için G2 fazına geçişi engeller	↑	↓	↑
p16	Siklin kinaza bağımlı inhibisyon → hücre döngüsü durmasına neden olur	↑	↓	?
SFRP2	Wnt antagonisti	↑↑↑	↓↓	↑↑
FHIT	Tümör baskılayıcı, apoptoz indüksiyonu	↑↑	↓↓	?
XAF-1	Pro-apoptotik gen, apoptozu inhibe eden proteinleri inhibe eder	↑↑	↓	↑
APAF1	Pro-apoptotik gen, kaspaz 9 aktivasyonu	↑↑↑↑	↓↓↓	↑↑
DAPK-1	IFN-γ kaynaklı apoptozun aracısı	↑	↓	?
DLC-1	RhoAGTPaz inhibitörü	↑	↓	?
DLK-1	Pro apoptotik gen	↑↑	↓↓	↑↑ (Transfeksiyon hücre proliferasyonunu azaltır, apoptozu artırır)
HOX-B-13	Pro apoptotik gen	↑↑↑	↓↓	↑↑ (Transfeksiyon hücre proliferasyonunu azaltır)
DAL-1	Protein 4.1 ile ilişkili tümör baskılayıcı gen	↑↑	↓	↑
SPINT-2	Tümör baskılayıcı: Ras yolunu aktive eden HGF’yi inhibe eder	↑↑	↓	?

Tablo 2.2. RCC’de metilasyon ile motive edildiği bilinen genlerin listesi (devamı)

Gen	Fonksiyon	RCC’de normal dokuya kıyasla promotör metilasyonu	RCC’de normal dokuya göre gen ekspresyonu	Hipometilasyon ajanının gen ekspresyonu üzerine etkisi
Gama-katenin	Hücre-hücre adezyonunda rol oynar. Fonksiyon kaybı kanserde daha kötü prognoz ile ilişkili	↑↑↑	↓↓	↑↑
Konneksin-32	Gap junction proteini. Hemodiyaliz hastalarında artmış RCC insidansında rol oynayabilir	↑↑	↓↓	?
Ecad	Tümör baskılayıcı: hücre-hücre adezyonu glikoproteinini kodlar	↑↑	↓↓	↑↑
HLA-G	Tümör promotörü: tümör hücrelerinin immün sistemden kaçmasına yardımcı olur	?	↑	↑
IL-8	Tümör promotörü: anjiyogenezi ve metastazi destekler	↓ (genomik hipometilasyon)		?
CA9/G250	Tümör promotörü: hipoksik tümörlerde eksprese edilir, çevredeki asidik pH’ı nötralize eden ve kanserin ilerlemesine yardımcı olan bikarbonat üretir	↓↓	↑↑	↑
CYTIP	Metastazi teşvik eder. Tümör hücrelerinin hücre ölümü sitokinlerinden kaçmasına yardımcı olur	↑↑	?	↑

2.2.3. Böbrek Kanseri Güncel Tedavi Yöntemleri

Metastatik olmayan RCC’li hastalarda birincil tedavi yöntemi kısmi ya da radikal nefrektomi adı verilen cerrahi işlemdir (Angori vd., 2022). Direkt olarak cerrahi işlemlerin gerçekleştirilebilmesi için nefronların ve böbreğin doğal yapısının olabildiğinde korunması açısından tümörün büyüklük olarak 3 cm’den fazla olması gerekmektedir (Linehan vd., 2003). Ayrıca RCC’li hastaların yaklaşık %15’i metastatik durumdadır. Metastatik RCC’ye sahip hastaların çoğunluğunda tedavi cerrahi olmayan bir şekilde yönetilirken (%70), yaklaşık %30’u nefrektomi adı verilen cerrahi yönetime tabi tutulur. Hedefe yönelik tedavilerin ortaya çıkmasından önce, sitokinlerle tedavi edilen metastatik RCC’li hastaların sağkalımı ortalama 10 ay olarak belirlenmiştir. Hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesiyle birlikte bu hastalarda ilerlemesiz sağkalım oranı yaklaşık 27 aya, genel sağkalım ise 40 aya yükselmiştir.

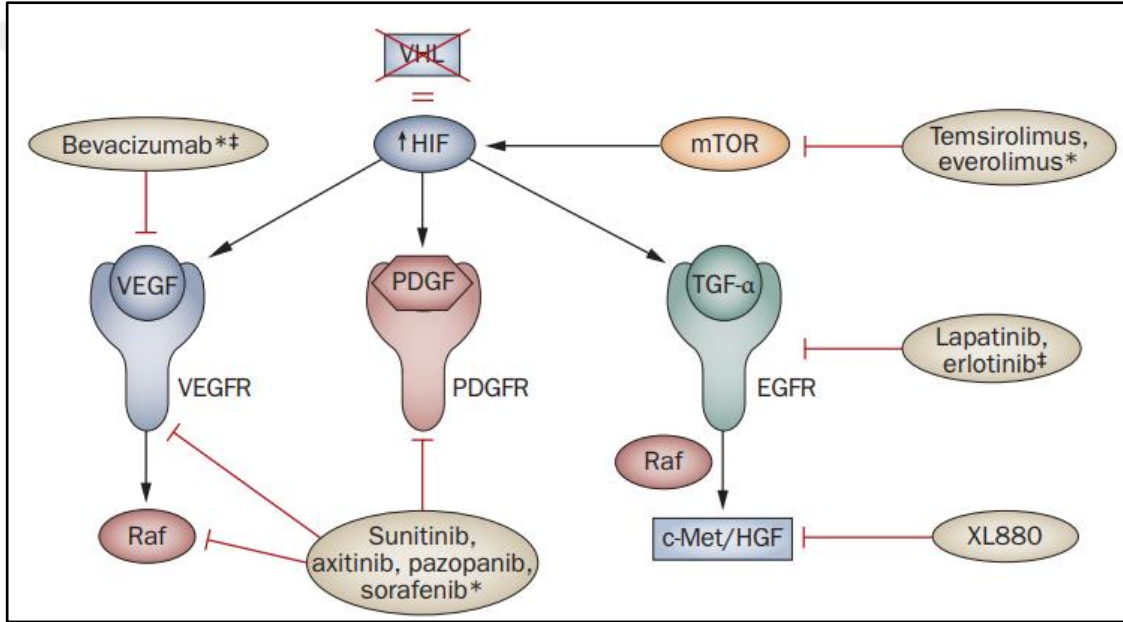
Diğer bir taraftan hastalara hedefe yönelik tedavilerin cerrahi işlem öncesi ya da sonrası mı uygulanması gerektiği hala bir tartışma konusudur (Sun vd., 2010).

Metastatik ya da ameliyat edilemeyen RCC'lerde ise tipik olarak sistemik veya hedef odaklı terapi yöntemlerine başvurulmaktadır. Hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinden önce interferon (IFN) ve interlökin 2 (IL-2) gibi sitokinler RCC tedavisinde en önemli moleküllerdi. Aktive edilmiş T hücreleri, hücre zarı üzerindeki IL-2 reseptörlerine bağlanarak sitotoksik aktivitenin güçlenmesine neden olurlar. Bu durum sitolitik fonksiyonlara ve hücresel efektörlerin (doğal katil hücreleri (NK) ve T lenfositleri gibi) çoğalmasına neden olur. Bu nedenle kanser tedavisinde intravenöz olarak IL-2 uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bazı klinisyenler IL-2'nin kullanımını etkinliğini en üst düzeye çıkarmak ve genel sağkalımı arttırmak için birinci basamak tedavi ile sınırlamaktadır. Ancak yüksek dozda IL-2 uygulamaları hastalarda kardiyak toksisiteye neden olmaktadır. Bununla birlikte klinik veriler IL-2 uygulamalarının genç hastalarda tolere edilebileceğini ancak ileri yaştaki hastalarda uygulamanın sınırlı olduğunu göstermiştir (Barata ve Rini, 2017; Hsieh vd., 2017; Sun vd., 2010).

Lökosit türevli IFN'ler ise lenfositler, lenfoblastlar ve makrofajlar tarafından üretilen interferon α türlerinin bir karışımından oluşmaktadır. IFN- α , makrofaj ve monositlerin aktivasyonunu, NK hücrelerinin ve sitotoksik T lenfositlerin aktivitesinde artışı ve hücre yüzeyinde antijen ekspresyonunu indüklediği için önemli bir antikanser aktivitesine sahiptir. Klinik uygulamalarda, metastatik RCC'li hastaları tedavi etmek için rekombinant IFN'ler kullanılmaktadır. Subkutan olarak IFN tedavisi uygulandığında hastalarda bir yıllık mortalite azalmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar IFN uygulamalarının özellikle metastatik RCC hastalarında etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermiştir. Yine de VEGF'yi doğrudan hedef alan bir monoklonal antikor olan bevacizumab gibi yeni tedavi yöntemleriyle birlikte kombine olarak kullanılabilir (Hsieh vd., 2017; Sun vd., 2010).

VHL tümör baskılayıcı geninin RCC'deki rolünün aydınlatılmasının ardından, 2007 ve 2008 yıllarında metastatik RCC tedavisi için beş yeni molekül geliştirilmiştir. Hücrelerde VHL proteini HIF proteinlerinin düzenlenmesi yoluyla oksijen değişikliğine karşı yanıt geliştirilmesini sağlamaktadır. VHL proteini, HIF- α alt biriminin bozunmasına neden olurken, VHL mutasyonu bulunan RCC hücrelerinde bu durum söz konusu değildir. Dolayısıyla HIF proteininin ifadesinde artış meydana gelir. HIF ekspresyonundaki artışla beraber VEGF, PDGF ve TGF- α gibi proteinlerin ifadesi

de artar. VEGF ve PDGF yolları, küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri olan sunitinib, sorafenib, pazopanib ve aksitinib tarafından hedeflenebilir. HIF ekspresyonu VHL dışında memeli rapamisin hedefi (mTOR) sinyal yolağıyla da düzenlenir. mTOR, HIF aktivitesinde artışa neden olduğundan mTOR inhibitörleri olan temsirolimus ve everolimus RCC için birer tedavi seçeneğidir (Şekil 2.10). Diğer bir taraftan VEGF reseptörü tirozin kinaz inhibitörleri olan pazopanib, axitinib, vandetanib ve cediranib; integrin inhibitörü olarak volosiksimab ve vitaksin gibi tedavi seçenekleri mevcuttur (Sun vd., 2010). Ancak nccRCC grubu hastalar bu ajanlara karşı daha kötü bir yanıt göstermiş ve ccRCC hastalarına oranla sağkalım süresi azalmıştır (Angori vd., 2022).



Şekil 2. 10. RCC'den sorumlu moleküler yollar ve tedavi olanakları. (*Dikey, ‡Yatay blokaj) (Sun vd., 2010).

pRCC'li hastalarda sıklıkla VHL mutasyonu olmadığından VHL'ye yönelik tedavi olanaklarının etkisi sınırlıdır. pRCC'de sıklıkla *MET* geninde amplifikasyonu veya mutasyonlarla tekrarlayan değişiklikler görülmektedir. *MET* geni hücre proliferasyonunu ve anjiogenezi düzenlemek için hepatosit büyüme faktörü (HGF) ile birlikte çalışan transmembran tirozin kinaz reseptörü c-met'i eksprese eder. c-met'in anormal ifadesi tümör oluşumuna, invazyona ve migrasyona neden olmaktadır. Bu nedenle pRCC tedavisinde sıklıkla *MET* geninin aşırı ifadesine yönelik stratejiler izlenmektedir. İkili bir MET-VEGF inhibitörü olan Cabozantinib, pRCC hastalarının tedavisi için 2016 yılında onaylanmış ve tüm nccRCC grubu hastalar için geniş bir

tedavi olanağı haline gelmiştir. Ayrıca MET kinaz inhibitörü olan Savolinibin de pRCC tedavisinde kullanılmaktadır. MET aktivasyonu, EGFR ekspresyonu ile da ilişkili olduğundan MET ve EGFR inhibitörlerinin (Tivantinib ve Erlotinib) kombinasyonları da tedavi seçeneğidir. pRCC'nin sporadik ve herediter formlarında incelenmiş olan ve modifikasyona uğramış c-met yolunu inhibe edebilen XL880 (Foretinib) bir tirozin kinaz inhibitörü olarak uygulanabilir (Qian vd., 2009; Sun vd., 2010). İlk kez 2021'de 165 nccRCC hastasında faz 2 klinik çalışmasında uygulanan Pembrolizumab ise pRCC hastalarında umut verici bir klinik aktivite göstermiştir. Benzer şekilde Nivolumab tek başına veya VEGF inhibitörü Cabozantinib ile kombinasyon halinde pRCC'de de yüksek etkinlik göstermiştir (Angori vd., 2022).

Her ne kadar sağkalım gibi klinik çıktılar daha önemli olsa da tedavi gören RCC'li hastaların yaşam kalitesi açısından uygulanan anti kanser ajanların yan etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır (Tablo 2.3). Bu nedenle hastalarda yan etkileri en aza indirecek ve sağkalım oranını yükseltecek yeni nesil anti kanser ajanlara ve tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tablo 2. 3. Onaylanmış ajanların bazı yan etkileri yaşam kalitesine etkisi (Hsieh vd., 2017).

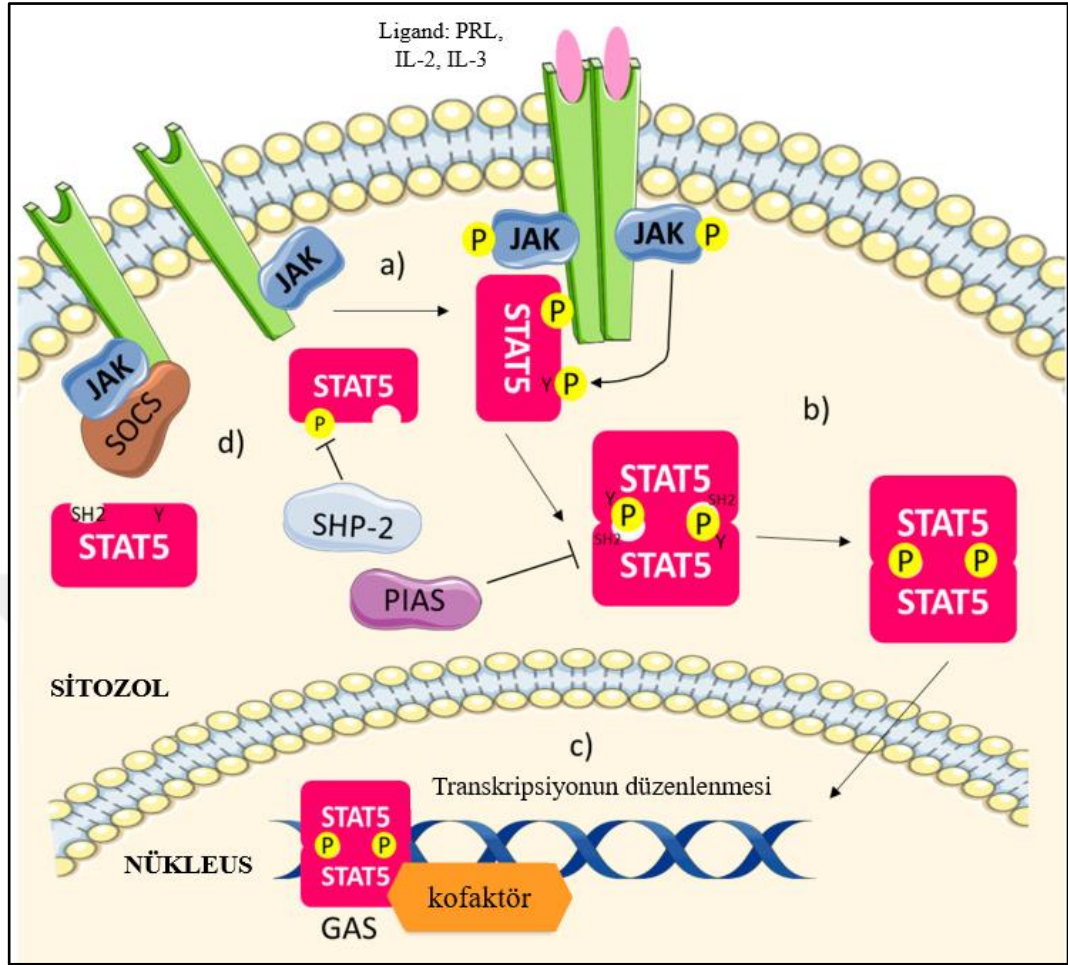
İlaç	Yan Etki	Yaşam Kalitesinde İyileşme
Axitinib	Hipertansiyon, ishal, hipotiroidizm ve el-ayak sendromu	Sorafenib'e oranla iyi
Bevacizumab	Proteinüri, hipertansiyon ve kanama	Rapor edilmemiş
Cabozantinib	İshal, el-ayak sendromu, hipertansiyon, bulantı ve hipotiroidizm	Rapor edilmemiş
Everolimus	Stomatit, hiperkolesterolemi, hiperglisemi ve pnömoni	Plaseboya oranla kötü
Nivolumab	Kolit, pnömoni ve endokrinopatiler	Everolimus'a oranla iyi
Pazopanib	İshal, hipertansiyon, karaciğer fonksiyon testi anormallikleri ve el-ayak sendromu	Plaseboya oranla kötü, Sunitinib'e oranla iyi
Sorafenib	Hipertansiyon, ishal, el-ayak sendromu ve döküntü	Plaseboya oranla iyi
Sunitinib	İshal, el-ayak sendromu, mukozit ve hipertansiyon	IFN- α 'ya oranla iyi
Temsirolimus	Stomatit, hiperglisemi, hiperkolesterolemi ve ödem	IFN- α 'ya oranla iyi

2.3. Renal Hücreli Karsinomada JAK/STAT Sinyal Yolağı

2.3.1 JAK/STAT Sinyal Yolağı

Transkripsiyon sinyal dönüştürücü ve aktivatörü (STAT) ailesi STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olmak üzere yedi üyeden oluşmaktadır. Bu proteinler, sitokin sinyallemesine yanıt olarak *Janus* kinazlar (JAK'lar) tarafından fosforilasyon üzerine aktive edilen transkripsiyon faktörleridir. IL-2 ya da IL-3 gibi bir sitokin, reseptörüne bağlandığında hücre zarı yüzeyinde bulunan bu reseptörler dimerize ya da multimerize olarak aktif hale gelirler. Ardından JAK proteinlerinin fosforile olmasını indüklerler. Fosforile olarak aktif hale gelen JAK'lar STAT proteinleri ile etkileşime geçerek tirozin kalıntıları üzerinden

fosforilasyonlarını sağlarlar. Fosforile edilmiş STAT proteinlerinin tam aktivasyonu ancak homo veya heterodimerize olduklarında meydana gelir. Bu aşamada bir STAT5 molekülünün SH2 alanı, diğer STAT5 molekülünün fosfo-tirozin (pY) kalıntısıyla etkileşime girmektedir. Ardından dimerize haldeki STAT5, nükleusa transloke olur ve yapısında bulunan DNA bağlanma alanları ile (DBD) transkripsiyonunu indükleyeceği genlerin promotorlarının IFN- γ ile aktive olan bölgelerine (*interferon gamma activated sites*, GAS) verimli bir şekilde bağlanır (Şekil 2.11). STAT5'in transkripsiyonunu sağladığı hedef genleri arasında hücre proliferasyonunu indükleyen *siklin D1* ve serin/treonin kinaz *Pim-1* gibi genler bulunur. Bunun yanı sıra *Janus* kinaz bağlayıcı protein (JAB) gibi apoptozda yer alan genlerin transkripsiyonel olarak düzenlenmesini de üzerinde bulunan transaktivasyon alanı (TD) aracılığıyla sağlar. STAT5'in transkripsiyonel aktivitesi bromodomainler ve ekstra terminal alan (BET) ailesinin üyesi olan sentrozomal P4.1 ile ilişkili protein (CPAP) gibi protein kofaktör/aktivatörleri tarafından modüle edilebilir. Örneğin adiposit hücrelerinde olduğu gibi glukokortikoid reseptörü ve CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein (*CCAAT/enhancer binding protein*, C/EBP) ile hücre tipine spesifik transkripsiyon faktörleri tarafından da STAT5'in transkripsiyonel aktivitesi modüle edilebilir. Bu sinyal yolağının negatif regülasyonu ise fosfatazlar, sitokin sinyalleme baskılayıcıları (*the suppressors of cytokine signalling*, SOCS) ve STAT aktivasyonunu önleyen aktifleştirilmiş STAT protein inhibitörleri (*protein inhibitors of activated STAT*, PIAS) tarafından sağlanmaktadır. SOCS'ler, STAT5 fosforilasyonunu inhibe etmek için JAK'lara ve reseptörlere bağlanabilir. Öte yandan PIAS'ler, STAT5'in dimerizasyonunu bozarak aktivasyonunu önler ve bu nedenle STAT5, GAS bölgelerine bağlanmak için nükleusa transloke olamazlar (Halim vd., 2020).

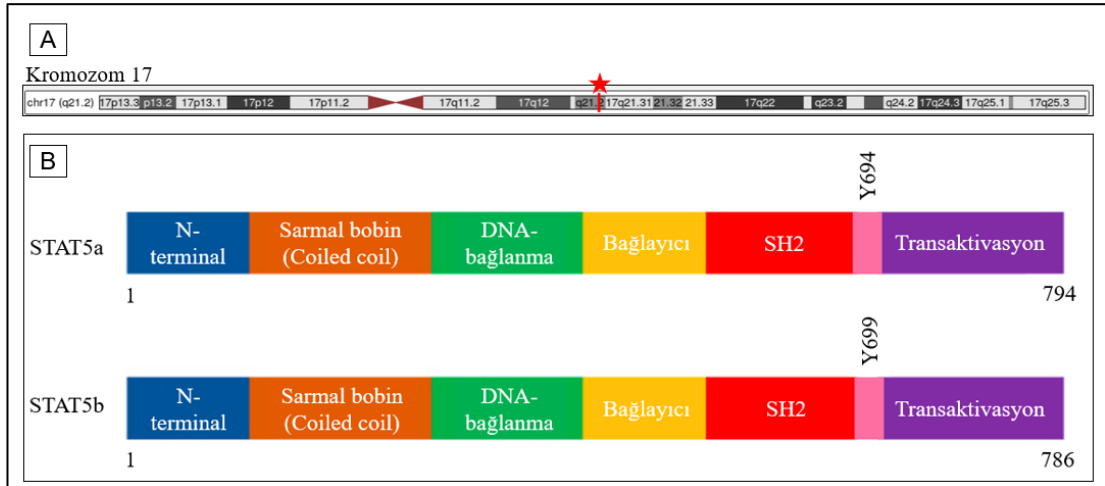


Şekil 2. 11. JAK/STAT sinyal yolağının aktivasyonu (Halim vd., 2020).

Son yıllarda, STAT3 ve STAT5 transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyonunu yalnızca gen promotörlerine bağlanarak değil, aynı zamanda çeşitli kromatin yeniden modelleyicilerini de dahil ederek, gen ekspresyonunu ve kromatin durumlarını etkileyebildiği gösterilmiştir. STAT3/5, histon asetiltransferazlar (HAT'ler), histon deasetilazlar (HDAC'ler) ve TET1/2 (*ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*) ya da DNMT1 (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*) gibi çeşitli kromatin yeniden modelleme veya DNA değiştirici enzimleri aracılığıyla bir hücredeki kromatin modellemesini değiştirebilir. STAT proteinleri bu etkileşimler yoluyla ökromatin veya heterokromatin oluşumu ya da DNA metilasyonu sağlayarak gen ekspresyonu değiştirilebilir. Ayrıca STAT proteinlerinin kendileri de bu enzimler tarafından posttranslasyonel olarak modifiye edilebilir (Orlova vd., 2019).

2.3.2. STAT5 Proteini İzoformları ve Fizyolojik Roller

STAT5 laktasyon sürecindeki meme hücrelerinde β -kazein geninin bir transkripsiyon faktörü olarak keşfedilmiş ve bu nedenle meme bezi faktörü (MGF) olarak adlandırılmıştır. Klonlama çalışmalarının ardından MGF'in aslında STAT protein ailesinin bir mensubu olduğu belirlenmiştir. Daha sonra 794 amino asitten oluşan bu protein STAT5 olarak adlandırılmıştır. Prolaktin (PRL) sinyaliyle aktive edilen JAK2, fosforilasyon yoluyla STAT5'i 694. tirozin (Y694) rezidüsü üzerinden aktive eder. Daha sonra ilerleyen moleküle çalışmalarla birlikte STAT5'in kromozom 17'de (17q21.2) lokalize olan kümelenmiş iki gen tarafından ifade edildiğini göstermiştir (Şekil 2.12-A). Bu iki gen birbirleriyle %90 oranda benzerlik gösteren peptit sekansına sahip STAT5a ve STAT5b proteinlerini kodlamaktadır (Şekil 2.1-2B). Başlangıçta MGF olarak adlandırılan ve PRL sinyaliyle ilişkili olan protein STAT5a'yı tanımlamaktadır. STAT5b ise 786 amino asitten oluşan ve Y699 rezidüsü üzerinden fosforile edilen bir proteindir (Halim vd., 2020). Ayrıca STAT5a dimerleri DNA'ya, STAT5b dimerleri kadar verimli bağlanamaz ve STAT5a, tercihen tetramerler oluşturur (Wingelhofer vd., 2018). Bununla birlikte her iki protein de yapısal olarak benzer domainlere sahiptirler ve hücre proliferasyonu, apoptoz gibi hücresel proseslerde sorumlu olan genlerin düzenlenmesinden aynı derecede sorumludurlar. Ancak C-terminal bölgelerindeki yapısal farklılıklar nedeniyle, birbirlerinden farklı işlevlere de sahiptirler. Örneğin, STAT5a'nın nöral hücre gelişimini, STAT5b'nin ise T hücresi gelişimini modüle eden genlerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Halim vd., 2020).



Şekil 2. 12. (A) Kromozom 17'de STAT5'in lokalizasyonu (UCSC Genome Browser) (B) STAT5 izoformlarının yapısı (Halim vd., 2020).

STAT5 sinyali, normal meme bezlerinin gelişimi ve hamilelik sırasında emzirme için önemlidir. STAT5a aktivasyonu, emzirme döneminde alveoler hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemektedir. Ayrıca meme epitel hücrelerinin sağkalımını teşvik etmektedir. STAT5'in her iki izoformu için de *knock out (KO)* fare modellerinde gerçekleştirilen çalışmalar, STAT5a KO farelerde meme bezi gelişiminin kusurlu olduğunu STAT5b'de ise bu durumun gözlemlenmediğini belirtmiştir (Halim vd., 2020).

STAT5 sinyali hematopoezin düzenlenmesinde çok önemlidir. Hematopoetik hücrelerde IL-3 ligandına yanıt olarak STAT5, p21 ve JAB ekspresyonlarıyla birlikte hücrelerin proliferasyondan, farklılaşmasından ve apoptozundan sorumludur. Diğer bir yandan IL-2 kaynaklı STAT5 sinyali, IL-17 üretimini inhibe ederek T yardımcı 17 (Th17) hücre popülasyonunu sınırlamaktadır. STAT5 ayrıca FoxP3 (*Forkhead box protein P3*) seviyelerini modüle ederek regülatör T hücrelerinin üretimini düzenlemektedir. Ek olarak STAT5b, vücuttaki T hücresi homeostazını korumak amacıyla re-stimülasyon ile T hücre ölümünü (RICD) sağlar (Halim vd., 2020). Bununla birlikte STAT5b genindeki mutasyonlar ilk olarak büyüme hormonu duyarsızlığı (GHI) sendromu, şiddetli insülin-benzeri büyüme faktörü IGF-1 eksikliği (IGFD) ve doğum sonrası büyüme geriliğine neden olmaktadır (Hwa vd., 2011).

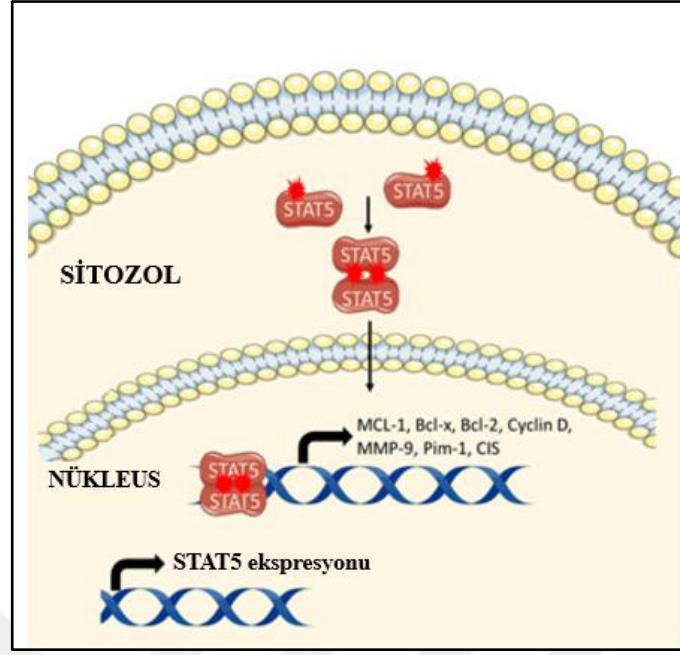
2.3.3. STAT5'in Çeşitli Kanserlerdeki Rolü

Son yıllarda, kanser gelişiminde STAT5'in önemine dair artan kanıtlar ortaya çıkmıştır. Çoğunlukla yapısal aktivasyonu veya STAT5 kaybı nedeniyle anormal STAT5 sinyalinin, tümör sağkalımı, proliferasyonu, metastazıyla birlikte anti-kanser ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol aldığı belirlenmiştir. Küresel olarak en yüksek mortalite oranlarına sahip meme, akciğer, kolorektal ve karaciğer kanserleri gibi ilk on kanser tipinin gelişimine STAT5 katkıda bulunmaktadır (Tablo 2.4) (Brachet-Botineau vd., 2020; Halim vd., 2022).

Tablo 2. 4. STAT5'in çeşitli kanserlerdeki onkogen ya da tümör baskılayıcı rolü (Halim vd., 2020)

Kanser Tipi	STAT5'in Rolü	STAT5'in Durumu	STAT5 Durumunun Çeşitli Kanserlerde Etkileri
Meme	Tümör baskılayıcı	İnaktive ve ifade kaybı	Metastaz ↑ Daha agresif kanser
	Onkogen	Yapısal olarak aktif	Tümör başlangıcı ↑ Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde metastaz ↑
Kolorektal	Onkogen	Yüksek ekspresyon ve yapısal olarak aktif	Hücre proliferasyonu, sağkalım, metastaz ve ilaç direnci ↑ Apoptoz ↓
Akciğer	Onkogen	Yüksek ekspresyon	Hücre proliferasyonu ve metastaz ↑
Prostat	Onkogen	Yapısal olarak aktif	Hücre proliferasyonu ve metastaz ↑ Apoptoz ↓
Karaciğer	Tümör baskılayıcı	Ekspresyonun azalması	HCC'nin gelişmesine yol açan STAT3 sinyali ↑ Apoptoz ↓
	Onkogen	Aktivasyonda artış	Hücre proliferasyonu, metastaz, ilaç direnci ve kanser kök hücresi popülasyonu ↑
Hematolojik maligniteler	Onkogen	Mutasyona uğramış ve yapısal olarak aktif	Kanser başlangıcı ↑ Hücre proliferasyonu, sağkalım ve ilaç direnci ↑ Apoptoz ↓

STAT5'in ve diğer STAT ailesi üyelerinin gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle kanser progresyonuyla ilişkili olduğu çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir. Hücrel sağkalımı ve homeostazı düzenleyebilen STAT5'in anormal aktivasyonu, farklı malignitelerde sıklıkla gözlenmiştir (Şekil 2.13). Kontrolsüz STAT5 aktivasyonu, kanser hücresi proliferasyonunun ve invazyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin kronik miyeloid lösemi hücrelerinde STAT5 ifadesinin siRNA aracılı olarak azaltılması apoptoz ve otofaji gibi hücre ölüm yollarında aktivasyona neden olmuştur. Bu nedenle STAT5'in inhibisyonu, kanser tedavisi için yararlı bir yaklaşım olabilir. Ayrıca STAT5 ifadesinin inhibe edildiği kanser hücrelerinde uygulanan anti kanser ajanın apoptozu ve otofajiyi daha kuvvetli şekilde arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 2.14) (Jung vd., 2022). Bunun gibi sonuçlar, STAT5'in RCC de dahil olmak üzere kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rolü olabileceğini göstermiştir.



Şekil 2. 13. Hücrede STAT5 mutasyonu ya da STAT5 ekspresyonunda artış mekanizması (Halim vd., 2020).

Genel olarak RCC'de JAK/STAT sinyal yolu, IFN- α direnci ve hücre döngüsünün G1 fazında durması ile ilişkilidir. Ayrıca, JAK/STAT sinyal yolu, tümör hücrelerinde proliferasyon, apoptoz ve metastazda önemli bir rol oynamaktadır. RCC'de bazı çalışmalar STAT5 ifadesi ve bununla ilişkili hücre davranışlarıyla ilgili işlevleri bildirmiş olsa da hastalar için prognostik tahmin ve hedef tedavi için veriler yeterince fazla değildir.

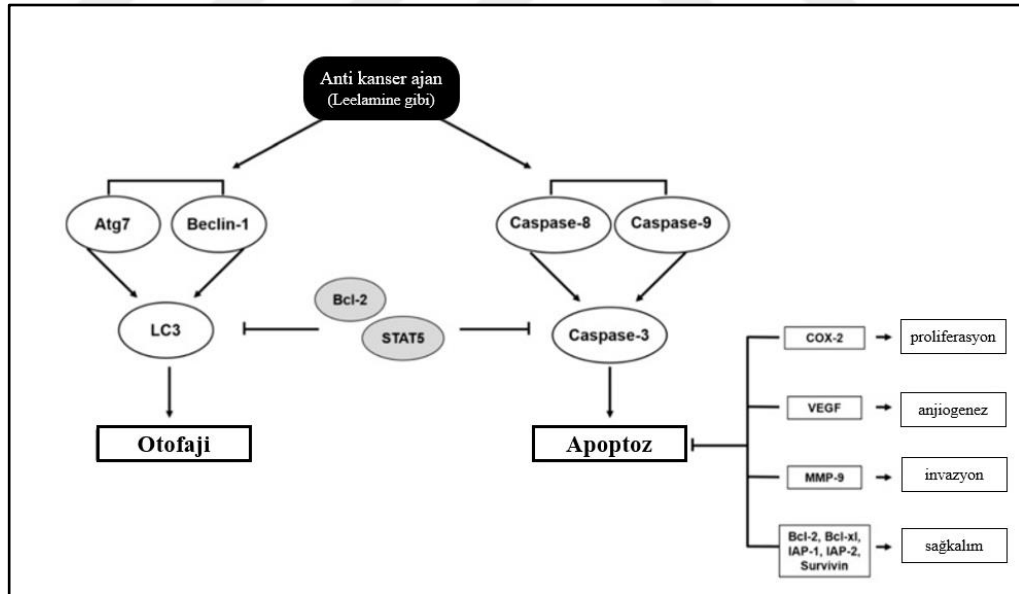
Gerçekleştirilen bir biyoinformatik analiz çalışmasında RCC hastalarından alınan doku örneklerinde transkripsiyonel seviyede STAT1, STAT2, STAT4 ve STAT6 ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte normal dokularla kıyaslandığında RCC'de STAT3, STAT5a ve STAT5b mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. *The Human Protein Atlas* verilerine göre ise RCC'de sağlıklı dokuya kıyasla STAT1, STAT2, STAT4 ve STAT6'nın protein ekspresyonu daha yüksekken STAT3 ve STAT5b'nin ekspresyonu daha düşüktür. Ayrıca RCC'li hastaların sağkalımı ile STAT proteinlerinin ekspresyon profili arasındaki korelasyon da analiz edilmiştir. Çalışmaya göre STAT2, STAT4 ve STAT5b düzeyleri ile RCC'li hastalarının sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. STAT2 ($P < 0,0001$) ve STAT4 ($P = 0,00055$), ekspresyonu yüksek ve STAT5b ($P < 0,0001$) ekspresyonları düşük/orta durumda olan hastalarda düşük sağkalım gözlemlenmiştir. Bununla birlikte RCC'li hastalarda ilaç direnci açısından

STAT proteinleri incelendiğinde, düşük düzeyde STAT5a ekspresyonunun 42 ve STAT5b ekspresyonunun 55 ilaca veya küçük moleküle direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle RCC hastalarında STAT5a ve STAT5b'nin ilaca duyarlılık çalışmalarında potansiyel belirteçler olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Zhou vd., 2020).

Ayrıca RCC hastalarında çinko-parmak proteini 382'nin (ZFN382) STAT5a ve STAT5b'nin transkripsiyon faktörü hedefleri olarak tanımlanmıştır. miRNA hedefleri olarak ise STAT5a için miR-302C ve miR-137 tanımlanırken, STAT5b için miR-17-5P, miR-20A, miR-106A, miR-106B, miR-20B, miR-519D (GCACTTT), miR-200B, miR-200C ve miR-429 (CAGTATT) tanımlanmıştır (Zhou vd., 2020).

Diğer bir taraftan RCC hasta dokuları ve hücre hatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada p-STAT5 seviyeleri incelenmiştir. Normal böbrek dokusuna kıyasla RCC'de p-STAT5 seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir (Song vd., 2007).

Diğer STAT ailesi proteinlerinin de RCC'de özellikle metastatik durumlarda yüksek aktivasyon sıklığı gösterdiği ve STAT aktivasyonunun RCC gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Horiguchi vd., 2002).



Şekil 2. 14. STAT5'in hücre ölüm yollarıyla ilişkisi (Jung vd., 2022).

2.4. Renal Hücreli Karsinomada Yağ Asit Metabolizması

RCC'nin en yaygın tipi olan ccRCC için en önemli risk faktörü obezitedir. İnsanlarda ve hayvan modellerinde yapılan birçok çalışmada, böbrekteki lipid birikiminin ccRCC yokluğunda dahi obezite nedeniyle meydana gelebileceği ve bu durumun lipotoksiste

olarak adlandırılan toksik etkilere yol açabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte karaciğer ve pankreas gibi organlarda lipid birikimi tümörigenez ile ilişkilendirilmektedir. Sağlıklı bir böbrekte proksimal tübül hücrelerinin normalde çok düşük miktarda yağ asidi sentaz ekspresyonuna sahip olduğu ancak

lipit alımı ve kullanımı arasındaki dengesizliklere duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Böylelikle lipid homeostazında oluşabilecek dengesizlikler sonucunda böbrekte lipid birikimi ve lipotoksisite ortaya çıkabileceği tahmin edilmektedir.

Renal tübüler hücrelerde lipid alımı ve kullanımı arasındaki dengesizlikler obezite, diyabet ve böbrek hasarı hayvan modellerinde gösterildiği gibi obezite ve diyabet hastası insanlarda da gösterilmiştir. Bu dengesizlik nefronun proksimal tübülünde yağ asidi alımıyla ve buna bağlı olarak plazmada yağ asidi konsantrasyonlarındaki artışla oluşur. Yağ asidi taşıyıcısı olan CD36 gibi proteinlerin yüksek ekspresyonlarıyla karakterize olan bu durum lipid biyosentezinin ana düzenleyicileri olan sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinlerin (SREBP'ler) aktivitesindeki değişikliklerle de bağlantılıdır.

Lipid birikiminin hücreler için zararlı olduğu düşünülmemektedir ancak bozulmuş bir lipid metabolizmasıyla birlikte yağ asitlerinin hücre içinde aşırı birikimi mitokondriyal hasar, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve proinflamatuvar sinyalleşme dahil olmak üzere birçok toksik etkiye neden olmaktadır. Bununla birlikte hücre tipine bağlı olarak oluşacak yanıt değişebilmektedir.

Kanser hücrelerinde ise *de novo* lipid sentezi gibi metabolik yolların yeniden programlanabileceği ve neoplastik dokuların lipidleri *de novo* sentez etme yeteneğini kazanabildiği gösterilmiştir. Bu nedenle çoğu kanserde lipid birikimi olmasa bile lipid metabolizmasında değişiklikler tanımlanmıştır. Neoplastik dokularda lipid metabolizmasındaki değişimler, fosfolipitlerin yeni hücre zarları oluşturmaya ve böylece tümör mikroçevresinin gelişimine, tümörün büyümesine ve pro-onkogenik sinyallerin artışına destek sağlamaktadır.

Kanser hücrelerinde lipid alımı aktifleşirken, hücreler diğer bir taraftan da yağ asitleri ve kolesterol dahil lipidleri lipid olmayan substratlardan sentezleme yeteneği kazanmaktadır. Ayrıca bu hücrelerde lipidlerin beta oksidasyonu da aktive edilebilir ve fazla yağ asitleri hücre içinde lipid damlacıkları şeklinde trigliserit olarak depolanabilir.

ccRCC’de ise ekstrasellüler lipitlerin alımında artış, tümörün derecesine bağlı olarak artan *de novo* lipit sentezi, yağ asitlerinin beta oksidasyonu ve hücre içinde büyük lipit damlacıklarının birikimi görülmektedir. Normal böbrek dokusuyla kıyaslandığında ccRCC’de kolesterol esterlerinde ve triaçilgliserol seviyelerinde artışla birlikte düşük fosfolipid seviyeleri (fosfatidilkolinler dışında) göstermektedir.

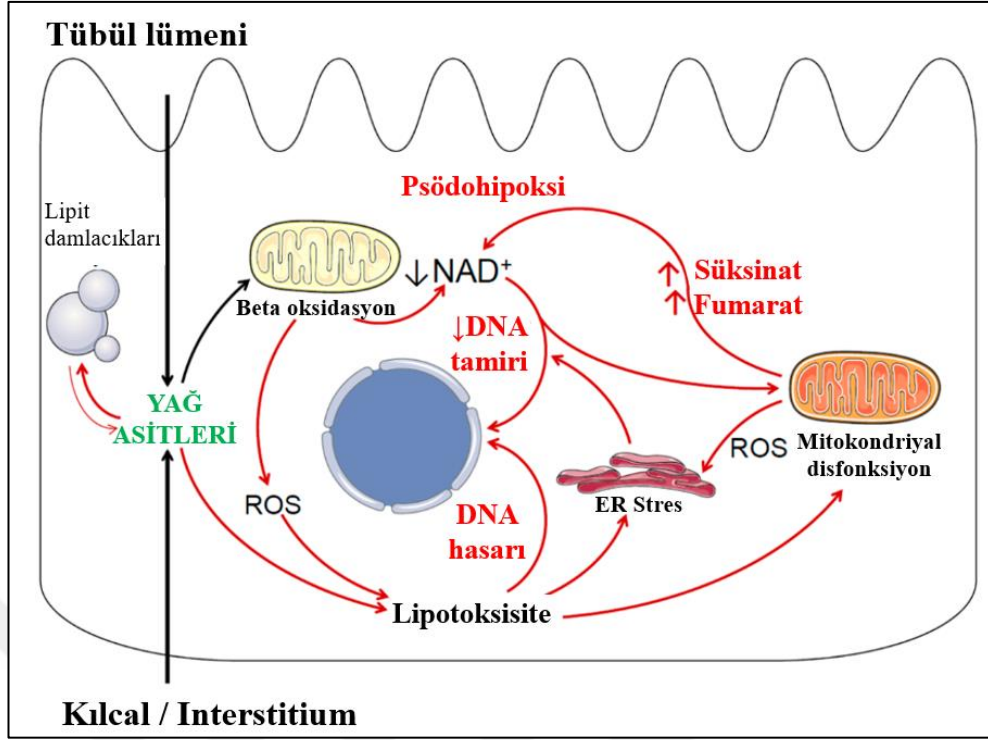
Sağlıklı böbrek dokusuyla kıyaslandığında ccRCC’de meydana gelen diğer önemli değişiklikler; yağ asidi alımında görevli CD36’da artış, yağ asidi sentezinde görevli sterol-CoA desaturaz ve yağ asidi elongasyon faktörleri 2 ve 5’te artış, beta oksidasyon için yağ asitlerinin mitokondriye taşınması için hız sınırlayıcı enzim olan CPT1A’da ve trigliseritlerin lipit damlacıkları şeklinde depolanmasını sağlayan perilipin 2’de azalma olarak kendini göstermektedir.

Yağ asitlerinin metabolizmasındaki bozukluklara ek olarak, ccRCC’nin eksojen kolesterol alımıyla da ilişkili olduğu düşünülmektedir. ccRCC’de yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol alımı lipit birikimine, tümör büyümesine ve sağkalımına katkıda bulunmaktadır. Bulgular kesin olmasa da ccRCC patogenezinde düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolün potansiyel rolü olduğu da varsayılmaktadır.

ccRCC’de VHL aracılı olarak HIF aktivasyonu, mitokondriye CPT1A aracılı yağ asidi taşınmasını azaltarak yağ asitlerini beta oksidasyonunu baskılar. Bununla birlikte HIF aktivasyonu orta ve uzun zincirli açıl-CoA dehidrojenazlarını inhibe eder. Akt ve SREBP-1 aktivasyonu ile ise hücre içi lipit birikimi birden fazla yolağın kontrolüyle birlikte artabilir.

ccRCC’de meydana gelen genetik değişiklikler ile artan lipit alımı arasındaki bağlantılar henüz belirsizdir. Ancak CD36 dışında, sağlıklı renal hücrelerde çok az seviyede eksprese edilen ve HIF-1’in transkripsiyonel bir hedefi olan yağ asidi taşıyıcı FATP4’ün ccRCC’li hastalarda kötü prognozun bir biyobelirteci olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır.

ccRCC tümörjenezinde ve ilerlemesinde lipit birikiminin rolü tam olarak anlaşılmamış olsa da, trigliserit birikiminin ccRCC hücrelerini lipid hidroperoksitlerin demire bağımlı birikiminin aracılık ettiği düzenlenmiş bir hücre ölümü tipi olan ferroptozu daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir.



Şekil 2. 15. Renal proksimal tübül hücrelerinde obeziteye bağlı lipid metabolizmasındaki bozukluklarının ccRCC'ye katkıda bulunabileceği potansiyel mekanizmalar (Bobulescu vd., 2021).

Tümör mikroçevresindeki, peritümoral yağ dokusundaki ve lokal inflamatuvar yanıtlardaki farklılıklar ile adipokinlerin etkisi dahil olmak üzere RCCde obezitenin etkisini açıklamak için birçok mekanizma önerilmiştir (Şekil 2.15). Obeziteye bağlı lipid birikimi ve lipotoksisitenin ccRCC kanser hücresi transformasyonuna katkıda bulunduğu oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi, mitokondriyal disfonksiyon, artan pro-onkogenik metabolit üretimi, DNA hasarı ve DNA onarım yollarının negatif modülasyonu olmak üzere birkaç mekanizma ile açıklanabilir. Esterlenmemiş serbest yağ asitleri, dolaşımdan ve apikal taraftan proksimal tübül hücrelerine girer. Normal koşullar altında çoğu serbest yağ asidi, beta oksidasyona uğradıkları mitokondriye taşınır ve böylece proksimal tübülün büyük ATP gereksinimlerini karşılar. Beta oksidasyonun artmasına neden olan fazla serbest yağ asitleri, hücresel nikotinamid adenin dinükleotidini (NAD^+) tüketerek psödohipoksik bir duruma neden olabilir ve bu da VHL'den bağımsız HIF aktivasyonuna yol açabilir. Azalan NAD^+ seviyeleri, PARP enzimleri ve sirtuinler dahil olmak üzere NAD^+ bağımlı hücresel DNA onarımını ve DNA hasarı yanıt mekanizmalarını da olumsuz etkileyebilir. Artan beta oksidasyonu ayrıca ROS üretiminin artmasına neden olur. Serbest yağ asitlerinin mevcudiyeti hücrelerin beta oksidatif kapasitesini aştığında,

fazla yağ asitleri lipit damlacıklarında depolanabilir ve ayrıca alternatif metabolik yollara girerek seramidler ve diaçilgliserol gibi toksik bileşiklerin oluşmasına neden olabilir. Böylece bu bileşikler, artan ROS'un da etkisiyle toplu olarak lipotoksisteye ve bunun sonucunda da DNA hasarı, ER stresi ve mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olur. Buna karşılık, ER stresi hücrenin DNA onarımını ve DNA hasarı yanıt mekanizmalarını daha da bozabilir ve mitokondriyal işlev bozukluğu, süksinat ve fumarat gibi psödohipoksiye katkıda bulunan pro-onkogenik metabolitlerin üretiminin artmasına neden olabilir (Bobulescu vd., 2021).

Kanser hücrelerindeki hızlı proliferasyon kapasitesi nedeniyle yağ asitlerinin varlığı önemlidir. Bu sebeple kandaki lipit konsantrasyonundan bağımsız olarak kanser hücreleri yağ asidi sentezinde artışı sağlayıp, yağ asidi kullanımlarını arttırabilirler. RCC'de gözlemlenen bu anormal lipit metabolizması davranışları, yağ asidi sentezini kontrol eden genler ve eksprese ettikleri proteinler ile ilişkilidir. RCC'de lipit metabolizmasında görevli proteinlerin ekspresyon profillerindeki değişikliklerin özeti Tablo 2.5'de gösterildiği gibidir (Tablo 2.5) (Temiz, 2024).

Tablo 2. 5. RCC'de lipit metabolizmasında görevli proteinlerin ekspresyon profillerindeki değişiklikler (Temiz, 2024).

Lipit Metabolizması Basamağı	Mekanizması
Kolesterol biyosentezinde azalma	↓ HMG-CoA redüktaz
Kolesterol alımında artış	↑ VLDL-R ↑ SR-B1
Yağ asidi biyosentezinde artış	↑ ACC ↑ ACLY ↑ FASN ↑ SCD ↑ FADS1
Yağ asidi alımında artış	↑ FABP-5
Yağ asidi katabolizmasında azalma	↓ CPT1A
Lipolizde azalma	↓ ATGL
Lipit damlacıklarında birikim	HIF- α stabilizasyonu ↑ DGAT1/2

2.5. Mikro RNA

Ökaryotlarda yaygın olarak bulunan mikro RNA'lar (miRNA) 19 ila 24 nükleotitten meydana gelen endojen kodlanmayan küçük RNA'lardır. miRNA'lar, mRNA'ların 3' transle edilmemiş bölgelerine (3'UTR) bağlanarak gen ifadesi destabilize eder ya da baskırlar. Bu şekilde post-transkripsiyonel olarak düzenlenme çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesine ve patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Gao vd., 2020).

Tanımlanmış miRNA'lar transkripsiyon durumlarına göre intragenik ve intergenik olarak sınıflandırılırlar. İntergenik miRNA'lar bir genden bağımsız olarak transkribe edilir ve kendi promotorları tarafından düzenlenirler. İntragenik miRNA'lar ise çoğunlukla protein kodlayan bir genin intronlarından transkribe edilirler. Ancak ekzonlardan transkribe edilen intragenik miRNA'lar da bulunur ve günümüzde tanımlanan miRNA'ların çoğu intragenik formdadır (O'Brien vd., 2018).

2.5.1. miRNA Biyogenezi

Hayvanlarda, miRNA biyogenezi primer miRNA (pri-miRNA) transkriptinin RNAz II aracılığıyla oluşturulmasıyla başlar. Pri-miRNA, nükleus içinde Drosha ve DGCR8 enzimleriyle bir öncü forma dönüştürülür ve pre-miRNA oluşur. Daha sonra Pre-miRNA'lar sitoplazmaya eksportin-5 aracılı olarak taşınır. Sitoplazmada Pre-miRNA'lar, Dicer tarafından işlenerek olgun miRNA'lar (mature miRNA) haline getirilir. Daha sonra efektör RNA kaynaklı susturma kompleksini (RISC) üretmek için Argonaute (AGO2) proteinine yüklenirler (Wahid vd., 2010). Çoğu durumda RISC, eIF4F kompleksine müdahale ederek translasyonel inhibisyonu indüklemek için hedef mRNA'lara bağlanır. Ardından GW182, PAN2/3 ve CCR4-NOT kompleksi RISC ile birlikte deadenilasyonu başlatır ve mRNA *decapping* edilir. Böylece kesilen mRNA, XRN1 yoluyla 5'-'3' bozunmaya uğrayabilir (O'Brien vd., 2018).

2.5.2. miR-33a

miRNA'ların fizyolojik ve patolojik durumlarda birçok işlevi vardır ve bazı miRNA'ların lipid homeostazı üzerinde önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Ono vd., 2015). İnsanlarda *SREBP-1* geninin intron 17'sinde bulunan miR-33b ve kromozom 22'deki *SREBP-2* geninin intron 16'sında bulunan miR-33a olmak üzere iki miR-33 geni bulunmaktadır (Davalos vd., 2011). Bununla birlikte miR-33a, prostat,

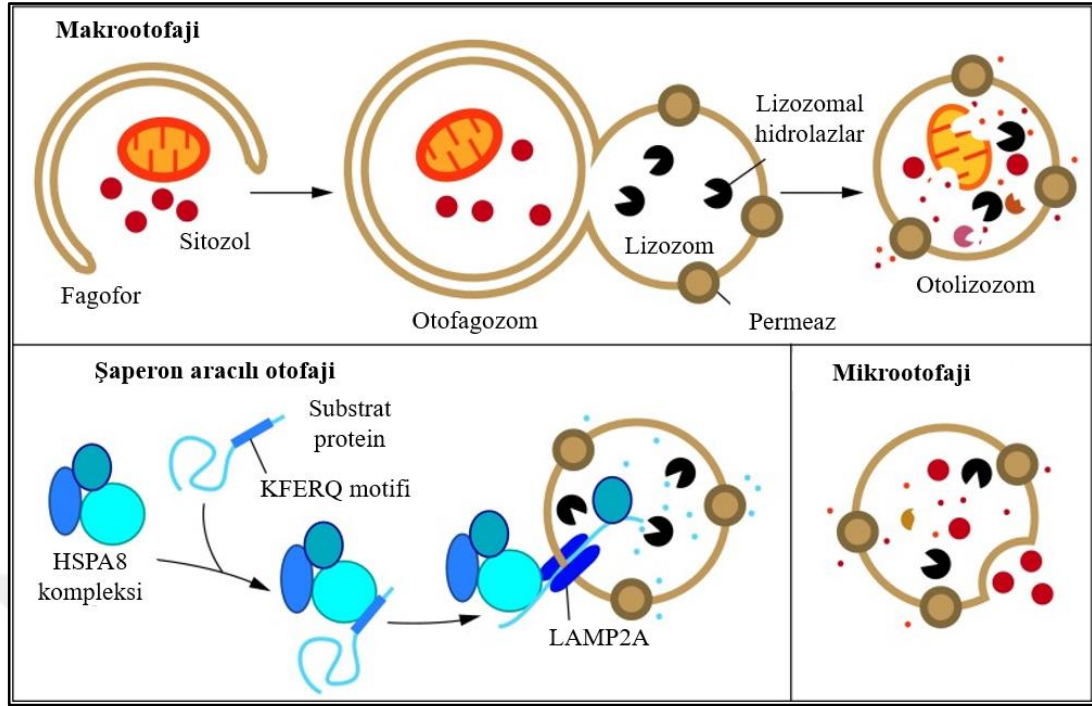
safra kesesi, melanoma, osteosarkoma ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde, *down-stream* genlerini doğrudan hedefleyerek bir tümör baskılayıcı miRNA olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte miR-33a'nın çeşitli insan kanserlerinde antikanser rolü oynadığını ve miR-33a'nın yüksek ekspresyonunun kanser hücresi proliferasyonu, invazyonu, migrasyonu engelleyebileceğini ve ilaç direncini düzenleyebileceğini göstermiştir (Gao vd., 2020; Jiang vd., 2019).

RCC'de ise hastalardan alınan doku örnekleriyle ve hücre hatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada miR-33a seviyesinin normal böbrek dokularına ve hücre hatlarına oranla RCC dokularında ve hücre hatlarında azaldığı ve bu durumun kötü prognozla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Jiang vd., 2019)

Drosophila melanogaster'den insana kadar yüksek oranda korunmuş intronik miR-33, kolesterol alımını veya sentezini kontrol eden genleri düzenlemektedir (Davalos vd., 2011). SREBP'ler, kolesterol, trigliseritler, fosfolipitler ve yağ asitlerinin sentezinde veya hücre alımında rol oynayan otuzdan fazla genin ekspresyonunu düzenlemektedirler. Ayrıca bu biyomolekülleri sentezlemek için gereken NADPH kofaktörlerini aktive etmektedirler. SREBF sinyal yolu, fagositoz ve hücre döngüsü ilerlemesi dahil olmak üzere çeşitli hücre süreçleri düzenlemektedir. Sağlıklı dokularda, SREBF-2'nin transkripsiyonel aktivasyonu, miR-33a'yı düzenler ve sonuç olarak kolesterol de dahil olmak üzere hücre lipit metabolizmasını artırır. Çalışmalar kolesterolün apoptozda rol oynadığını, SREBP/miR-33'nin ise hücre büyümesine ve hücre döngüsü ilerlemesine katıldığını göstermiştir. Bu nedenle, miR-33a seviyelerinin düzensizliği, kolesterol seviyelerini etkileyerek tümör oluşumuna katkıda bulunabilir. Bu durumda tümörler, miR-33a seviyeleri veya ilişkili mekanizmalar düzeltilerek tedavi edilebilir (Gao vd., 2020).

2.6. Otofaji

Otofaji, tüm ökaryotlarda yüksek oranda korunan hücre bir degradasyon ve geri dönüşüm sürecidir. Memeli hücrelerinde mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA) olmak üzere üç temel otofaji türü vardır (Şekil 2.16). Üç otofaji tipi farklı yollar izlese de her birinde hedef molekül bozunur ve geri dönüşüm için lizozoma teslim edilir (Parzych ve Klionsky, 2014).



Şekil 2. 16. Memelilerde görülen otofaji tipleri (Parzych ve Klionsky, 2014).

2.6.1. Makrotofaji

Makrotofaji, agregasyon halindeki proteinlerin veya hasar görmüş hücre içi organellerin degradasyonu için lizozomlarla kaynaşan çift zar yapılı bir otofagozom içine kapsüllendiği selektif olmayan bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Qian ve Yang, 2016). Makrotofaji lizozomun sınırlı zarından uzakta meydana gelmesi ve hedef kargoyu lizozoma taşıyan sitozolik vesiküllerin oluşması nedeniyle mikrotofaji ve CMA'dan ayrılır. Makrotofajiyi diğer hücre içi vesikül aracılı proseslerden ayıran en önemli özellik, otofagozom olarak adlandırılan vesiküllerin *de novo* olarak oluşmasıdır. Yani otofagozomlar önceden varolan bir organelden ya da membran tomurcuklanmasından oluşmazlar. Memelilerde otofagozom oluşumu sitoplazmada birden fazla herhangi bir bölgede başlayabilir.

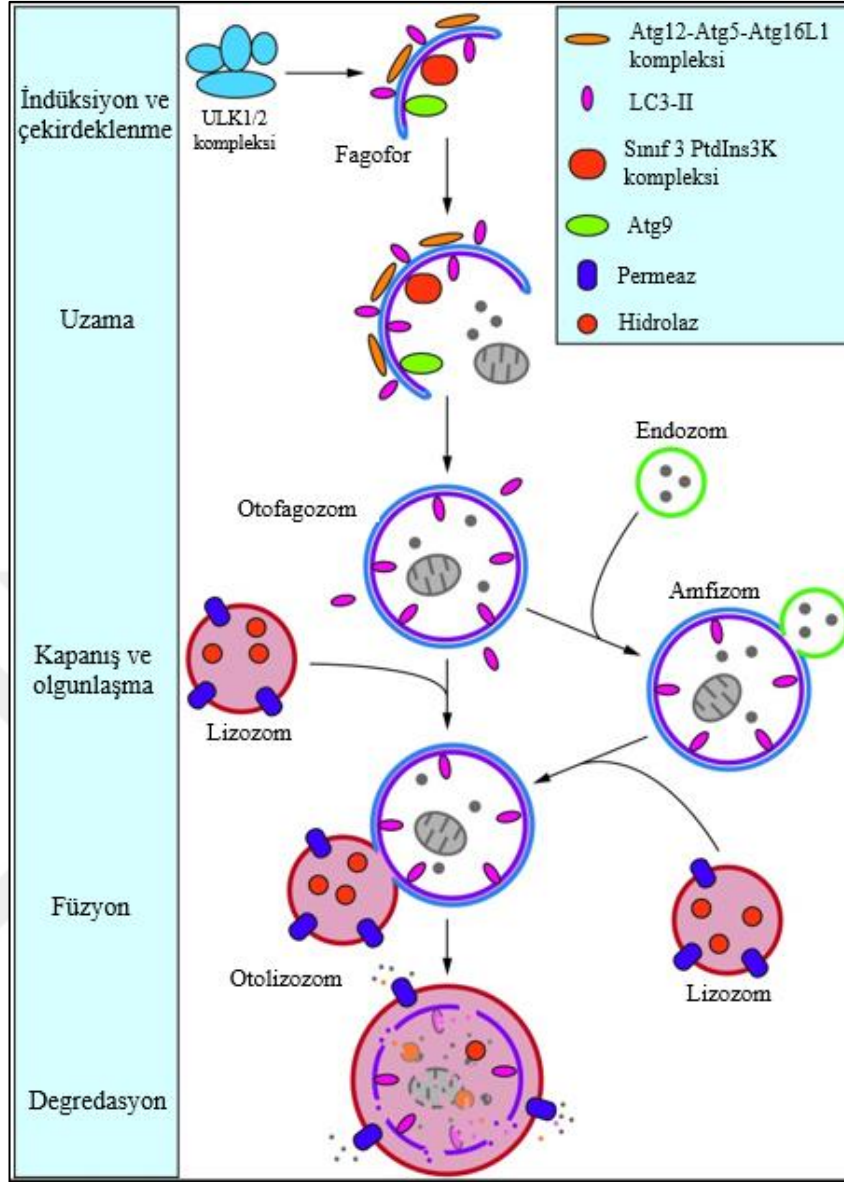
Başlama aşamasının (*initiation*) ardından zar genişleyerek primer çift membranlı fagofor yapısını oluşturur. Fagoforun oluşumunda zarın kaynağının plazma zarı, endoplazmik retikulum, golgi ve mitokondri olabileceği düşünülmektedir. Daha sonra fagofor genişleyerek bükülür ve küresel bir hal alır (*elongation*). Küresel bir hal alan fagofor, memelilerde 0,5 ila 1,5 µm arasında değişken boyutlara sahip otofagozom olarak adlandırılır. Otofagozom oluşuktan sonra lizozomla füzyon olarak otolizozomları oluşturur. Ardından otolizozomun asidik lümenine yerleşik hidrolazlar

ile taşınan yük degrade edilir ve tekrar kullanılmak üzere sitoplazmaya bırakılır. Diğer bir taraftan memeli hücrelerinde otofagozomlar erken ya da geç endozomlar ile birleşerek amfizomları oluşturup daha sonra lizozomla füzyon olabilirler.

Memeli hücrelerinde otofagozom oluşumu ULK1/2, Atg13, Atg101 (c12orf44) ve RB1CC1/FIP200 kompleksi tarafından indüklenir. Memeli hücrelerinde ULK1/2-ATG13-RB1CC1 kompleksi stabildir ve besin durumundan bağımsız olarak oluşmaktadır. mTORC1 kompleksinin oluşumu ise hücre içindeki besin durumuyla ilişkilidir. mTORC1, besin varlığında kompleks halinde bulunarak ULK1/2 ve Atg13'ü fosforile eder ve etkisiz hale getirir. Buna karşılık açlık durumunda ya da rapamisin uygulandığında MTORC1 indüksiyon kompleksinden ayrılarak bu bölgelerde defosforilasyona neden olur ve makrotofaji indüklenir.

Daha sonra fagoforun çekirdeklenmesi (*nucleation*) için Atg14, BECN1, PIK3C3/VPS34 ve PIK3R4/p150 kompleksi yoluyla gerçekleşir (Sınıf 3 PtdIns3K kompleksi). PtdIns3K kompleksinin düzenlenmesi, büyük ölçüde makrotofaji için gerekli olan BECN1 ile etkileşime giren proteinler yoluyla gerçekleşir. Anti apoptotik bir protein olan Bcl-2, BECN1'i bağlayarak PIK3C3 ile etkileşimini önler ve makrotofaji inhibe edilmiş olur. Bir başka BECN1 bağlayıcı protein olan KIAA0226/Rubicon, UVRAG ile ilişkili PtdIns3K komplekslerinde PIK3C3 aktivitesini inhibe etmektedir. PtdIns3K kompleksinin iki pozitif düzenleyicisi AMBRA1 (BECN1'i doğrudan bağlayan) ve SH3GLB1/Bif-1'dir.

Fagoforun genişlemesinde UBL (*ubiquitin-like protein*) proteinlerinin oluşturduğu iki konjugasyon sistemi bulunur. İlk sistem Atg12-Atg5-Atg16L1 kompleksinin oluşumunu içerir. Atg12-Atg5 konjugasyonunun ardından Atg16L1, Atg5'e kovalent olmayan bir şekilde bağlanır ve daha büyük bir kompleks oluşturmak için dimerize olur ancak otofagozomun tamamlanmasının ardından ayrışır. Fagofor genişlemesinde yer alan ikinci UBL sistemi, LC3 sistemidir. LC3, Atg4 tarafından işlenerek LC-I formuna getirilir. LC-I, Atg7 ile aktive edilerek Atg3'e aktarılır. Daha sonra LC-I, lipid fosfatidiletanolamine (PE) ile konjuge edilir ve LC-I'in PE ile işlenmiş formu ise LC-II olarak adlandırılır. Fagoforun uzamasında zar üretimi için Atg9 proteini önemlidir. Daha sonra oluşan otofagozomların lizozomlar ile birleşmesi mikrotübül hareketlerine bağlıdır (Şekil 2.17) (Parzych ve Klionsky, 2014).



Şekil 2. 17. Makrotofajinin morfolojisi (Parzych ve Klionsky, 2014).

2.6.2. Mikrotofaji

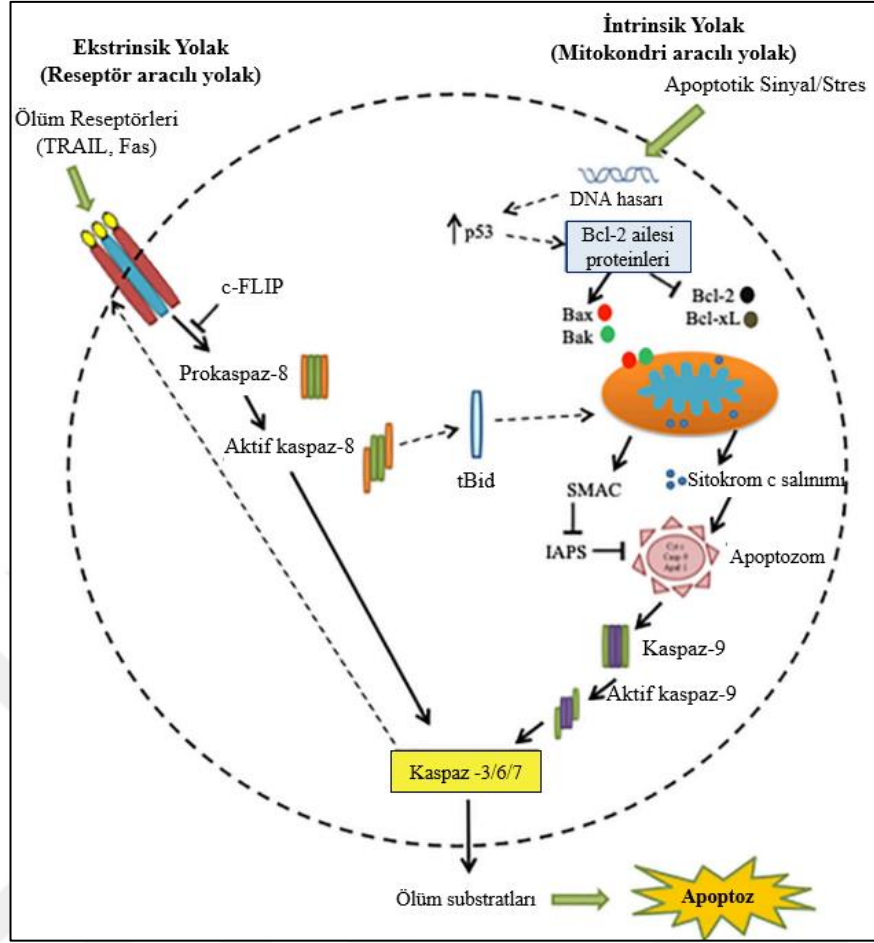
Lizozomal membranın çıkıntılar oluşturarak ya da invajinasyon yoluyla sitoplazmik içeriği lizozom içine alması mikrotofaji olarak adlandırılır. Ardından bir zarla çevrili şekilde lizozom içine alınan içerik degrede edilir (Parzych ve Klionsky, 2014). Bu süreç seçici bir şekilde gerçekleştirilmez ve sağlam organeller de mikrotofaji yoluyla degrede edilebilir. Mikrotofaji sürecindeki bazı aksaklıklar nörodejeneratif hastalıklara, miyokardiyal bozukluklara ya da glikojen depo hastalıklarına neden olabilir (Li vd., 2011).

2.6.3. Şaperon Aracılı Otofaji

CMA mikrootofajiden farklı olarak kargoyu ayırmak için membranöz yapılar oluşmaz. Diğer otofaji tiplerinin aksine CMA oldukça spesifik bir süreçtir. CMA substratlarında ortak olarak KFERQ pentapeptit hedefleme motifleri bulunur. KFERQ motifini içeren hedef proteinler, sitozolik şaperonların etkisiyle açılırlar ve lümen içinde parçalandıkları yerde doğrudan lizozomal membran boyunca translokasyona uğrarlar. CMA, belirli glikolitik enzimler, transkripsiyon faktörleri ve bunların inhibitörleri, kalsiyum ve lipid bağlayıcı proteinler, proteozom alt birimleri ve veziküler trafikte yer alan proteinler dahil olmak üzere çok çeşitli substrat proteinlerini degrade edebilir (Parzych ve Klionsky, 2014).

2.7. Apoptoz

Programlanmış hücre ölüm mekanizmalarından biri olan apoptoz, çok hücreli organizmalarda rutin şekilde gerçekleşen normal fizyolojik bir mekanizmadır. Çeşitli biyokimyasal olaylarla tetiklenebilen apoptoz, nüklear kondensasyon, hücre büzülmesi, membran yapısının bozulması ve DNA'nın parçalanması gibi morfolojik özelliklerle karakterizedir. Apoptotik hücre ölümünün ekstrinsik ve intrinsik olarak iki ana yolağa ayrılmaktadır (Şekil 2.18). Ölüm reseptörü sinyali olarak adlandırılan ekstrinsik yolak, ölüm reseptörleri ile ölüm ligandlarının birbirine bağlanmasıyla başlar. Mitokondriyal yolak olarak adlandırılan intrinsik yolak ise büyüme faktörü yoksunluğu, iyonize radyasyon, anti kanser ilaçlar veya oksidatif stres aracılı olarak indüklenir. İntrinsik yolak mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması ve sitokrom-c salınımı ile karakterizedir (Taşkiran vd., 2021). Bununla birlikte her iki yolakta da kaspazlar apoptozun temel başlatıcıları ve yürütücüleridir (Jan ve Chaudhry, 2019).



Şekil 2. 18. Apoptoz yolları (Jan ve Chaudhry, 2019).

2.7.1. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik apoptoz yolağı TNF (tümör nekroz faktörü), Fas-L (Fas ligand) ve TRAIL (TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand) gibi ekstrasellüler ligandlar ile hedeflenmektedir. Bu ligandlar ölüm reseptörü olarak adlandırılan TNFR1 (tip 1 TNF reseptörü), Fas ve TRAIL reseptörü gibi reseptörlerin ekstrasellüler domainlerine bağlanırlar. Ölüm reseptörlerinin spesifik ölüm ligandları tarafından bu şekilde tetiklenmesi, ölüme neden olan bir sinyal kompleksinin (DISC) oluşmasıyla sonuçlanır. DISC, bir adaptör molekülü olarak Fas ilişkili ölüm domaini içeren, prokaspaz-8, prokaspaz-10 ve hücrel FLICE inhibitör proteinlerinden (c-FLIP) oluşmaktadır. Daha sonra kaspaz 8'in etki alanı DISC'te kalacak şekilde aktive olur. Aktif kaspaz 8, kaspaz aktivasyon kaskadını başlatmak için DISC'ten ayrılır (Jan ve Chaudhry, 2019; Elmore, 2007).

2.7.2. İntresik Yolak

Oksidatif stres, radyasyon, hipoksi, serbest radikaller, viral enfeksiyonlar ve sitotoksik ilaçlar gibi çeşitli hücre dışı ve hücre içi streslerin tetiklediği apoptotik yolak intrinsik yolak olarak tanımlanmaktadır. İntresik yolak mitokondriyal membrana Bax/Bak proteinlerinin insersiyonu ile başlar ve ardından mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitozole sitokrom c salınımı gerçekleşir. Sitokrom c'nin salınması anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL tarafından engellenir. Sitokrom c sitozole geçtikten sonra apoptozom üretmek için Apaf-1 ve prokaspaz-9 ile birleşir. Apoptozom kaspaz-9'u tetikleyen çok proteinli bir komplekstir ve bu şekilde kaspaz-3 sinyalinin tetiklenmesini sağlayarak hücrelerin programlı olarak elimine edilmesini sağlar. Diğer bir taraftan kaspaz-9 dışında intrinsik yolak SMAC/DIABLO, Bcl-2, Bcl-w, Nox, Aven ve Myc proteinleri ile düzenlenir (Jan ve Chaudhry, 2019).

2.8. Nanoterapötiklerin Kanser Tedavisinde Kullanımı

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve hormon tedavisi kullanılmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi yaklaşımları sitotoksikiteye neden olmasına rağmen nöropatiler, kemik iliğinin baskılanması, gastrointestinal bozukluklar, cilt hastalıkları, saç dökülmesi ve yorgunluk gibi çeşitli ağır yan etkilere sahip olması nedeniyle hastaların yaşam kalitesini düşürmekte ve yüksek oranda nüks riski taşımaktadır. Bununla birlikte antrasiklin ve bleomisin gibi kemoterapötiklerin ilaca özgü olarak kardiyotoksikite ve pulmoner toksikite gibi yan etkileri de mevcuttur (Gavas vd., 2021; Wiesmann vd., 2020; Krishnan ve George, 2014).

Geleneksel olarak kullanılan birçok kemoterapötik zayıf stabiliteye sahip olmakla birlikte dağılımları geneldir yani ilaçların sadece küçük bir kısmı tümöre ulaşmaktadır. Enjekte edilen ajanlar genellikle retiküloendotelyal sistemin (RES) monositleri ve makrofajları tarafından uzaklaştırılmaktadır. Bir kemoterapötik ajanın başarılı olabilmesi için RES tarafından uzaklaştırılmaktan kurtulması ve damarlar yoluyla farklı bölgelere ulaştırılarak damar duvarlarını geçmesi ve ardından hedefe ulaşmak için interstisyel boşluktan geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle kullanılan ajanın yüksek stabiliteye sahip olmaması tedavide önemli bir sınırlayıcıdır (Gavas vd., 2021; Wiesmann vd., 2020; Krishnan ve George, 2014).

Günümüzde kemoterapinin en önemli sınırlayıcı faktörü olarak kendini gösteren kemorezistans metastazlara ve tekrarlayan tümörlere neden olmaktadır. Geleneksel kemoterapi yöntemlerinin uygulandığı hastalarda kanser hücrelerinin DNA onarım yetenekleri, anti apoptotik proteinleri aşırı derecede ekspresyonu, detoksifiye edici enzimleri ve ilaç atık taşıyıcılarını (ABC) yüksek oranda ifade etmeleri ilaca karşı direnç oluşmasına neden olarak sağkalım oranını yüksek oranda düşürmektedir (Gavas vd., 2021; Wiesmann vd., 2020; Krishnan ve George, 2014).

Gelişen biyoteknolojiyle birlikte immünoterapi gibi hedefe yönelik tedavilerin ortaya çıkışı sadece primer kanserleri tedavi etmekle kalmayıp uzak metastazı önlemiş ve nüks oranını düşmesine neden olarak umut verici sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Ancak immünoterapötik ajanların da çeşitli otoimmün hastalıklara neden olması önemli bir yan etki olarak kendini göstermiştir. Bununla birlikte çeşitli çalışmalar immünoterapinin katı tümörlere karşı daha az etkili olduğunu göstermiştir (Gavas vd., 2021).

Tüm bu engelleyici faktörler göz önüne alındığında kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi için çalışmalar ivme kazanmış ve nanopartiküller kullanılarak bu sınırlayıcı tedavi yanıtlarının ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Nanopartikül bazlı ilaç dağıtım sistemleri, iyi farmakokinetik, hassas hedefleme, azaltılmış yan etkiler ve düşük ilaç direnci göstermektedir. Ayrıca halihazırda kullanılmakta olan kemoterapötik ajanların yan etkilerinin sınırlandırılması, özgüllüklerinin artırılması, farmakokinetiğinin ve ilaç çözünürlüğünün iyileştirilmesi amacıyla nanopartiküllerle birlikte kombine olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Wiesmann vd., 2020). Bununla birlikte nanopartiküllerin çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde sadece tedavide değil aynı zamanda teşhis aşamasında da klinik uygulamaları geliştirilmiştir.

Yüksek biyouyumluluk, özgüllük ve penetrasyon yetenekleri sebebiyle bazı nanopartiküllerin kullanımı ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Tablo 2.6).

Tablo 2. 6. FDA tarafından kullanımları onaylanmış bazı nanoterapötikler (Gavas vd., 2021; Wiesmann vd., 2020).

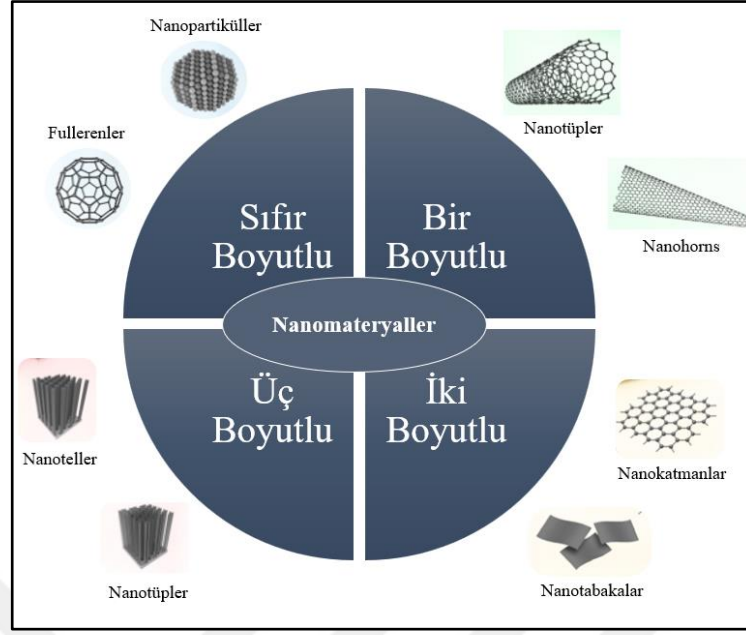
Ticari Adı	Materyal	İlaç	Şirket	Endikasyon	Onay Yılı/Yeri
Doxil®	Lipozom-PEG	Doksorubisin	Janssen	Metastatik ovaryum kanseri, metastatik meme kanseri, Kaposi sarkoma, multiple myeloma	1995/Amerika
Eligard®	PLGA	Löprolid asetat	Tolmar	Prostat kanseri	2002/Amerika
Abraxane®	Albumin	Paklitaksel	Celgene	Metastatik meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreas kanseri	2005/Amerika
Genexol PM®	mPEG-PLA	Paklitaksel	Samyang Corporation	Metastatik meme kanseri	Klinik denemede, Güney Kore
Onivyde®	Lipozom	İrinotekan	Merrimack	Prostat kanseri	2015, Amerika
Oncaspar®	Polimerik NP	Pegaspargase	Sigma-Tau	Akut lenfoblastik lösemi	2006/Amerika
Apealea®	Miseller	Paklitaksel	Elevar Therapeutics Inc.	Yumurtalık, periton ve fallopi tüpü kanseri	2018 /Avrupa
Nanotherm®	Demir Oksit	Demir Oksit NP	MagForce	Glioblastoma	2010/Amerika
Auroshell®	Altın nanoshell	Altın	Nanospectra Bioscience	Farklı solid tümörlerin lazerle ısıtılması	Klinik denemede (Faz I)

2.8.1. Nanopartiküller ve Sentez Yöntemleri

Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO), nanopartikülleri (NP), nano-objenin en uzun ve en kısa eksenlerinin uzunluklarının önemli ölçüde farklı olmadığı, nano ölçekteki tüm dış boyutlara sahip nano-objeler olarak tanımlamaktadır. Eğer boyutlar önemli ölçüde farklıysa (tipik olarak üç kattan fazla), nanofiberler veya nanoplatlar gibi terimler tercih edebilmektedir.

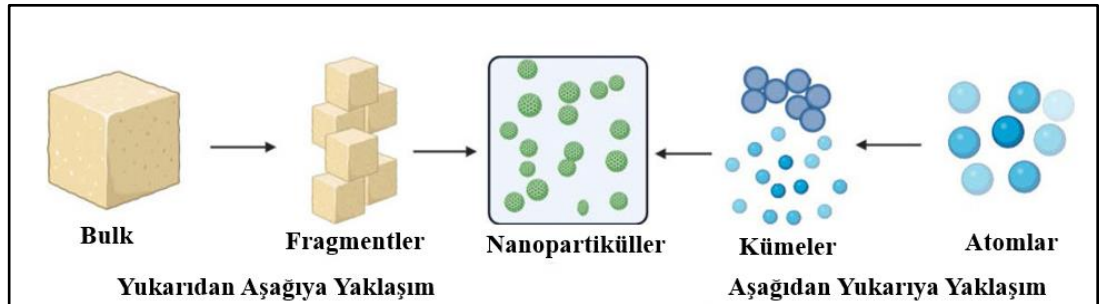
NP'ler küresel, silindirik, konik, boru şeklinde, içi boş çekirdek, spiral ya da düzensiz şekillerde farklı boyut ve yapılarda olabilmektedirler. NP'ler 1 ila 100 nm arasında herhangi bir boyutta bulunabilirler. Eğer NP'lerin boyutu 1 nm'den daha küçük olursa sıklıkla atom kümeleri terimi tercih edilmektedir. Şekil açısından incelendiğinde NP'ler şekilsiz ya da tek veya çok kristalli olabilmektedirler. Ayrıca gevşek ya da yığın şeklinde bulunmaktadır. NP'ler tek tip veya birkaç katmandan oluşabilmektedir. Birkaç katmandan oluşan NP'ler genellikle çeşitli küçük moleküllerden, metal iyonlarından, yüzey aktif maddelerden veya polimerlerden oluşan yüzey katmanı; çekirdek tabakasında kimyasal olarak farklı bir malzemeden yapılmış kabuk katmanı ve NP'nin merkezi kısmını oluşturan çekirdek katmanından oluşmaktadır. Yüksek yüzey/hacim oranı, mikron altı boyut ve gelişmiş hedefleme sistemi gibi olağanüstü özellikleri sayesinde bu malzemeler multidisipliner alanlarda büyük önem kazanmıştır (Gavas vd., 2021).

Nanoteknolojinin temel unsurlarını oluşturan nanomalzemeler boyutlarına göre dört sınıfa ayrılmaktadırlar. Nanopartiküllerin, kuantum noktalarının (*quantum dots*) ve fullerenerlerin içinde bulunduğu sıfır boyutlu nanomalzeme sınıfında (0-D) yer alan nanomalzemelerin üç boyutu da nano ölçek aralığında yer almaktadır. Tek boyutlu nanomalzemelerin (1-D) nanoölçeğin dışında bir boyutu bulunurken nanotüpler, nanofiberler, nanodrodlar, nanoteller ve nanohornlar bu sınıfta yer almaktadır. Nano ölçeğin dışında iki boyutu bulunan iki boyutlu nanomalzemeler (2-D) grubunda ise nanotabakalar (*nanosheets*), nanofilmler ve nanokatmanlar (*nanolayers*) bulunmaktadır. Ayrıca hiçbir boyutu nano boyutla sınırlı olmayan ve nanotel, nanotüp, nanopartikül dağılımlarını içeren üç boyutlu nanomalzemeler (3-D, *bulk nanomaterials*) bulunmaktadır (Şekil 2.19). Nanomateryallerin boyutları sentez yöntemleri açısından önemlidir (Joudeh ve Linke, 2022; Gavvas vd., 2021).



Şekil 2. 19. Nanomateriyallerin sınıflandırılması (Joudeh ve Linke, 2022 esinlenerek yeniden çizilmiştir).

NP'ler çok farklı şekil, boyut ve yapıya sahip olduklarından sentezlenmeleri için çok sayıda sentez yöntemi geliştirilmiştir ancak genel olarak sentez yöntemleri reaksiyon koşullarına göre iki ana gruba ayrılmıştır. Birinci grubu oluşturan aşağıdan yukarıya yaklaşım (*bottom-up approach*) atomlardan kümelere ve NP'lere kadar yapı malzemesinin basit malzemelerden üretilmesidir. Biyosentez aşağıdan yukarıya yaklaşım grubunda yer almaktadır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda ise (*top-down approach*) NP sentezi için ana malzemeyi (*bulk*) azaltan yıkıcı yöntemler tercih edilmektedir. Daha büyük moleküller parçalanarak NP'lere dönüştürülerek küçük birimler oluşturulmaktadır (Şekil 2.20). Reaksiyon koşulları ve diğer sentez parametreleri değiştirilerek NP'lerin boyutu, şekli ve yükü gibi morfolojik parametrelerinde farklılıklar sağlanabilmektedir (Gavas vd., 2021).



Şekil 2. 20. NP'lerin sentez yöntemleri (Gavas vd., 2021).

2.8.2. Nanopartiküllerin Hücresel Hedefleme Mekanizmaları

Günümüzde kullanılmakta olan geleneksel kemoterapi yaklaşımları tümör hücrelerini sınırlı miktarda hedeflediği gibi sağlıklı doku ve organlara da zarar vermektedir. Bu nedenle kanser nanoteknolojisinde sağlıklı hücrelerin korunarak sadece tümör hücrelerinin hedeflenmesi önemli bir amaçtır. Nanopartiküller gibi nanoteknolojik ürünler bir ilaç ya da gen (CRISPR gibi) taşıma sistemi geliştirmek için oldukça uygun ürünlerdir. NP'ler ile bir ilaç ya da gen taşıma sistemi kurularak hücrelere aktarılması ilaç/gen taşıma sisteminin terapötik etkisini artırarak hedefe yönelik tedaviye olanak sağladığı gibi normal hücreleri de sitotoksiteden korumaktadır. Ayrıca NP'ler tümör mikroçevresine uygun olarak tasarlanabilir böylece çok sayıda fizyolojik ve biyolojik bariyerden çeşitli moleküllerin geçişi kolaylıkla sağlanabilmektedir. Biyolojik bariyerlerden NP'lerin geçişini kolaylaştırmak adına yüzeyleri epitel, endotel ya da diğer hücresel membranlarla kaplanabileceği gibi mekanik, fizikokimyasal ve enzimatik membranlar da kaplama elamanı olarak kullanılabilir. Böylece NP'ler hücreler tarafından yabancı olmayan bir madde olarak algılanarak hedefe yönelik stratejiler geliştirilmesi konusunda olanak sağlamaktadır. Ancak yine de NP'nin hücre zarından geçerek sitozole ulaşması hücre altı hedefine ulaşacağı anlamına gelmemektedir. Bu nedenle hücresel veya nükleer hedeflemeyi sağlamak amacıyla optimizasyonların yapılması gerekmektedir. Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda NP'lerin hedefe ulaşması açısından çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. NP'nin hedef hücreye ya da tümör mikroçevresine ulaşana kadar vasküler sistemde (kanda) kalma yeteneği, retikuloendotelial sistemden ve mononükleer fagosit sisteminden kaçış, tümör mikroçevresinde birikme, tümör sıvısına yüksek basınç penetrasyonu ve sadece tümör hücrelerini hedef alma bu stratejiler arasında yer almaktadır (Joudeh ve Linke, 2022; Gavas vd., 2021)

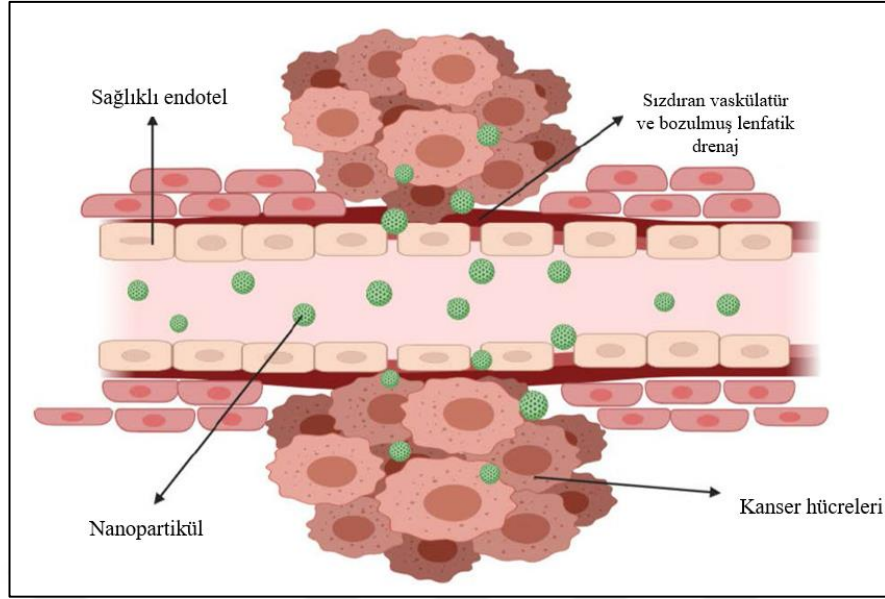
Pasif Hedefleme

Kanser hücreleri primer tümör üzerinden hızla bölünerek ve kontakt inhibisyonun bozulmasıyla birlikte üst üste yığılarak hipoksik bir ortam oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle daha fazla besin ve oksijene ulaşabilmek için tümörigenezin en önemli basamaklarından biri olan neovaskülarizasyon ile yeni kan damarlarının oluşması gerçekleşir. Hipoksi ortamında fizyolojik olarak kan damarlarındaki endotel tabakası daha geçirgen hale gelmektedir ve neovaskülarizasyon ile oluşan yeni kan damarları normal kan damarlarına kıyasla daha geçirgen ve geniş gözeneklidir. Tümör

çevresindeki kan damarlarının daha geçirgen ve gözenekli yapıda olması tümör tipine ve mikroçevresine bağlı olmakla birlikte 200 ile 2000 nm arasında değişiklik göstermektedir. Bu durum NP'lerin bu tür kan damarlarından yayılmasına ve nihayetinde kanser hücrelerinde toplanmasına izin vermektedir.

Normal dokularda ekstraselüler sıvının (ECF) lenfatik damarlara drenajı sıklıkla ortalama 0.1–2 $\mu\text{m/s}$ akış hızında gerçekleşmektedir. Tümör oluştuğunda ise lenfatik fonksiyonun bozulmasıyla birlikte lenfatik drenajda da bozulmalar meydana gelir ve minimum düzeyde interstisyel sıvı alımına sebep olmaktadır. Bu durumda tümör bölgelerinde dokular arası fazla madde değişimi olmadığından NP'lerin tutulumu sağlanmaktadır. Böylece NP'lerin gelişmiş düzeyde geçirgenlik ve tutulum etkisi göstermesi kanser tedavisinde tümör hücrelerine spesifik olarak kullanılmaları açısından önemlidir ayrıca bu durum geliştirilmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi olarak da adlandırılmaktadır. Pasif hedeflemede özellikle tümör mikroçevresinin hedeflendiği yaklaşımlarda NP'lerin EPR etkisi en önemli özelliktir. Geleneksel olarak kullanılan kemoterapötik ajanların dolaşımında bu şekilde uzun süre kalmaları mümkün değildir. Bu sebeple ajanlar nano boyutlardaki taşıyıcılar ile kapsüllenerek kullanılabilir. Böylece kemoterapötik ajanların farmakokinetik etkileri artırılabilir, tümöre spesifik olarak etki etmeleri ve yan etkilerinin azaltılması sağlanabilmektedir.

Kanser hücrelerinin hızla bölünmesiyle birlikte metabolik özelliklerinde de değişimler meydana gelmektedir. Özellikle hücre bölünmesi için ana enerji kaynağı olarak nitelendirilen glikolizdeki artış tümör mikroçevresini asidik hale getirmektedir. Tümör mikroçevresinde pH'ın düşmesine duyarlı NP'ler tasarlanabilmektedir (Pelicano vd., 2006; Gavas vd., 2021). Bu şekilde kemoterapötik bir ajanın hedef tümör dokusuna nanomalzemelerle kaplanarak taşınması ya da direkt olarak metal oksitler gibi NP'lerin direkt kullanımı geleneksel yöntemlere oranla daha avantajlı bir durumdur. Tümörün ve tümör mikroçevresinin özelliklerinden yararlanarak NP'lerin kullanımıyla kanser hücrelerinin hedeflenmesi pasif hedefleme olarak adlandırılmaktadır. Pasif hedeflemenin temelinde tümörün temel özellikleri dışında NP'nin boyutu ve dolaşım süresi de önemlidir. Pasif hedeflemede spesifik bir ligand mevcut değildir (Şekil 2.21).



Şekil 2. 21. Nanopartiküller ile kanser hücrelerinin pasif olarak hedeflenmesi (Gavas vd., 2021).

FDA tarafından kullanılması onaylanan ve pasif hedefleme yöntemiyle çalışan Abraxane® (Celgene, ABD) albümin aracılı olarak taksan sınıfı bir bileşik olan paklitaksel (PTX) taşınımını sağlamaktadır. PTX mikrotübüllerin çalışma prensibini bozarak hücreleri G2-M fazında bloke eden bir bileşik olmakla birlikte hali hazırda kemoterapide kullanılmaktadır. Ancak PTX'in çözünürlüğü düşük olduğundan çeşitli kimyasallar ile kombine edilerek kullanılmaktadır ve bu durum hastalar için nörotoksisite, nefrotoksisite vb. gibi ciddi yan etkiler ortaya çıkardığından ilaç toksisitesinin düşürülmesi ve etkinliğinin artırılması için albümin gibi bir taşıyıcı kullanılarak uygulanmıştır. Daha önce küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve metastatik meme kanserinde kullanılan *Abraxane* insan kanından izole edilen albümine bağlı amorf PTX NP'lerini içermektedir. Albümin insanda lipofilik moleküllerin transferini sağladığından bir kemoterapötik ajanın taşınmasını arttırabilmektedir (Gürses, 2013).

Güney Kore'de özellikle metastatik meme kanseri tedavisinde kullanımı onaylanan, ABD'de ise pankreas kanseri için faz 2 klinik çalışmaları devam eden Genexol PM®, PTX ve steril liyofilize polimerik misel içeren, spesifik olarak kanser hücrelerini hedefleyebilen ve nude farelerde diğer NP'lere oranla daha yüksek dozlarda tolere edilebilen bir NP'dir. Biyolojik dağılımı yüksek olduğundan karaciğer, böbrek, akciğer ve dalak gibi dokularda ve daha belirgin olarak kanser hücrelerinde iki ila üç kat daha fazla etkinlik göstermiştir.

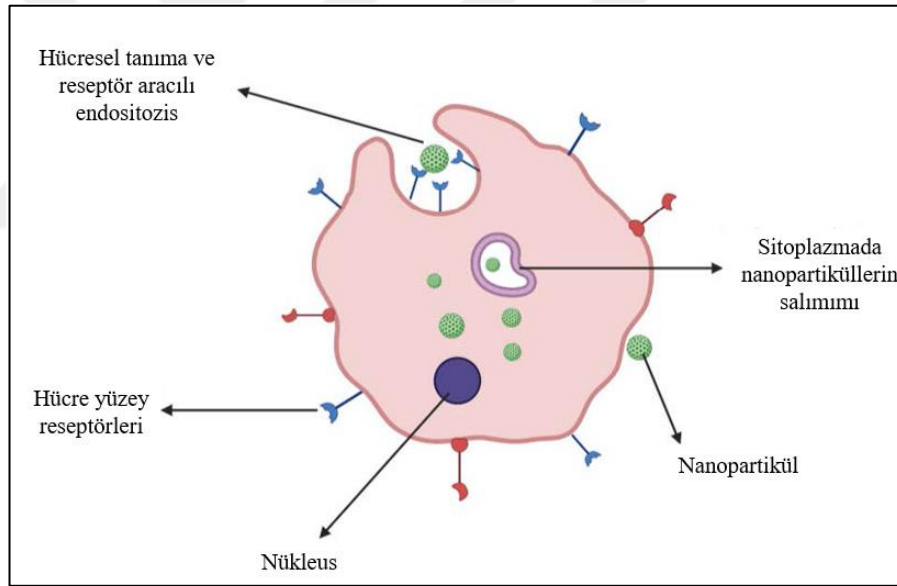
Pasif hedefleme stratejisi ile çalışan ve aktif maddesi daunorubisin olan DaunoXome® ise lipozom kaplı bir NP ile kombine şekilde kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayan bir antikanser olarak kullanılmaktadır. Özellikle Kaposi sarkoma tedavisinde önemli bir tedavi seçeneğidir. FDA tarafından kullanımı 1996 yılında onaylanmıştır.

Aktif Hedefleme

Hedef hücrelere spesifik olarak eksprese edilen reseptörler ya da aşırı eksprese edilen moleküller aracılığıyla NP aracılı tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kullanılan yöntem aktif hedefleme olarak adlandırılmaktadır. Aktif hedefleme olarak adlandırılan ve hücreye spesifik reseptörlere bağlanan çeşitli ligandlar (folat, transferrin vb.) aracılığıyla da gerçekleştirilebilen bu strateji ligand aracılı hedefleme olarak da bilinmektedir. Aktif hedeflemenin başarısı hücre yüzey reseptörlerinin NP'leri ligand olarak tanımlamasına bağlıdır. İlk olarak hedeflemenin başarısı için ligandlara sahip NP'lerin daha fazla afinite göstermesi amacıyla hedef hücreye benzer ve yakın olması gerekmektedir. Bu nedenle hücre zarıyla benzer özellikler gösteren lipozomlar sıklıkla tercih edilmektedir. Böylece NP'lerin kanser hücrelerine bağlanması ile ilaç penetrasyonunda artış sağlanmaktadır. Tasarlanan ligandlar küçük moleküller içerebileceği gibi protein, peptit, antikor, şeker ve vitaminleri de içerebilmektedir. Ligand aracılı hedefleme çalışmalarında sıklıkla epidermal büyüme reseptörü (EGFR), folat reseptörü, glikoproteinler ve transferrin reseptörü tercih edilmektedir.

Aktif hedeflemede reseptör-ligand etkileşimiyle birlikte NP'ler reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınmaktadır (Şekil 2.22). Aktif hedeflemede NP'lerin çok değerlikli yapıda olmasından faydalanılarak kanser hücrelerine spesifik yaklaşımlar geliştirilmesi önemli bir amaçtır. Bununla birlikte NP'lerin mimarisi ve ligand-hedef kimyası aktif hedeflemenin etkinliğini değiştirmektedir. NP'lerin boyutu, fizikokimyasal özellikleri, ligand yoğunluğu ve uygulama yöntemi gibi parametreler sınırlayıcıdır. Bu nedenle sıklıkla kanser hücrelerinde ifadesi aşırı derecede yüksek olan reseptör ya da diğer moleküllerden yararlanılmaktadır. Aktif hedeflemenin kanser hücrelerinin metabolizması göz önüne alındığında en iyi örneği olarak transferrin reseptörü ile gerçekleştirilen çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Demirin hücre içine taşınmasını sağlayan glikoprotein yapıları transferrin reseptörü, kanser hücrelerinde aşırı derecede eksprese edilirken (özellikle solid tümörlerde) sağlıklı hücrelerde çok daha düşük seviyede ekspresyon profili sergilemektedir. Bu sebeple direkt olarak transferrin

reseptörünü hedef alan ligandlar yerine buna uygun NP'ler tasarlanabilmektedir (Oh ve Park, 2014; Chithrani ve Chan, 2007). Transferrin reseptörü aracılı olarak aktif hedefleme yöntemi kullanılarak tasarlanan GNR-DOX-Tf-NP'lerinin (altın-nanorod-doksorubisin-transferrin-nanopartikülleri) akciğer kanseri hücre hatlarında DNA hasarı ve apoptozu arttırdığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada, transferrinin hedeflenmediği serbest doksorubisin (DOX) ile transferrin reseptörüne uygun olarak altın nanorodlar ile birlikte tasarlanmış GNR-DOX-Tf-NP'ler uygulamaları gerçekleştirilmiş ve NP aracılı yaklaşımın kanser hücrelerinde sitotoksisiteye daha yüksek oranda neden olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı yaklaşım insan koroner arter düz kas hücrelerine uygulandığında serbest DOX'a kıyasla NP bazlı yaklaşım daha az sitotoksisiteye neden olmuştur. Yani aktif hedefleme yöntemiyle kanser hücrelerine spesifik tedavi yaklaşımları geliştirilebilmektedir (Amreddy vd., 2015).



Şekil 2. 22. Nanopartiküller ile kanser hücrelerinin aktif olarak hedeflenmesi (Gavas vd., 2021).

Kanser hücrelerinde transferrin gibi ifadesi artan moleküllerin aracı olarak kullanılması dışında çevredeki hücrelerin özelliklerinden yararlanılarak da aktif hedefleme stratejileri geliştirilebilmektedir. Warburg etkisi olarak da açıklanan tümör dokularının sağlıklı hücrelere kıyasla daha asidik olması durumu aktif hedeflemede önemli bir rol oynamaktadır. Warburg etkisine göre sağlıklı hücreler oksidatif fosforilasyon ve sitrik asit döngüsü yoluyla enerji üretimlerini sağlarken, kanser hücreleri glikoliz yoluyla enerji üretimlerini gerçekleştirmektedir. Normal durumda hücrelerde yüksek miktarda laktik asit birikimi hücre ölümüne neden olmaktadır,

bununla birlikte kanser hücreleri bu durumla başa çıkmak için laktik asidi hücre dışına atabilecekleri hücre zarında lokalize olan proton pompalarını daha yüksek miktarda eksprese etmeye başlamaktadırlar. Böylece çevre dokularda asidik bir ortam oluşmaktadır. Warburg etkisi göz önüne alındığında pH değişimlerine duyarlı lipozom NP bazlı ilaç salınım sistemleri tasarlanabilmektedir (Gavas vd., 2021). Bununla birlikte ilaç taşıyıcı sistemler özellikle çoklu ilaç direncine karşı geliştirilen tedavi stratejileri için önemlidir. Çoklu ilaç direnci geliştirmiş lösemi hücre hatlarıyla gerçekleştirilmiş ve lipozomların taşıyıcı platform olarak kullanıldığı bir çalışmada kemoterapötik bir ajan olan DOX ile birlikte P-glikoprotein inhibitörü verapamil lipozom aracılı olarak uygulanmıştır. Ayrıca transferrin reseptörü aracılığıyla kanser hücrelerine spesifik hedefleme sağlanan bu çalışmada serbest DOX'a kıyasla NP bazlı taşıyıcı sistem kullanıldığında ilacın sitotoksitesinin arttığı belirlenmiştir (Milane vd., 2011).

NP'lerin yüzeyleri lipozom dışında polietilen glikol (PEG, PEGilasyon) ile de kaplanabilmektedir. Bu yöntem hedef hücelere ve dokulara ilaç ve gen iletiminin verimliliğini artırmak için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. İlaçların sistemik dolaşım süresini iyileştirmek ve çeşitli yan etkileri azaltmak için proteinlerin PEGilasyonunun başarısından yola çıkarak, NP'ler üzerindeki PEG kaplamalar, yüzeyi agregasyon, opsonizasyon ve fagositozdan koruyarak sistemik dolaşım süresini uzatmaktadır (Suk vd., 2016). Özellikle kemoterapötik ajanların olası yan etkilerini önlemek amacıyla klinikte kullanılan ajanların PEGile formları üretilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde ekspresyonu yüksek oranda artan HER2'yi (EGF reseptörü-2) hedefleyen antrasiklin sınıfı bir ajan olan DOX hastalarda yüksek oranda kardiyotoksisiteye neden olmaktadır (Linders vd., 2024; Wang vd., 2010). Bu nedenle PEGile lipozomal DOX geliştirilmiştir. HER2 hedefli lipozomal DOX, insan kardiyomiyosit canlılığını azaltmamakta ve sağlıklı dokularda apoptozu indüklememektedir (Reynolds vd., 2012).

Pankreas kanseri hücreleriyle gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise pankreas kanseri hücrelerinde yüksek oranda ifade edilen potasyum kanal proteinleri hedeflenmiş ve bu kanallara yönelik bir poliklonal antikor, DOX ve PEGile altın NP'leri birlikte kullanılmıştır. DOX'un nano taşıyıcılar aracılığıyla verilmesi, ajanın %50 etki etmesi için gereken doz miktarında azalma meydana getirerek yarım maksimal etkili konsantrasyon (EC_{50}) değerinin serbest ilaca kıyasla 30 kattan fazla düşmesine neden

olmuştur. NP aracılı ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak kemoterapötik ajanların uygulanması çoklu ilaç direncinin üstesinden gelebileceği gibi yan etkileri azaltması amacıyla da daha az konsantrasyonlarda ilaç uygulamalarını mümkün kılmaktadır (Spadavecchia vd., 2016).

Kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere oranla ekspresyon seviyesi değişen bir diğer molekül olan folat reseptörü aracılı olarak da hücreye spesifik NP aracılı yaklaşımlar gerçekleştirilebilmektedir. Folik asit (B9 vitamini) nükleotit sentezinde önemli bir rol oynamakla beraber hücre içine folat reseptörleri aracılı olarak alınmaktadır. Bununla birlikte tümör tipine göre farklılık göstererek folat reseptörünün alfa izoformu (FR- α) solid tümörlerde yüksek şekilde ifade edilirken, beta formu (FR- β) lösemi ve lenfomalarda yüksek oranda eksprese edilmektedir. Kanser hücresine ve çeşidine spesifik yaklaşımların sağlanması açısından folat reseptörü gibi proteinler ile NP aracılı aktif hedefleme sistemleri sağlanabilmektedir (Low ve Kularatne, 2009). Bu stratejiye bağlı olarak şu anda klinik denemelerde yer alan ve ilerlemiş katı tümörler üzerinde denemeleri gerçekleştirilen MORAb-202 (Faz I); ilaç direnci kazanmış ovaryum, fallopi tüpü ve primer peritoneal kanserlerde IMG853 (Faz I) ve geliştirilme aşamaları sürmekte olan etarfolatid (EC20), EC17 ve OTL38 ajanlar bildirilmiştir (İbrahim vd., 2023; Low ve Kularatne, 2009).

2.8.3. Nanopartikül Çeşitleri

Toplumsal bir sağlık problemi olarak her geçen gün insidansı artmakta olan kanserin tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapi yöntemleri, kanser hücrelerinin çoklu ilaç direnci kazanması ve hastalarda görülen ciddi yan etkiler sebebiyle tedaviyi zorlaştırmakta ve bu nedenle her yıl kanser kaynaklı ölümler artmaktadır. Kemoterapi kanser tedavisinde en sık başvuru olan tedavi yöntemi olsa da kullanılan ajanların tümör hücrelerini spesifik olarak hedefleme oranı oldukça düşüktür. Bununla birlikte tümör mikroçevresinin heterojen özellik göstermesi de tedaviye verilen yanıtı değiştirmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinin çok hızlı şekilde mutasyon geçirerek çoklu ilaç direnci geliştirmesi tedavi olanaklarını sınırlamaktadır (Sun vd., 2023).

Geleneksel tedavinin çeşitli faktörlerle birlikte sınırlandırılması, nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte tümör mikroçevresinin kanser tipine spesifik olarak tanımlanmasını ve NP aracılı ilaç ya da gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini sağlamıştır. NP aracılı sistemlerin geliştirilmesiyle birlikte ise hedef hücreyi uyarıcı

ve daha etkili tedavi yöntemi olarak adlandırılan akıllı NP'ler (*smart nanoparticles*) üretilmektedir (Sun vd., 2023). NP'ler normalde çözünmeyen ilaçları lokal ve uzak tümör bölgelerine daha iyi bir şekilde iletebilmektedir. Böylece geleneksel kemoterapiye göre daha az yan etki gözlemlenmekte ve biyouyumluluğu yüksek, toksisitesi ve immünojenitesi düşük, biyolojik olarak parçalanabilir ajanlar üretilmektedir. Ayrıca NP'lerin boyut, şekil, seçici bağlanma kapasitesi, yüksek permeabilite ve tutulumları, yüzey modifikasyonu gibi özelliklere sahip olmaları kanser terapisinde önemli bir rol oynamalarına neden olmaktadır. NP'lerin bu özelliklere sahip olmaları geleneksel tedavide öngörülemeyen yan etkilerin ve işlev kayıplarını azaltmaktadır (Mundekkad ve Cho, 2022).

NP'lerin özellikleri ligandlarıyla boyut, morfoloji, zeta potansiyeli ve yüzey işlevselliklerine bağlıdır. NP'lerin zeta potansiyelleri dağılımlarını ve alınımlarını etkilemektedir. Dolaşım süresi daha kısa olan negatif yüklü katyonik parçacıklar, tümör içerisinde yeterli miktarda birikememektedir. Buna bağlı olarak NP'lerin yeteneği, türlerine ve kullanılan formülasyon maddelerine bağlı olarak farklılık göstermektedir (Rizi vd., 2022). NP'ler sıklıkla boyutlarına ve tümörün patofizyolojik karakterine göre farklı özelliklerde tercih edilebilmektedir. NP'ler organik ve inorganik olarak iki gruba ayrılmakla beraber her iki grubun birlikte kullanıldığı NP'ler de mevcuttur (Hibrit NP'ler). Organik NP'ler lipozom ve dendrimer bazlı NP'leri içerirken; inorganik NP'ler metalik, metal oksit, silika, magnetik NP'leri ve karbon nanotüpler gibi nanomateriyalleri içermektedir. Ayrıca kanser hücrelerine daha selektif şekilde yaklaşabilmek için her iki NP tipini de içerebilen hibrid NP'ler (lipit-polimer, hücre membranı-kaplı NP'ler) tasarlanabilmektedir (Yao vd., 2020).

Organik Nanopartiküller

Organik NP'ler yaklaşık on yıldır kullanılan ve birçok tipi bulunan materyallerdir. Klinikte nano boyutlu ilaç yaklaşımı olarak kullanılan ilk NP tipi organik NP'ler sınıfına giren lipozomlardır.

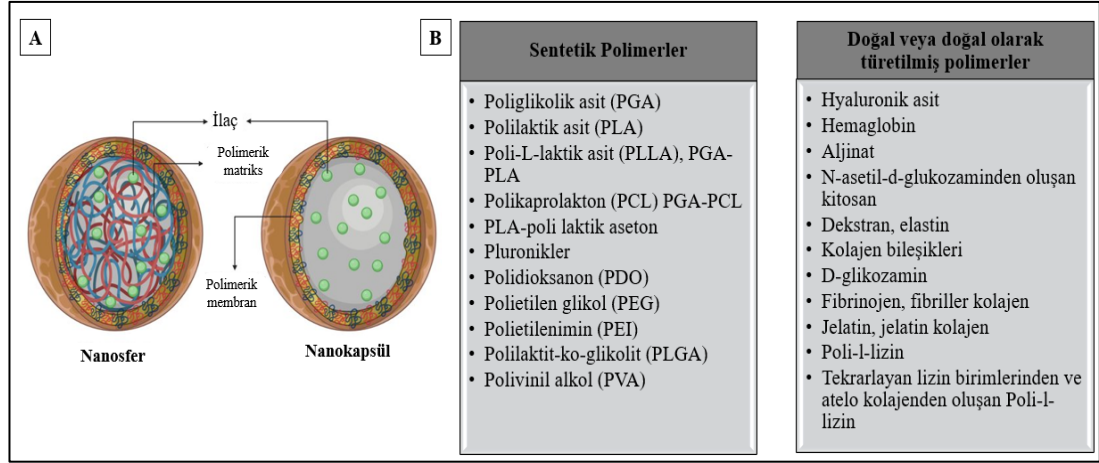
Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, farklı monomerlerin oluşturduğu spesifik yapısal mimariye sahip "koloidal makromoleküller" olarak iyi tanımlanmıştır (Gavas v.d., 2021). Multidisipliner çalışmalarla birlikte polimerik NP'lerin geliştirilmesi, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, aşı, biyomalzeme ve tıbbi cihaz üretimi açısından önemli bir basamaktır. Polimerik NP'ler geleneksel ilaçlara kıyasla yüksek sirkülasyon süresi,

stabilite, yapısal ayrışma, enkapsülasyon hızı ve erken salınım gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca polimerik NP'ler organik-organik ya da organik-inorganik şekillerde bir araya getirilerek oluşturulabildiğinden çeşitli avantajlara sahiptir. Sıklıkla emülsiyon polimerizasyonu, diyaliz, çözücü buharlaştırılması ve tuzlama (*salting-out*) yöntemleriyle üretilmektedirler (Sun vd., 2023). Polimerik NP'lerin sentezi tipik olarak çözeltilerin yüzey gerilimini azaltmaya yardımcı olan bir yüzey aktif maddenin kullanılmasını içerir. Yüzey aktif madde daha sonra polimerin yapı taşı olan monomer ile karıştırılır. Monomer daha sonra polimerize edilir ve nanopartiküller oluşturur (Alrushaid vd., 2023).

Polimerik NP'ler, uzun süreli ilaç dağıtım sistemleri için etkili taşıyıcılar olarak kabul edilmiştir. 1990'larda polilaktik asit (PLA) ve poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) kullanılarak polimerik NP'lerin sentezi araştırılmaktadır. Yapılan çalışmaların sonucunda polimerik NP'lerin dolaşımda uzun süre kalabildikleri tespit edilmiştir. Bu özellikleri sebebiyle kanser tedavisinde kullanımları artmıştır. Çok yönlü NP'ler olarak kabul edildiklerinden, biyolojik olarak parçalanabilen ya da parçalanamayan, sentetik veya doğal kaynaklardan üretilmiş olarak farklı varyasyonlarda üretilmektedirler. Biyobozunur özelliğe sahip olan polimerler, vücudun doğal metabolik yolları tarafından basit şekilde ayrıştırılıp, monomerleri metabolize edilebildikleri için oldukça avantajlıdır (Sell vd., 2023).

Polimerik NP'ler doğal veya doğal olarak türetilmiş polimerler ve sentetik polimerler olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.2-3B). Polimerik NP'lerin en büyük avantajları yüksek biyoyumluluk ve stabilite göstermeleri, biyolojik olarak parçalanabilir olmaları ve düşük maliyetleridir. Ayrıca ilaç yüklü polimerik NP sistemleri kullanılarak hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların uzun süre salınması mümkündür. Bu durum vücuttaki istenmeyen yan etkileri en aza indirmektedir (Rizi vd., 2022).



Şekil 2. 23. (A) Nanosfer ve nanokapsül polimerik NP'lerinin yapıları (Balçım vd., 2020). (B) Kanser tedavisinde kullanılan biyolojik olarak parçalanabilen doğal ve sentetik polimerler (Rizi vd., 2022)

Çeşitli ilaçlar polimerik bir NP ile birlikte ya nanosfer ya da nanokapsül oluşturacak şekilde yerleştirilerek ilaç taşıyıcı sistemler tasarlanabilmektedir (Şekil 2.23-A). Bu nanopartiküller, ilaç verilmesi sırasında ilaç moleküllerini koruma yeteneğine sahiptir (Alrushaid vd., 2023). Genel olarak nanosferler, ilaç parçacıklarının eşit olarak dağıldığı polimerik bir matris sisteminden oluşur. Nanokapsüller, polimerik bir zarla çevrili bir çekirdekten oluşur. Polimerik membrandaki gözenekler, bu NP'lerden bir ilacın salınmasını kontrol etmektedir. Diğer bir polimerik NP grubu ise geleneksel polimerik NP'lere göre daha yüksek mukavemet ve elastikiyet sergileyen nanohidrojellerdir. Özellikle kanser tedavisi alanında ortaya çıkan polimerik NP'lerden biri olan nano hidrojeller temel olarak bir polimerik ağdan oluşan çapraz bağlı (kimyasal veya fiziksel olarak) hidrofilik NP'lerdir. Genel olarak nano hidrojeller sadece hidrofilik ilaçlar vermek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, piyasada bulunan birçok ilaç doğası gereği hidrofobik olduğundan, hidrofobik ilaçların hidrojellere entegre edilmesi için yeni yöntemler geliştirilmiştir (Dristant vd., 2023).

Polimerik NP olarak başlangıçta poliakrilamid, polimetilmetakrilat (PMMA) ve polistiren gibi biyolojik olarak parçalanamayan polimerler kullanılmıştır. Ancak zamanla sentetik polimerik NP'ler vücutta birikerek toksisite oluşturmuş ve çalışmaları sınırlamıştır. Ardından biyolojik olarak parçalanabilen polimerik NP'ler üzerindeki çalışmalar artış göstermiştir ve günümüzde de sıklıkla biyolojik polimerik NP'ler üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Polilaktik asit, poli(amino asitler), kitosan, aljinat ve albümin gibi biyolojik moleküller daha az toksisiteye neden olup, ilaç salınımını arttırarak daha yüksek biyobozunurluk göstermektedirler. Ayrıca

polimerik NP'ler yüzey aktif polisorbatarla kaplandığında kan beyin bariyerinin (BBB) endotel hücre zarı ile etkileşimlerini arttırdığı tespit edilmiştir (Gavas vd., 2021). Antikanser ilaçlar, antiviral ajanlar, vitaminler, antioksidanlar, antisens oligonükleotitler ve plazmid DNA gibi ilaçları vermek için doğal polimerler kullanılmıştır (Alrushaid vd., 2023).

Biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olan PLGA (poli-laktik-ko-glikolik asit), transdermal yollardan ilaç dağıtımında kullanılmıştır. Polimerik NP'ler, beyin kanseri teşhisi için daha iyi optik ve manyetik rezonans görüntüleme için kullanılmıştır. DOX yüklü proteazla aktive edilmiş yakın kızılötesi floresan polimerik NP'ler, kanser için görüntüleme ve tedavi için kullanılmıştır. Başka bir çalışmada, ^{99m}Tc-PLA/PVA/Atezolizumab nanopartiküllerinin biyolojik dağılımı, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin teşhisinde kullanılmıştır (Alrushaid vd., 2023).

Suda çözünürlüğü yüksek oranda olan poli(alkil sinanoakrilat) (PACA) polimerlerinin ve birkaç PACA türevinin (etil, n-bütül ve oktil siyanoakrilat) kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Bu polimerler, yüksek oranda biyolojik bozunabilirliğe sahip, düşük toksisiteli koloidal taşıyıcıların geliştirilmesi için yeni ufuklar açmıştır. Ligandların konjuge edilmesiyle hazırlanan hedefe yönelik dağıtım sistemleri, reseptör aracılı alım yoluyla tümörlerde artan birikim göstermiştir. DOX'un spesifik olarak kanser hücrelerine verilmesi için folat ile kombine edilmiş kitosan kaplı PACA NP'leri üretilmiştir. Bu NP'ler ile gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları, NP'lerin folat reseptörlerini eksprese eden kanser hücreleri üzerindeki terapötik etkisinin arttığını göstermiştir. Bu polimerlerin biyogörüntülemeye, özellikle floresan görüntülemeye uygulanması, kuantum noktalarıyla birleştirilmiş PEG ile PACA NP'ler hazırlanarak araştırılmıştır (Kumar vd., 2019).

Poli (laktit-ko glikolit asit) (PLGA) ise çok yüksek oranda biyolojik olarak parçalanabilirliği ve biyoyumluluğu nedeniyle ilaç dağıtımında kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. Antikanser ilaçlarla birlikte oligonükleotitlerin ve proteinlerin verilmesi için PLGA bazlı dağıtım sistemleri de kullanılmıştır. 5-florourasil, PTX, sisplatin, DOX ve dosetaksel gibi çeşitli hidrofilik ve hidrofobik antikanser ilaçları, bu polimerler kullanılarak özellikle kanser hücrelerine uygulanmıştır. Ayrıca, bu polimerler ilacın kanser bölgelerine hedefe yönelik olarak verilmesi için araştırılmıştır. Kanser hücrelerine spesifik hedefleme için özellikle kanser hücreleri yüzeyinde bol miktarda eksprese edilen bazı moleküllere yönelik çeşitli

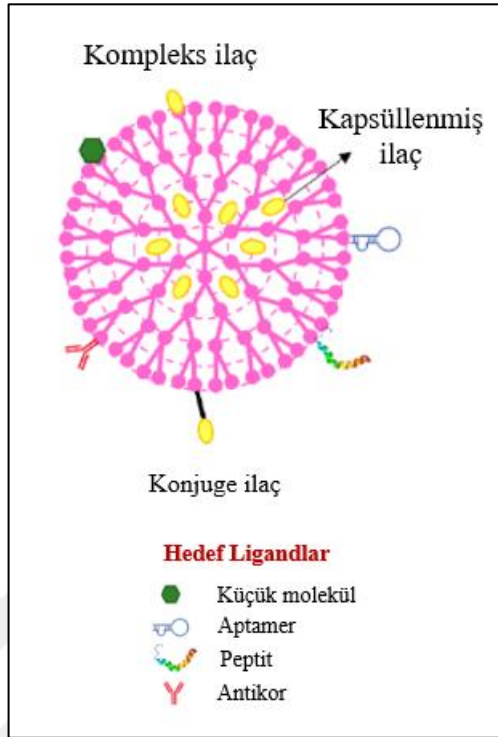
ligandlarla modifiye edilmişlerdir. Ligandlarla modifiye edilmiş PLGA bazlı nano taşıyıcı sistemlerin, tümör bölgelerine yüksek dozda antikanser ajan ulaştırdığı gösterilmiştir. Bir çalışmada aptamer konjuge PLGAb-polietilen glikol (PEG) nanopartikülleri sisplatin ile kombine edilmiş ve prostat kanseri ksenograft fare modellerinde *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. İlaç yüklü bu nano taşıyıcının serbest ilaca benzer şekilde antikanser etki gösterdiği belirlenmiştir. Böylece ajanların istenmeyen yan etkileri azaltılarak hedefe spesifik tedavi yöntemleri geliştirilmede polimerik NP'lerin kullanımı tercih edilebilir (Kumar vd., 2019). Bunların dışında polimerik NP'lerin kullanıldığı PTX poliglumex (Xyotax), PEG-kamptotin (Protekan), modifiye dekstran-kamptotin (DE 310), HPMa ko-polimeri-DACH-platinat (AP5346), HPMa ko-polimeri-platinat (AP 5280), HPMa ko-polimeri-PTX (PNU166945) ve HPMa ko-polimeri-DOX galaktozamin (PK2) gibi örnekler mevcuttur (Gavas vd., 2021).

Polimerik bazlı nanopartiküllerin düşük stabilite ve toplanma eğilimi gibi bazı dezavantajları vardır. Bu özellikler, ilaç dağıtımı gibi bazı uygulamalarda kullanılmalarını zorlaştırabilir. Ek olarak, reaksiyon koşullarının dikkatlice kontrol edilmesi gerektiğinden, polimerik bazlı nanopartiküllerin sentezlenmesi zor olabilir. Polimerik bazlı NP'ler oksidasyona eğilimlidir ve bu da bazı uygulamalarda kullanılmalarını sınırlandırabilir. Reaksiyon koşullarının dikkatle izlenmesi gerektiğinden, polimerik bazlı nanoparçacıkların endüstriyel uygulamalar için ölçeklendirilmesi zordur (Alrushaid vd., 2023).

Dendrimerler

Dendrimerler yapı bakımından ağaç dallarına benzeyen, radyal olarak simetrik, küresel ve kompakt nano boyutlardaki yapılardır (Şekil 2.24). İç ve dış olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadırlar. Dış tabakayı ilaç konjugasyonu ve hedeflemesi için kullanılan fonksiyonel gruplar oluştururken, iç tabakada ilaç kapsülleme etkinliği, toksisitesi ve kontrollü salım mekanizmaları için gerekli elemanlar yer almaktadır. Dendrimer tasarımları farklı özellik ve işlevlere sahip olacak şekilde sağlanabilmektedir. Sıklıkla yinelemeli sentez yöntemleriyle üretilen dendrimerler, sentez sürecindeki kontrol edilebilir özellikleri nedeniyle farmasötik olarak geniş bir uygulanabilirlik sunarlar. Yüksek dallanma, suda çözünürlük, iç kısımlarındaki boşluklu yapı ve biyouyumluluk gibi özellikleri nedeniyle ideal aktif yardımcı

maddeler olan dendrimerler, çözünmeyen ilaçların çözünürlüğünü ve ilaç etkinliğini artırabilir, ilaç toksisitesini azaltabilirler (Sun vd., 2023).



Şekil 2. 24. Dendrimer yapısı (Rai vd., 2023).

Mevcut antikanser ilaçların çoğunun tümör hücrelerini spesifik olarak hedefleyememesi ve sistemik toksisite sebebiyle dendrimerler ilaç ve gen taşıyıcı sistemler olarak kanser tedavisinde kullanılabilir. Aynı zamanda BBB'yi geçebilme özelliğine de sahip olan dendrimerlerin, tümör ilişkili antijenlere özgü antikorlar tarafından spesifik olarak kanser hücrelerine hedeflenmesi ve böylece endositoz yoluyla hücre içine alınmaları mümkündür. Dendrimerlerin yüzeyindeki çok sayıda pozitif yüklü grup, negatif yüklü hücre zarı ile etkileşime girer ve özellikle kanser hücreleri için sitotoksositeye katkıda bulunur. Böylece dendrimerler tümör dokusunda intratumoral birikim sağlayarak sistemik toksisitenin azalmasını sağlayabilmektedir (Crintea vd., 2023; Alrushaid vd., 2023; Rai vd., 2023).

Dendrimerler yapıları itibariyle belirteç olarak kullanılacak boyaları ve diğer materyalleri (genetik materyaller ya da ajanlar) kapsülleme, kompleksleştirme ya da konjugasyon yoluyla taşıyabilirler. Bu nedenle tedavinin yanı sıra teşhis ya da tümör lokalizasyonu sayesinde tedaviyi izleme aracı olarak da kullanılabilirler (Crintea vd., 2023).

Çok sayıda dendrimer mevcuttur ve yapılarına, dallanmalarına, çözünürlüklerine, uç kısımlarına ve üretimlerine göre kategorize edilirler. Poliamidoamin (PAMAM), poli(propilenimin) (PPI) ve poli(L-lisin) (PLL) antikanser ilaç dağıtımı için en çok araştırılan dendrimerlerdir (Rai vd., 2023; Alrushaid vd., 2023). Antikanser ajanların taşınmasında en sık kullanılan dendrimerler PAMAM ve PPI'dır. Kullanım amaçlarına göre dendrimerler işlevselleştirme denilen bir işlemle aktif bölgeler eklenerek kullanılabilir. Böylece çok işlevli mimariye sahip yapılara dönüşen dendrimerlere yüksek biyouyumluluk, düşük ve kanser hücrelerine seçici toksisite özellikleri kazandırılmış olur. Bununla birlikte gelişen nanoteknoloji pH, sıcaklık ve ışık gibi çevresel faktörlere yanıt verebilecek duyarlı NP'ler geliştirmeye odaklanmıştır (Rai vd., 2023).

Kolon kanseri hücre hattı HT-29 ile gerçekleştirilen bir çalışmada sialyl Lewis X antikoru ile konjuge edilmiş PAMAM dendrimerler kullanılmış ve kolon kanseri hücreleri spesifik olarak hedeflenmiştir. *In vivo*'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise gambogik asidin (GBA) hedefe yönelik etki sağlaması için kolik asit ve E vitamini ile modifiye edilmiş telodendrimer geliştirilmiştir. GBA-telodendrimer formülasyonu kolon kanseri ksenograft hayvan modellerine enjekte edilmiştir. Ardından *in vivo* görüntüleme sağlanmış ve telodendrimerlerin kolon kanseri hücrelerini spesifik olarak hedefleyebildiğini göstermiştir (Rai vd., 2023).

Şeker veya lipit ile kaplı dendrimerler, immünostimülatör antikanser ilaçlarından farklı olarak antijenisiteyi baskılayabilirler. Yani dendrimerlere yüklenen ajanların kan dolaşımındaki yarı ömürleri önemli ölçüde uzatılabilir. Kolon kanseri tedavisinde kullanılan Capecitabine (CPB), karaciğere, kemik iliğine, kana ve saç hücrelerine zarar verebilir. Gerçekleştirilen bir çalışmada CPB'nin antikanser aktivitesini arttırmak ve sadece kolon kanseri hücrelerini hedefleyerek sağlıklı dokuları korumak amacıyla G4 PAMAM (dördüncü nesil PAMAM) dendrimerleri kullanılmıştır. Serbest ilaçla kıyaslandığında dendrimerle konjuge edilmiş CPB'nin tümör boyutunda daha belirgin bir azalmaya neden olduğu, karaciğer ve kanda daha az yan etkiye sebebiyet verdiği tespit edilmiştir (Rai vd., 2023).

PTX, kamptotesin, 5-florourasil, metotreksat ve DOX gibi hidrofobik antikanser ilaçların uygulanması ve çözünürlüklerinin sağlanması için dendrimerlerin özelliklerinden yararlanılabilir. Yaygın olarak kullanılan DOX, kardiyotoksisiteye neden olduğundan PAMAM bazlı ilaç taşıma sistemi, DOX'un toksik etkilerini

azaltmak ve aynı zamanda etkinliğini korumak için tasarlanmıştır. Akciğer kanserinde gerçekleştirilen bir çalışmada ilaç birikimini önlemek amacıyla düşük pH ortamında üzerinde bulunan yükleri bırakabilen DOX-dendrimer konjugatları uygulanmış ve metastatik özelliklerin azaldığı belirlenmiştir. Diğer bir yandan serbest PTX'in böbrekte sitotoksikite gösterdiği ancak G4 PAMAM ile konjuge edilen PTX'in bu etkiyi azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum PTX'in böbrek kanserlerinde kullanımını mümkün kılmaktadır. Diğer bir antikanser ajan olan ve nükleik asit sentezini engelleyen melfalan, PPI ile kapsüllendiğinde fare modellerinde sadece kanser hücrelerinin hedeflenmesini sağlamıştır.

Başka bir araştırmada, tümör büyümesinin inhibisyonunu sağlamak için G4.5 PPI dendrimerleri geliştirilmiştir. Bu tip dendrimerlerle, PTX kapsüllenmiş ve monoklonal antikör mAbK1 konjuge edilmiştir (mAbK1-PPI-PTX). Kanser hücrelerinde spesifik olarak aşırı eksprese edilirken çoğu normal hücrede eksprese edilmeyen mezotelin proteini mAbK1 ile hedeflenebilmektedir. mAbK1-PPI-PTX, serbest PTX'e göre çok daha yüksek oranda tümör proliferasyonunu inhibe etmiştir. Diğer bir dendrimer olan PLL, DOX için bir taşıyıcı olarak kullanıldığında serbest DOX'a oranla prostat kanseri hücrelerinde daha derin penetrasyon göstermiş ve tümör proliferasyonunun inhibisyonuna yol açmıştır. Böylece dendrimerler aracılığıyla antikanser ilaç dağıtımının etkinliği ve verimliliği artırabilir ancak üretimleri maliyetlidir. Bununla birlikte dendrimerlerin insan sağlığı üzerindeki uzun vadeli etkileri belirlenmeli ve kalite kontrol sorunları giderilmelidir (Yan vd., 2021).

Polimerik Miseller

Polimer misellerin boyutları tipik olarak 10 ila 100 nm arasında değişebilir. Koloidal olarak stabil olan çekirdek bölge ve çözölmüş hidrofilik polimer zincirlerinden oluşan dış bölge (korona veya kabuk bölgesi olarak da bilinir) olmak üzere iki ayrı bölümden oluşurlar. Hidrofobik moleküller için taşıyıcı sistem olarak ve doku mühendisliğinde iskele olarak kullanılabilirler (Sun vd., 2023).

Polimer miseller, hidrofobik ilaçları hidrofobik çekirdek bölgelerinde etkili bir şekilde kapsülleyebilir. Böylece ilaç yan etkilerinin ortadan kaldırılması, çözünmeyen ilaçların suda çözünürlüğünü arttırmak, ilaç salım hızının kontrolü ve ilaç moleküllerinin belirli ortamlarda bozulmadan korunması sağlanabilmektedir (Sun vd., 2023). Polimerik yapıdaki miseller polimer-ilac konjugatları, kapsüllü ilaç taşıyıcılar ve poli iyon kompleksi miseller olmak üzere üç farklı şekilde kategorize edilmektedir.

Polimer-ilaç konjugatları ve kapsüllü ilaç taşıyıcılar sıklıkla birçok ilacın terapötik dozlarda verimli bir şekilde taşınımını sağlamak amacıyla kullanılırken, poli iyon kompleksi miseller ile zıt yüklü polimer/ilaç kombinasyonları taşınabilir. Poli iyon kompleksleri peptitler ve DNA'nın taşınmasına yükün nötralizasyonunu sağlayarak olarak vermektedir (Mandal vd., 2017).

Tümör dokusunu hedeflemek için dolaşımda uzun süre kalabilme özelliği taşıyan polimerik miseller, potansiyel bir kanser tedavisi aracıdır. Misellerin yüksek çözünürlük özelliği, çözünmeyen ilaçların stabilitesini ve biyoyararlanımını artırabilir. Bununla birlikte misellerin yapısı pH değişimlerinden etkilendiğinden ve normal doku ile tümör dokusu arasında pH farkı bulunduğundan seçici toksisite göstermeleri sağlanabilir. Örneğin, transferrin reseptörü hedefli ve pH'a duyarlı misel sistemi, çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek, yan etkileri minimum düzeye indirmek ve tümör hedefli tedaviyi sağlamak için akıllı nanopartiküller olarak kullanılabilir. Ayrıca DOX yüklenen ve folat ile modifiye edilmiş pH'a duyarlı misel kombinasyonu, DOX'un anti kanser etkisini arttırmıştır. Uygulanan bu kombinasyon DOX'un sistemik toksisitesini azaltarak, kalp ve akciğer dokularındaki yan etkileri minimuma indirmiştir (Sun vd., 2023). Benzer şekilde katı tümörlere misellerle konjuge edilerek uygulanan epirubicin, serbest ilaca kıyasla daha az toksisite göstermiştir. Yumurtalık kanserinde polimerik misellerle konjuge edilmiş Genexol ve karboplatinin de etkinliği artış gösterirken toksisitede azalma meydana gelmiştir (Jin vd., 2020).

Miseller sıcaklık ve pH gibi dış uyarıcılara karşı oldukça duyarlı olduklarından kemo-fototermal tedavi için son derece uygundur (Sun vd., 2023). Polimerik misellerin anti kanser ilaçların taşınımlarının yanı sıra göz hastalıklarının tedavisinde de oküler ilaç taşınım sistemi olarak kullanıldıkları çalışmalar mevcuttur (Mandal vd., 2017).

Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorların (mAb) spesifik olarak hedefleme yetenekleri kanser tedavisinde kullanımlarını oldukça yaygın hale getirmiştir. Hali hazırda mAb'ler kemoterapide kullanılmakla beraber NP'ler ile birleştirilerek kanser hücrelerini spesifik hedef hale getirmede önemli araçlar olarak yer almaktadır. NP'lerle birlikte kullanılan mAb'lerin, tek başına kullanılan bir kemoterapik ajandan veya mAb'den çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir. HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinde gerçekleştirilen bir antikor-ilaç NP konjuge çalışmada, iç kısımda PTX ajanı ve modifiye yüzeyde transtuzumab kullanılmıştır. Tek başına PTX ya da transtuzumab

uygulamasına kıyasla konjuge NP daha az toksisite ve daha yüksek anti kanser etki göstermiştir (Cheng vd., 2021; Gavas vd., 2021; Sievers ve Senter, 2013)

Ekstrasellüler Vesiküller

Ekstrasellüler vesiküller (EV) boyutları 50 ila 1000 nm arasında değişen çift katmanlı fosfolipid yapılı vesiküllerdir. EV'ler çeşitli hücre tipleri tarafından sürekli olarak salgılanırlar. Boyut, köken ve içerik bakımından EV'ler eksozomlar, mikrovesiküller ve apoptotik cisimler olarak üç gruba ayrılmaktadırlar. Eksozomlarla birleştirilen NP'ler, köken aldıkları hücrelere çok benzeyen lipid ve moleküllere sahip oldukları için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Eksozomlar biyolojik yapılar olduğundan bağışıklık sisteminden kolayca kaçabilirler ve kanser hücreleri içine çok hızlı şekilde sızabilirler. Bu nedenle hedef bölgelere sitotoksik ilaçlar ve diğer anti kanser ilaçları taşımak amacıyla doğal araçlar görevi görürler (Tablo 2.7). Meme kanseri hücrelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada DOX yüklü eksozomlar (exoDOX) kullanılmış ve serbest DOX'a kıyasla exoDOX'un daha sitotoksik etki yarattığı, ilacın kalpte birikiminin önlendiği belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada makrofajdan türetilmiş bir eksozom, aminoetilanizamid-polietilen glikol (AA-PEG) ile modifiye edilmiştir. Ardından AA-PEG eksozomu PTX ile kombine edilmiştir. Daha sonra tasarlanan eksozom, pulmoner metastazlı akciğer kanseri fare modelinde iyileştirilmiş terapötik sonuçlar göstermiştir. Eksozomlar nükleik asitlerin taşınmasında kullanılabilirler. Bir çalışmada miR-497 taşıyan eksozomlar A549 hücrelerine aktarılmıştır. Aktarımın gerçekleştirildiği akciğer kanseri hücrelerinde proliferasyon azalmış ve ilişkili genlerin ekspresyonu baskılanmıştır (Cheng vd., 2021; Gavas vd., 2021).

Tablo 2. 7. Ekstrasellüler vesiküllerin kanser tedavisinde kullanımı (Cheng vd., 2021).

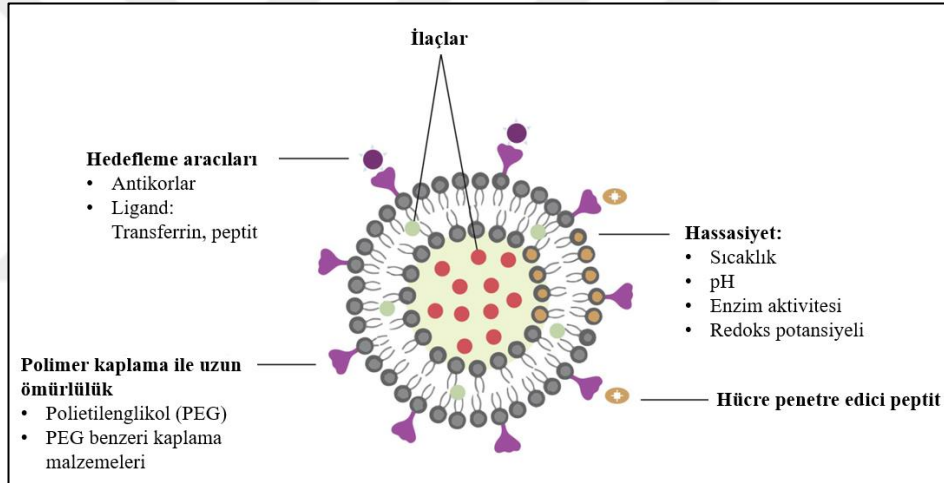
Nano taşıyıcı	Farmasötik bileşenler	Hastalık	Etki
AA-PEG ile modifiye eksozom	Paklitaksel	Akciğer kanseri	Yüksek yükleme kapasitesi, kanser hücrelerinde daha iyi birikim ve iyileştirilmiş terapötik sonuçlar sergiledi.
Eksozom	Doksorubisin	Osteosarkoma	Serbest DOX'a kıyasla miyokard hücrelerine sitotoksikite azalırken anti-tümör etkisi arttırıldı.
Eksozom	miR-497	Akciğer kanseri	Tümör büyümesi ve ilişkili genlerin ekspresyonu baskılandı.
Mikrovesikül	Terapötik mRNA/protein	Schwannoma	Suicide terapötik mRNA / protein yüklü mikroveziküller, ön ilacı aktif forma dönüştürdü ve kanser hücresi ölümüne yol açtı.
Ekstrasellüler vesikül	miR-101	Osteosarkoma	miR-101 yüklü ekstrasellüler vesikül alındıktan sonra osteosarkom hücre invazyonu ve migrasyonu baskılandı.
Eksozom	İnterferon- γ füzyon protein	Prostat kanseri	Eksozomal aşı, prostat kanserinden türetilen eksozomlara karşı bağışıklık tepkisini indükledi ve tümör büyümesini inhibe etti.

Sentetik NP'lerle karşılaştırıldığında, eksozom NP'ler doğal biyoyumluluğa, daha yüksek kimyasal stabiliteye ve hücreler arası iletişimi yönetme yeteneğine sahiptir.

Ayrıca EV'ler radyoterapi ve immünoterapide de kullanılabilir. Birçok avantaja rağmen, anti kanser tedavisi için EV'lerin uygulanmasını sınırlayan seri üretimde zorluklar olması ve diğer NP'lere oranla ajanların nispeten daha düşük miktarda yüklenebilmesi gibi faktörler bulunmaktadır (Ma vd., 2021; Cheng vd., 2021).

Lipozomlar

Günümüzde en başarılı ilaç taşıma sistemi olarak kabul edilen lipozomlar, klinik uygulamalar için onay alan ilk nano ölçekli ilaçlardır. Lipit dış tabaka ve ilacı hapseden bir çekirdekten oluşan lipozomlar hidrofobik veya hidrofilik özellikler deki ilaçları taşıyabilirler (Şekil 2.25). Lipozomların lipit tabakalarının yapısı değiştirilerek canlı hücrelerin hareketlilik ve deformasyon gibi biyofiziksel özelliklerini taklit edilebilir. Lipozomların bu özelliklerinden yararlanılarak ilaçların daha etkili şekilde amacına ulaştırılması sağlayabilir (Yao vd., 2020).



Şekil 2. 25. Lipozomal ilaç taşıma sistemi (Sell vd., 2023).

Dolaşımda uzun süre kalabilme yetenekleri sayesinde anti kanser ilaçların ve genetik materyallerin taşınması lipozomlarla sağlanabilir. Anti kanser ilaçların taşınımında serbest ilaca kıyasla sistemik toksisite lipozomlar yardımıyla azaltılabilir. Bununla birlikte ilaçların çözünürlüğünü arttırıp, kapsüllenen ilacın yavaş ve sürekli salınımını sağlayabilirler. Özellikle meme ve prostat kanserlerine yönelik çalışmalarda lipozomların kullanılması oldukça yaygın hale gelmiştir. DOX ve PTX'in yan etkilerini azaltmak, ilaç direncini önlemek ve anti kanser etkinliklerini arttırmak amacıyla lipozom aracılı taşıma sistemlerinin kullanıldığı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Yao vd., 2020). Hali hazırda çeşitli kanser tipleri üzerinde kullanılan FDA tarafından onaylı Onivyde®, Vyxeos® ve Zolsketil® gibi lipozomal

ilaçlar bulunmaktadır. Ayrıca klinik denemeleri süren lipozomal ilaçlar da mevcuttur. Ancak çeşitli kanserlerin tedavisindeki etkinliklerine rağmen, lipozomlar da dahil olmak üzere NP'lerin henüz belirlenmemiş bazı potansiyel toksik etkilere sahip olabileceği ve hücreleri spesifik hedefleme etkinliklerinin kesin olmadığı bilinmektedir (Fulton ve Missaoui, 2023).

Solid Lipit NP (SLN)

Solid lipit NP'lerin (SLN) boyları 1 ila 1000 nm arasında değişebilir ancak çoğunlukla 150-300 nm boyutlarındadırlar. İlaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilen SLN'ler ilaç hareketliliğini kısıtlayarak ilacın düzenli bir şekilde salınımını sağlayabilirler. Böylece ilacın daha stabil halde olmasını sağladıkları gibi hidrofobik ve hidrofilik özelliklerdeki molekülleri taşıyabilirler. SLN'lerin en önemli özelliklerinden biri oda sıcaklığında da vücut sıcaklığında da katı halde bulunmalarıdır. Ayrıca polimerik NP'lerin, lipozomların ve çeşitli emülgatörlerin birleştirilerek faydalı özelliklerinin bir arada kullanılmasına olanak sağlayabilirler (Sheoran vd., 2022). Bu nedenle kanser tedavisinde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirler. DOX ve idarubisin SLN aracılı olarak lösemi hücrelerine ve lösemi modeli farelere uygulandığında olumlu sonuçlar göstermiştir (Gavas vd., 2021). Ayrıca bağırsak, mide, meme ve prostat kanserlerinde SLN'lerin çeşitli kemoterapik ajanlar için taşıyıcı olarak kullanıldığı uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte beyine ilaç taşınması, gen terapileri ve aşılar da adjuvan olarak kullanımları da mevcuttur (Sheoran vd., 2022).

Nanoemülsiyonlar

Nanoemülsiyonlar, sulu ortamda 10-1000 nm arasında değişen bir yağ damlacığının heterojen karışımlarına sahip kolloidal NP'lerdir. Dış yüzeylerinde yüzey aktif madde ve iç kısımda lipit molekülleriyle birlikte taşınacak ilaç bir arada bulunmaktadır. Dış tabakadaki kapsülleme nedeniyle taşınan ilacın bozulmaya karşı korunması ve plazmadaki yarı ömrünün uzatılması sağlanmaktadır. Nanoemülsiyonlar geniş yüzey alanı, yüzeysel yük, dolaşımda yüksek yarı ömür, spesifik hedefleme ve formülasyonun görüntüleme kapasitesi sayesinde kanser araştırmalarında tercih edilmektedir (Sánchez-López vd, 2019). Nanoemülsiyonlar büyüklükleri ve yükleri sebebiyle bariyerlerden geçme avantajına sahip olduklarından dokularda kolayca birikebilirler. Bu nedenle cilt gibi geçirgenliği zor olan biyolojik bariyerlere karşı terapötik taşıyıcı olarak kullanılabilirler. Özellikle melanomada hem lokal (topikal ve dermal) hem de sistemik (transdermal) olarak ilaçların verilmesi nanoemülsiyonlar ile

sağlanabilir (Duarte vd., 2023). Nanoemülsiyonlar diğer NP'lerden farklı olarak optik berraklık, stabilite ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi daha gelişmiş özelliklere sahiptir. Ancak nanoemülsiyonların klinik uygulamalarında zorluklar vardır çünkü üretimleri için yüksek sıcaklık ve basınç sağlanmalı, homojenizatörler ve mikroakışkanlaştırıcılar gibi pahalı cihazlar bulundurulmalıdır (Gavas vd., 2021).

Nanospongular

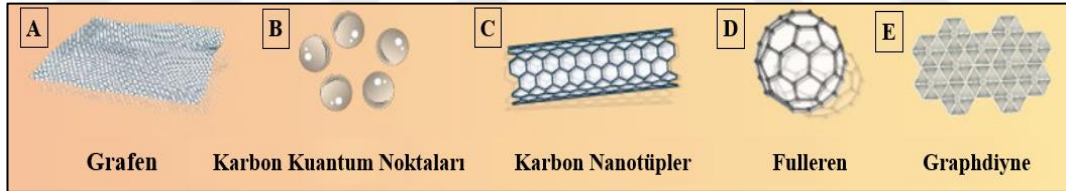
Nanospongular katı, çapraz bağlı, polimerik, nano boyutlu, gözenekli ve ağ benzeri yapılardır. Çok çeşitli sıcaklıklarda ve pH seviyelerinde önemli stabilite sergileyen hidrofilik, hidrofobik ve 3 boyutlu özellikler gösterirler. Yüksek biyoyumumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve düşük sitotoksikite gibi özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalar için uygundur. Nanosponguların ağ benzeri kolloidal yapıları ilaçlar, fitokimyasallar, uçucu yağlar, antineoplastik ajanlar, genetik materyaller, proteinler ve peptitler dahil olmak üzere farklı bileşiklerin kapsüllenmesi için ideal adaylar yapar. Meme, prostat, karaciğer, akciğer ve servikal kanserlerin tedavisinde siklodekstrin, DNAzyme ve etil selüloz gibi nanosponguların kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte nanosponguların yüzeyleri çeşitli yöntemlerle işlevselleştirilerek kullanım amaçları çeşitlendirilebilir. Örneğin siklodekstrin bazlı nanosponguların yüzeyleri kolesterol ile işlevselleştirilerek biyoyararlanımı artırılabilir. Diğer NP'ler gibi nanospongulara da DOX gibi anti kanser ilaçlar yüklenerek toksisite ve olası yan etkilerini azaltılabilir. Ayrıca çeşitli ilaçların oral dozlarını azaltmak amacıyla ya da cilt yoluyla uygulanan ajanların penetrasyonlarını artırarak trans-epidermal ilaç dağıtımını amacıyla kullanılabilirler. Nanospongular programlanabilir ve sürekli bir ilaç salınımı gösterirler ancak üretimleri yüksek maliyetlidir. Ayrıca üretimleri için daha çevre dostu yaklaşımlar geliştirilmelidir (Karthic vd., 2022; Iravani ve Varma, 2022; Gavvas vd., 2021).

İnorganik Nanopartiküller

Karbon Nanopartiküller

Karbon NP'ler karbon nanotüpler, grafen, graphdiyne, fullerene, karbon kuantum noktaları (*quantum dots*) ve nanodiamondlar olarak gruplandırılmaktadır (Şekil 2.26). Karbon nanotüpler (CNT) esasen karbon atomlarından yapılmış silindirik moleküllerdir. CNT'ler, 1 nm kadar küçük çaplara ve birkaç µm uzunluğa sahip yüksek bir en/boy oranına sahip, açık uçlu veya kapaklı olabilen kesintisiz silindir şeklinde yuvarlanan grafen tabakalardır. Tek bir grafen tabakasından yapılan CNT'ler, tek

duvarlı bir nanotüp (*single-walled nanotubes*, SWNT) ile sonuçlanırken, birkaç grafen tabakası çok duvarlı karbon nanotüpleri (*multiwalled carbon nanotubes*, MWNT) oluşturur. 1991'de Iijima tarafından keşfedildiklerinden beri, benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri ve elektronik cihazlardan ve sensörlerden yüksek mukavemetli ve düşük ağırlıklı nanokompozit malzemelere kadar çok çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamaları nedeniyle karbonun bu allotroplarına yoğun ilgi olmuştur. CNT'ler çözünür değildir ancak organik gruplarla işlevselleştirilerek biyolojik uygulamaların yolu açılmıştır. Yüksek yüzey alanlarından dolayı, çok çeşitli terapötik molekülleri adsorbe edebilir veya konjuge edebilirler. İğne benzeri şekilleri nedeniyle, CNT'ler hücre zarını delebilir ve görünür hücre hasarına neden olmadan hücre içine geçebilir. Kanser gibi hastalıkların tedavisinde CNT'ler, terapötik moleküllerin hedef hücreye nüfuz etmesine yardımcı olabilirler. Diğer NP'ler gibi CNT'ler de ilaç taşıyıcı sistemler olarak kanser tedavisinde kullanılabilir. Bir çalışmada folik asit reseptörlerini yüksek seviyede eksprese eden kanser hücrelerinin hedeflendiği sisplatin yerleştirilen MWNT nano taşıyıcı sistemlerin lipozom gibi küresel NP'lere kıyasla lenf nodlarında daha iyi tutulum gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle lenf kanserlerinde CNT'lerin kullanılması umut vadetmektedir (Elhissi vd., 2012).



Şekil 2. 26. Karbon nanopartikül tipleri (A) Grafen, (B) Karbon kuantum noktaları, (C) Karbon Nanotüpler, (D) Fulleren, (E) Graphdiyne (Tang vd., 2022).

Grafen bazlı nanomalzemeler, 2004 yılında keşfedildiklerinden beri antikanser ilaç dağıtımı için incelenmiştir. Grafen ve grafen oksit (GO), indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve grafen nanoribbonlar (GNR) gibi türevleri, genellikle fototerapi, kemoterapi ve görüntüleme gibi birçok stratejiyle bütünleşmek için yeni platformlar olarak tasarlanan birçok benzersiz ve üstün fizikokimyasal özelliğe sahiptir. İki boyutlu (2B) yapıları, hidrofobik bazal düzlemde, hidrofobik etkileşim veya eşlenik reaksiyon yoluyla çeşitli antikanser ajanların yüklenmesini sağlayan devasa bir bağlanma yüzey alanı sağlamaktadır. Optik özellikleri sebebiyle ışıkla tetiklenmeleri, kontrollü ilaç dağıtım sistemi olarak kullanılmaları mümkündür. Bununla birlikte ROS oluşumuna neden olmaları hücre ölüm yollarını tetikleyebilir (Tang vd., 2022).

İki boyutlu bir nanomateryal olan Graphdiyne (GDY) ise diğer karbon NP'lerin aksine düzgün dağılmış nanoporlara, geniş absorpsiyon aralığına ve mükemmel fotoelektronik özelliklere sahiptir. GDY yüksek adsorpsiyon enerjisi ve güçlü elektron yakalama özellikleri nedeniyle DNA, glikoz ve nem tespiti için bir biyosensör görevi görebilir. Şimdiye kadar GDY bazlı nanomalzemeler, çok işlevli performansları nedeniyle hedefe yönelik ilaç dağıtımı, radyasyondan korunma, biyosensing ve biyogörüntüleme dahil olmak üzere kanser tanı ve tedavisinde kullanılabilmektedir (Tang vd., 2022).

Fulleren, karbon allotropu olarak keşfedilmiştir (Nobel Kimya Ödülü, 1996). Fulleren, özel yapı ve farklı fizyokimyasal özellikleri nedeniyle kanser tanı ve tedavisinde yaygın olarak araştırılmaktadır. Fulleren, içi boş bir küre, elipsoid veya tüp şekline yuvarlanan bir grafen levha yapısındadır. Fullerenin benzersiz geometrisi ve moleküler topolojisi, ona geniş yüzey alanı, küçük parçacık boyutu ve yüksek reaktivite gibi belirgin özellikler kazandırır. Geniş spesifik alanı ve benzersiz 3B iskele yapısı, fullerene kafesine birden fazla ilacın yüklenmesini sağlar. Katı tümörlere penetrasyonun mükemmel özellikleri ve yüksek kimyasal reaktivite göz önüne alındığında, fullerene, terapötik moleküllerin hedefe ulaştırılmasını sağlamak için tümör bölgelerinin özel koşullarına dayanan uyarılara duyarlı sistemler olarak da tasarlanabilir. Ek olarak, doğal optik ve termodinamik özellikleri nedeniyle, fullerene iyi bir ışığa duyarlılaştırıcı ajan olarak işlev gördüğü kanıtlanmıştır. Bu özelliği nedeniyle kanser tanı ve tedavisinde umut verici bir nanomalzemedir. Özellikle, antikanser aktivitesi ve kanser hücreleri üzerindeki duyarlılık etkisi nedeniyle fullerene, güçlü bir antineoplastik ajan olarak işlev görebilir. Ayrıca fullerene, serbest radikalleri temizleme kapasitesi nedeniyle antioksidan olarak kullanılabilir (Tang vd., 2022).

Ayırt edici fotofiziksel özellikleriyle kuantum noktaları (QD'ler) genellikle grup II ve grup VI elementlerin oluşturduğu moleküllerinin yüz binlerce atomundan oluşmaktadır. Bu NP kullanılarak ilaç istenen yerde salınırken tümörün görüntülenmesi sağlanabilir. Peptitler, folat ve büyük proteinler dahil olmak üzere çeşitli ligandlar, bir tümör lokalizasyonunu aktif olarak hedeflemek için QD yüzeyine aktarılabilir. Bununla birlikte QD'ler sıklıkla kanser görüntülenmesinde kullanılmaktadır (Sun vd., 2023).

Nanodiamondlar (ND) ise düzenli yapıdaki karbon atomlarından oluşan çapları birkaç nm'lik küçük elmas kristalleridir. ND'ler oldukça sert ve aşınmaya dirençlidirler.

Ayrıca diğerkarbon NP'lere kıyasla moleküllereyapışmalarını kolaylaştıran pürüzlü yüzeyleri vardır. Biyolojik sistemler tarafından iyi tolere edilebilen özellikleri ve çeşitli bileşiklerle yüzey modifikasyonunun kolaylığı nedeniyle ND'ler, ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilecek umut verici nanomateriyallerdir. ND-DOX konjugatı uygulanan karaciğerkanseri fare modellerinde serbest DOX'a kıyasla ND ile konjuge DOX daha yavaş salınım göstermiş ve farelerde sağkalımı 4 kat arttırmıştır. Ayrıca ND-DOX, serbest DOX'un aksine böbrekler, karaciğerve dalak üzerinde toksik bir etki göstermemiştir. Ancak ND'ler agregasyon gösterebildiklerinden kullanımları sınırlıdır (Lisik ve Krokosz, 2021).

Silika Nanopartikülleri

Kanser terapisinde mezoporöz silika nanoparçacıkları (MSN), suda az çözünen ilaçların taşıyıcıları olarak büyük ilgi görmektedir. MSN'ler sadece ilaç taşıyıcı sistemler için değil, aynı zamanda kataliz, manyetizma, sensörler ve optik malzemeler ile de kullanılabilir. MSN'ler bir terapötik ajan ve bir manyetik ya da optik izleyiciden oluştuklarından tanı ve tedavi amaçlı da kullanılabilirler (Esfahani vd., 2022). HeLa servikal karsinom hücre hatlarında gerçekleştirilen bir çalışmada folik asit ile modifiye edilmiş kuantum noktaları dış katman olarak kullanılmış ve MSN'ler DOX ile yüklenmiştir (FA-CQD-DOX-MSN). Uygulama gerçekleştirildiğinde HeLa hücre hatlarında ilaç salınımı pH değişimi ve glutasyon varlığında kontrollü bir şekilde gerçekleştirilip aynı zamanda görüntüleme de sağlanabilmiştir (Prasad vd., 2016). Kamptotesin ve PTX gibi sudaki çözünürlükleri nedeniyle etkileri azalan anti kanser ilaçlar MSN aracılı olarak taşındığında çözünürlüklerinde ve sitotoksitelerinde önemli bir fark gözlemlenmiştir. Örneğin Capan-1 pankreas kanseri hücre hattına MSN taşıyıcısıyla kamptotesin uygulandığında ilacın sitotoksik etkisi yaklaşık %86 artış göstermiştir. Benzer şekilde HepG2 karaciğerkanseri hücre hattında MSN aracılı PTX uygulamaları ajanın sitotoksik etkisini 4,3 kat arttırmıştır. Doku mühendisliği ve kök hücre araştırmalarının yanı sıra immünoterapi, gen terapisi ve radyoterapide de kullanılabilen MSN'lerin solunum, dolaşım, sindirim ve sinir sistemlerinde toksisiteye neden olması kullanımını sınırlandırmaktadır (Esfahani vd., 2022).

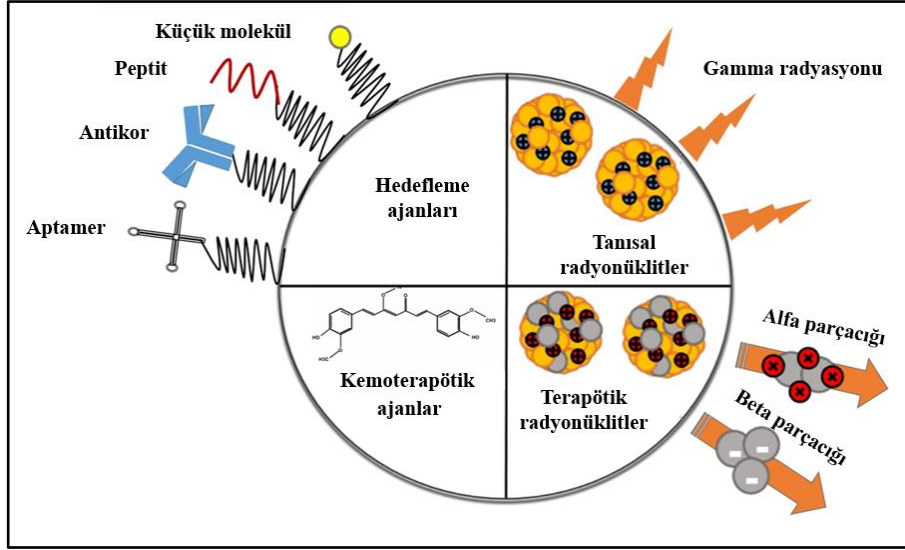
Kalsiyum Fosfat Nanopartikülleri

Kalsiyum fosfat, kemik gibi sert dokuların inorganik mineralidir ve kemik dokusu mühendisliğinde çok sayıda uygulamada kullanılmaktadır. Biyoyumluluğu ve biyodegradasyonu yüksek olan kalsiyum fosfat, NP formunda nükleik asitler, ilaçlar,

proteinler ve enzimler gibi terapötik ajanların tümör hücrelerine aktarılması için etkili dağıtım sistemi olarak da kullanılabilirler. Kalsiyum fosfat NP'lerin kolay hazırlanmaları, işlevselleştirilebilmeleri ve pH'a bağlı çözünürlük özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaları avantajlıdır. Melanoma, meme, karaciğer, kolorektal, servikal ve gastrik kanserlerde antikanser bir ajan taşıyan kalsiyum fosfat NP'leri bakır, lipid ve PEG gibi bir kaplayıcı kullanılarak çeşitli hedef moleküllere yönelik tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Buna rağmen NP'lerin agregasyonu, yüzey modifikasyonu gerektirmeleri, çoklu ve hassas konjugasyon yöntemleri sebebiyle dezavantajları mevcuttur (Khalifehzadeh ve Arami, 2020).

Manyetik Nanopartiküller

Manyetik NP'ler tipik olarak demir (Fe_3O_4 ve Fe_2O_3), kobalt, nikel ve bazı toprak metalleri gibi saf metallere veya metal-polimer karışımlarından üretilen NP'lerdir. Hipertermi kanser tedavisi, kontrollü ilaç salınımı, manyetik rezonans görüntüleme ve biyosensing gibi birçok tıbbi uygulamada kullanılırlar. En önemli avantajları manyetik özellikleri sebebiyle kontrol edilebilmeleridir. Manyetik NP'lerin kimyasal bileşimi, boyutu, şekli, morfolojisi ve manyetik davranışı, biyomedikal uygulamalarını belirlemede en önemli kriterlerdir. Biyouyumluluklarını arttırmak amacıyla bir kaplamayla birlikte uygulanabilirler. Yüzeylerinin bu şekilde kaplanması fonksiyonel ligandların entegrasyonuna yardımcı olur. Yüzey kimyasının değiştirilmesi, manyetik NP'lerin çok işlevli olmasına neden olabilir. Ayrıca ilaç taşıyıcı sistemler olarak da kullanılabilen manyetik NP'ler, gamma radyasyonu, kızılötesi ışınlar, alfa ve beta parçacıkları gibi dış uyaranlara yanıt verebildiklerinden oldukça avantajlıdır. Manyetik NP'ler, antikorlar, peptitler ve molekül ligandları gibi farklı fonksiyonel moleküllerle etiketlenebilirler (Şekil 2.27). Böylece çok değerlikli manyetik NP'ler aracılı olarak kombine hipertermi-ilac dağıtımı ve multimodal görüntüleme gibi çok işlevli kanser tanı ve tedavi yöntemleri geliştirilebilir (Govindan vd., 2023; Farzin vd., 2020).



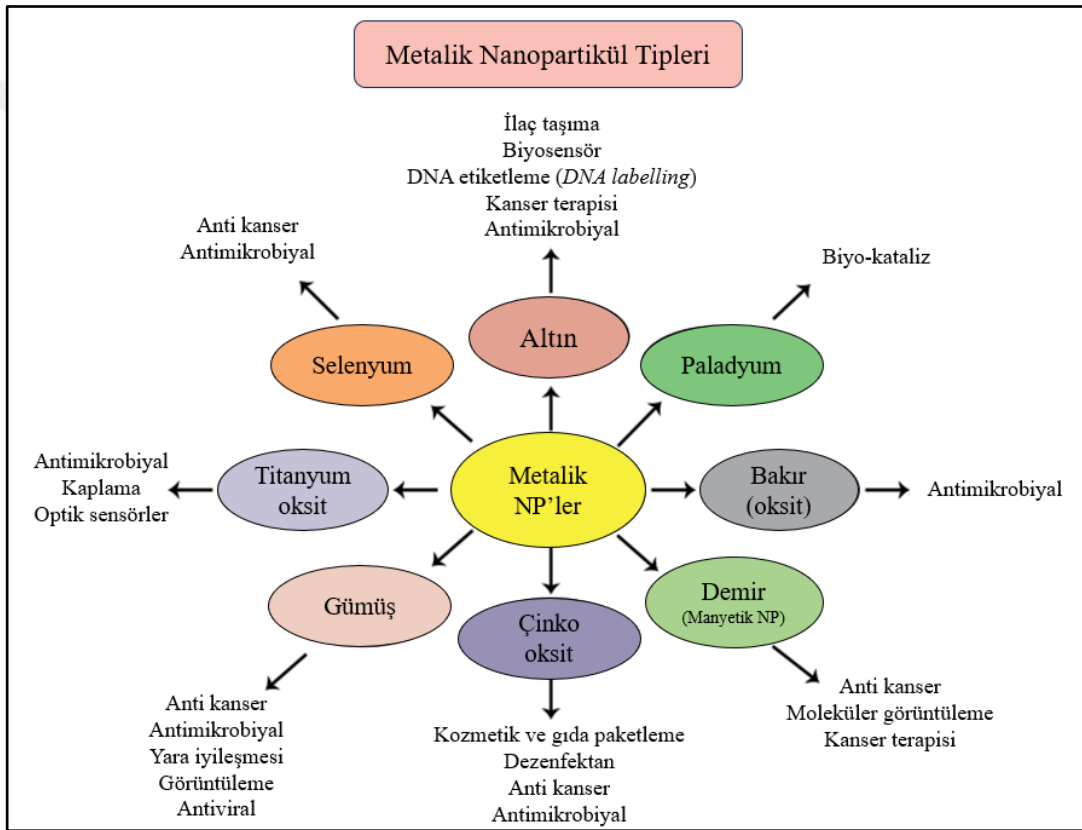
Şekil 2. 27. Kanser tanı ve tedavisinde kullanılan manyetik nanopartiküllerin çok fonksiyonlu özellikleri (Farzin vd., 2020).

Sağlıklı ve kanser hücreleri hipertermi sıcaklık aralığında (42-45°C) farklı davranışlar göstermektedir. Sağlıklı hücreler bu sıcaklıklara kısa bir süre dayanabilirken, kanser hücreleri apoptoza uğramaktadırlar. Bu nedenle manyetik NP'ler uygulanan bir manyetik alan altında sıcaklığın artmasını sağlayarak kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlayabilirler. Bu yöntem günümüzde prostat, rahim, akciğer ve boyun kanserleri gibi pek çok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Geleneksel kemoterapide kullanılan ajanlar kanser hücrelerini spesifik olarak hedefleyemeyip sağlıklı dokularda da tahribat oluşturduğundan manyetik NP'lerin kullanımı yan etkilerin azaltılmasına olanak sağlamaktadır (Farzin vd., 2020).

Metalik ve Metal Oksit Nanopartiküller

Altın, gümüş, demir, selenyum, paladyum, titanyum, çinko, bakır ve alaşım şeklindeki çeşitli metalik nanopartiküller (MNP), kanser de dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hedef liganda göre işlevselleştirilmiş MNP'ler, geleneksel kemoterapinin üstesinden gelemediği zorlukları ortadan kaldırabilir. Verimli şekilde lokalize olabilmeleri, yüksek çözünürlük, spesifik hedefleme ve stabiliteleri nedeniyle kanser tedavisinde umut vadetmektedirler. Ayrıca anti kanser ajanların kapsüllenecek taşınmasında kaplama aracı olarak kullanılabilirler ve bu şekilde ajanın stabilitesinde ve terapötik etkinliğinde artışa neden olurlar. *In vitro*'da MNP'lerin direkt olarak hücrelere uygulanmaları sitotoksik bir etki yaratmaktadır. Ancak kanser hücrelerine spesifik olarak etki etmeleri ve sağlıklı

dokuda hasara sebebiyet vermemeleri açısından bazı MNP'lerin kullanımları sınırlıdır. Terapötik etkinliklerinin yanı sıra malign lezyonların görüntülenmesi ve tümöre özgü tümör ilişkili antijenlerin saptanmasını sağlayan tanı araçları olarak da kullanılmaktadırlar. Akciğer, meme ve yumurtalık kanseri gibi çeşitli kanserlerin tanı ve tedavisinde MNP'lerin kullanıldığı bildirilmiştir. Üretimleri kolay olan yüksek elektromanyetik alan ve optik özelliklere sahip MNP'ler, tek başlarına ya da tümöre özgü antikolar, peptitler, nükleik asitler, diğer küçük moleküller ve anti kanser ajanlarla birlikte kombine olarak uygulandıklarında eşzamanlı olarak tespit ve yönetime olanak verirler (Şekil 2.28) (Roshani vd., 2023).



Şekil 2. 28. Metalik nanopartikül tipleri ve uygulamaları (Roshani vd., 2023).

Gümüş NP'ler (Ag NP) antimikrobiyal, antienflamatuar, antianjiyojenik ve anti kanser etkiler göstermektedir (Roshani vd., 2023). Bir antikanser ajan olan Epirubicin kaplı Ag NP'ler karaciğer kanseri hücre hattına uygulandığında düşük dozajda büyük bir antikanser özellik göstermiştir (Ding vd., 2019).

Altın NP'ler (Au NP) kanser kök hücrelerini tanımlamak için kullanılırlar. Böylece hedefe yönelik kanser kök hücre tedavisi geliştirmek için değerli bir araç haline gelmişlerdir. Au NP'ler bilgisayarlı tomografi (BT) görüntüleri üzerinde güçlü bir

kontrast etki gösterdiğinden kanserin erken teşhisini sağlar. Ayrıca Au NP ve Ag NP'ler yüksek sıcaklıklarda çok yüksek oksidasyon direncine sahiptirler ve elektromanyetik dalgaları verimli bir şekilde ısıya dönüştürerek kanser hücrelerinin termal ablasyonu için kullanılabilir MNP'ler olarak tanımlanmışlardır. Bu nedenle özellikle Au NP'ler kanser hücrelerine fototermal tedavi sağlamak için kullanılabilir bir fototermal etkiye sahiptirler (Roshani vd., 2023).

Selenyum NP'ler (Se NP) ise daha yüksek biyouyumlulukları ve biyoaktiviteleri ve organik ya da inorganik Se bileşiklerinden daha düşük toksisiteyi nedeniyle terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Antikanser, antidiyabetik ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Kanser hücrelerinde Se NP'ler selenoproteinleri aktive ederler ve hücre ölümüne neden olurlar. Bununla birlikte ROS stresini, kromozomal varyasyonları ve DNA hasarını önleyerek sağlıklı hücreleri korurlar (Roshani vd., 2023).

Paladyum NP'ler (Pd NP) düşük sitotoksikite, antimikrobiyal ve antitümör özelliklere sahip olduklarından gen ya da ilaç taşıyıcıları, ilaç aktivatörleri ve biyosensörler geliştirmek için kullanılabilirler (Roshani vd., 2023). Bununla birlikte, bazı çalışmalar Pd NP'lerin fototermal ve fotodinamik tedaviler yoluyla kanserde terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Pd NP'ler yakın kızılötesi spektroskopide (NIR) emilir, bu özellikleri nedeniyle NIR lazer ışınlaması altında ısı üreterek oldukça spesifik şekilde kanser terapilerinde kullanılabilirler. Bir fare modelinde prostat kanseri tümörünü tedavi etmek için Pd NP ile grafen oksit (GO-Pd NP) kullanılmıştır. GO-PdNP intratümöral olarak uygulandığında yüksek fototermal etki sebebiyle ROS oluşumu gözlemlenmiştir (Gutiérrez vd., 2023).

Titanyum dioksit NP'ler (TiO₂ NP), stabil, dayanıklı, fotodinamik ve sonodinamik özellikler gösteren NP'lerdir. Biyolojik dokularla uyumluluk gösteren TiO₂ NP'ler antimikrobiyal ve anti kanser özelliklere sahiptir. Ayrıca antikorlar ve polimerlerle birlikte kombine olarak kullanılabilirler. Anti kanser bir ajanla kombine şekilde uygulandıklarında kanser hücrelerinde ROS oluşumuna bağlı DNA hasarı oluşturarak apoptoza neden olurlar (Çeşmeli ve Biray-Avcı, 2018; Roshani vd., 2023).

Tümör hücrelerinin bakır homeostazına duyarlı olması sebebiyle bakır NP (Cu NP) uygulamaları ise aşırı ROS birikimine, proteazomal kompleksin işlevini yerine getirememesine ve anjiyogenezin inhibisyonuna neden olarak hücrelerde ölüme neden olmaktadır. Ayrıca Cu NP'nin antimikrobiyal etki gösterdiği de tespit edilmiştir (Aishajiang vd., 2023; Roshani vd., 2023).

2.8.4. Çinko Oksit Nanopartikülleri

Çinko oksit nanopartikülleri (ZnO NP) boyutları 100 nm'den daha küçük olan nanopartiküllerdir. ZnO NP'ler uygun maliyetli ve çevre dostu olarak kimyasal yöntemlerle hazırlanabilirler ancak katı ya da gaz gibi farklı yöntemlerle de sentezlenebilirler.

ZnO NP'ler ultraviyole (UV) ışınlarını kolayca absorblayabildiğinden kozmetik sektörü (özellikle güneş kremlerinde), elektronik cihazlar ve biyomedikal uygulamalar gibi geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Yüksek biyouyumluluk gösteren ZnO NP'lerin ve hacimli formları FDA tarafından güvenli kabul edilmiştir. Vücutta demirden sonra en bol bulunan eser element Zn, immün sistemde önemli rol oynar ve hücrede moleküler bileşenleri stabilize ederek hücre ve organ bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur. Lipit, karbonhidrat, protein, nükleik asitlerin sentezi ve parçalanmasında görev alan 300'den fazla enzimin yapısına katılan Zn, tüm bu hücresel aktivitelerde kofaktör görevi gördüğünden biyolojik olarak kolayca parçalanabilir.

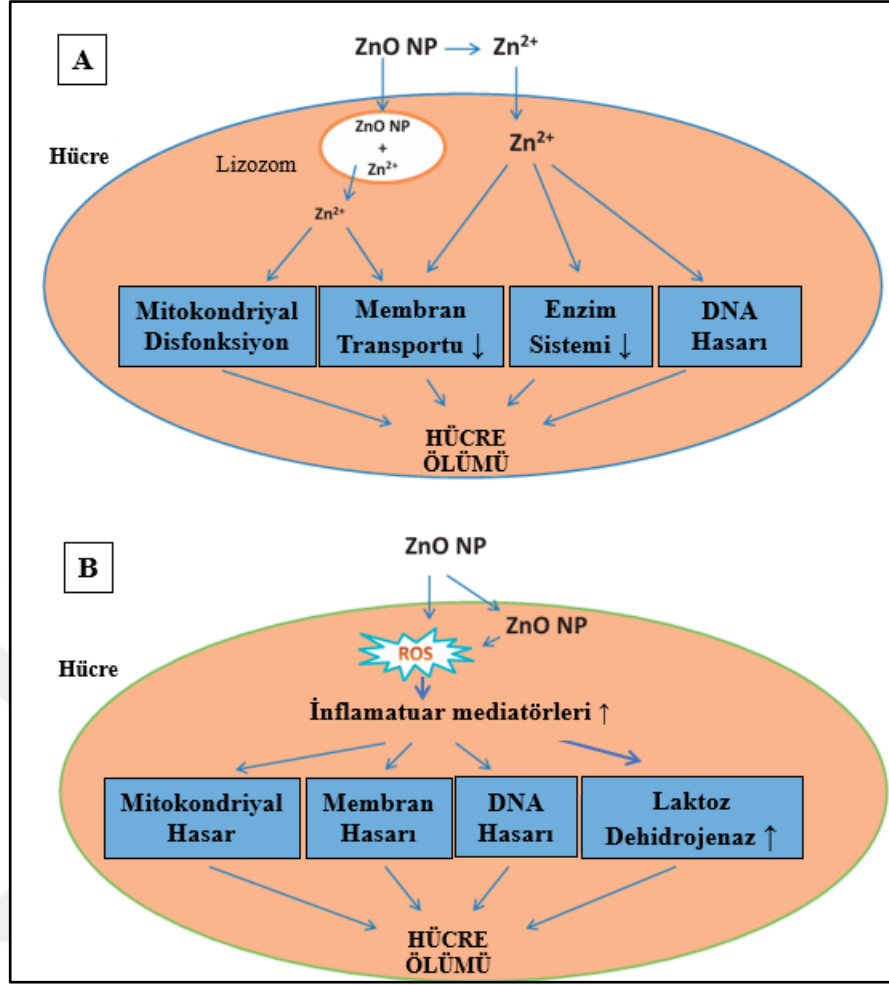
Zn, p53 ve kaspazlar gibi hücre döngüsünün ve apoptozun kontrolünü sağlayan protein ve enzimlerin yapısına katılmaktadır (Bisht ve Rayamajhi, 2016). Zn eksikliğine bağlı olarak bu proteinlerin çalışması engellenebilir ve böylece maligniteler ortaya çıkabilir (Eron vd., 2018; Loh, 2010). Yani Zn hücreleri kansere karşı korumayla ilgili süreçlerde yer almaktadır (Bisht ve Rayamajhi, 2016).

Düşük Zn konsantrasyonu kanserin başlamasına ve ilerlemesine yol açabilirken, yüksek ZnO konsantrasyonu homeostazın ve plazma zarının Zn taşıma sisteminin bozunmasına neden olarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda anti kanser özelliğinden de yararlanan ZnO NP'ler, *in vitro*'da diğer nanopartiküllere kıyasla kanserli hücrelere karşı seçici sitotoksiste gösterme özelliğine sahiptir. Ayrıca seçici sitotoksitenin arttırılması için diğer NP tiplerinde olduğu gibi yüzey modifikasyonları gerçekleştirilebilir. Ekstrasellüler olarak ZnO NP biyouyumluluk gösterirken, hücre içine yüksek miktarda alındığında Zn aracılı dengesiz protein aktivitesi ve oksidatif stres gelişmektedir. Böylece gelişen hücresel sitotoksiste hücrelerin ölümüne sebep olmaktadır (Bisht ve Rayamajhi, 2016).

Özellikle kanser hücrelerinde ZnO NP'nin seçici sitotoksiste göstermesinin yarı iletken doğada olmasından kaynaklandığı tahmin edilse de henüz tam mekanizması açıklığa kavuşturulamamıştır. Diğer bir taraftan kanser hücrelerinin

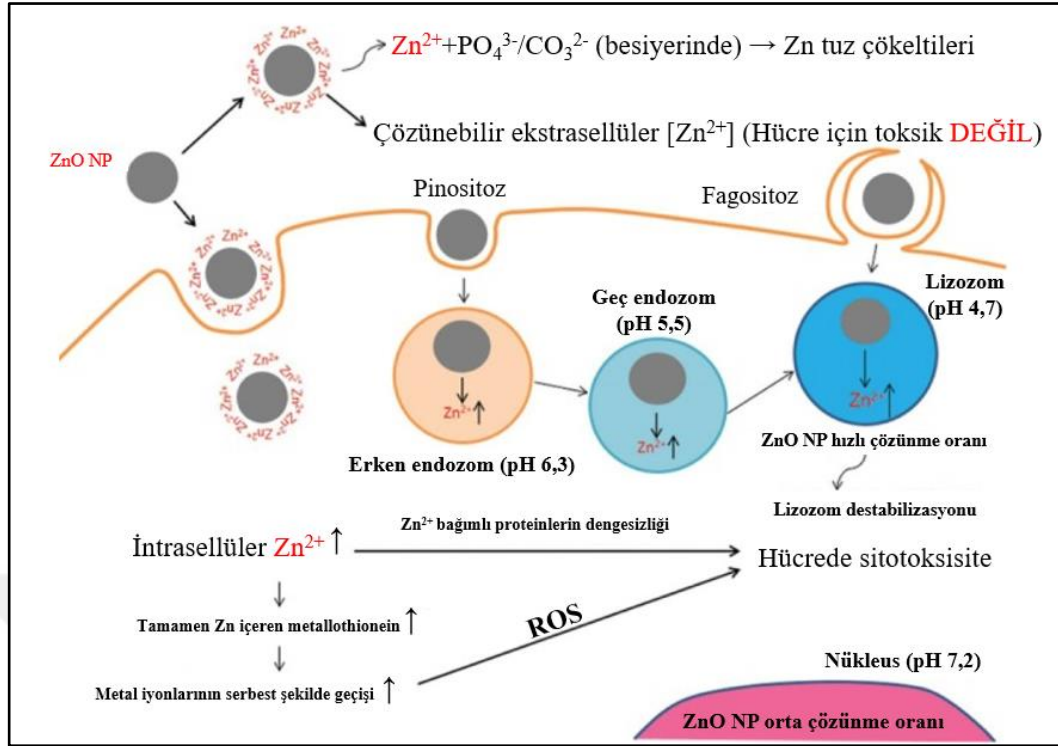
metabolizmalarının sağlıklı hücreslere kıyasla daha hızlı olması, daha fazla ROS üretmelerine neden olmaktadır. ZnO NP uygulandığında oluşan redoks reaksiyon sistemiyle birlikte hücrelerde daha fazla ROS oluşacaktır. Sağlıklı hücreler bu durumu çeşitli mekanizmalar ile tolere edebilirken, normalden daha yüksek oranda ROS birikimi kanser hücrelerinde oksidatif strese neden olabilir ve böylece hücre ölümü gerçekleşebilir (Bisht ve Rayamajhi, 2016). Bununla birlikte T hücreleriyle gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada, ZnO NP'nin sağlıklı hücreslere kıyasla kanser hücrelerinde 28-35 kat daha fazla seçici toksisite gösterdiği belirlenmiştir (Hanley vd., 2008).

Daha önce de bahsedildiği gibi ekstrasellüler alanda ZnO NP çok az sitotoksosite göstermektedir. Özellikle *in vitro* ortamda ekstrasellüler alanda çözünür ZnO NP'nin hücreler için kullanılan besiyerlerindeki fosfat ile birlikte amorf çinko-karbonat fosfat çökeltileri oluşturduğu tespit edilmiştir. Oluşan bu ekstrasellüler çökeltiler hücreleri Zn'nin sitotoksitesinden korumaktadır. Bununla birlikte ZnO NP hücre içine alındığında sitotoksosite oluşturması (Şekil 2.29-B), endositozla alınan ZnO NP'lerin sitoplazmada çözünmüş Zn^{2+} iyonlarına dönüşmesi (Şekil 2.29-A) ve ardından Zn aracılı protein aktivitesi dengesizliği, ROS oluşumunun indüklenmesi ve DNA hasarına bağlı hücre ölümü olarak üç temel mekanizmayla açıklanmaktadır.



Şekil 2. 29. ZnO NP etki mekanizmaları (A) Zn²⁺ iyonlarının sitotoksiste göstermesi (B) ZnO NP'nin ROS aracılı sitotoksiste göstermesi (Singh, 2019).

Hücre içine endozom ya da reseptör aracılı olarak (LDL reseptörleri) alınan ZnO NP'lerin çözünme hızı pH azaldıkça artar. Erken endozomun pH'ı 6,3'tür ve çözünür Zn²⁺ iyonlarının salınmasını destekler niteliktedir. Geç endozomda ise pH 5,5'e düşerken, lizozomda 4,7'ye düşer. Bu aşamada ZnO NP'ler daha hızlı çözünmeye başlar. Böylece pH'ı 7 olan kanda ZnO NP çözünmez ancak hücre içinde pH düşeceğinden çözünmeye başlar. Böylece Zn²⁺ iyonlarının hücre içinde artışıyla Zn bağımlı protein aktivitesi dengesizliği ortaya çıkar ve bu durum hücresel sitotoksisteye neden olur (Şekil 2.30) (Singh, 2019; Bisht ve Rayamajhi, 2016).



Şekil 2. 30. ZnO NP'nin sitotoksikite mekanizması (Bisht ve Rayamajhi, 2016).

Diğer bir taraftan çözünür Zn^{2+} iyonlarındaki artış ayrıca ROS oluşumuna neden olarak oksidatif stres aracılı sitotoksikiteye yol açar. ZnO NP'ler tarafından ROS oluşumu iki farklı şekilde indüklenebilir. İlki hücrelerin NP'lere karşı oluşturduğu proinflatuar tepkiden kaynaklanmaktadır. İkincisi ise ZnO NP'leri ROS üreten bir redoks reaksiyon sistemi haline getiren karakteristik yüzey özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Böylece ZnO NP'ler yüksek ROS seviyeleri ve oksidatif stres aracılı olarak hücrelerde lipit, protein ve DNA'da hasara sebep olmaktadır. Hücrede yüksek ROS seviyeleri, lipitlerde peroksidasyonla membran bütünlüğünün bozulmasıyla ve proteinlerde denatürasyonla nekroza sebep olurken DNA'da tek zincir kırıklarına neden olarak apoptoza sebep olur.

Bir ROS tipi olan OH^- radikali DNA'da 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-Okso-dG) DNA eklentisinin oluşumu yoluyla DNA'da tek sarmallı kırılmaya neden olmaktadır. Bu DNA kırıkları ve oluşan çapraz bağlar intrinsik apoptozun aktifleşmesine neden olarak hücreyi apoptoza sürükler. Bu nedenle ZnO NP'nin sitotoksik yanıt oluşturarak hücreyi ölüme sürüklemesinde temel mekanizmanın apoptoz olduğu düşünülmektedir (Bisht ve Rayamajhi, 2016). Ancak bazı kaynaklarda ZnO NP'nin hücreleri temel olarak nekroz ve apoptoz yoluyla ölüme sürüklediği belirtilmiştir. Bununla birlikte

bazı durumlarda otofaji ve mitofajinin meydana geldiği de gösterilmiştir (Wei vd., 2017; Shen vd., 2019; Wiesmann vd., 2020).

Bazı çalışmalar ZnO NP uygulamalarının mitokondriyal disfonksiyona neden olduğunu göstermiştir. ZnO NP'ler mitokondriyal DNA kopya sayısının değişmesine ve mitokondriyal yoğunluğun azalmasına neden olarak mitokondriyal biyogenezin değişmesini sağlarlar. İç mitokondriyal zarda bulunan, fosfatidilkolin sentezinde görev alan ve mitokondriyal füzyonu düzenleyen fosfatidilserin dekarboksilaz (PSD1) enzimi, ZnO NP etkisiyle sitozole salınmaktadır. Mitokondriyal biyogenezin değişiminin yanı sıra mitokondriyal membran potansiyelinde değişimlerle birlikte apoptozun ve kaspazların indüksiyonu yoluyla ZnO NP etki edebilir (Tablo 2.8) (Patron-Romero vd., 2022).

Tablo 2. 8. ZnO NP'nin mitokondriyal yollara etkisi (Patron-Romero vd., 2022).

Mitokondriyal Yolak	ZnO NP Etkisi
Mitokondriyal biyogenez	↑ Mitokondriyal DNA replikasyonu ve transkripsiton sistemi ↑ PSD1'in mitokondriyal onarımı ↑ PGC-1 tarafından mitokondriyal biyogenez ↑ Mitofaji
Apoptozun indüksiyonu	↑ p53, BAX, BAK, SMAC ve sitokrom-c seviyelerinin apoptozu indüklemesi ↑ DNA fragmentasyonu ve sitoplazmik redüksiyon ↑ Anti-BCL2
Kaspazların indüksiyonu	↑ Aktive edilmiş kaspaz-9'a dönüştürmek için pro-kaspaz-9 ve pro-kaspaz-3 ↑ Apaf-1 ↑ Apoptozom
Mitokondriyal membran potansiyeli	↑ Mitokondriyal membran potansiyeli ↑ ATP sentaz ↑ ROS ↑ Pro-apoptotik proteinlerin taşınmasıyla mitokondriyal por anomalileri

ZnO NP'ler tek başlarına kullanılabileceği gibi ilaç, gen ve protein taşıyıcı sistemleri olarak kullanılabilirler. pH değişimlerine duyarlı olmaları tümör hedefli uygulamalarda taşıyıcı sistem olarak kullanımlarını avantajlı kılmaktadır. Taşıyıcı sistemler dışında tanı aşamasında da uygun fizikokimyasal özellikleri sebebiyle ZnO NP'ler kullanılabilir. ZnO NP ile geliştirilen biyosensör çalışmaları erken evre karaciğer kanseri teşhisi ve rahim ağzı kanserinin en önemli sebeplerinden biri olan HPV-16 (insan papilloma virüsü tip 16) gibi viral onkogenlerin tespiti için uygulanmıştır.

İlaç taşıyıcı sistemler için ZnO NP; üretiminin düşük maliyeti, özelleştirilebilir yapısı, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, programlı ilaç salınımı kabiliyeti, hedefe yönelik olması ve düşük toksisitesi sebebiyle tercih edilmektedir (Tablo 2.9). ZnO NP'ler ile oluşturulan nanotüp, nanorod ya da porlu kafes yapıları taşınan ilacın verimli bir şekilde verilmesini sağlamaktadır. Ayrıca yüzey kısmında gerçekleştirilen modifikasyonlarla hücreye spesifik yaklaşımlar geliştirilebilir (Anjum vd., 2021).

Tablo 2. 9. Çeşitli ZnO NP formülasyonlarının hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerindeki rolü (Anjum vd., 2021 ve ATCC).

ZnO NP Formülasyonu	Boyut	Yüklenen İlaç	Hücre Hattı (Hastalık, Organizma)
Biyoaktif yüklü ZnO NP'ler	90 nm	Taksifolin	MCF-7 (Meme kanseri, İnsan)
	-	Naringenin-Quercetin-Kurkumin	A-431 (Skuomoz hücreli karsinoma, İnsan)
	26 nm	Kurkumin	MCF-7
Geleneksel ilaç yüklü ZnO NP	47,4 nm	DOX	MCF-7
	160 nm	DOX	MBA-MB-231 (Üçlü negatif meme kanseri, İnsan)
	55 nm	DOX	MCF-7 HT-29 (Kolon kanseri, İnsan)
	2-4 nm	DOX	-
	125 nm	Paklitaksel	MCF-7 MDA-MB-231
	100-120 nm	Anthraquinone	HT-29
	50 nm	Ruthenium	HeLa (Serviks kanseri, İnsan)
	291-325 nm	Paklitaksel	S-180 (Sarkoma, Fare)
ZnO Nanokompozit	28-63 nm	-	MCF-7
	21-39 nm	Quertecin	MCF-7
	10.2 nm	Hyaluronan	PANC-1 (Pankreas kanseri, İnsan) CaOV-3 (Ovaryum kanseri, İnsan) COLO205 (Kolon kanseri, İnsan) HL-60 (Akut promiyelositik lösemi, İnsan)
	35 nm	Kurkumin	AGS (Mide kanseri, İnsan)

Biyoaktif ve anti kanser etkileri olan moleküllerin düşük biyoyararlanımlarını önlemek amacıyla taksifolin gibi ajanlar, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerle kaplanmış ZnO NP ile taşıyıcı sistem haline getirilmiştir. Meme kanseri hücre hattı MCF-7 ile gerçekleştirilen çalışmalarda taksifolin yüklü ZnO NP uygulamaları hücreleri apoptoza sürüklemiştir. Diğer bir taraftan PEG ve β -siklodekstrin ile yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiş ZnO NP'ler hidrofobik yapılı kurkumin ile yüklenerek MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Yapılan analizler ZnO NP ile kapsüllenmiş ilacın salınımının arttığını ve hücrelerde daha büyük bir apoptotik etkiye neden olduğunu göstermiştir (Anjum vd., 2021).

Geleneksel kemoterapide kullanılan DOX ve PTX gibi anti kanser ilaçların sağlıklı hücrelere zarar vermesini önlemek ve kanser hücrelerine spesifik tedavi uygulamak amacıyla diğer NP'ler gibi ZnO NP'ler de kullanılmaktadır. Hem tanı sağlayan hem de tedavi edici ajanların tek bir NP'de toplanması (teranostik yaklaşım) nanoteknolojinin gelişimiyle birlikte ön plana çıkmıştır. Teranostik ajanların en etkililerinden biri olarak ZnO NP'ler, çeşitli belirteç ve geleneksel anti kanser ajanlarla bir araya getirilerek kullanılabilir. Örneğin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, folik asitle işlevselleştirilmiş PEG kaplı DOX yüklü ZnO nanotabakaları (FA-PEG-DOX-ZnO) sentezlenerek uygulanmıştır. Sentezlenen bu NP'nin kemo-fototermal tedavide kullanılabileceği, kanser hücrelerine spesifik olarak DOX ve ısı taşınımı sağladığı belirlenmiştir (Vimala vd., 2017; Anjum vd., 2021).

Ayrıca herhangi bir ilaç taşıyıcı sistem ya da yüzey modifikasyonu olmadan da ZnO NP uygulamaları kanser hücrelerinde sitotoksik etkiye sebep olabilir. Nöroblastoma, baş-boyun, serviks, akciğer, karaciğer ve tiroid kanserlerinde ZnO NP'lerin ROS oluşumuna ve DNA hasarına neden olduğu, mitokondriyal membran potansiyelini değiştirdiği, hücre siklusunda ilerlemeyi düzenlediği ve apoptoz ve nekrozu indüklediği kanıtlanmıştır (Wiesmann vd., 2020).

Tüm bu bilgiler ışığında ZnO NP'lerin çeşitli kanser tipleri için yenilikçi anti kanser ajanlar olarak kullanılabileceği ve böylece çoklu ilaç direnci gibi engellerin üstesinden gelinebileceği düşünülmektedir. Ancak ZnO NP'lerin *in vitro* ve *in vivo* analiz yöntemleriyle insan sağlığına etkisinin uzun vadeli olarak incelenmesi gerekmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYALLER

3.1.1. Kullanılan Cihazların Listesi

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Ekler bölümünde EK A’da yer almaktadır.

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi

Çalışmada hücre kültüründe kullanılan donanımların listesi Ekler bölümünde EK B’de yer almaktadır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Ekler bölümünde EK C’de yer almaktadır.

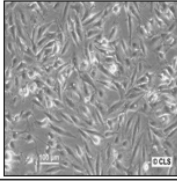
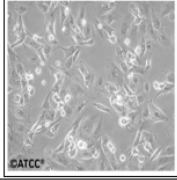
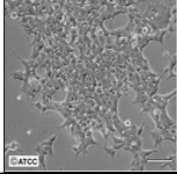
3.1.4. Kullanılan Tamponların İçeriği

Çalışmada kullanılan tamponların içeriği Ekler bölümünde EK D’de yer almaktadır.

3.1.5. Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan hücre hatlarına ilişkin özellikler tabloda yer almaktadır (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1. Kullanılan RCC ve HEK-293 hücre hatlarına ilişkin karakteristik özellikler (ATCC, CLS).

Hücre Hattı	ATCC No	Kökeni	Kişisel Bilgi (Cinsiyet/Yaş)	Metastaz Durumu	Çoğalma Süresi (saat)	Görünümü
A-498	HTB-44™	Böbrek, ccRCC	Kadın/52	Primer	~66,8	
Caki-1	HTB-46™	Böbrek, ccRCC	Erkek/49	Metastatik	~39	
HEK-293	CRL-1573™	Böbrek	Embriyo	-	~33	

3.1.6. Kullanılan Antikor, miRNA ve Plazmidler

Çalışmada kullanılan antikor, miRNA ve plazmidlere ilişkin bilgiler Ekler bölümünde EK B ve C’de yer almaktadır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

ccRCC hücre hatları olan Caki-1 (ATCC®, HTB-46™) ve A-498 (ATCC®, HTB-44™) ile kontrol grubu olarak kullanılan HEK-293 (ATCC®, CRL-1573™) hücre hatları %10 FBS %1 Penisilin/streptomisin içeren besiyerlerinde 37°C ve %5 CO₂ koşulları altında t25 hücre kültürü kaplarında kültüre edilmiştir. Caki-1 hücre hattı için DMEM besiyeri kullanılırken, A-498 ve HEK-293 hücre hatları için EMEM besiyeri kullanılmıştır.

Hücrelerin yoğunluğu hücre kültürü kaplarının yüzeylerinde %70 ila 80 durumuna geldikten sonra pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasaj sonrasında hücreler yeni t25 hücre kaplarına ana stoklar olarak ekilirken diğer bir yandan deneyler için uygun sayılarda diğer hücre kültürü kaplarına ekimler gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin Açılması ve Dondurulması

Hücreler temin edildikten sonra henüz pasaj numaraları küçükken dondurularak -80°C ve sıvı azotta stoklanmıştır. Hücreler bulundukları t25 hücre kültürü kaplarında konfluent hale geldiğinde üzerlerindeki medya uzaklaştırılarak 1 ml 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra tripsinlenerek kaldırılan hücrelerin üzerine tripsin aktivitesini inhibe etmek için besiyeri eklenerek 2500 rpm x 4 dakika santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak hücre yoğunluğuna göre hücre dondurma medyası eklenerek süspansiyon kriyo tüplere aktarılmıştır. Stoklar -80°C’de ve sıvı azot içerisinde saklanmıştır.

Herhangi bir kontaminasyon durumunda, hücre morfolojilerinde problemler yaşandığında veya hücre pasaj numaraları büyüdüğünde hücreler -80°C ya da sıvı azottan alınarak elde eriyik hale getirilmiş ve 1 ml taze besiyeri eklenerek 15 ml’lik falkona alınmıştır. Ardından santrifüjlenerek süpernatant atılmış ve pellet üzerine 1 ml taze besiyeri eklenerek nazikçe pipetaj yapılmıştır. Daha sonra içerisinde 2 ml taze besiyeri bulunan t25 hücre kültürü kaplarına hücre süspansiyonu alınarak 37°C ve %5 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin yoğunluğu %70-80 durumuna gelince üzerlerindeki medya uzaklaştırılmış ve 1 ml 1X PBS ile hücreler yıkanmıştır. Daha sonra 500 µl tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek hücreler yaklaşık 4 dakika 37°C ve %5 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir. Ardından hücrelerin adeziv özelliklerini kaybettikleri ışık mikroskobu altında doğrulandıktan sonra tripsinin aktivitesini inhibe ederek hücrelerde hasar oluşmasını önlemek için 1:1 oranda FBS içeren besiyeri eklenmiştir. 15 ml'lik falkona hücre süspansiyonu toplanmıştır. Ardından hücreler 2500 rpm x 4 dakika olacak şekilde santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 1 ml taze besiyeri eklenerek nazıkçe pipetaj yapılmıştır. Daha sonra Neubauer hemositometresi üzerine 10 µl hücre süspansiyonu eklenerek hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hemositometreye göre belirlenen alanda sayılan hücre sayısı 10⁴ ile çarpılarak 1 ml'de bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır. Daha sonra gerçekleştirilecek deney tipine göre uygun hücre sayısı ve hücre kültürü kaplarına ekim gerçekleştirilmiştir.

Hücrelere STAT5, GFP-LC3, miR-33a Mimik ve Anti-miR-33a Transfeksiyonu

Tripsinlenerek kaldırılan hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilmiştir. Hücreler yaklaşık %70 yoğunluğa ulaştıklarında üzerlerindeki medya atılarak 1X PBS ile yıkanmış ve 2 ml taze medya eklenmiştir. Bu işlemi takiben transfeksiyon karışımı hazırlanmıştır. miR-33a transfeksiyonları için kuyu başına 100 µl FBS ve antibiyotik içermeyen besiyeri ve miRNA oranının 3 katı olacak şekilde 3 µl (3:1) transfeksiyon ajanı eklenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilen karışım içine mimik uygulaması için 20 µM'lık ana stok miR-33a mimik'ten 5 nM eklenmiştir. Anti-miR-33a uygulaması içinse 20 µM'lık ana stoktan 50 nM olacak şekilde eklenmiştir. Transfeksiyon karışımları oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Geçen sürenin ardından taze medya üzerine damla damla olacak şekilde transfeksiyon karışımı eklenmiş ve hücreler 24 saat inkübe edilmiştir.

Transfeksiyonu sağlayacak plazmitler (STAT5B ya da GFP-LC3) içinse kuyu başına 100 µl olacak şekilde besiyeri eklenerek 1000 ng plazmit örneğine tekabül eden hacimde plazmit eklenmiştir. Diğer bir taraftan 100 µl FBS ve antibiyotik içermeyen medya ile 1000 ng plazmit örneğine göre 3:1 oranda 3 µl transfeksiyon ajanı eklenmiştir. Aynı ayrı hazırlanan karışımlar 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra karıştırılarak 20 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra transfeksiyon karışımı hücrelere damla damla uygulanmıştır ve hücreler 48 saat inkübe edilmiştir.

Transfeksiyon süresinin ardından STAT5B plazmidi transfekte edilen hücrelerin medyaları değiştirilerek plazmidin memeli hücrelerinde selektif belirteci olan higromisin minimum konsantrasyonda (50 µg/ml) uygulanmaya başlanmıştır. Higromisin uygulama konsantrasyonu arttırılarak hücreler selektif olarak seçilmiş ve stabil hücre hatları oluşturulmuştur (STAT5+ hücreler).

3.2.2. ZnO NP'nin Hücre Canlılığı, Hücre Proliferasyonu ve Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

ZnO NP Solüsyonunun Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanması

NP'ler boyut bakımından ele alındığında böbreklerdeki glomerüler kılcal duvarlardan geçişin sağlanması için 10 ila 100 nm boyutlarında olmaları ideal kabul edilmektedir. Bazı çalışmalarda 10 nm'den küçük NP'lerin tümörlerde daha iyi biriktiği ve daha derine nüfuz edebildiği belirlenmiştir. Ayrıca NP boyutu ne kadar küçükse, kan dolaşımında o kadar uzun süre kalabileceği bilinmektedir. 10 nm'den küçük boyutlu NP'ler, difüzyon yoluyla sitoplazmada sitotoksosite göstebilir ve nükleusa girerek DNA'da hasar oluşturabilir. Ancak 10 nm'den küçük NP'lerin sağlıklı hücre ve dokularda tahribat oluşturarak sistemik toksisiteye sebep olabileceği gösterilmiştir (Bisht ve Rayamajhi, 2016). Bu nedenle çalışmada boyutları 50 nm'den küçük ZnO NP kullanılmaktadır.

Transfeksiyon gerçekleştirilmeyen kontrol grubu ve STAT5+ hücrelere belirlenen konsantrasyonlarda (15 ve 25 µg/ml) ZnO NP uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Ana stok olarak FBS ve antibiyotik içermeyen medya ile hazırlanan 1 mg/ml ZnO NP solüsyonu uygulama öncesinde sonike edilerek nanopartiküllerin homojenizasyonu sağlanmıştır (Khan vd., 2020; Reshma vd Monahan, 2017). Daha sonra taze medya içine, hesaplanan miktarlarda ZnO NP solüsyonu alınarak pipetaj yapılmış ve hücrelere 24 saat boyunca uygulanmıştır.

MTT Hücre Canlılık Testi

Hücreler 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelerin sağlıklı bir şekilde adeziv özellik kazanmalarının ardından 5-100 µg/ml aralığında ZnO NP uygulanmıştır. Hücrelere 24 saat ZnO NP ile muamele edildikten sonra MTT tetrazolium tuzu 10 µl/kuyu olacak şekilde eklenmiş ve 4 saat 37°C ve %5 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir. Ardından hücrelerin üzerindeki medya dikkatlice uzaklaştırılarak 100 µl/kuyu DMSO

eklenmiştir. Bu şekilde 5 dakika karanlıkta bekletildikten sonra mikropilaka okuyucuda, ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Hücre Sağkalım Testi

Zamana bağlı olarak ZnO NP uygulamalarının hücre proliferasyon oranına etkisinin incelenmesi için hücre sağkalım testi uygulanmıştır. Kontrol ve STAT5+ hücreler 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilmiştir. Daha sonra 15 ve 25 µg/ml ZnO NP 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Her 24 saatte bir hücrelerin üzerindeki medya uzaklaştırılmış ve tripsinlenerek kaldırılan hücreler 2500 rpm x 4 dakika olacak şekilde santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1X PBS ile homojenize edilerek %0,4 (w/v) tripan mavisi ile boyanmış ve hemositometrede sayılmıştır.

Koloni Formasyon Testi

ZnO NP’nin RCC hücrelerinde uzun süreli etkisini gözlemlemek amacıyla koloni formasyon testi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 2×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen hücrelere ZnO NP uygulanmış ve 24 saat sonra bu besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri eklenmiştir. Hücrelerin bölünme süreleri göz önüne alınarak kontrol grubu yaklaşık %80 konfluent hale gelince (yaklaşık 14 gün) deney sonlandırılmıştır. Hücreler 1X PBS ile yıkanmış ardından -80°C %100 metanol ile fikse edilmiştir. Ardından %0,1 kristal viyole eklenerek koloniler boyanmıştır. Daha sonra görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Koloni olarak değerlendirilebilmesi için minimum 50 hücre sınır olarak belirlenmiştir.

PI Boyama ve Akış Sitometrisi ile Hücre Döngüsü Analizi

Kontrol ve STAT5+ hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildikten sonra 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamaları 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Ardından tripsinlenerek kaldırılmış hücreler 500 µl soğuk %70 etanol ile 1-2 gün +4°C’de fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından santrifüjlenen hücrelerin üzerinden fiksatif uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 460 µl 1X PBS, 30 µl propidium iodide (PI, 4 mg/ml) ve 10 µl RNaz A (20 mg/ml) ile hücreler homojenize edilerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler akış sitometrisinde analiz edilmiştir. Hücre popülasyonunda *side* ve *forward scatter* kullanılarak hücre büyüklüğü tespit edilmiştir. Daha sonra 10^4 hücre popülasyonu uygun şekilde seçilerek *gate* alınmış ve böylece hücre debrisleri elimine

edilmiştir. Ardından ZnO NP uygulamalarının ardından sub G1, G1, S ve G2/M fazlarındaki hücre sayılarının analizi sağlanmıştır.

Reaktif Oksijen Ürünü (ROS) Oluşumunun DCFH-DA Boyama ve Akış Sitometrisi Analizi

Kontrol ve STAT5+ hücre hatları 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Ertesi gün 15 $\mu\text{g/ml}$ ve 25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında ZnO NP uygulanarak hücreler 24 saat 37°C ve %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin üzerindeki medya uzaklaştırılarak 1X PBS ile hücreler yıkanmıştır. Ardından hücreler diklorodihidroflorescein diasetat (DCFH-DA) ($0.5 \mu\text{M}$) ile boyanarak 30 dakika 37°C 'de inkübe edilmiştir. Ardından hücrelerdeki ROS miktarının analizi için floresans mikroskop ile görüntüleme sağlanmıştır (Ex./Em.: 495 nm/529 nm). Daha sonra boyanan hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve 1X PBS ile homojenize edilerek akış sitometrisinde analiz edilmiştir.

Floresan Mikroskopi Analizi

Kontrol ve STAT5+ hücreler 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildikten sonra ZnO NP uygulamaları 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Daha sonra aşağıda belirtilen şekilde floresan boyalar uygulanmış ve uygun filtreler kullanılarak floresan mikroskopta görüntüleme sağlanmıştır.

Propidium İodide

1 ml besiyeri içine 1 mg/ml PI boyası eklenerek 37°C 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından görüntüleme sağlanmıştır (Ex. 493 nm/Em. 636 nm).

DiOC₆

4 nM 3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC_6) uygulanan hücreler 37°C 'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından görüntüleme sağlanmıştır (Ex. 482 nm/Em. 504 nm).

DAPI

5 μM 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) uygulanan hücreler 37°C 'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından görüntüleme sağlanmıştır (Ex. 358 nm/Em. 461 nm).

Mitotracker

Mitotracker® Red CMXRos (Invitrogen) 100 nM olacak şekilde hücrelere uygulanarak 37°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından görüntüleme sağlanmıştır (Ex: 579 nm/Em: 599 nm).

3.2.3. ZnO NP’nin Hücre Ölümüne Etkisinin Belirlenmesi

Annexin V-PI Boyama

Kontrol ve STAT5+ hücre hatları 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve belirlenen konsantrasyonlarda ZnO NP uygulanmıştır. 24 saat sonra hücreler tripsinlenerek kaldırılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılarak bir kez 1X PBS ile yıkanan hücreler eBioscience Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Invitrogen) üreticinin talimatına göre kullanılarak hücreler boyanmıştır. Daha sonra akış sitometrisinde 10^4 hücre popülasyonunda analiz gerçekleştirilerek canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre sayısı belirlenmiştir.

3.2.4. ZnO NP’nin Renal Hücreli Karsinoma Hücre Hatlarında Protein

Ekspresyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmaya yönelik oluşturulan deney grupları Tablo 3.2’de verilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3. 2. Çalışmaya Yönelik Oluşturulan Deney Grubu

Deney Grubu	
Normal	Kontrol
	ZnO NP
	miR-33a
	miR-33a+ZnO NP
STAT5+	Kontrol
	ZnO NP
	miR-33a
	miR-33a+ZnO NP

Protein İzolasyonu

60 cm²’lik hücre kültürü kaplarına ekilen 10^6 hücre yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra 24 saat boyunca ZnO NP uygulaması gerçekleştirilmiştir. Ardından ZnO NP uygulanan hücrelerin üst medyaları mikrofüj tüplerinde toplanarak santrifüjlenmiş, kontrol gruplarının ise üst medyaları uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler soğuk 1X

PBS ile yıkanarak kazıyıcı ile kazınmıştır. Hücreler +4°C 16000 rpm x 2 dakika şeklinde santrifüjlenerek toplanmıştır. Ardından pellet hacmine göre hücre özütleme tamponu (CLB) ile çözülmüştür. Daha sonra oda sıcaklığında 20 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Ardından +4°C 16000 rpm x 20 dakika santrifüjlenerek süpernatant temiz bir mikrofüj tüpüne alınmıştır. İzole edilen proteinler -20°C’de saklanmıştır.

Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ve Hazırlanması

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi için standart eğri oluşturmak için BSA (Bovine Serum Albumin) 1,5 µg-7,5 µg aralığında kullanılmıştır. Artan oranda BSA iki tekrarlı şekilde 96 kuyucuklu kaplara eklenmiştir. Protein örnekleri ise 1’er µl iki tekrarlı biçimde eklenmiştir. Ardından Bradford solüsyonu 200 µl/kuyu eklenerek örnekler karanlıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra iMark mikroparka okuyucuda 595 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri ölçülerek her bir protein örneği için değerlerin ortalamaları alınarak BSA standardında protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

Konsantrasyonları belirlenen protein örnekleri 5:1 oranında 5X Laemmli tamponu ile bir araya getirilerek spinlenmiş ve homojenize edilmiştir. Daha sonra ısıtıcı blok yardımıyla 95°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir.

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE) ve Western Blotting

Protein Örneklerinin SDS-PAGE Jele Yüklmesi ve Yürütülmesi

Analizi gerçekleştirilecek proteinin büyüklüğüne (kDa) bağlı olarak belirlenen jel yüzdesine göre BioRad dikey elektroföres sistemleri kullanılarak ayırma (alt) jeli dökülmüştür. Jel içerikleri EK C Tablo 7.3.2’de yer almaktadır. Jellerin düzgün şekilde polimerleşmesi için izopropanol eklenmiştir. Polimerize olan jellerin üzerindeki izopropanolu uzaklaştırmak amacıyla distile su ile yıkama gerçekleştirilmiş ve filtre kağıtlarıyla distile su da uzaklaştırılmıştır. Daha sonra üst jel dökülerek taraklar yerleştirilmiştir. Üst jel polimerize olduktan sonra jeller kasete takılarak soğuk 1X yürütme tamponu eklenmiştir. Ardından taraklar çıkarılarak PageRuler Plus Prestained Protein Ladder ve protein örnekleri sırasıyla yüklenmiştir (Tablo 12). Örnekler 80-100 V’de yürütülmüştür.

Proteinlerin Jelden Membrana Transferi ve Bloklama

Yürütme işleminin ardından camlar ayrılarak üst jel kesilmiş, alt jel ise distile suya alınmıştır. Islak transfer sistemi için transfer kasetleri, süngerler ve filtre kağıtları

soğuk 1X transfer tamponuna alınmıştır. Daha sonra poliviniliden diflorür (PVDF) membranlar 30 saniye saf metanolde aktive edilmiş ve transfer tamponuna alınmıştır. Akım yönü göz önüne alınarak transfer kasetinin siyah yüzünden başlayarak sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve sünger aralarında hava baloncuğu kalmayacak biçimde yerleştirilmiştir. Transfer kaseti dikkatlice kapatılarak soğuk 1X transfer solüsyonu bulunan tanka alınmıştır. Akım 300 A olacak şekilde protein büyüklüğü göz önüne alınarak transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue solüsyonuna alınırken, membran %5 yağsız süt solüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

Proteinlerin Primer ve Sekonder Antikorlarla İşaretlenmesi

Bloklama işlemini takiben membranlar gece boyu +4°C’de silindir döndürücüde, %5 yağsız süt ve ilgili antikorla 1:1000 oranında hazırlanmış primer antikorlarda inkübe edilmiştir. Daha sonra membranlar TBS-Tween ile 3’er kez 10’ar dakika yıkanmış ve 1:3000 oranında hazırlanmış sekonder antikorlara alınmıştır. Sekonder antikorlarla oda sıcaklığında 4 saat ya da 4°C’de gece boyu silindir döndürücüde inkübasyonun ardından membranlar TBS-Tween ile 3’er kez 10’ar dakika ve TBS ile 1 kez 5 dakika yıkanarak görüntüleme aşamasına geçilmiştir. Primer ve sekonder antikorlar hazırlandıktan sonra -20°C’de saklanmıştır ve kullanılan antikorlara ait bilgiler EK C Tablo 7.3.3’te yer almaktadır.

Protein Bant Profillerinin Kemilüminesans Görüntülenmesi

Görüntüleme için içerikleri EK D’de yer alan miktarlarda kemilüminesans membran görüntüleme çözeltileri hazırlanmıştır. A ve B çözeltileri karanlıkta karıştırılmış ve membranlar çözeltiye alınarak 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kemilüminesans cihazı (BioRad) ve ImageJ yazılımı ile bant profilleri gözlemlenmiştir.

Membranların Striplenmesi

Görüntülenmesi sağlanan membranlardan antikorların uzaklaştırılması ve aynı membranda farklı bir proteine ait bant profillerinin gözlemlenebilmesi amacıyla mild strip solüsyonu kullanılmıştır. Membranlar oda sıcaklığında çalkalayıcıda ikişer kez 10’ar dakika mild strip solüsyonu ile, ikişer kez 10’ar dakika 1X PBS ile, ikişer kez 10’ar dakika TBS ile ve bir kez 5 dakika TBS ile inkübe edilmiştir. Ardından 1 saat boyunca %5 yağsız süt solüsyonu ile bloklama gerçekleştirilmiş ve primer antikorla muamele edilmiştir.



3.2.5. ZnO NP'nin Yağ Asit Metabolizmasına Etkisinin İncelenmesi

BODIPY™ 493/503 Boyama ve Floresan Görüntüleme

ZnO NP'nin nötral lipit damlacıklarına etkisinin belirlenmesi amacıyla kontrol ve STAT5+ hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Daha sonra 24 saat boyunca ZnO NP uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Ardından hücrelerin üzerindeki medya uzaklaştırılmış ve soğuk 1 ml %4 paraformaldehit eklenerek 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fiksatif uzaklaştırılarak 500 μ l %0,1 Triton-X100 eklenerek 10 dakika inkübasyonla permeabilizasyon sağlanmıştır. Ardından Triton-X100 uzaklaştırılmış ve 1X PBS içinde homojenize edilen 2 μ M BODIPY 15 dakika boyunca oda sıcaklığında uygulanmıştır. Ardından floresan mikroskopta görüntüleme sağlanmıştır (Ex. 510 nm/Em. 665 nm).

miRNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

miRNA İzolasyonu

6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 10^5 olacak şekilde ekilen RCC hücrelerine 24 saat süreyle miR-33a mimik ve anti-miR-33a uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon süresinin ardından tripsinlenerek kaldırılan hücreler mikrofüj tüpüne toplanarak santrifüjlenmiş ve 1X PBS içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra miRNeasy Mini Kit kullanılarak üreticinin talimatına göre QIAzol lizis solüsyonu eklenerek pipetaj yapılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından kloroform eklenmiş ve 15 saniye güçlü şekilde invert edilerek 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sağlanmıştır. Sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $12000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilen örneklerde üst faz yeni bir koleksiyon tüpüne alınmıştır. Üzerine saf etanol eklenerek pipetaj yapılmış ve örnek spin kolona alınmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında $8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj gerçekleştirilmiş ve alt faz atılmıştır. Daha sonra kolon üzerine RWT tamponu eklenerek $8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüjlenmiştir. Koleksiyon tüpüne geçen alt faz uzaklaştırılmış ve kolona RPE solüsyonu eklenmiştir. $8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüjlendikten sonra bu basamak tekrarlanmış ancak ikinci santrifüj 2 dakika yapılmıştır. Ardından kolon temiz bir mikrofüj tüpüne alınarak üzerine RNaz içermeyen saf su eklenmiştir. Hemen ardından nanodrop spektrofotometre ile konsantrasyonları belirlenen miRNA örnekleri cDNA'ya çevrilmiş ve miRNA stokları -80°C 'de saklanmıştır.

miRNA'lardan cDNA Eldesi

miRNA örnekleri miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) kullanılarak üreticinin talimatına göre cDNA'ya çevrilmiştir. Talimata göre 10 µl total hacim için; 2 µl RT Reaction Mix, 5 µl RNaz içermeyen su, 1 µl 10X RT Enzyme Mix ve 5 ng/µl miRNA örneği eklenmiştir. Ardından oluşturulan karışım termal döngüleyiciye alınarak reverse transkripsiyon aşaması 42°C'de 1 saat ve reaksiyonun inaktivasyonu için 95°C'de 5 dakika cDNA eldesi sağlanmıştır. Daha sonra örnekler -80°C'de saklanmıştır.

Kantatif Gerçek Zamanlı Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

RCC hücrelerinde hücre içi miR-33a ekspresyon seviyelerinin analizi ve gerçekleştirilen miR-33a mimik transfeksiyonlarının başarısının tespiti için miScript SYBR Green PCR Kiti (Qiagen) ile qRT-PCR analizi yapılmıştır. İnsan küçük nükleer U6 RNA'sı bir internal kontrol olarak kullanılmıştır. RNU6B ve miR-33a primerleri için ayrı ayrı 10 µl 2X SYBR Green Mix, 2 µl 10X miScript Universal Primer, 2 µl 10X miScript Primer Assay, cDNA konsantrasyonuna göre cDNA örneği ve total hacmi tamamlayacak şekilde RNaz içermeyen su kullanılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımı her bir PCR stripine 20 µl olacak şekilde bölüştürüldü. Daha sonra CFX Connect qRT-PCR cihazında denatürasyon aşaması 94°C'de 15 sn, bağlanma aşaması 55°C'de 30 saniye, uzama aşaması 70°C'de 30 saniye olarak 40 döngü şeklinde reaksiyon gerçekleştirildi. Ardından $\Delta\Delta C_t$ yöntemiyle miRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri hesaplandı. miR-33a ve RNU6B primer dizileri EK C Tablo 7.3.4'te yer almaktadır.

3.2.6. ZnO NP'nin Otofajik Parametrelere Etkisinin İncelenmesi

LysoTracker® Red DND-99 ile Asidik Organellerin Belirlenmesi

Kontrol ve STAT5+ hücreler 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Ardından ZnO NP uygulamaları 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte hücrelere mTOR inhibitörü rapamisin pozitif kontrol olarak 1 µM olacak şekilde 24 saat boyunca uygulanmıştır (Nayman vd., 2019). Ardından 1 µM LysoTracker® Red DND-99 boyası ile 15 dakika 37°C'de inkübe edilen hücreler floresan mikroskopta görüntülenmiştir.

3.2.6.2. GFP-LC3 Transfeksiyonu Sonrası Floresan Görüntüleme ve Akış Sitometrisi Analizi

Pürifikasyonu sağlanmış GFP-LC3 plazmidi, kontrol ve STAT5+ hücrelere lipofectamine türevli transfeksiyon ajanıyla transfeke edilmiştir. 48 saatin ardından hücrelere 15 µg/ml ZnO NP ve 1 µM rapamisin uygulamaları 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücrelerin üzerindeki medya uzaklaştırılarak floresan mikroskopunda görüntüleme sağlanmıştır. Ardından hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve akış sitometrisinde analiz gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. STAT5B ve GFP-LC3 Plazmitlerinin Eldesi

Bakteri Kültürü

Üreticiden tedarigi sağlanan *Escherichia coli* DH5α suşuna transforme edilmiş STAT5B (#167800, AddGene) ve GFP-LC3 (#11546, AddGene) plazmitleri sırasıyla 100 µg/ml amfisilin ve 50 µg/ml kanamisin içeren LB agarlara inoküle edilmiştir. Ardından 24 saat 37°C’de inkübe edilen bakterilerden koloniler seçilerek ilgili antibiyotikleri içeren 1 ml’lik LB Broth kültürlerine alınmıştır. Bakteriler 37°C’de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiş, belli bir yoğunluğa geldikten sonra LB Broth hacimleri kademeli olarak arttırılmıştır ve böylece ana stoklar oluşturulmuştur. Daha sonra ana stoklardan alınan bakteri örnekleri 35 ml’lik LB Broth kültürlerine plazmit izolasyonu için ekilmiştir. Gece boyu 37°C’de çalkalamalı etüvde inkübe edilen kültürlerin OD600 değerleri nanodrop spektrofotometrede ölçülmüştür. Ardından izolasyon aşamasına geçilmiştir.

Plazmit İzolasyonu

Bakteri kültürleri oda sıcaklığında 8000 rpm’de 2 dakika santrifüjlenmiş ve üst faz atılmıştır. GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) kullanılarak talimatlara uygun şekilde plazmitler izole edilmiştir. Daha sonra izole edilen plazmitlerin konsantrasyon (ng/µl) ve A260/280 değerleriyle saflıkları belirlenmiştir. Ardından plazmit örnekleri %1 agaroz jelde 70 V’de yürütülmüştür.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizlerinde en az üç bağımsız deneyin ortalamaları GraphPad Prism 8.0.1 yazılımı aracılığıyla Tukey’s multiple comparisons test ile değerlendirildi.

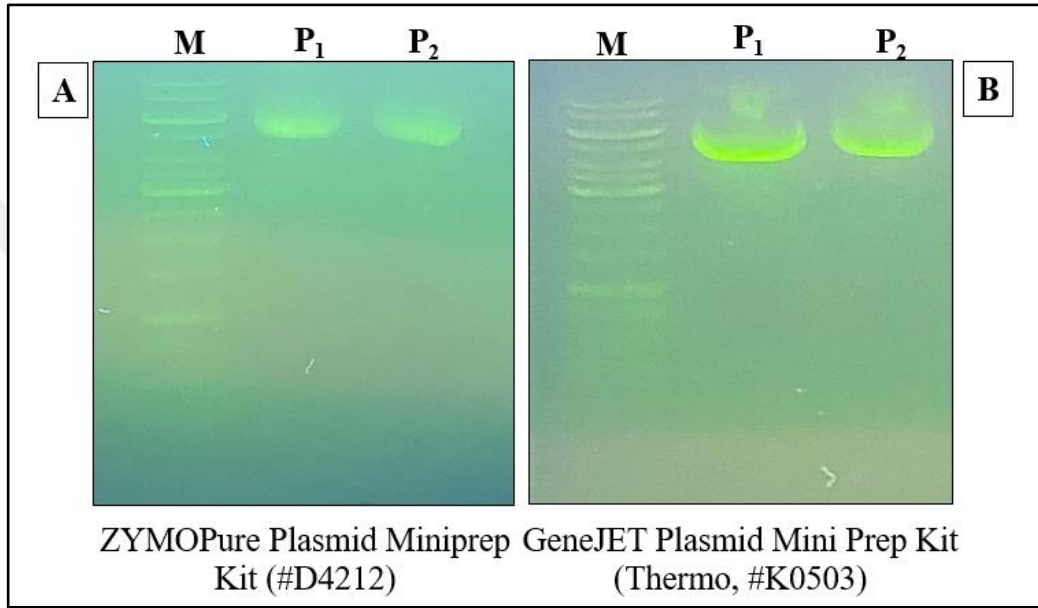
Tüm test sonuçları ilgili şekillerin altında istatistiksel anlamlılık sınırlarıyla birlikte sunulmaktadır.



4. SONUÇLAR

4.1. RCC Hücrelerinde STAT5 İfadesinin Arttırılması

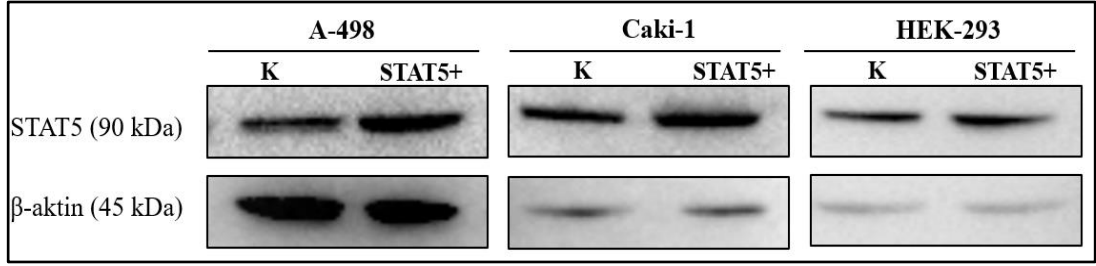
Koloni seçilimi gerçekleştirilen STAT5B plazmidi taşıyan *E.coli* bakterilerinden iki farklı kit ile plazmit izolasyonları gerçekleştirilerek saflık ve konsantrasyon tayinleri yapılmıştır. İzole edilen plazmit örnekleri %1 agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.1). 8682 bp'ye sahip STAT5B görüntülenmiştir.



Şekil 4. 1. Farklı kitlerle izole edilmiş STAT5B plazmitlerinin %1 agaroz jeldeki görüntüleri. Koloni seçimleri yapılarak LB Broth ortamında kültüre edilen bakterilerden iki farklı kit kullanılarak üreticilerin talimatlarına göre plazmit izolasyonları gerçekleştirilmiş ve %1 agaroz jelde örnekler yürütülmüştür. Plazmit örneklerinin saflık ve konsantrasyon tayinleri gerçekleştirildikten sonra hücrelere transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. (A) ZYMOPure Plasmid Miniprep Kit (#D4212) ile (B) Thermo GeneJET Plasmid Mini Prep Kit (Thermo, #K0503) ile. M: 1 kb marker, P: Plazmit örneği

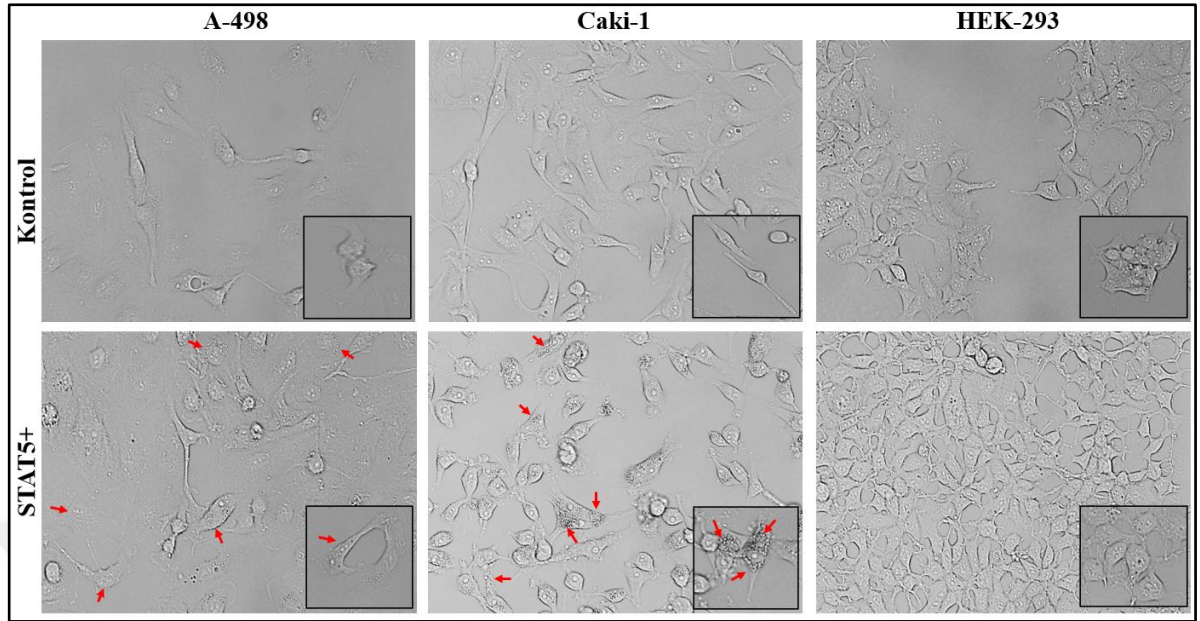
STAT5B plazmitleri lipofektamin aracılı transfeksiyon ajanı kullanılarak hücrelere transfekte edilmiştir. 48 saatlik transfeksiyon süresinin ardından protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra %12 SDS-PAGE jelle 30 µg protein lizati yüklenerek proteinler STAT5 antikoru ile problanmış. Her hücre hattında kontrol grubuna oranla STAT5 ifadesinde en az 2 kat artış gözlemlenmiştir ve β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 4.2). Stabil hücre hattı oluşturmak amaçlandığından STAT5B plazmidinin memelide seçici belirteci olan higromisin artan oranda hücrelere

uygulanmıştır. Böylece ilerleyen çalışmalar için stabil STAT5+ hücre hattı oluşturulmuştur.



Şekil 4. 2. RCC ve HEK-293 hücre hatlarında transfeksiyon sonrası STAT5 ekspresyonlarının gösterilmesi. Saflık ve konsantrasyon tayinleri gerçekleştirilen STAT5B plazmitlerinin transfeksiyonu RCC ve HEK-293 hücre hatlarına lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı ile 1:3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oranında 48 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Daha sonra artan oranda Higromisin uygulamaları ile STAT5+ hücre seçilimi yapılmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 μg 'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüştür. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. STAT5+ stabil hücre hatlarında düzenli olarak protein izolasyonları gerçekleştirilerek STAT5 ifadeleri kontrol edilmiştir. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

Gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında kontrol ve STAT5+ RCC hücreleri ışık mikroskopuyla incelenmiştir. STAT5+ RCC hücrelerinde morfolojik değişimler tespit edilmiştir. STAT5+ hücrelerin kontrole kıyasla daha uzun podlar oluşturduğu ve hücre içi vakuol yapılarının arttığı belirlenmiştir. Ancak STAT5 ifadesinin artışı HEK-293 hücrelerinde kontrole kıyasla benzer bir etkiye sebep olmamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. STAT5 ekspresyonları arttırılan RCC hücrelerinde morfolojik değişimlerin ışık mikroskopuyla gösterilmesi. STAT5 transfeksiyonunun ardından hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS eklenmiş ve ışık mikroskopuyla görüntüleme sağlanmıştır. Kırmızı renkli oklar ile vakuol yapıları gösterilmektedir. Büyütme 40X. Ölçek çubuğu 200 μ m.

4.2. ZnO NP'nin Hücre Döngüsü Regülasyonu ve Hücre Sağkalım Mekanizmaları Üzerindeki Etkisinin Anlaşılması

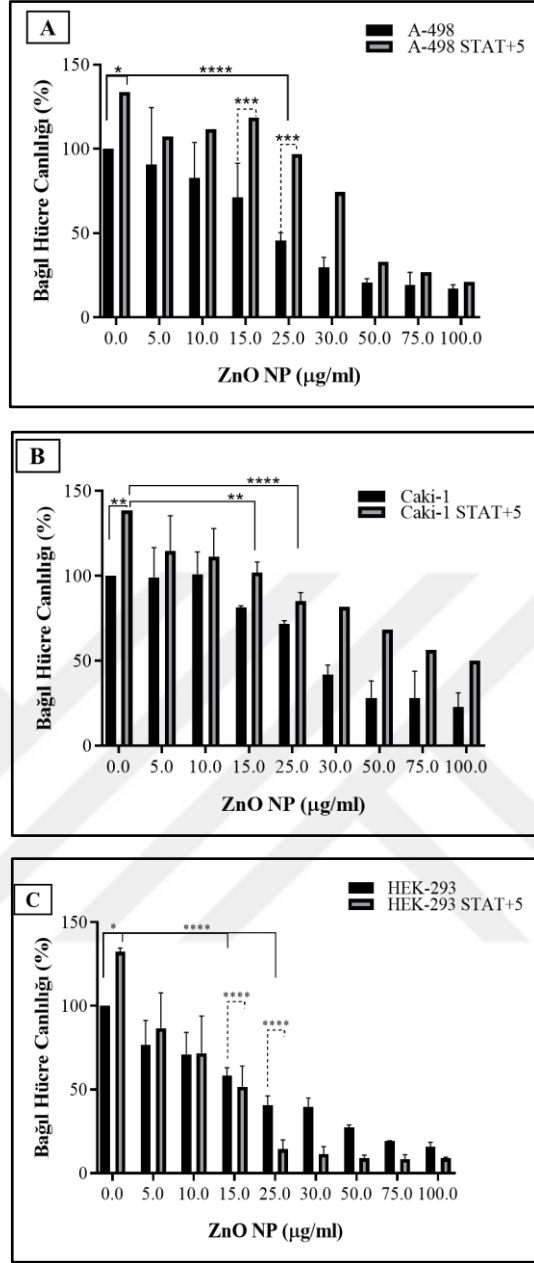
4.2.1. ZnO NP Uygulaması Hücre Canlılığını Doza Bağımlı Olarak Azaltmaktadır

RCC ve HEK-293 hücrelerinde ZnO NP etkisiyle hücre canlılığı doza bağımlı olarak azalmıştır. ZnO NP'nin normal ve STAT5+ hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin incelenmesi için 5, 10, 15, 25, 30, 50, 75 ve 100 μ g/ml konsantrasyonları 24 saat boyunca uygulanıp MTT sağkalım testi ile analiz edilmiştir. RCC hücre hatlarında 5 μ g/ml ZnO NP hücre canlılığında yaklaşık %5 azalmaya sebep olmuştur. 10 μ g/ml ZnO NP, A-498 hücrelerinde hücre canlılığında yaklaşık %10 azalmaya neden olurken, Caki-1 hücrelerinde hücre canlılığı kontrol grubuyla benzer şekildedir. 24 saatlik 15 μ g/ml ZnO NP uygulaması ise A-498 ve Caki-1 hücre hattında %20 (Şekil 4.4-A-B) ve HEK-293 hücre hattında %42 (Şekil 4.4-C) oranlarında hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur. Bununla birlikte 25 μ g/ml ZnO NP uygulaması hücre canlılığında A-498 hücrelerinde %55, Caki-1 hücrelerinde %25 ve HEK-293 hücrelerinde %60 oranlarında azalmaya sebep olmuştur. RCC hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında ZnO NP'ye A-498, Caki-1'den daha duyarlıdır. HEK-293

hücre hattı RCC hücrelerine kıyasla ZnO NP uygulamalarına daha duyarlıdır (Şekil 4.4). Daha yüksek ZnO NP konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etki yarattığı gözlenmiştir.

STAT5+ RCC hücrelerinde ise 5, 10 ve 15 µg/ml ZnO NP konsantrasyonlarında hücre canlılığı azalmamıştır. STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulaması 30 µg/ml konsantrasyonunda %30 oranında azaltmıştır. %50 hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon aralığının 40 µg/ml oranında olduğu analiz edilmiştir. STAT5+ Caki-1 hücreleri ZnO NP uygulamasına karşı normal Caki-1 hücrelerine oranla daha dirençli olup 30 µg/ml konsantrasyonda ZnO NP uygulaması %20 oranında, %50 hücre ölümüne sebep olan konsantrasyonun 100 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda STAT5+ HEK-293 hücrelerinde 5 µg/ml ZnO NP uygulaması ile hücre canlılığı %3, 10 µg/ml ZnO NP ile %34 ve 15 µg/ml ZnO NP ile %40 oranlarında azalmıştır. STAT5+ RCC hücreleri, normal RCC hücrelerine kıyasla ZnO NP'ye karşı daha dirençlidir.

24 saat boyunca uygulanan ZnO NP konsantrasyona bağımlı olarak her üç hücre hattında hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur. Ancak, A-498 ve HEK-293 hücrelerine nazaran Caki-1 hücrelerinin ZnO NP uygulamasına karşı daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Bu kapsamda, ZnO NP' nin hücre canlılığına ve hücre ölüm mekanizmalarına etkisinin moleküler mekanizmasının RCC hücrelerinde araştırılması üzere 15 ve 25 µg/ml konsantrasyonları ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.



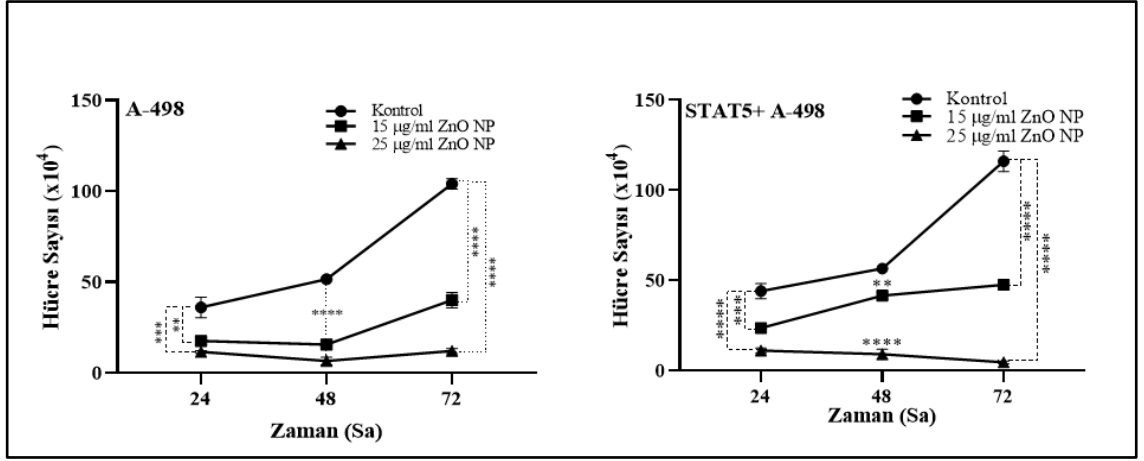
Şekil 4. 4. Normal ve STAT5+ RCC hücrelerinde ZnO NP uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkisi. 10^4 hücre 24 saat (5-100 $\mu\text{g/ml}$) maruz bırakılmıştır. ZnO NP uygulamasının ardından MTT hücre canlılık testi gerçekleştirilmiştir. Grafikler Ortalama $\pm$ Std.Sapma'yı göstermektedir. İstatistiksel analiz için Tukey's multiple comparisons test uygulanmıştır. Veriler 4 tekrar içeren üç ayrı deneyin ortalamasıdır (n=3). (A) A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkisi *p=0,0450, ***p=0,0002, ****p<0,0001. (B) Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkisi. Kontrol Caki-1 vs. Kontrol STAT5+ Caki-1**p=0,0026, Kontrol STAT5+ Caki-1 vs. 15 $\mu\text{g/ml}$ STAT5+ Caki-1 **p=0,0055 ve ****p<0,0001. (C) HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkisi *p=0,0177, ****p<0,0001

4.2.2. ZnO NP Uygulaması Hücre Proliferasyonunu Zamana Bağlı Olarak Azaltmaktadır

ZnO NP'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi tripan mavisi yöntemiyle her bir hücre hattı için 24-72 saatlik zamana bağlı bir şekilde belirlenmiştir. Bununla birlikte ZnO NP'nin RCC ve HEK-293 hücrelerinde hücre morfolojisi üzerindeki etkisi, ışık mikroskobu ile zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde gözlemlenmiştir.

Her hücre hattının proliferasyonu ZnO NP uygulamalarıyla inhibe edilmiştir. Kontrol grupları kendi aralarında kıyaslandığında STAT5+ RCC hücrelerinin proliferasyonlarının normal RCC hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

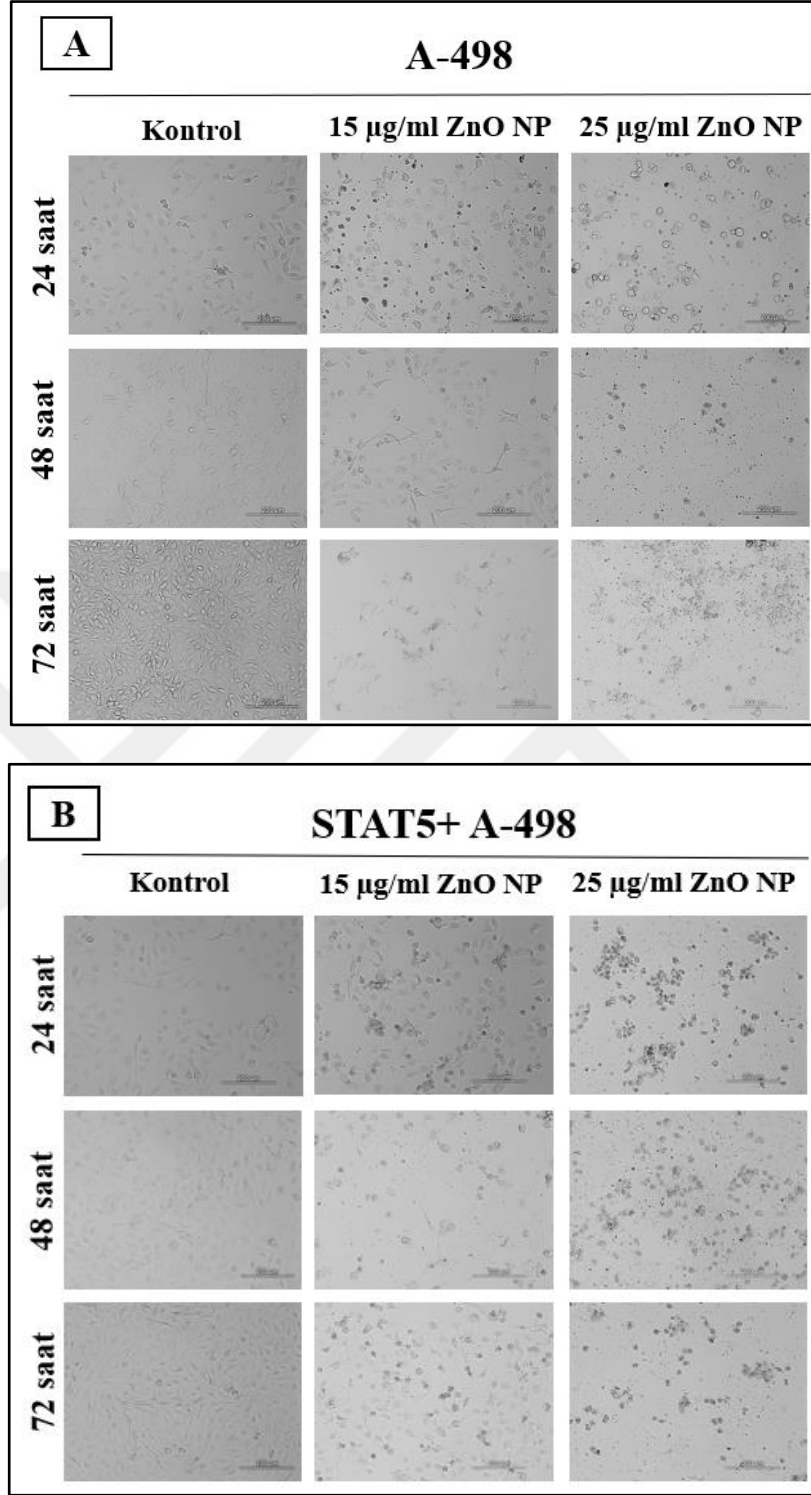
A-498 ve STAT5+ A-498 hücre hatlarında 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamalarında hücre sayısı kontrole oranla 24 saatte azalmıştır (Şekil 4.5). ZnO NP uygulamaları, kontrole oranla 48 ve 72. saatlerde de sitotoksik bir etki göstermiş MTT sağ kalım testini doğrulayacak şekilde hücre canlılığında azalma ve aynı zamanda zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda baskılanmaya sebep olmuştur. A-498 ve STAT5+ A-498 hücre hatları karşılaştırıldığında STAT5+ hücreler, ZnO NP'den daha az etkilenmektedir. 24. saatte A-498 hücrelerinin proliferasyon hızı azalmış hücre sayısı 36×10^4 'ten 15 µg/ml ZnO NP uygulaması ile 18×10^4 hücreye düşürülürken; STAT5+ A-498 hücrelerinde hücre sayısı 44×10^4 'ten 15 µg/ml ZnO NP uygulaması ile 24×10^4 hücreye düşmüştür. STAT5 ifadesinin artırılması A-498 hücrelerinin 15 µg/ml ZnO NP uygulamasına direnç göstermesine sebep olmuş, ancak bu konsantrasyonun hücre çoğalma hızını baskıladığı gözlenmiştir. 25 µg/ml ZnO NP uygulaması hem A-498 hem de STAT5+ A-498 hücrelerinde sitotoksik etki göstererek hücre sayısını azaltmış ve hücre çoğalmasını anlamlı oranda baskılamıştır.



Şekil 4. 5. ZnO NP uygulamalarının A-498 ve STAT5+ A-498 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi. 2×10^5 hücre 24-72 saat ZnO NP'ye (15 ve 25 µg/ml) maruz bırakılmıştır. Veriler, üç tekrarlı yapılan iki deneyden elde edilen Ortalama $\pm$ Std.Sapma'yı göstermektedir. İstatistiksel analiz için Tukey's multiple comparisons test uygulanmıştır. A-498 24 saat için $**p=0,0018$ $***p<0,0002$; 48 saat için $****p<0,0001$; 72 saat için $****p<0,0001$. STAT5+ A-498 24 saat için $***p=0,0001$ $****p<0,0001$; 48 saat için $**p=0,0016$ $****p<0,0001$; 72 saat için $****p<0,0001$ (n=3).

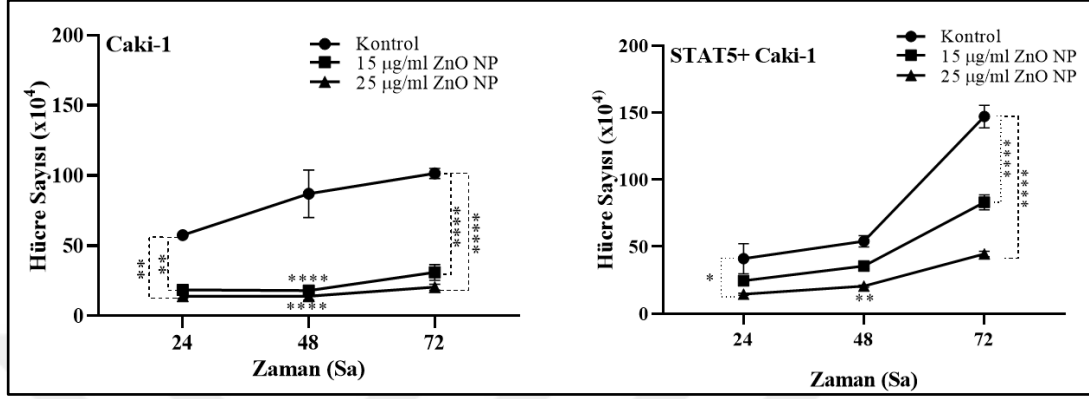
Uygulanan ZnO NP'nin hücre morfolojisine etkisi zamana bağlı olarak incelenmiştir. 24. saatte 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamalarıyla hem A-498 hem de STAT5+ A-498 hücreleri adeziv özelliklerini kaybetmiştir (Şekil 4.6). 25 µg/ml ZnO NP uygulaması, 15 µg/ml ZnO NP konsantrasyonuna kıyasla bu durumun artmasına neden olmuştur. Bununla birlikte her iki konsantrasyonda da 24-72 saat aralıklarında apoptotik hücrelere rastlanmıştır. Ancak 24-72 saatlik inceleme süreçlerinde STAT5+ A-498 hücreleri normal A-498 hücrelerine kıyasla ZnO NP uygulamalarına direnç göstermiştir. Ayrıca 24 saatlik sürecin ardından uygulanan ZnO NP, besiyeri içerisinde aglomerasyon oluşturmuştur.

15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamaları 24-72 saat aralığında Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde kontrole oranla hücre proliferasyonunu azaltmıştır (Şekil 4.7). ZnO NP uygulaması 24-72. saatlerde hücrelerde kontrole oranla sitostatik bir etki göstermiş ve ancak kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre proliferasyonunda anlamlı oranda baskılanmaya sebep olmuştur. Caki-1 hücrelerinde 24. saatte hücre sayısı 58×10^4 'ten 19×10^4 'e düşmüştür. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ise 41×10^4 'ten 25×10^4 'e düşmüştür. Normal Caki-1 hücreleriyle karşılaştırıldığında STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP, hücre proliferasyonunu daha az baskılamıştır (Şekil 4.7).



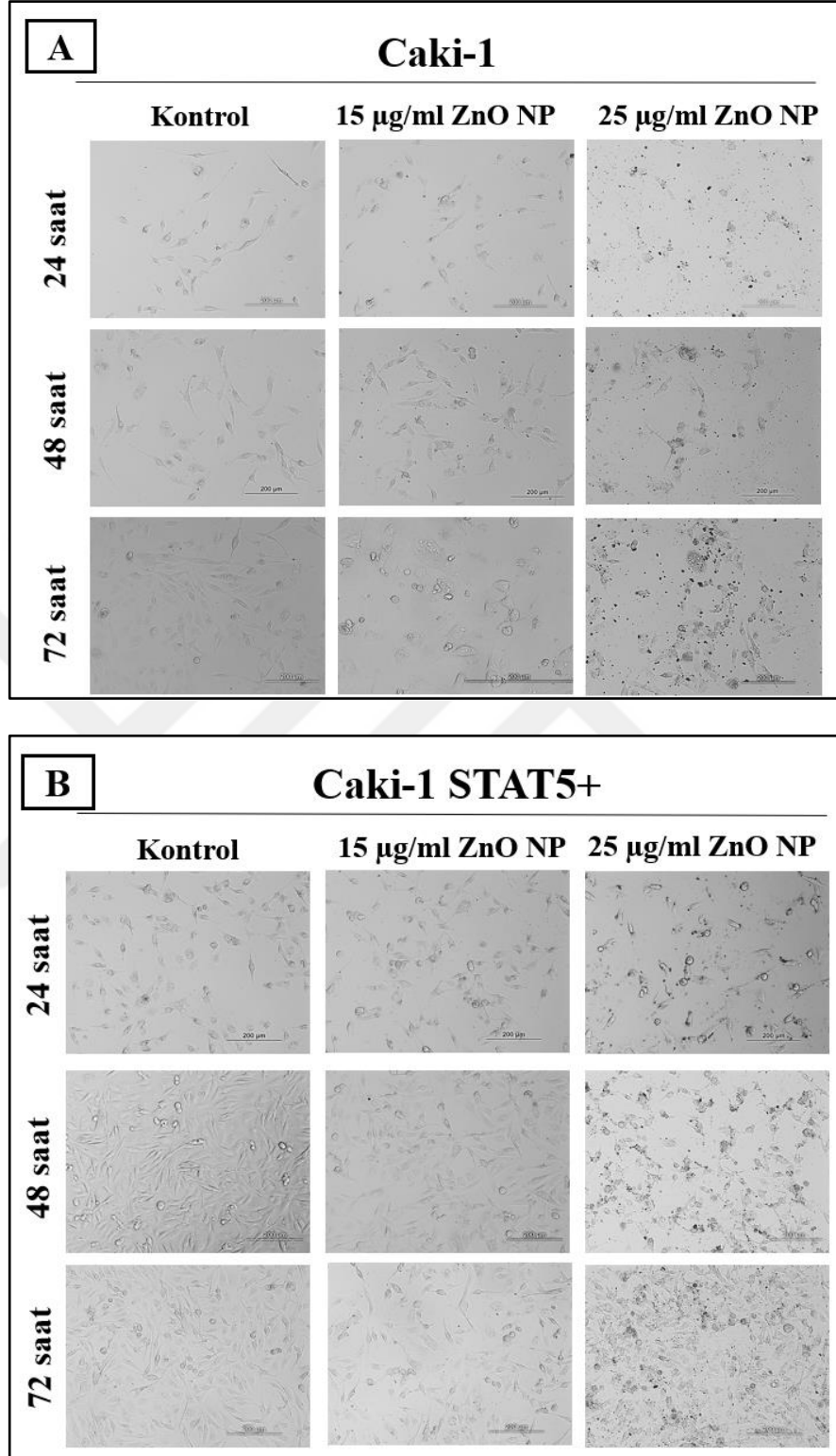
Şekil 4. 6. ZnO NP'nin A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde hücre morfolojisine zamana bağlı olarak etkisi. (A) A-498 hücreleri (B) STAT5+ A-498 hücreleri. Işık mikroskobu görüntüleri en az üç biyolojik tekrarın temsili figürleridir. Görüntüler bağımsız üç biyolojik tekrarın temsili figürleridir. Görüntüler bağımsız üç biyolojik tekrarın temsili figürleridir. Büyütme 20X. Ölçek çubuğu 200 µm (n=3).

A-498 ve Caki-1 hücreleri kıyaslandığında ZnO NP uygulamalarına karşı A-498 hücreleri daha duyarlıdır ve bu nedenle A-498 hücrelerinde hücre proliferasyon hızı Caki-1 hücrelerine kıyasla daha fazla azalmıştır. RCC hücrelerinde ZnO NP'nin hücre proliferasyonunu baskılamadaki etkisi 24-72 saatler arasında devam etmiştir.



Şekil 4. 7. ZnO NP uygulamalarının Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi. 2×10^5 hücre 24-72 saat ZnO NP'ye (15 ve 25 µg/ml) maruz bırakılmıştır. Veriler, üç tekrarlı yapılan iki deneyden elde edilen Ortalama $\pm$ Std.Sapma'yı göstermektedir. İstatistiksel analiz için Tukey's multiple comparisons test uygulanmıştır. Caki-1 24 saat 15 µg/ml ZnO NP için **p=0,003 ve 25 µg/ml ZnO NP için **p=0,0014; 48 ve 72 saat için ****p<0,0001. STAT5+ Caki-1 24 saat için *p=0,0145; 48 saat için **p=0,003; 72 saat için ****p<0,0001 (n=3).

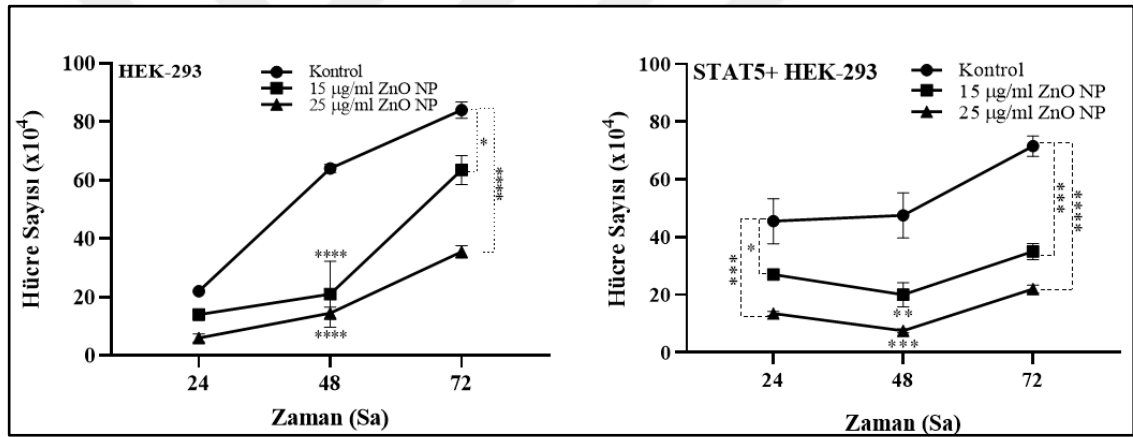
Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP'nin zamana bağlı olarak etkisi hücre morfolojisi açısından incelendiğinde Caki-1 hücrelerinde 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamalarıyla 24.-72. saatlerde hücrelerin adeziv özellikleri kaybolmuştur ve incelemelerde apoptotik hücrelere rastlanmıştır. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ise 15 µg/ml ZnO NP uygulaması normal hücrelere kıyasla 24-72 saat aralığında hücre morfolojisinde anlamlı bir değişime sebep olmamıştır. 25 µg/ml ZnO NP uygulaması STAT5+ Caki-1 hücrelerde adeziv özelliğin kaybına sebep olmuş ve bu durum 48-72. saatlerde artış göstermiştir. Ancak Caki-1 hücrelerine kıyasla STAT5+ Caki-1 hücrelerinde 24-72. saatlerde hücre proliferasyon hızı fazlayken ZnO NP'ye karşı duyarlılık daha azdır (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. ZnO NP'nin Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde hücre morfolojisine zamana bağlı olarak etkisi. (A) Caki-1 hücreleri (B) STAT5+ Caki-1 hücreleri. Işık mikroskobu görüntüleri en az üç biyolojik tekrarın temsili figürleridir. Görüntüler bağımsız üç biyolojik tekrarın temsili figürleridir.

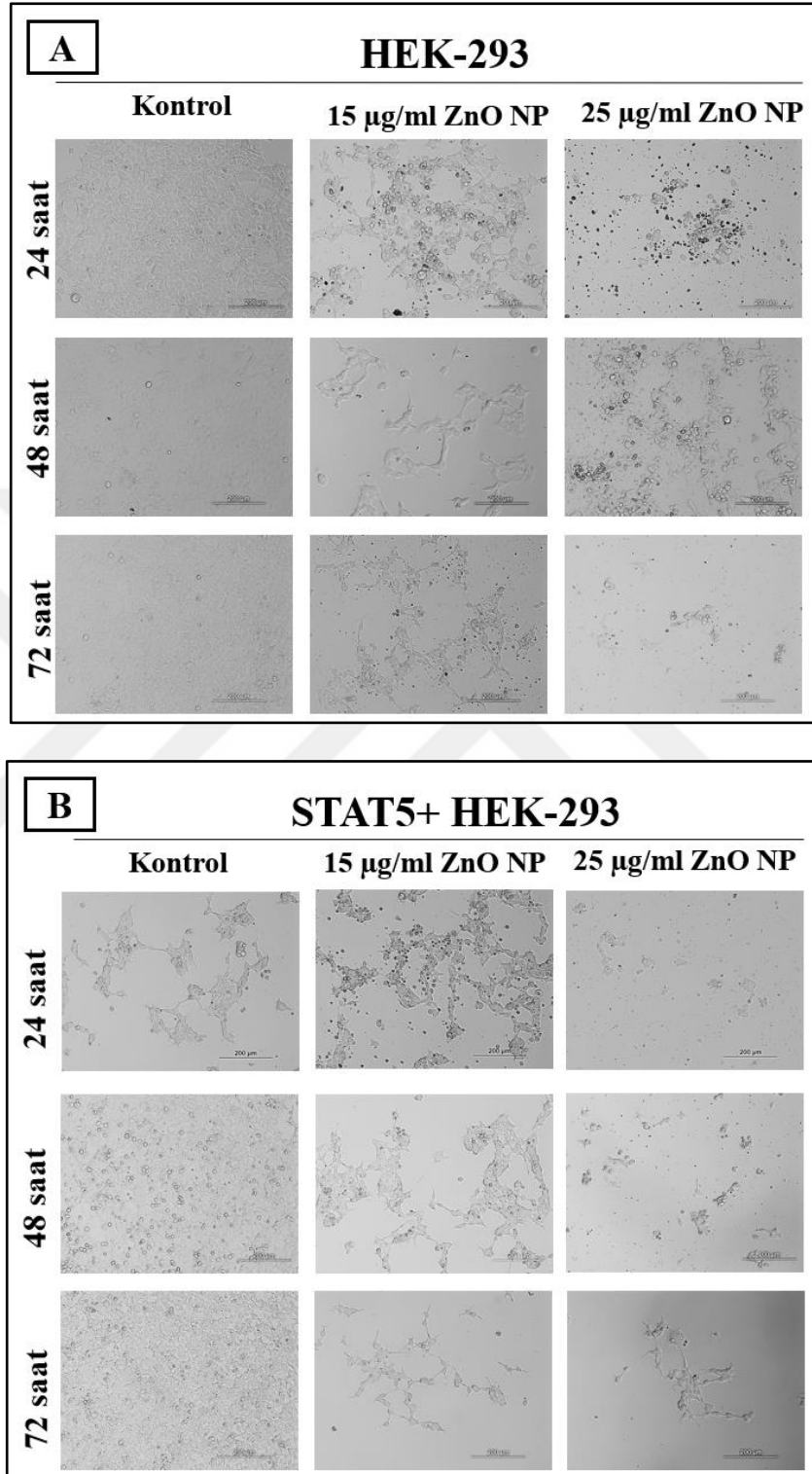
Büyütme 20X. Ölçek çubuğu 200 µm (n=3).

HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerine 24-72 saat aralığında 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulaması incelendiğinde 15 µg/ml ZnO NP konsantrasyonu 24. saatte HEK-293 hücrelerinde hücre sayısının 22×10^4 'ten 14×10^4 'e düşmesine neden olmuştur. Bununla birlikte STAT5+ HEK-293 hücrelerinde 24. saatte 15 µg/ml ZnO NP uygulaması hücre sayısının 46×10^4 'ten 27×10^4 'e düşmesine sebep olmuştur. 24. saatte normal ve STAT5+ HEK-293 kontrol grupları karşılaştırıldığında ise aynı sayıda hücre ekilmesine rağmen STAT5+ HEK-293 hücrelerinin sayıca daha fazla olduğu yani proliferasyon hızlarının arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte 48 ve 72. saatlerde hem HEK-293 hem de STAT5+ HEK-293 hücrelerinde her iki ZnO NP konsantrasyonu da kontrol grubuyla kıyaslandığında hücre proliferasyon hızını baskılayarak sitostatik etki göstermiştir (Şekil 4.9). Hem normal hem de STAT5+ RCC hücreleri ve HEK-293 karşılaştırıldığında, HEK-293 hücreleri ZnO NP'ye karşı daha duyarlıdır.



Şekil 4. 9. ZnO NP uygulamalarının HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi. 2×10^5 hücre 24-72 saat ZnO NP'ye (15 ve 25 µg/ml) maruz bırakılmıştır. Veriler, üç tekrarlı yapılan iki deneyden elde edilen Ortalama $\pm$ Std.Sapma'yı göstermektedir. İstatistiksel analiz için Tukey's multiple comparisons test uygulanmıştır. HEK-293 48 saat için **** $p < 0,0001$; 72 saat için * $p = 0,0207$ **** $p < 0,0001$. STAT5+ HEK-293 24 saat için * $p = 0,0303$ *** $p = 0,0007$; 48 saat için ** $p = 0,0022$ *** $p = 0,0001$; 72 saat için *** $p = 0,0003$ **** $p < 0,0001$ (n=3).

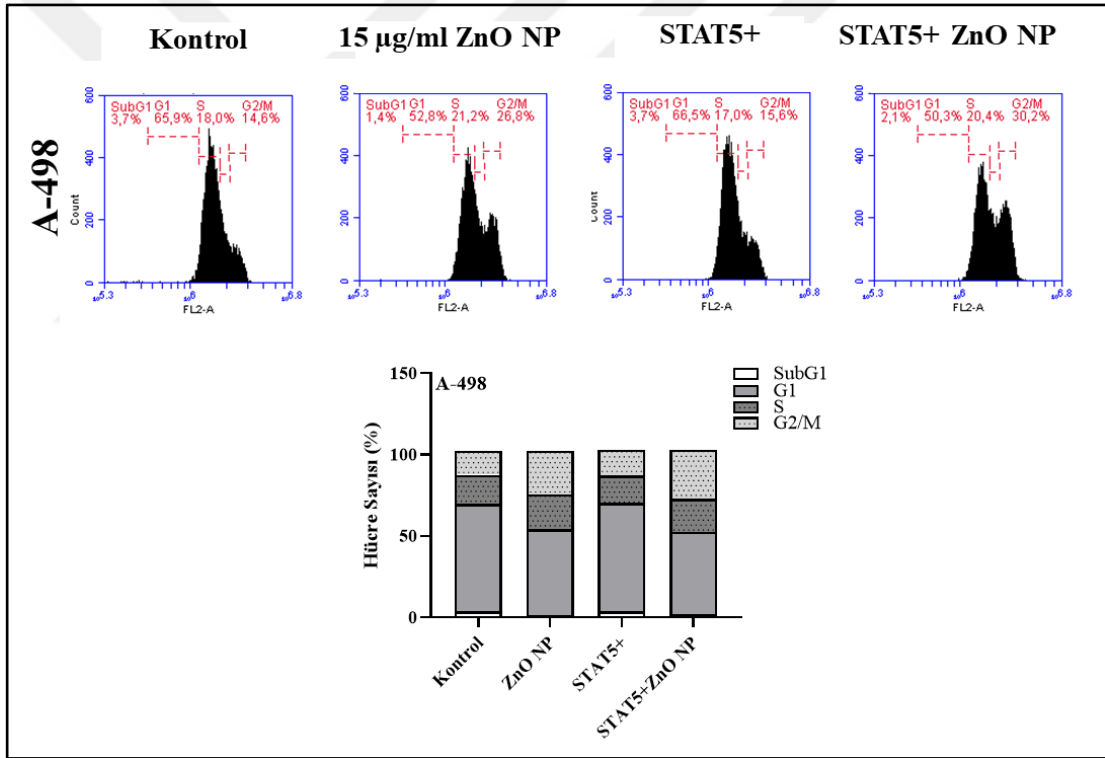
HEK-293 ve STAT5+ hücrelerine zamana bağlı olarak ZnO NP'nin etkisi hücre morfolojisi açısından incelendiğinde her iki hücre hattında da adeziv özellikler azalmıştır. Bununla birlikte 24. saatte HEK-293 hücreleri 15 µg/ml ZnO NP uygulamasıyla adeziv hücreler de bulunurken, 25 µg/ml ZnO NP uygulamasıyla bu karakterdeki hücre sayısı kontrole oranla azalmıştır. Diğer bir taraftan 24. saatte 25 µg/ml ZnO NP uygulaması normal HEK-293 hücrelerine kıyasla, STAT5+ HEK-293 hücrelerinde adeziv karakterin kaybı açısından daha az etkilidir (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10. ZnO NP'nin HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde hücre morfolojisine zamana bağlı olarak etkisi. (A) HEK-293 hücreleri (B) STAT5+ HEK-293 hücreleri. Işık mikroskobu görüntüleri en az üç biyolojik tekrarın temsili figürleridir. Görüntüler bağımsız üç biyolojik tekrarın temsili figürleridir. Büyütme 20X. Ölçek çubuğu 200 µm (n=3).

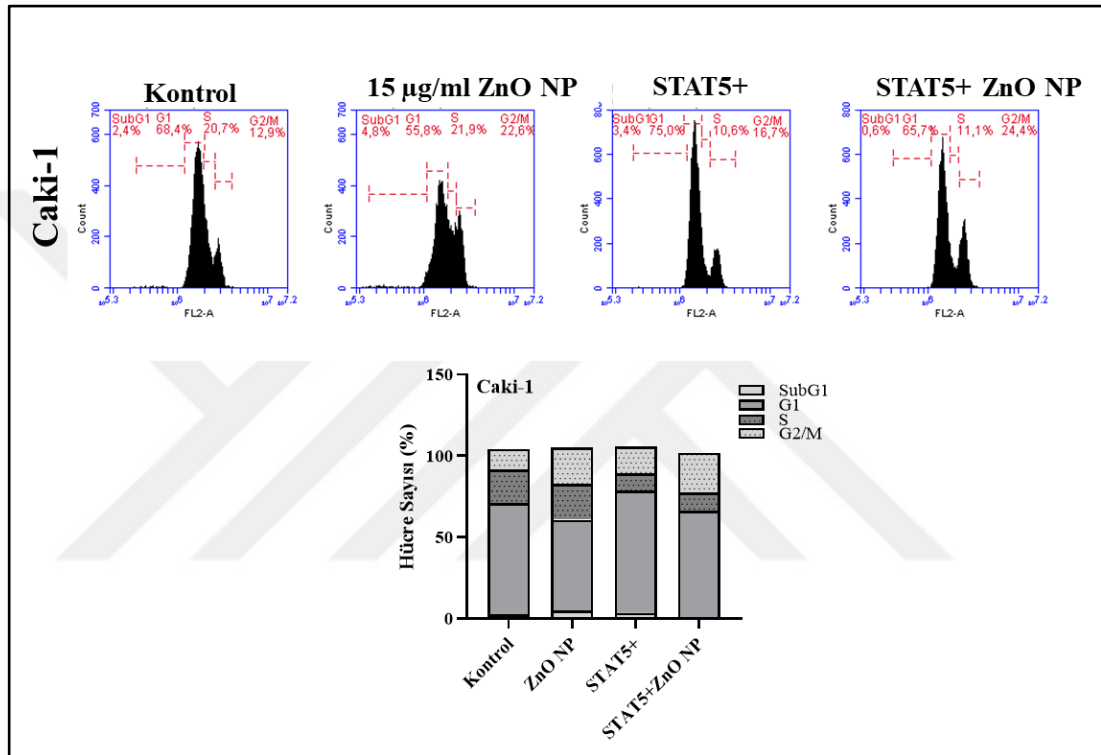
4.2.2. RCC Hücrelerinde ZnO NP uygulaması sonrası Hücre Döngüsü G2/M Fazında tutulu kalmıştır

ZnO NP'nin hücre döngüsü regülasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için PI ile boyanan hücreler akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Her bir hücre hattı 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Ardından hücrelere 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmış ve 10^4 hücre için analiz gerçekleştirilmiştir. A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulaması hücrelerin G2/M fazında tutulu kalmasına neden olmuştur (Şekil 4.11). G2/M aşamasındaki hücre popülasyonu kontrol grubunda %14.6 iken, 15 µg/ml ZnO NP uygulaması sonrası bu oran % 27 ye yükselmiştir. STAT5+ A-498 hücrelerinde G2/M fazındaki hücre sayısı yaklaşık olarak %15 artış göstermiştir.



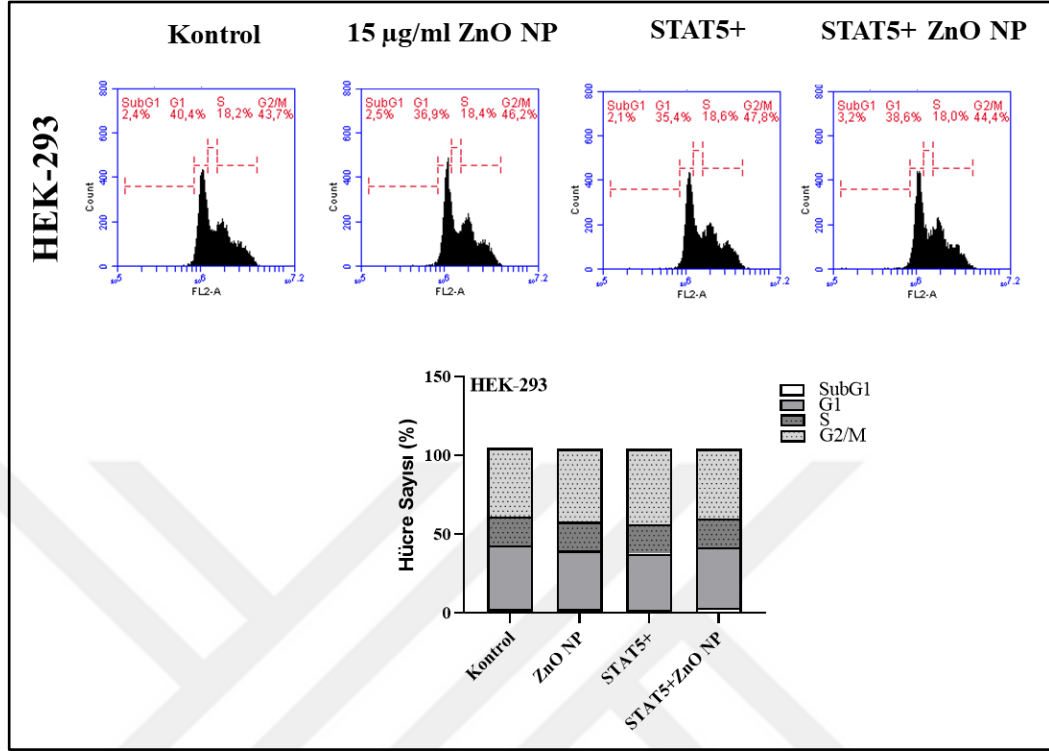
Şekil 4. 11. A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre döngüsü faz dağılımı üzerine etkisinin analizi. 24 saat boyunca ZnO NP uygulamasını takiben kontrol ve STAT5+ hücreler analiz edilmiştir. PI ile boyanan hücreler akış sitometrisinde 10^4 hücre olacak şekilde analiz edilmiştir. Verilen şekiller en az üç bağımsız deneyin temsili görüntüsüdür. (n=3). Histogram analizinde hücre döngüsü fazları yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerine 24 saat ZnO NP uygulamasının ardından PI boyama ile 10^4 hücre analiz edilmiştir. ZnO NP uygulaması hücrelerin G2/M fazında tutulu kalmasına neden olmuştur (Şekil 4.12). G2/M fazında hücre popülasyonu kontrol grubunda %12,9 iken, 15 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP uygulaması sonrası bu oran % 22,6 ya yükselmiştir. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde G2/M fazındaki hücre sayısı yaklaşık olarak %16,7 iken, ZnO NP uygulamalarıyla artış göstererek %24,4'e yükselmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4. 12. Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre döngüsü faz dağılımı üzerine etkisinin analizi. 24 saat boyunca ZnO NP uygulamasını takiben kontrol ve STAT5+ hücreler analiz edilmiştir. PI ile boyanan hücreler akış sitometrisinde 10^4 hücre olacak şekilde analiz edilmiştir. Verilen şekiller en az üç bağımsız deneyin temsili görüntüsüdür. (n=3). Histogram analizinde hücre döngüsü fazları yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

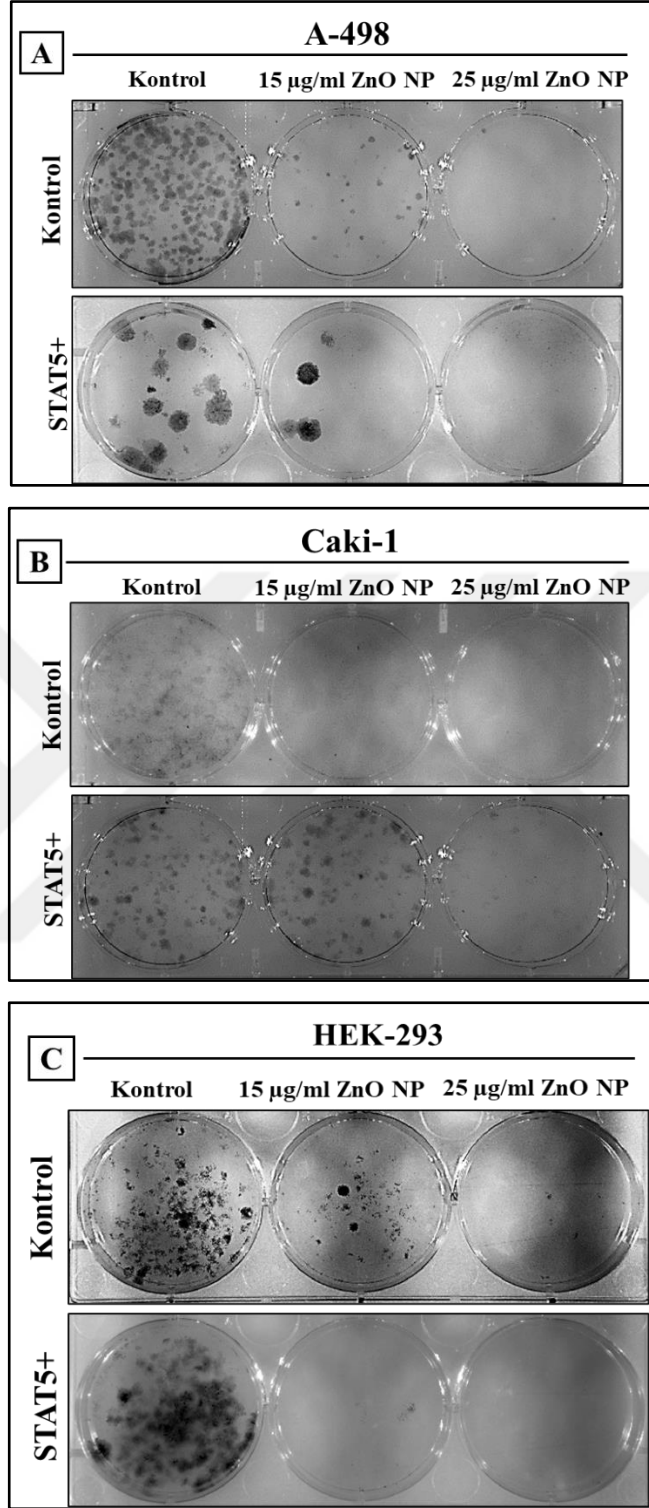
HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre döngüsü fazlarına etkisi incelendiğinde, anlamlı bir farkın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4. 13. HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre döngüsü faz dağılımı üzerine etkisinin analizi. 24 saat boyunca ZnO NP uygulamasını takiben kontrol ve STAT5+ hücreler analiz edilmiştir. PI ile boyanan hücreler akış sitometrisinde 10^4 hücre olacak şekilde analiz edilmiştir. Verilen şekiller en az üç bağımsız deneyin temsili görüntüsüdür. (n=3). Histogram analizinde hücre döngüsü fazları yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

4.2.3. ZnO NP, RCC Hücrelerinde Koloni Oluşum Kabiliyetini Azaltmaktadır

6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 2×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen RCC ve HEK-293 hücrelerine 24 saat boyunca 15 ve 25 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP uygulanmıştır. Yaklaşık 14 gün sonra hücreler kristal viyole ile boyanmış ve hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. Koloniler ışık mikroskobu ile incelenmiş ve hücrelerin koloni olarak değerlendirilebilmesi için 50 hücre sınır olarak belirlenmiştir. Bu deney ile birlikte ZnO NP'nin etkisinin yanı sıra STAT5 ifadesi arttığında koloni çapı ve sayısının nasıl etkilendiği incelenmiştir. Tüm hücre hatlarında her iki konsantrasyondaki ZnO NP uygulaması koloni oluşumunu baskılamıştır. RCC hücrelerinde STAT5 ifadesindeki artış koloni çaplarında artışa neden olmuştur. Konsantrasyona bağımlı olarak ZnO NP koloni oluşum potansiyelini A-498 hücrelerinde baskılamıştır. STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP nin uzun süreli etkisinin normal A-498 hücrelerine kıyasla daha fazla gözlenmiştir (Şekil 4.14-A). Caki-1 hücrelerinde STAT5 ifadesi koloni sayısında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Hücre sağkalım deneylerine istinaden, ZnO NP uzun süreli etkisi koloni sayılarının azalması olarak yorumlanmıştır. Özellikle 25 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP uygulaması normal Caki-1 hücre koloni oluşumunu kayda değer ölçüde baskılamıştır (Şekil 4.14-B). HEK-293 hücrelerinde STAT5 ifadesindeki artış koloni sayılarına ek olarak koloni çaplarının artışı ile sonuçlanmıştır. ZnO NP uygulamaları artan konsantrasyonlarda koloni oluşumu anlamlı ölçüde baskılamıştır (Şekil 4.14-C).



Şekil 4. 14. ZnO NP uygulamasının normal ve STAT5+ RCC ve HEK-293 hücrelerinde koloni oluşturma kabiliyeti üzerine etkisinin analizi. 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilen hücrelere 24 saat boyunca ZnO NP uygulaması gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 14 günlük inkübasyonun ardından hücreler kristal viyole ile boyanmıştır (A) A-498 ve STAT5+ A-498 (B) Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 (C) HEK-293 ve STAT5+ HEK-293.

4.2.4. ZnO NP Uygulaması Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP) Kaybına Neden Olmuştur

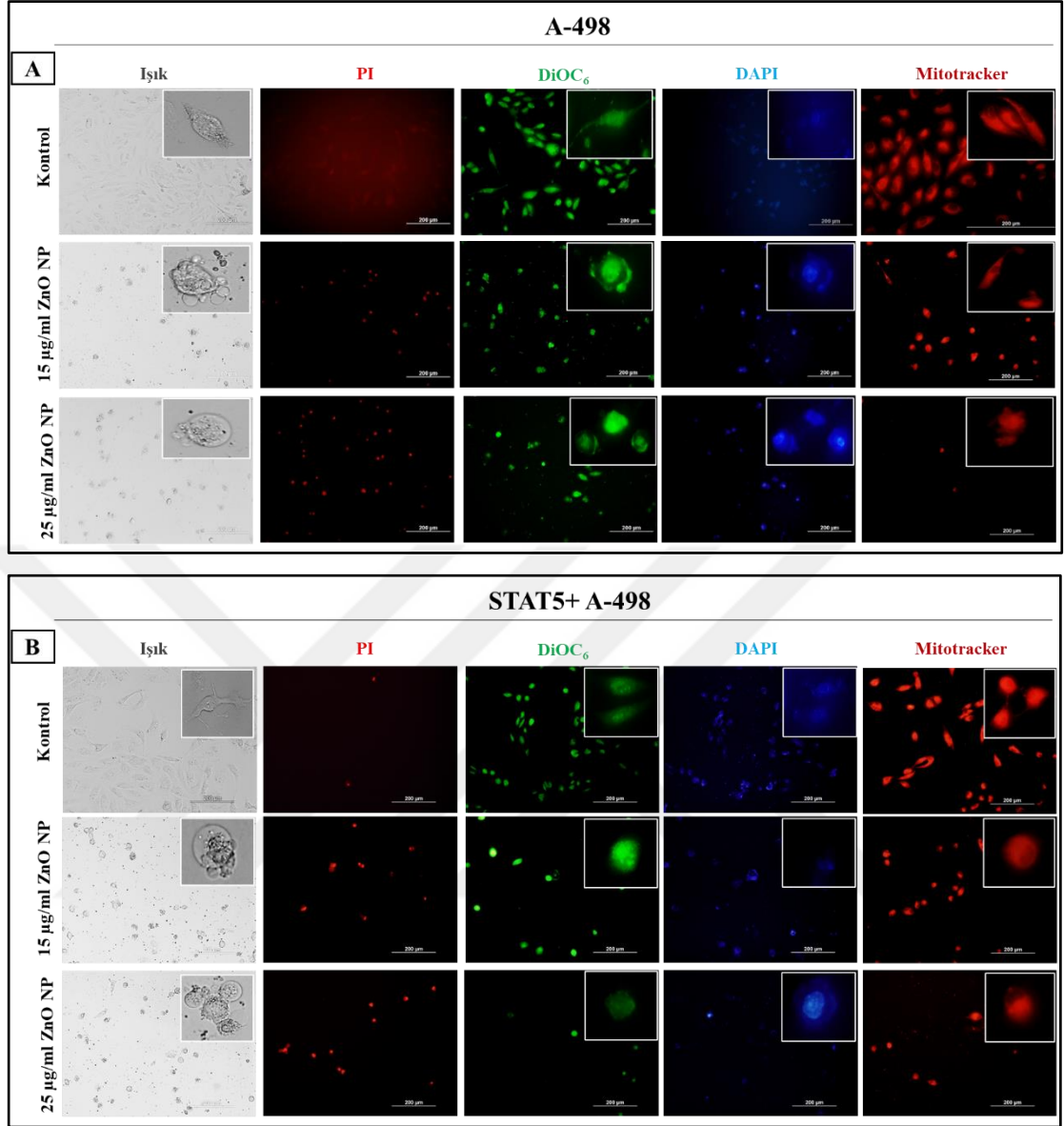
ZnO NP'nin MMP kaybı üzerindeki etkisini anlamak için hücreler 24 saat boyunca 15 ve 25 µg/ml ZnO NP'ye maruz bırakılmıştır. Ardından 15 dakika boyunca DiOC₆ ile boyanarak floresan mikroskopunda gözlemlenmiştir. Tüm hücre hatlarında ZnO NP uygulamaları MMP kaybına neden olmuştur. 25 µg/ml ZnO NP uygulaması 15 µg/ml ZnO NP'ye kıyasla MMP kaybında artışa sebep olmuştur. Ayrıca ZnO NP uygulamalarıyla hücrelerin morfolojik özelliklerini kaybettiği 40X görüntülerde daha ayrıntılı gösterilmiştir.

Kontrol grubu ve ZnO NP uygulanan hücreler Mitotracker® Red CMXRos ile boyanarak mitokondriyal fonksiyondaki değişim gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla ZnO NP uygulanan hücrelerde konsantrasyona bağımlı olarak mitokondriyal fonksiyon azalmıştır.

ZnO NP'nin hücre ölümüne etkisini görselleştirmek amacıyla PI boyama gerçekleştirilmiştir. ZnO NP uygulanan hücrelerde kırmızı renkli PI ışımada artış meydana gelmiş ve bu durum tüm hücre hatlarında konsantrasyona bağımlı olarak artmıştır.

Diğer bir taraftan ZnO NP uygulamasının DNA hasarı oluşumuna etkisini incelemek için DAPI boyaması gerçekleştirilmiştir. Uygulanan ZnO NP konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak DNA hasarı oluşumu artmıştır.

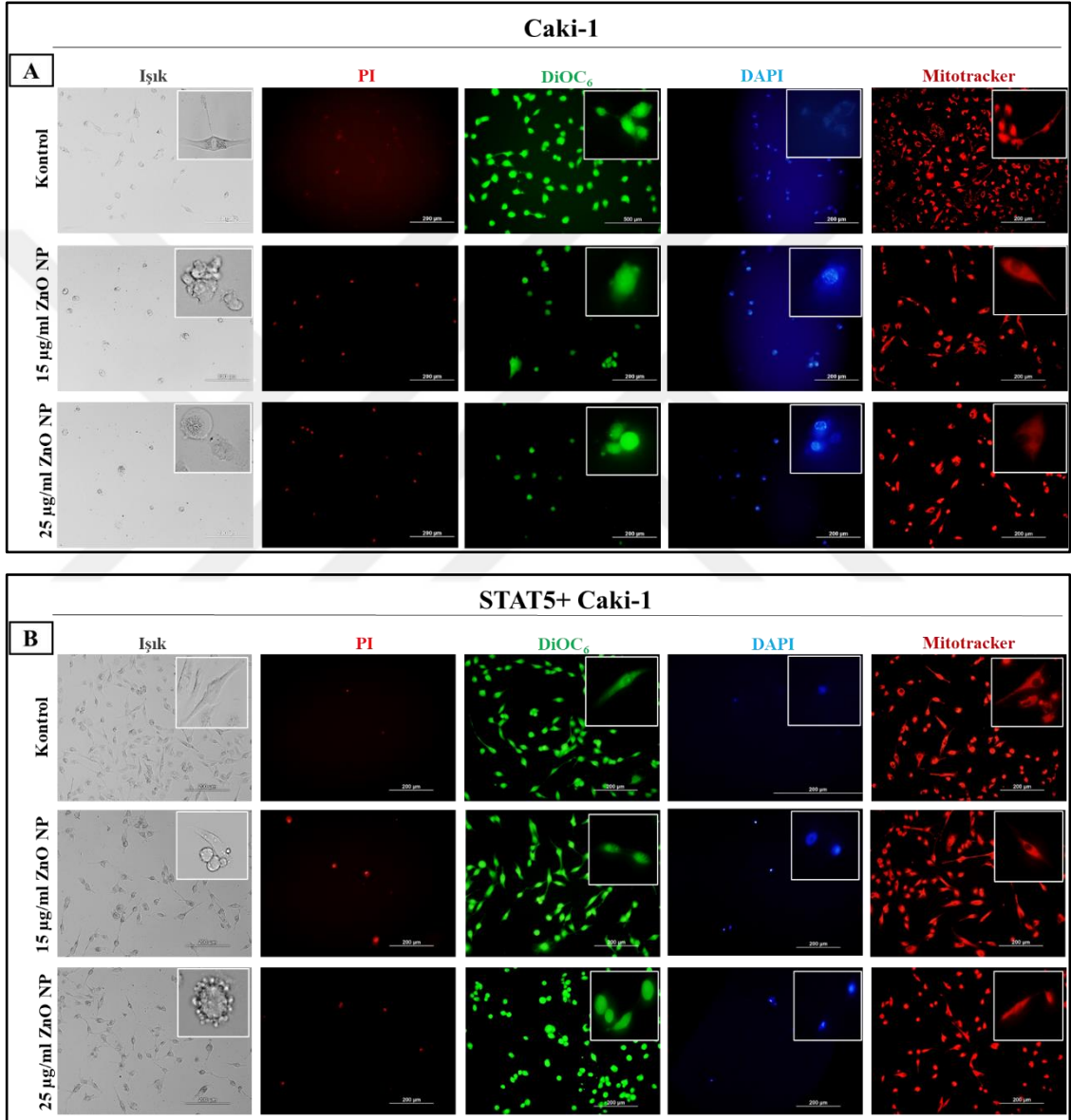
A-498 ve STAT5+ A-498 hücreleri karşılaştırıldığında 15 µg/ml ZnO NP uygulaması A-498 hücrelerinde STAT5+ grubuna kıyasla daha fazla MMP kaybına neden olmuştur. Bununla birlikte PI boyamaya göre STAT5+ hücreler, normal hücrelere kıyasla ZnO NP'ye daha dirençlidir. DNA hasarı açısından incelendiğinde 15 µg/ml ZnO NP uygulaması A-498 hücrelerinde DNA hasarına neden olarak DAPI ışımalarının artışına neden olmuştur. Bununla birlikte 25 µg/ml ZnO NP uygulaması DNA hasarını arttırmıştır. STAT5+ A-498 hücrelerinde ise A-498'e kıyasla DNA hasarına bağlı DAPI ışıması daha azdır. Ayrıca mitokondriyal fonksiyon incelendiğinde STAT5+ A-498 hücreleri A-498 hücre hattına kıyasla 15 µg/ml ZnO NP uygulamasına benzer bir yanıt oluşturmuştur. Bununla birlikte 25 µg/ml ZnO NP uygulaması A-498 hücrelerine kıyasla STAT5+ A-498 hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonda daha az azalmaya sebep olmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15. A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisi. (A) A-498 hücreleri (B) STAT5+ A-498 hücreleri. MMP kaybı DiOC₆ ve Mitotracker boyamaları ile belirlenmiştir (20X-40X). Ölü hücreleri göstermek için PI boyama yapılmıştır (20X). DNA fraksiyonları DAPI boyaması ile belirlenmiştir (20X-40X). Mitokondriyal fonksiyon Mitotracker® Red CMXRos ile belirlenmiştir (20X-40X). Verilen mikroskop görüntüleri en az üç tekrarlı deneylerin temsili görüntüleridir (n=3). Ölçek çubuğu: 200 µm.

Benzer şekilde Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde de 15 µg/ml ZnO NP uygulaması Caki-1 hücrelerinde STAT5+ grubuna kıyasla daha fazla MMP kaybına neden olmuştur. Ölü hücrelerin gösterilmesini amaçlayan PI boyama ile de normal Caki-1 hücrelerinin STAT5+ gruba kıyasla ZnO NP uygulamalarından daha fazla etkilendiği gösterilmiştir. ZnO NP uygulamalarıyla her iki grupta da DNA hasarı meydana gelmiş ancak normal Caki-1 hücreleri ZnO NP'ye daha duyarlı cevap

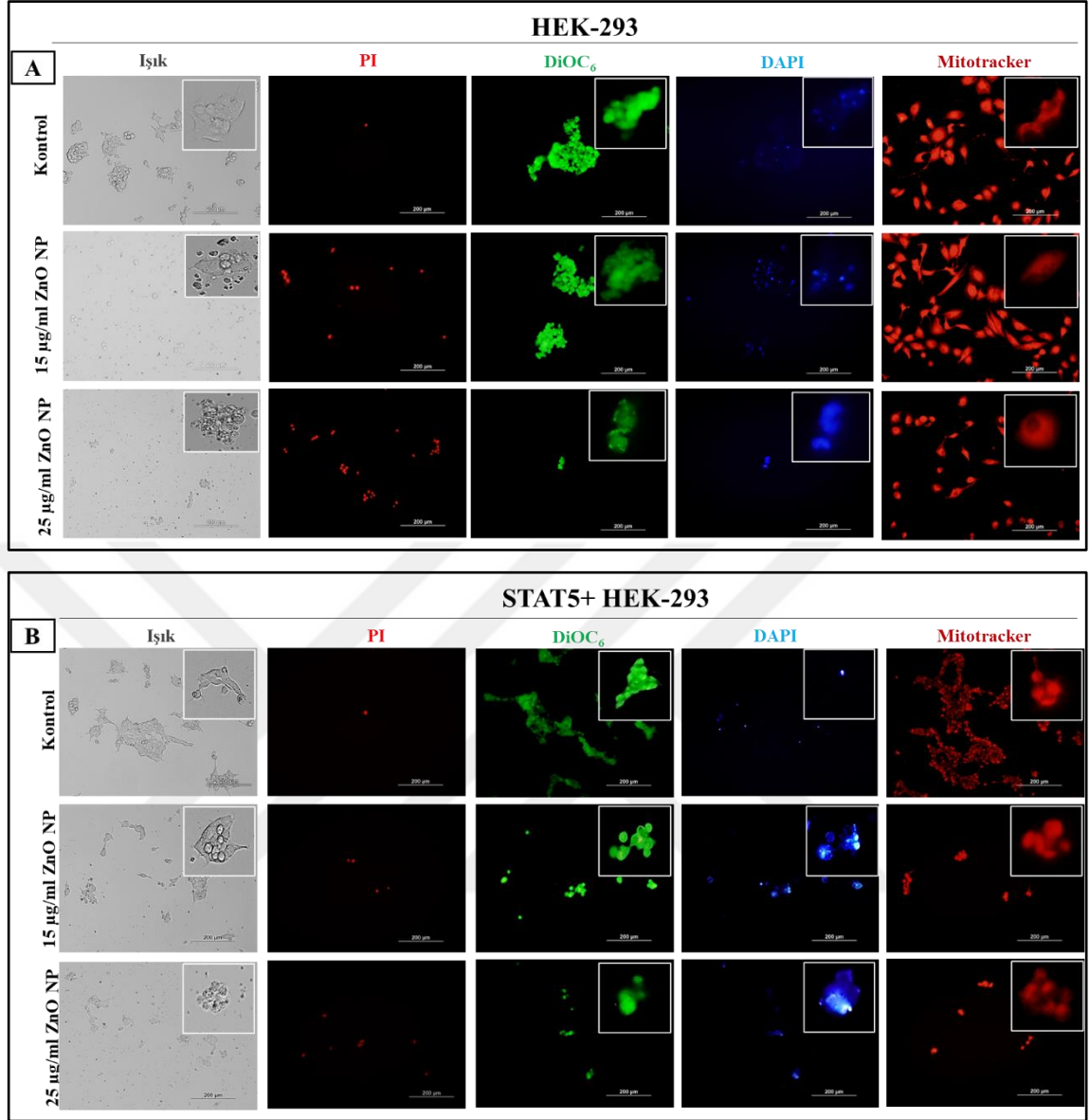
oluşturmuştur. Mitokondriyal fonksiyon açısından incelendiğinde ise 25 µg/ml ZnO NP uygulamasında dahi STAT5+ Caki-1 hücreleri mitokondriyal fonksiyon kaybına uğramamıştır. Diğer bir taraftan gerçekleştirilen ışık mikroskobu görüntülemelerinde her iki konsantrasyondaki ZnO NP uygulamasında da membran yapısı bozulmuş apoptotik hücreler gözlemlendiği gibi morfolojileri normal hücreler de belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4. 16. Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisi. (A) Caki-1 hücreleri (B) STAT5+ Caki-1 hücreleri. MMP kaybı DiOC₆ ve Mitotracker boyamaları ile belirlenmiştir (20X-40X). Ölü hücreleri göstermek için PI boyama yapılmıştır (20X). DNA fraksiyonları DAPI boyaması ile belirlenmiştir (20X-40X). Mitokondriyal fonksiyon Mitotracker® Red CMXRos ile belirlenmiştir (20X-40X). Verilen mikroskop görüntüleri en az üç tekrarlı deneylerin temsili görüntüleridir (n=3). Ölçek çubuğu: 200 µm.

RCC hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında A-498 ve STAT5+ A-498 hücreleri, Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücre hatlarından her iki konsantrasyondaki ZnO NP uygulamalarına karşı daha fazla duyarlılık göstermiştir.

HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücre hatlarında ise 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamaları ışık mikroskobu görüntülerinde gösterildiği gibi hücre morfolojilerinde değişime sebep olmuştur. STAT5+ HEK-293 hücreleri normal HEK-293 hücrelerine kıyasla 15 µg/ml ZnO NP uygulamasına daha dirençlidir. PI boyaması gerçekleştirildiğinde de benzer şekilde HEK-293 hücrelerinde PI ışıması STAT5+ HEK-293 hücrelerine göre daha fazladır. DiOC6 ile MMP ve DAPI ile DNA hasarı analiz edildiğinde HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücreleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenememiştir. Bununla birlikte ZnO NP uygulamalarıyla HEK-293 hücreleri STAT5+ hücrelere oranla mitokondriyal fonksiyon kaybına daha az uğramıştır (Şekil 4.17).

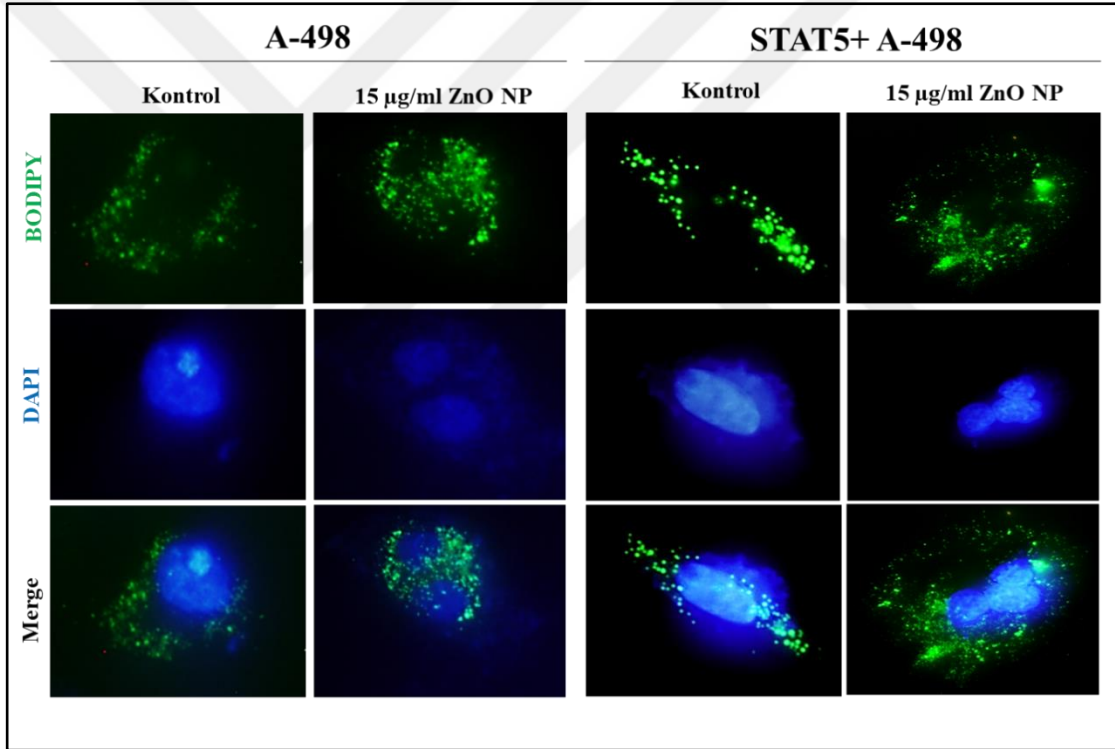


Şekil 4. 17. HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisi. (A) HEK-293 hücreleri (B) STAT5+ HEK-293 hücreleri. MMP kaybı DiOC₆ ve Mitotracker boyamaları ile belirlenmiştir (20X-40X). Ölü hücreleri göstermek için PI boyama yapılmıştır (20X). DNA fraksiyonları DAPI boyaması ile belirlenmiştir (20X-40X). Mitokondriyal fonksiyon Mitotracker® Red CMXRos ile belirlenmiştir (20X-40X). Verilen mikroskop görüntüleri en az üç tekrarlı deneylerin temsili görüntüleridir (n=3). Ölçek çubuğu: 200 µm.

4.3. ZnO NP'nin Yağ Asidi Metabolizmasının Üzerindeki Etkisinin Anlaşılması

4.3.1. STAT5 İfadesinin Artışı ve ZnO NP Uygulaması RCC Hücrelerinde Lipit Birikimini Modüle Etmiştir.

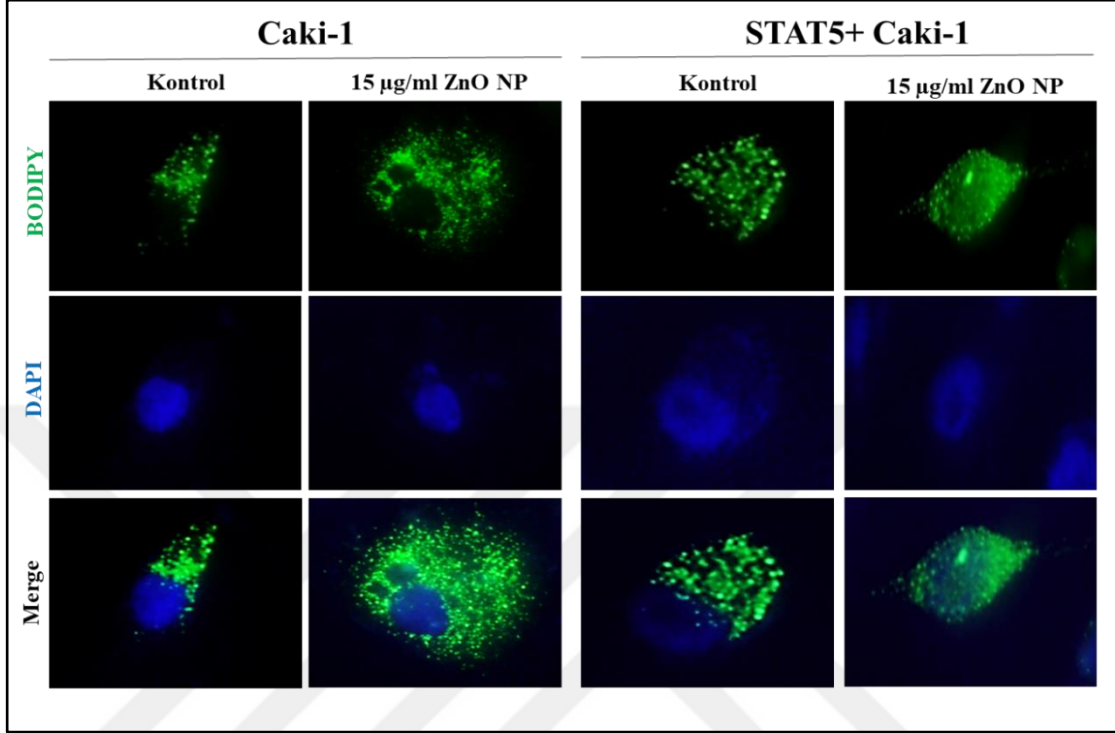
Nötral lipit damlacıklarının birikimi BODIPY boyama ile değerlendirilmiştir. A-498 hücrelerinde kontrol grubu ile 15 µg/ml ZnO NP uygulaması karşılaştırıldığında nötral lipit damlacıklarının boyutlarında anlamlı bir fark gözlemlenememiştir. STAT5+ A-498 hücrelerinde ise 15 µg/ml ZnO NP nötral lipit damlacıklarının boyutlarında azalmaya sebep olmuştur. A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinin kontrol grupları kıyaslandığında STAT5 ifadesindeki artışın hücre içi lipit birikiminde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4. 18. A-498 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin nötral lipit tanecikleri birikimi üzerine etkisi. 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 1×10^5 hücre ekilmiştir. 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmasının ardından nötral lipit taneciklerinin birikimini gözlemlemek için BODIPY boyaması yapılmıştır. Nukleuslar DAPI boyama ile gösterilmiştir. Görüntüler bağımsız iki deneyin temsili figürleridir. Büyütme 40X. Ölçek çubuğu 200 µm (n=2).

ZnO NP uygulamasıyla birlikte Caki-1 hücrelerinde nötral lipit taneciklerinin boyutlarında azalma meydana gelmiştir. Caki-1 kontrol ve STAT5+ Caki-1 kontrol grupları kıyaslandığında STAT5 ifadesindeki artış lipit taneciklerinin boyutlarında

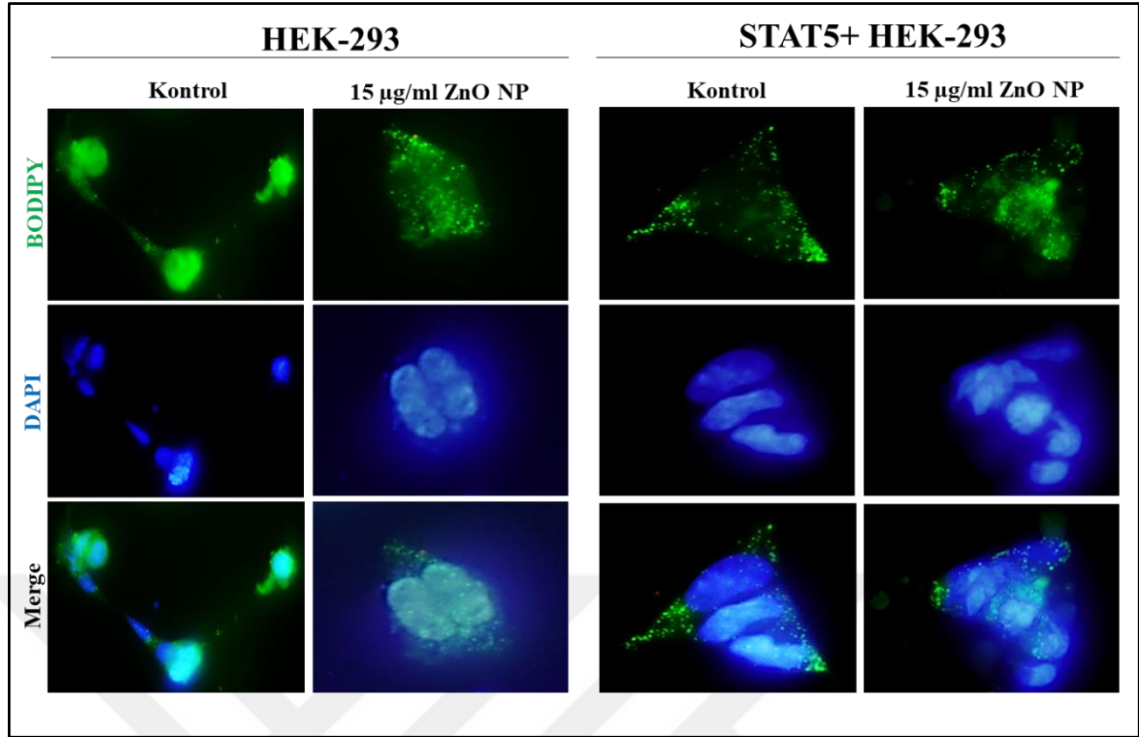
büyümeye sebep olmuştur. Bununla birlikte STAT5+ Caki-1 hücrelerine 15 µg/ml ZnO NP uygulanması nötral lipid taneciklerinin boyutlarında küçülmeye neden olmuştur (Şekil 4.19).



Şekil 4. 19. Caki-1 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin nötral lipid tanecikleri birikimi üzerine etkisi. 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 1×10^5 hücre ekilmiştir. 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmasının ardından nötral lipid taneciklerinin birikimini gözlemlemek için BODIPY boyaması yapılmıştır. Nukleuslar DAPI boyama ile gösterilmiştir. Görüntüler bağımsız iki deneyin temsili figürleridir. Büyütme 40X. Ölçek çubuğu 200 µm (n=2).

Her iki RCC hücresinde de STAT5+ ifadesindeki artış hücre içi nötral lipid taneciklerinin boyutlarında artışa sebep olmuştur. Bununla birlikte her iki hücre hattında da 24 saatlik 15 µg/ml ZnO NP uygulaması lipid birikiminde azalmayla sonuçlanmıştır.

HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise 15 µg/ml ZnO NP uygulaması lipid damlacıklarının birikiminde anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. Ancak normal ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinin kontrol gruplarına kıyaslandığında STAT5 ifadesindeki artış lipid damlacıklarının boyutlarında artışa neden olmuştur (Şekil 4.20).

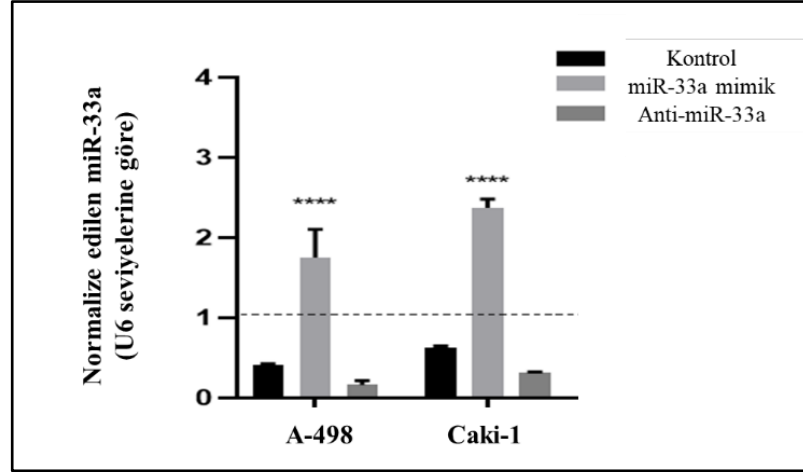


Şekil 4. 20. HEK-293 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin nötral lipit tanecikleri birikimi üzerine etkisi. 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 1×10^5 hücre ekilmiştir. 24 saat boyunca 15 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP uygulanmasının ardından nötral lipit taneciklerinin birikimini gözlemlemek için BODIPY boyaması yapılmıştır. Nukleuslar DAPI boyama ile gösterilmiştir. Görüntüler bağımsız iki deneyin temsili figürleridir. Büyütme 40X. Ölçek çubuğu 200 μm (n=2).

4.3.2. RCC Hücrelerinde miR-33a'nın Hücre İçi Ekspresyon Seviyelerinin Tespiti

RCC hücrelerinde yağ asit metabolizmasını miR-33a aracılı olarak incelemek amaçlandığından hücrelere mimik ve anti mimik miR-33a uygulamaları gerçekleştirilmiş ve 24 saatlik transfeksiyon süresinin ardından miRNA izolasyonları sağlanmıştır. Bunu takiben izole edilen miRNA'lardan cDNA eldesi sağlanmış ve qRT-PCR ile analiz sağlanmıştır. Tüm sonuçlar RNU6 seviyelerine göre normalize edilmiştir.

A-498 hücrelerinde hücre içi miR-33a ifadesi Caki-1 hücrelerine oranla daha azdır. miR-33a mimik uygulamasıyla birlikte her iki hücre hattında da miR-33a ifadesinde kontrole oranla anlamlı bir artış gerçekleştiği gösterilmiştir. Bununla birlikte hem gerçekleştirilen transfeksiyon işleminin başarısını doğrulamak hem de miR-33a mimik uygulamasının kontrolünü sağlamak amacıyla uygulanan anti-miR-33a ile birlikte her iki RCC hücre hattında da kontrole ve miR-33a mimik transfeksiyonuna oranla miR-33a ifadesi azalmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4. 21. RCC hücrelerinde miR-33a ifadelerinin tespiti. Hücrelere miR-33a ve anti-miR-33a transfeksiyonları 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Ardından miRNA izolasyonları ve cDNA eldesi sağlanmıştır. miR-33a'nın ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Her hücre hattı için sonuçlar RNU6'ya göre normalize edilerek sunulmuştur. Grafik Ortalama $\pm$ Std.Sapma'yı göstermektedir. İstatistiksel analiz için Tukey's multiple comparisons test uygulanmıştır.

****p<0,0001.

4.3.3. ZnO NP, Yağ Asidi Sentaz Metabolizmasının Düzenlenmesi Üzerinde Çeşitli Etkilere Neden Olmuştur

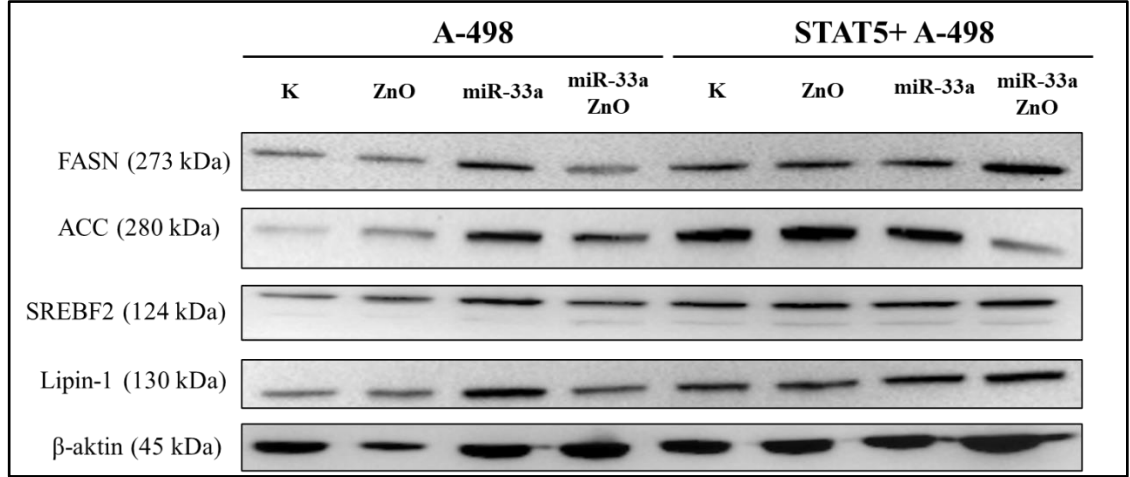
ZnO NP'nin yağ asit metabolizması etkisi miR-33a aracılı olarak tüm hücre hatlarında incelenmiştir. Normal ve STAT5+ hücrelerde bir grubuna 15 μ g/ml ZnO NP uygulaması gerçekleştirilirken diğer grubuna miR-33a mimik transfeksiyonu lipofektamin aracılı transfeksiyon ajanı ile gerçekleştirilmiştir. Bir gruba ise miR-33a ve ZnO NP uygulamaları birlikte uygulanmıştır. Daha sonra uygulamaların gerçekleştirildiği hücrelerden protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 μ g protein lizatu %10 SDS-PAGE jele yüklenmiştir. Ardından proteinler yağ asit metabolizmasında görevli FASN, ACC, Lipin-1 ve SREBF2 antikorları ile problanarak ifadeleri tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar β -aktine göre normalize edilerek sunulmuştur.

A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde tek başına ZnO NP uygulaması kontrole oranla ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerinde artışa sebep olmuştur. miR-33a uygulaması ise tek başına FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerini kontrole oranla arttırmıştır. Bununla birlikte miR-33a ve ZnO NP'nin birlikte uygulanması ifadesi araştırılan tüm proteinlerde tek başına miR-33a uygulamasına kıyasla azalmaya sebep olmuştur.

A-498 ve STAT5+ A-498 hücre hatlarının kontrol grupları karşılaştırıldığında STAT5 ifadesindeki artışın incelenen tüm protein ifadelerinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. STAT5+ A-498 hücrelerine tek başına ZnO NP uygulaması, normal A-498 hücrelerine ZnO NP uygulamasına kıyasla FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerinde artışa sebep olmuştur.

Tek başına miR-33a mimik uygulaması STAT5+ A-498 hücrelerinde kontrole oranla FASN ifadesinde anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. Tek başına miR-33a mimik uygulamasıyla ACC ifadesi STAT5+ hücrelerde kontrole oranla anlamlı bir değişime sebep olmazken, normal A-498 miR-33a mimik edilmiş hücelere kıyasla artış göstermiştir. SREBF2 ifadesi açısından karşılaştırıldığında tek başına miR-33a uygulaması STAT5+ A-498 hücrelerinde kontrole ve normal A-498 hücrelerine oranla anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Lipin-1 ifadesi ise STAT5+ A-498 hücrelerine miR-33a mimik transfeksiyonu ile kontrole kıyasla artış gösterirken, normal A-498 hücrelerine göre ifadesi azalmıştır.

miR-33a ve ZnO NP uygulamaları birlikte gerçekleştirildiğinde ise STAT5+ A-498 hücrelerinde kontrole kıyasla FASN, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerinde artış, ACC ifadesinde ise azalma gözlemlenmiştir. Bununla birlikte miR-33a ve ZnO NP'nin birlikte uygulanması, STAT5+ A-498 hücrelerinde normal A-498 hücrelerine kıyasla FASN, SREBF2 ve Lipin-1 ekspresyonlarında artışa neden olurken ACC ifadesinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4. 22. ZnO NP'nin yağ asit sentezi ile ilgili enzimlerin ekspresyonlarına etkisi. A-498 ve STAT5+ A-498 hücre hatlarına 5 nM miR-33a mimik uygulaması lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı ile 1:3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oranında 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücelere 24 saat boyunca 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 μg 'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 antikorları ile problanmıştır. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

Caki-1 hücrelerinde ise 24 saatlik ZnO NP uygulaması ile FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ekspresyonları kontrole oranla artmıştır.

Tek başına miR-33a mimik transfeksiyonu, Caki-1 hücre hattında kontrol grubuna oranla FASN ve Lipin-1 ekspresyonlarında artışa, ACC ekspresyonunda ise azalmaya sebep olmuştur. SREBF2 ifadesinde ise kontrole oranla anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

miR-33a ve ZnO NP birlikte uygulandığında ise kontrol grubuna oranla FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ekspresyonlarında artış meydana gelmiştir. Tek başına miR-33a uygulamasına göre miR-33a+ZnO NP uygulaması FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerini arttırmıştır. Tek başına ZnO NP uygulamasına göre ise FASN ve SREBF2 ifadeleri artarken Lipin-1 ekspresyonu azalmıştır.

Diğer bir taraftan STAT5+ hücrelerinde ZnO NP uygulamaları kontrole oranla Lipin-1 ekspresyonunun azalmasına sebep olurken incelenen diğer yağ asit metabolizması proteinlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir değişime sebep olmamıştır.

STAT5+ Caki-1 hücrelerine tek başına miR-33a uygulamasıyla kontrole oranla ACC ve SREBF2 ifadelerinin artmasını sağlarken, Lipin-1 ifadesinde azalmaya neden olmuştur. Normal Caki-1 hücreleriyle kıyaslandığında STAT5+ Caki-1 hücrelerinde

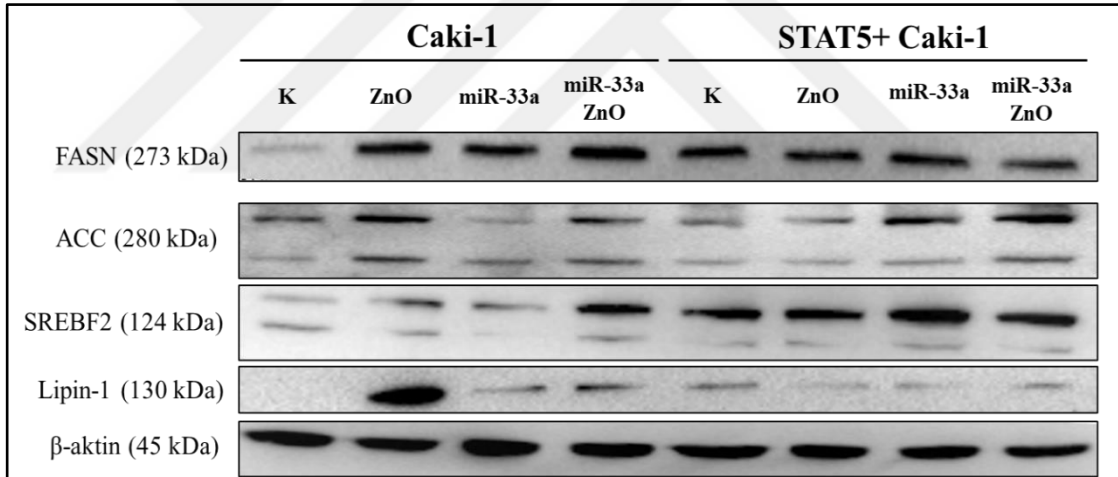
tek başına miR-33a mimik transfeksiyonuyla ACC ve SREBF2 ekspresyonları artmış, Lipin-1 ifadesi azalmıştır.

Tek başına miR-33a mimik uygulamasına kıyasla miR-33a ve ZnO NP bir arada uygulandığında STAT5+ Caki-1 hücrelerinde kontrol grubuna oranla FASN ve Lipin-1 ekspresyonları azalırken, ACC ifadesi artış göstermiştir.

Tek başına ZnO NP uygulamasına oranla miR-33a+ZnO NP uygulaması STAT5+ Caki-1 hücrelerinde FASN ifadesinin azalmasına ve ACC ekspresyonunun artmasına sebep olmuştur.

miR-33a ve ZnO NP'nin bir arada uygulanması STAT5 ifadesinin artışıyla birlikte normal Caki-1 hücrelerine kıyasla FASN ve Lipin-1 ifadelerinin daha az olmasına, ACC ve SREBF2'nin ise ekspresyonlarının artmasına neden olmuştur.

Ayrıca Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinin kontrol grupları kendi aralarında kıyaslandığında STAT5+ Caki-1 hücrelerinde SREBF2, FASN ve Lipin-1 ifadeleri artış göstermiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4. 23. ZnO NP'nin yağ asit sentezi ile ilgili enzimlerin ekspresyonlarına etkisi. Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücre hatlarına 5 nM miR-33a mimik uygulaması lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı ile 1:3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oranında 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücrelere 24 saat boyunca 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 μg 'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 antikorumları ile problanmıştır. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

HEK-293 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla ZnO NP uygulamasıyla birlikte ACC ekspresyonu artış göstermiştir. Diğer yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili protein ifadelerinde kontrole göre anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

Tek başına miR-33a uygulaması ele alındığında kontrole oranla SREBF2 ve Lipin-1 ekspresyonu azalmıştır.

miR-33a ve ZnO NP uygulamaları birlikte gerçekleştirildiğinde kontrole oranla FASN ekspresyonu azalırken, ACC ve SREBF2 ekspresyonlarında artış meydana gelmiştir. Tek başına miR-33a mimik uygulamasıyla karşılaştırıldığında miR-33a+ZnO NP uygulaması ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ekspresyonlarının artmasına neden olmuştur. Tek başına ZnO NP uygulamasıyla karşılaştırıldığında ise miR-33a ve ZnO NP'nin birlikte uygulanması FASN ve SREBF2 ekspresyonlarında azalmaya sebep olmuştur. STAT5+ HEK-293 hücreleri ele alındığında kontrol grubuna oranla ZnO NP'ye maruz bırakılan hücrelerde FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerinde artış meydana gelmiştir.

STAT5+ HEK-293 hücrelerine miR-33a mimik transfeksiyonu gerçekleştirilmesi kontrole oranla ACC protein seviyelerinde azalmaya neden olmuştur. miR-33a ve ZnO NP'nin bir arada kullanılması ise STAT5+ HEK-293 hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla FASN ve SREBF2 ekspresyonlarında artış meydana getirmiştir. Diğer bir taraftan ACC ve Lipin-1 ifadeleri azalmıştır.

STAT5+ HEK-293 hücrelerinde miR-33a+ZnO NP uygulaması, miR-33a'nın tek başına mimik edilmesine oranla FASN ve SREBF2 seviyelerinde artışa neden olmuştur. Ayrıca tek başına ZnO NP uygulaması STAT5+ grupta miR-33a+ZnO NP uygulamasına kıyasla ACC ifadesinde artış meydana getirmiştir. SREBF2 ifadesi ise ZnO NP uygulamasıyla karşılaştırıldığında miR-33a+ZnO NP uygulanan grupta artış göstermiştir.

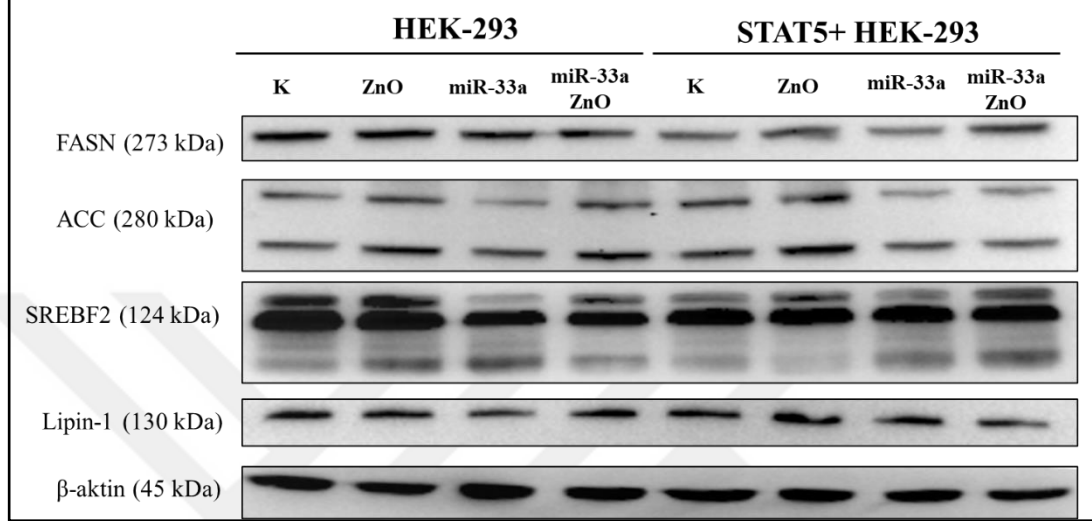
STAT5+ HEK-293 ve normal HEK-293 hücrelerinin kontrol grupları karşılaştırıldığında STAT5 ifadesindeki artışla birlikte FASN ve SREBF2 ifadeleri azalırken ACC ifadesi artmıştır.

ZnO NP uygulaması STAT5+ hücrelerde normal HEK-293 hücre hattına kıyasla FASN ve SREBF2 ekspresyonlarında azalışa neden olurken, ACC ve Lipin-1 ifadeleri artış göstermiştir.

Bununla birlikte miR-33a mimik uygulaması STAT5+ HEK-293 hücrelerinde normal hücrelere kıyasla FASN ekspresyonunda azalmaya ve SREBF2'de artışa neden olmuştur.

miR-33a mimik ve ZnO NP uygulamalarının birlikte gerçekleştirilmesi STAT5+ HEK-293 hücrelerinde normal hücrelere kıyasla ACC ve Lipin-1 ifadesini azaltırken, SREBF2 ifadesini arttırmıştır (Şekil 4.24).

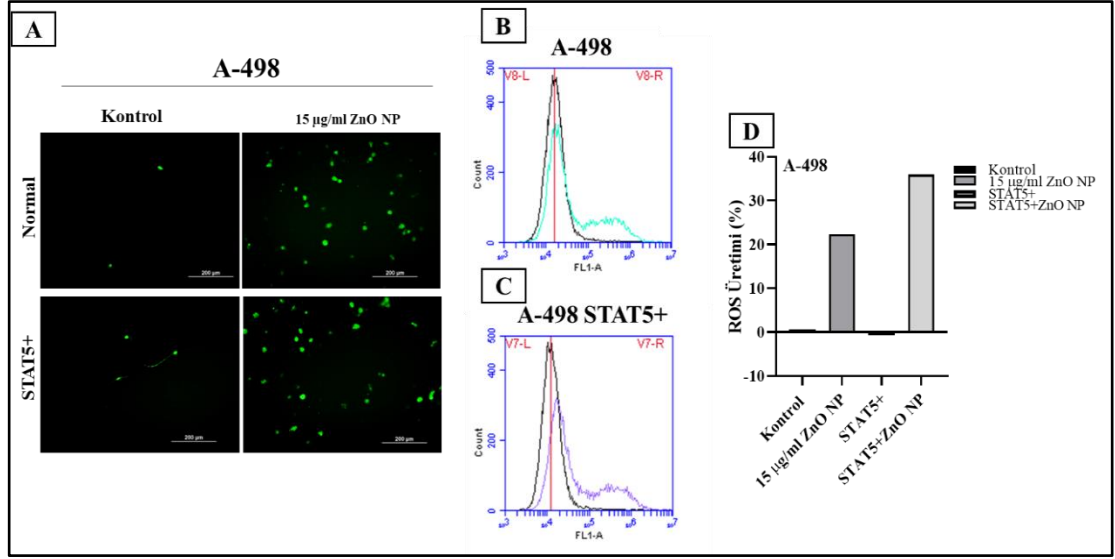
RCC hücrelerinde STAT5 ifadesindeki artış FASN, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerini arttırırken, HEK-293 hücre hattında azalmaya neden olmuştur.



Şekil 4. 24. ZnO NP'nin yağ asit sentezi ile ilgili enzimlerin ekspresyonlarına etkisi. HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücre hatlarına 5 nM miR-33a mimik uygulaması lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı ile 1:3 (µg/µl) oranında 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücrelere 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 µg'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 antikorumları ile problanmıştır. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

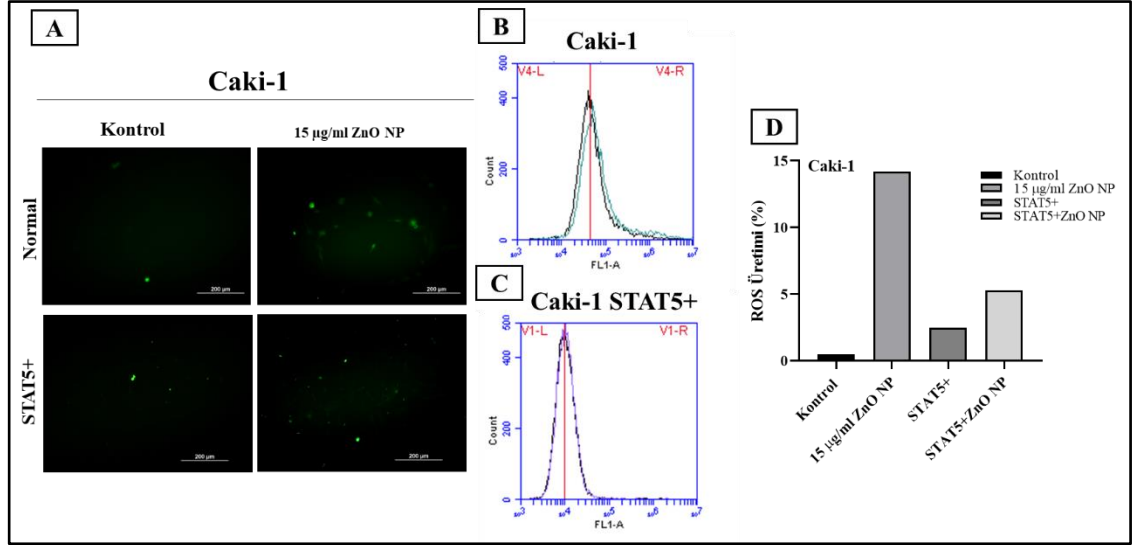
4.4. ZnO NP Uygulaması RCC Hücrelerinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Oluşumunu İndüklemiştir

Hücre ölümü ile ilişkili olan ROS üretimi, 15 µg/ml ZnO NP uygulamasını takiben DCFH-DA boyaması ile belirlenmiştir. Kontrole oranla artan yeşil ışımaya oranı, ZnO NP'nin A-498 hücrelerinde ROS oluşumunda artışa sebep olduğunu göstermiştir (Şekil 4.25). STAT5+ A-498 hücrelerinde hem normal A-498 hücrelerine hem de STAT5+ kontrole oranla 15 µg/ml ZnO NP uygulaması ROS üretimini daha fazla indüklemiştir (Şekil 4.25).



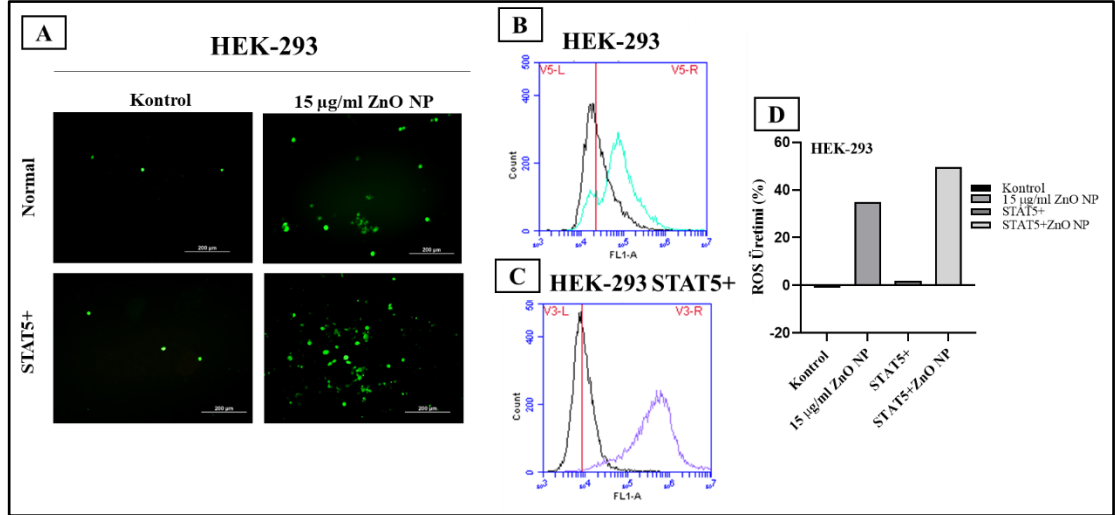
Şekil 4. 25. A-498 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin ROS üretimi üzerine etkisi. 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmasının ardından ROS birikimini gözlemlemek için 15 dakika boyunca DCFH-DA boyaması yapılmış ve floresan görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Ardından hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve akış sitometrisiyle 104 hücre analiz edilmiştir. (A) Floresan mikroskop görüntüleri. Görüntüler bağımsız iki deneyin temsili figürleridir. Büyütme 20X. Ölçek çubuğu 200 µm (B-C) Akış sitometrisi analizleri. Siyah renkli grafikler ZnO NP uygulanmamış gruplardır. (D) ROS üretimlerinin yüzde (%) olarak histogram grafikte gösterilmesi. (n=2).

Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde 15 µg/ml ZnO NP uygulamasıyla ROS üretiminde artış meydana gelmiştir. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde normal Caki-1 hücrelere kıyasla 15 µg/ml ZnO NP ROS oluşumuna daha az katkıda bulunmuştur (Şekil 4.26). Diğer bir taraftan RCC hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında 15 µg/ml ZnO NP uygulaması A-498 hücrelerinde daha fazla ROS oluşumuna sebep olurken, STAT5+ A-498 hücrelerinde STAT5+ Caki-1 hücrelerine kıyasla ZnO NP ROS oluşumunu daha yüksek derecede indüklemiştir.



Şekil 4. 26. Caki-1 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin ROS üretimi üzerine etkisi. 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmasının ardından ROS birikimini gözlemlemek için 15 dakika boyunca DCFH-DA boyaması yapılmış ve floresan görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Ardından hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve akış sitometrisiyle 104 hücre analiz edilmiştir. (A) Floresan mikroskop görüntüleri. Görüntüler bağımsız iki deneyin temsili figürleridir. Büyütme 20X. Ölçek çubuğu 200 µm (B-C) Akış sitometrisi analizleri. Siyah renkli grafikler ZnO NP uygulanmamış gruplardır. (D) ROS üretimlerinin yüzde (%) olarak histogram grafikte gösterilmesi. (n=2).

HEK-293 hücre hattında 24 saatlik 15 µg/ml ZnO NP uygulaması ROS oluşumuna sebep olmuştur. STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise ZnO NP'ye maruz bırakılan hücreler, STAT5 + kontrole kıyasla daha fazla ROS üretimi gerçekleştirmiştir ve bu durum STAT5+ A-498 ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.27).



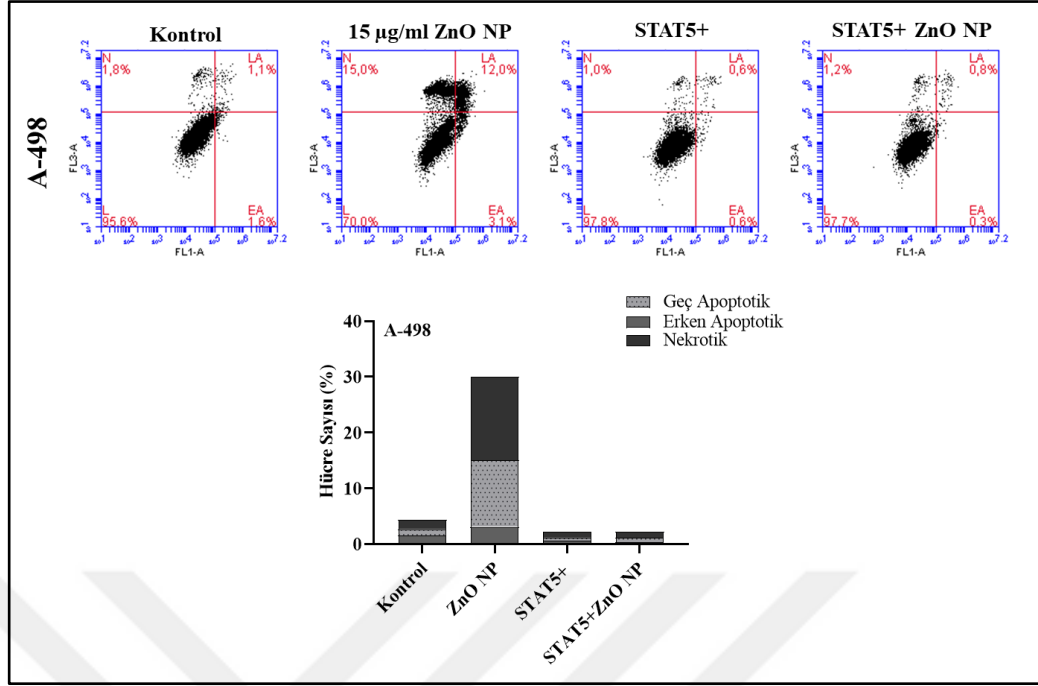
Şekil 4. 27. HEK-293 hücre hattında STAT5 modülasyonu ve ZnO NP'nin ROS üretimi üzerine etkisi. 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmasının ardından ROS birikimini gözlemlemek için 15 dakika boyunca DCFH-DA boyaması yapılmış ve floresan görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Ardından hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve akış sitometrisiyle 104 hücre analiz edilmiştir. (A) Floresan mikroskop görüntüleri. Görüntüler bağımsız iki deneyin temsili figürleridir. Büyütme 20X. Ölçek çubuğu 200 µm (B-C) Akış sitometrisi analizleri. Siyah renkli grafikler ZnO NP uygulanmamış gruplardır. (D) ROS üretimlerinin yüzde (%) olarak histogram grafikte gösterilmesi. (n=2).

4.5. ZnO NP Uygulamasının RCC Hücrelerine Apoptotik Etkisinin Araştırılması

4.5.1. Annexin V/PI Boyama ile Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi

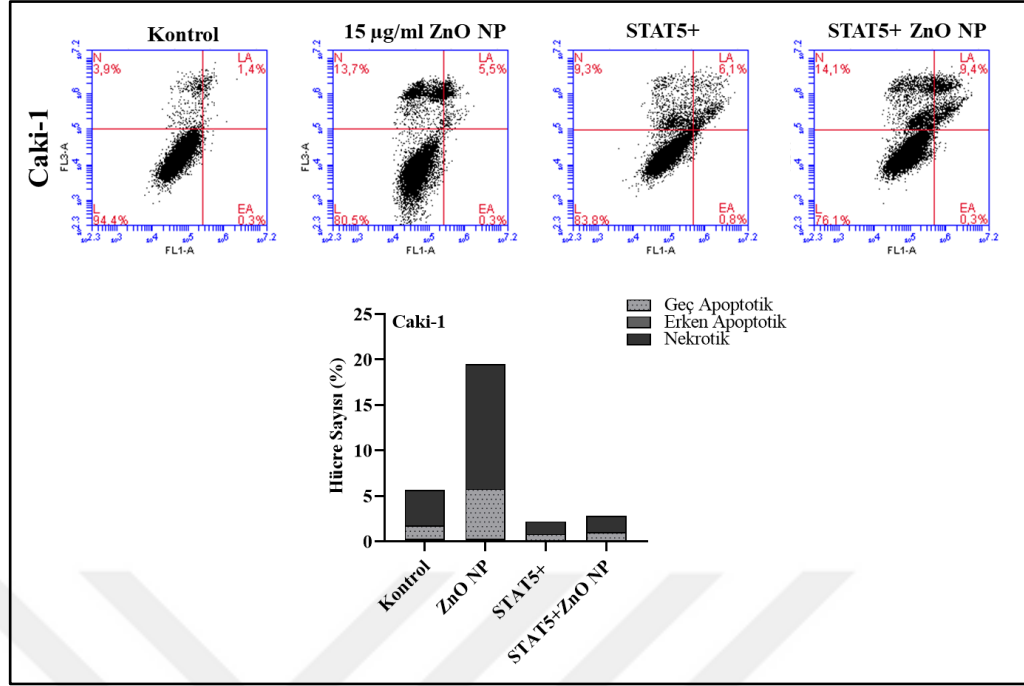
ZnO NP'nin apoptoz üzerindeki etkisini gözlemlemek için Annexin V/PI boyaması gerçekleştirilmiştir. RCC ve HEK-293 hücrelerine 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmış ve daha sonra hücreler boyanarak 10^4 hücre kuadrant grafik ile analiz edilmiştir. Grafikte sol üst kadrant nekrotik hücreleri, sağ üst ve alt kadrantlar sırasıyla geç ve erken apoptotik hücreleri göstermektedir. Sol alt kadranda ise canlı hücreler yer almaktadır.

24 saatlik ZnO NP uygulamasının ardından A-498 hücrelerinde hücre popülasyonunun %3,1'i erken apoptotikken, %12'si geç apoptotik durumdadır. Nekrotik hücreler ise %15 oranında saptanmıştır. STAT5+ A-498 hücrelerde ise ZnO NP uygulamasıyla hücre popülasyonunun %0,8'i geç apoptotik, %0,3'ü erken apoptotik ve %1,2'si nekrotik durumdadır (Şekil 4.28).



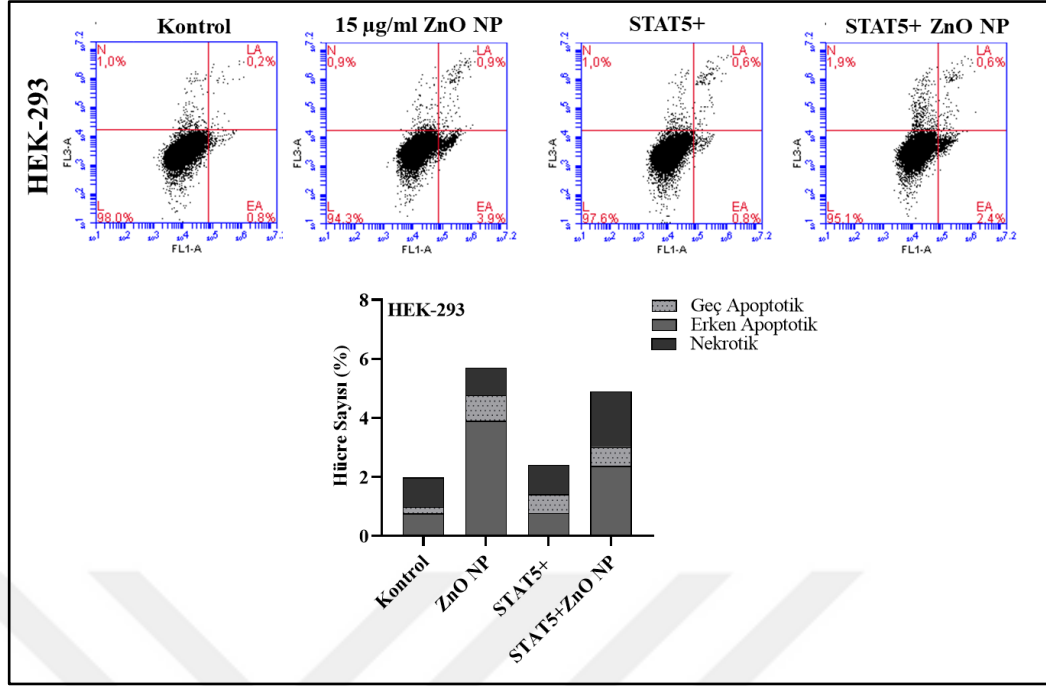
Şekil 4. 28. A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisinin analizi. 24 saat boyunca ZnO NP uygulamasını takiben kontrol ve STAT5+ hücreler Annexin V-PI boyaması gerçekleştirilmiş ve akış sitometrisinde 104 hücre olacak şekilde analiz edilmiştir. Histogram analizinde hücre ölüm oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir (n=3).

24 saatlik ZnO NP uygulamasının ardından Caki-1 hücrelerinde hücre popülasyonunun %0,3'ü erken apoptotikken, %5,5'i geç apoptotik durumdadır. Nekrotik hücreler ise %13,7 oranında saptanmıştır. STAT5+ Caki-1 hücrelerde ise ZnO NP uygulamasıyla hücre popülasyonunun %9,4'ü geç apoptotik, %0,3'ü erken apoptotik ve %14,1'i nekrotik durumdadır (Şekil 4.29).



Şekil 4. 29. Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisinin analizi. 24 saat boyunca ZnO NP uygulamasını takiben kontrol ve STAT5+ hücreler Annexin V-PI boyaması gerçekleştirilmiş ve akış sitometrisinde 104 hücre olacak şekilde analiz edilmiştir. Histogram analizinde hücre ölüm oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir (n=3).

24 saatlik ZnO NP uygulamasının ardından HEK-293 hücrelerinde hücre popülasyonunun %3,9'u erken apoptotikken, %0,9'u geç apoptotik durumdadır. Nekrotik hücreler ise %0,9 oranında saptanmıştır. STAT5+ HEK-293 hücrelerde ise ZnO NP uygulamasıyla hücre popülasyonunun %0,6'sı geç apoptotik, %2,4'ü erken apoptotik ve %1,9'u nekrotik durumdadır. HEK-293 hücreleri ile STAT5+ HEK-293 hücreleri kıyaslandığında uygulanan ZnO NP'ye karşı STAT5+ hücrelerin daha dirençli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.30).

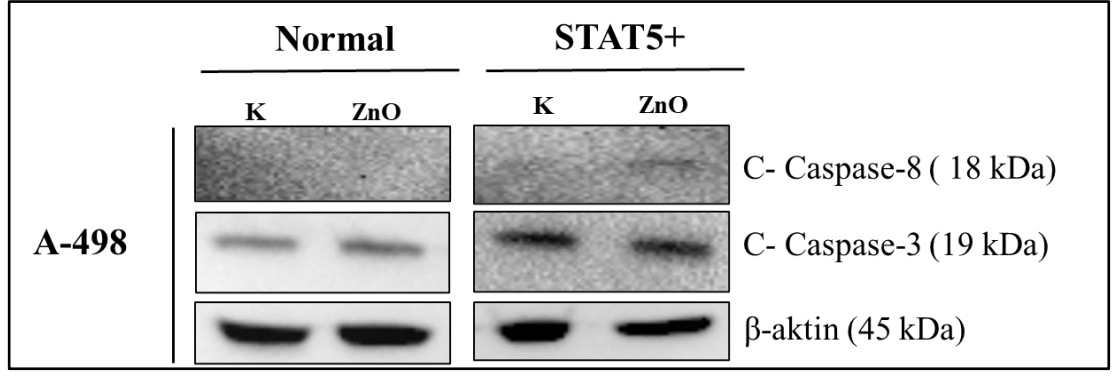


Şekil 4. 30. HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisinin analizi. 24 saat boyunca ZnO NP uygulamasını takiben kontrol ve STAT5+ hücreler Annexin V-PI boyaması gerçekleştirilmiş ve akış sitometrisinde 104 hücre olacak şekilde analiz edilmiştir. Histogram analizinde hücre ölüm oranı yüzde (%) olarak belirlenmiştir (n=3).

4.5.2. ZnO NP Uygulamasının Apoptotik Protein İfadelerine Etkisi

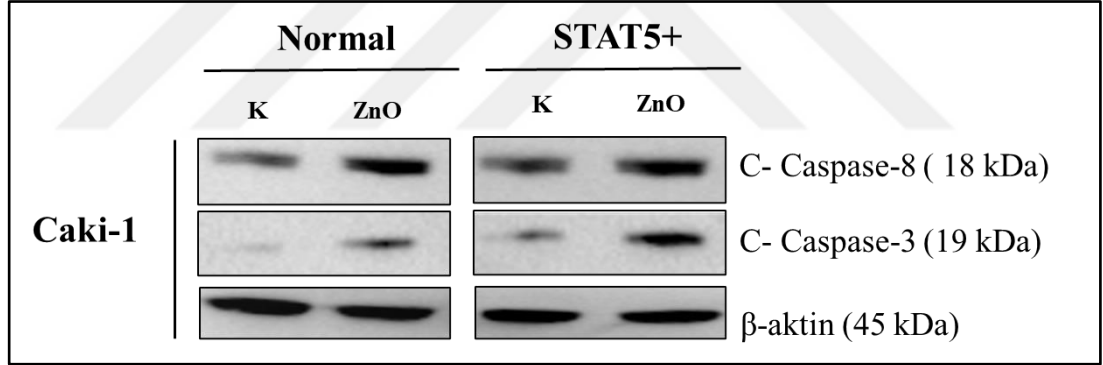
ZnO NP'nin apoptotik proteinler üzerindeki etkisini immünoiblotlama aracılığıyla incelenmiştir. Tüm normal ve STAT5+ hücre hatlarına 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmış ve daha sonra protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından SDS-PAGE jele yüklenen 30 µg'lık protein örnekleri kesilmiş kaspaz-8 ve kesilmiş kaspaz-3 antikorları ile problanarak ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

A-498 hücrelerine ZnO NP uygulaması kesilmiş kaspaz ifadesinde kontrole göre anlamlı bir değişime neden olmazken, kesilmiş kaspaz 3 ifadesi kontrole oranla artış göstermiştir. STAT5+ A-498 hücrelerinde ise kaspaz 3 ve kaspaz 8'in kesilmiş formlarının ekspresyonlarında kontrole oranla anlamlı bir değişim meydana gelmemiştir (Şekil 4.31).



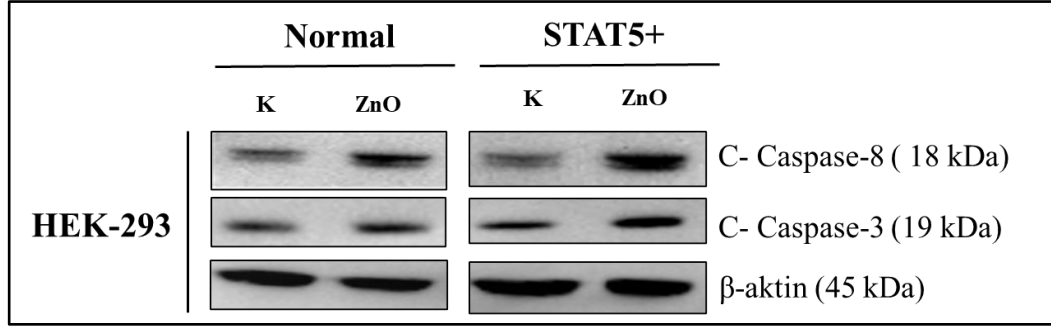
Şekil 4. 31. ZnO NP'nin apoptotik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi. A-498 ve STAT5+ A-498 hücre hatlarına 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 µg'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve C-Caspase-3 ve C-Caspase-8 antikorları ile problanmıştır. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulamasıyla kesilmiş kaspaz 3 ve kesilmiş kaspaz 8 ifadelerinde kontrole oranla anlamlı bir artış meydana gelmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4. 32. ZnO NP'nin apoptotik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi. Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücre hatlarına 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 µg'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülerek C-Caspase-3 ve C-Caspase-8 antikorları ile problanmıştır. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

HEK-293 hücrelerinde kontrole oranla ZnO NP uygulaması kesilmiş kaspaz 8 ifadesinde kontrole oranla artış meydana getirmiştir. Kesilmiş kaspaz 3 ifadesinde ise ZnO NP uygulamasıyla kontrole oranla anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise ZnO NP uygulaması kontrole oranla kesilmiş kaspaz 3 ve kesilmiş kaspaz 8 ifadesini arttırmıştır (Şekil 4.33).



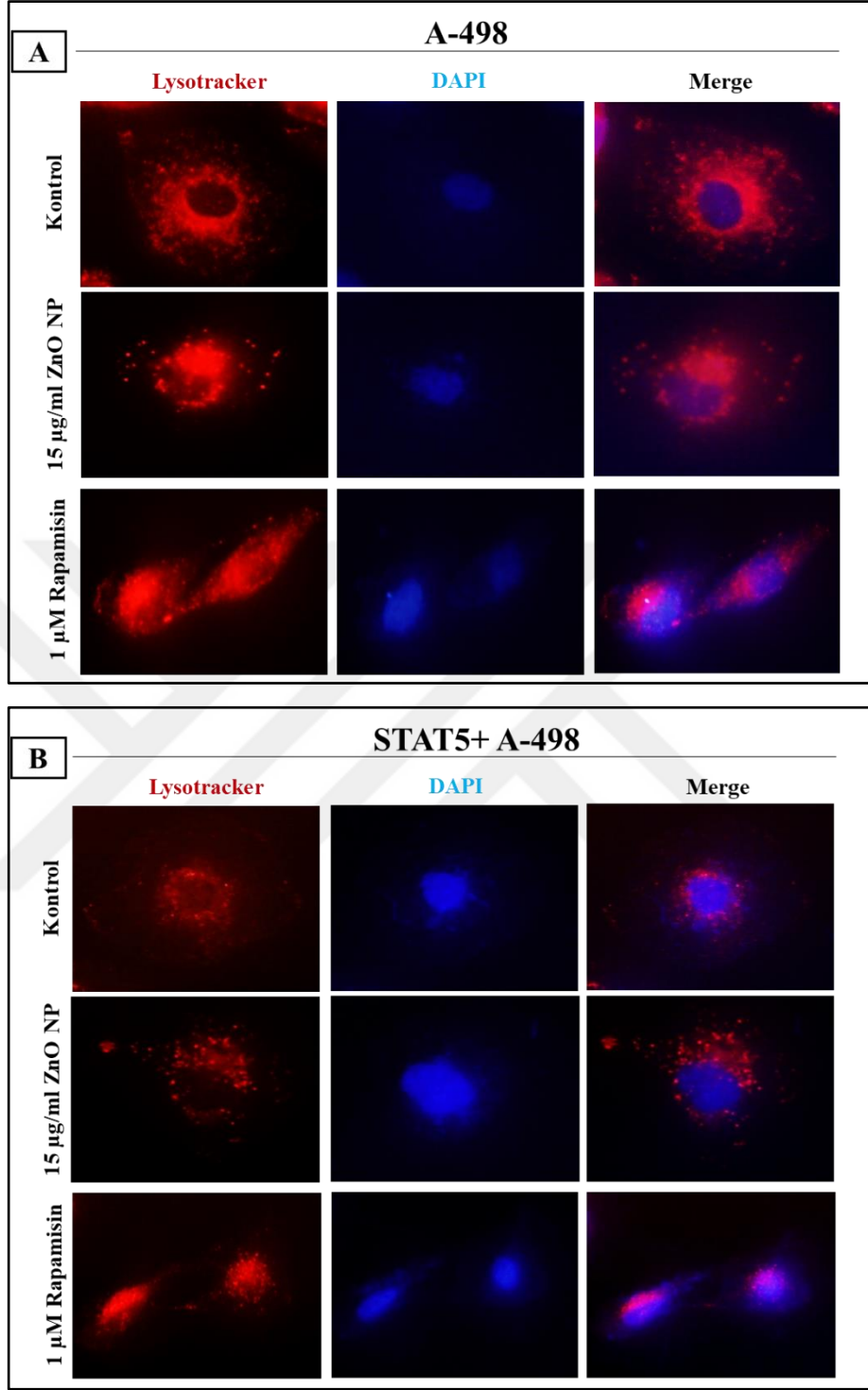
Şekil 4. 33. ZnO NP'nin apoptotik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi. HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücre hatlarına 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 µg'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüştür. Ardından proteinler C-Caspase-3 ve C-Caspase-8 antikorları ile problanmıştır. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

4.4. ZnO NP'nin RCC Hücrelerinde Otofajik Parametrelere Etkisi

4.4.1. ZnO NP Uygulaması RCC Hücrelerinde Asidik Vakuollerin Artışına Neden Olmaktadır

Tüm hücre hatları için 24 saatlik 15 µg/ml ZnO NP uygulamasının otolizozomların sayı ve etkinliklerinin saptanması aracılığıyla otofajiye etkisi LysoTracker ® Red DND-99 boyama ile sağlanmıştır. ZnO NP'nin lizozom etkinliğine etkisini saptamak ve sonuçları karşılaştırmalı olarak sunmak için pozitif kontrol olarak bir gruba 24 saat boyunca 1 µM Rapamisin uygulanmıştır. Daha sonra hücreler Lysotracker ile 15 dakika inkübe edilmiş ve floresan görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hücrelerin nükleusları DAPI boyama ile gösterilmiştir.

A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP ve Rapamisin uygulamaları kontrole oranla asidik vakuollerin boyutlarında artışa benzer oranlarda neden olmuştur. Bununla birlikte A-498 ve STAT5+ A-498 hücreleri arasında ZnO NP uygulamalarıyla asidik vakuollerin büyüklükleri açısından anlamlı bir fark gözlemlenememiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4. 34. ZnO NP'nin (A) A-498 ve (B) STAT5+ A-498 hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi. Nukleuslar DAPI boyama ile gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak hücelere 1 µM Rapamisin uygulanmıştır. Verilen mikroskop görüntüleri en az üç tekrarlı deneylerin temsili görüntüleridir (n=3).

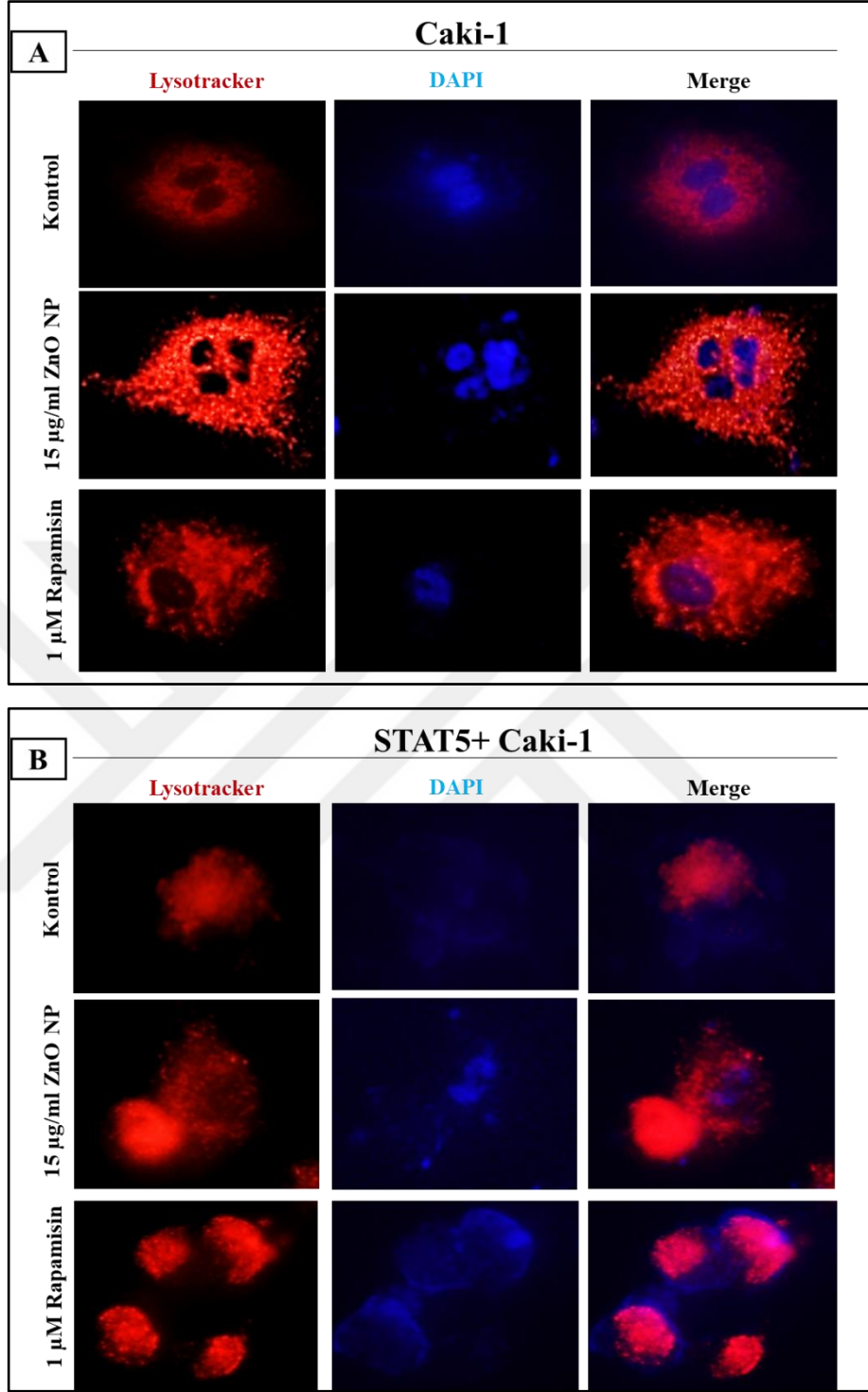
Büyütme 40X. Ölçek çubuğu: 200 µm.

Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde kontrole oranla ZnO NP uygulamaları asidik vakuol sayısında artışa neden olurken, vakuollerin büyüklükleri bakımından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde normal hücrelere kıyasla ZnO NP uygulamalarıyla oluşan asidik vakuoller daha az sayıdadır (Şekil 4.35).

RCC hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında ZnO NP uygulamalarıyla A-498 hücrelerindeki asidik vakuollerin boyutları büyüme gösterirken, Caki-1 hücrelerinde sayıca artış meydana gelmiştir. Bununla birlikte normal ve STAT5+ RCC hücreleri için Rapamisin ile ZnO NP uygulamaları asidik vakuol oluşumu bakımından benzer etkiye sebep olmuştur.

HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasıyla asidik vakuollerin büyüklükleri ve sayıları kontrole oranla artmıştır. Rapamisin uygulamasıyla ise asidik vakuoller sayıca artmıştır.

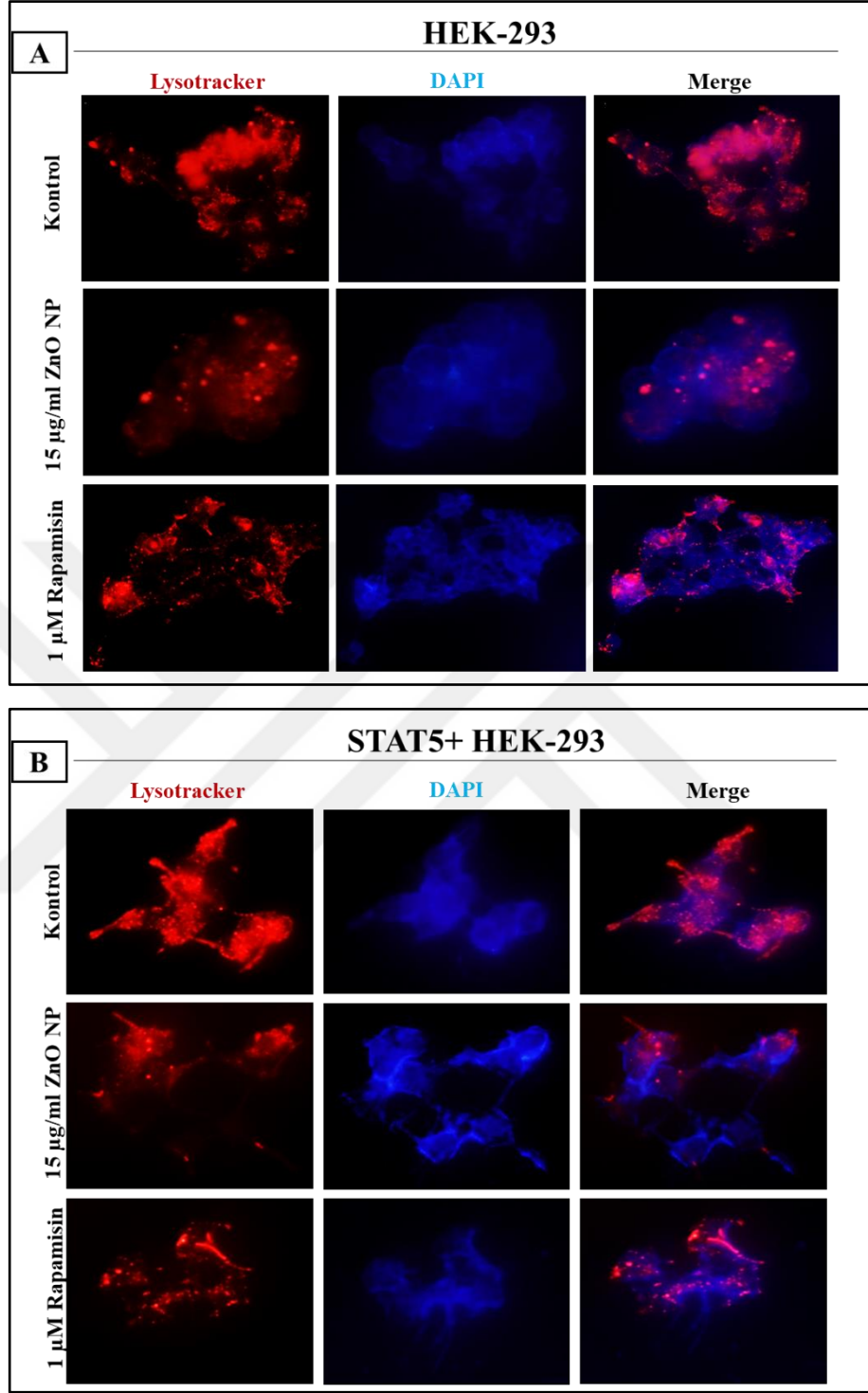
STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise Rapamisin uygulaması asidik vakuollerde sayıca artışa neden olurken, ZnO NP uygulaması kontrole oranla asidik vakuol büyüklüklerinde artışa neden olmuştur. (Şekil 4.36).



Şekil 4. 35. ZnO NP'nin Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi.

Nukleuslar DAPI boyama ile gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak hücelere 1 µM Rapamisin uygulanmıştır. Verilen mikroskop görüntüleri en az üç tekrarlı deneylerin temsili görüntüleridir (n=3).

Büyütme 40X. Ölçek çubuğu: 200 µm.



Şekil 4. 36. ZnO NP'nin HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde asidik vakuol oluşumuna etkisi. Nukleuslar DAPI boyama ile gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak hücelere 1 µM Rapamisin uygulanmıştır. Verilen mikroskop görüntüleri en az üç tekrarlı deneylerin temsili görüntüleridir (n=3).

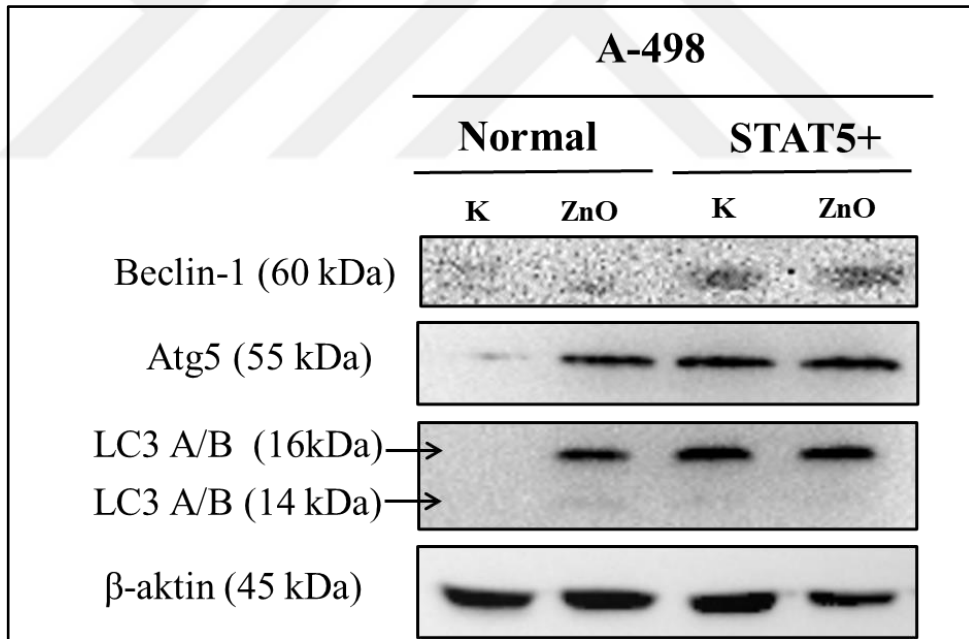
Büyütme 40X. Ölçek çubuğu: 200 µm.

4.4.2. ZnO NP Uygulamasının RCC Hücrelerinde Otofaji Proteinlerine Etkisi

Normal ve STAT5+ hücre hatlarında ZnO NP'nin otofaji ilişkili proteinler üzerindeki etkisi immünoablottama ile analiz edilmiştir. Hücrelere 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanarak protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen proteinler SDS-PAGE jele yüklenen 30 µg olacak şekilde yüklenmiştir. Ardından protein örnekleri Atg5, Beclin-1 ve LC3 A/B antikorları ile problanarak ifadeleri incelenmiştir.

A-498 hücrelerine ZnO NP uygulaması kontrole oranla Beclin-1 ifadesinde anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. Bununla birlikte ZnO NP uygulamasıyla Atg5 ve LC3 A/B ifadesi kontrole oranla artış göstermiştir. Diğer bir taraftan kontrole göre, ZnO NP uygulamasıyla otofagozom ilişkili protein LC3 A/B'nin kesilmiş 14 kDa'lık formu gözlemlenmiştir (Şekil 4.37).

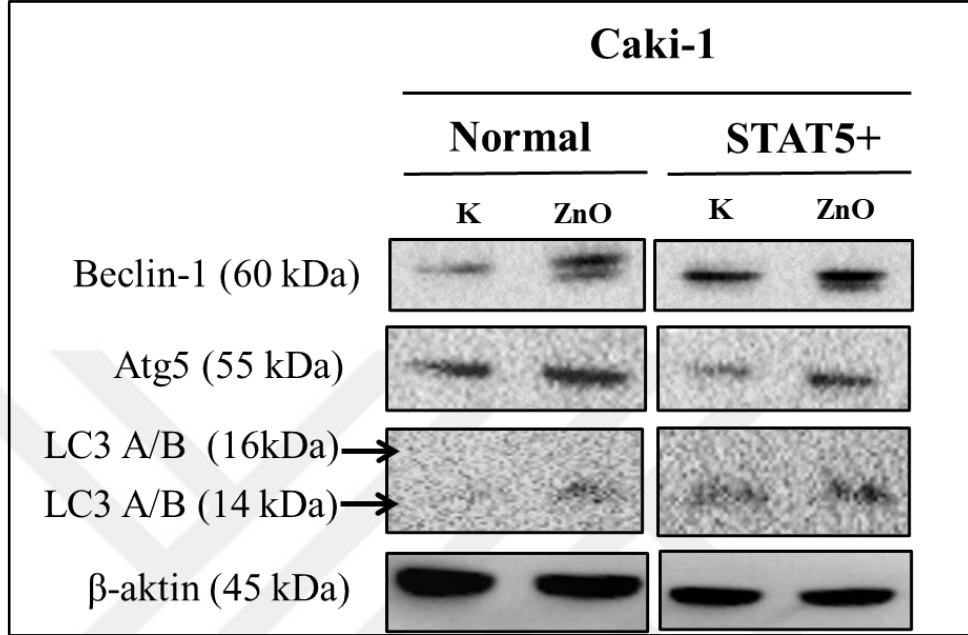
STAT5+ A-498 hücrelerinde ise ZnO NP uygulamasıyla kontrole oranla Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B ifadelerinde anlamlı bir değişim meydana gelmemiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4. 37. ZnO NP'nin otofajik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi. A-498 ve STAT5+ A-498 hücre hatlarına 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 µg'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B antikorları ile problanmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

Caki-1 hücre hattında kontrol grubuna oranla ZnO NP uygulamasıyla Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B ifadeleri artmıştır (Şekil 4.38).

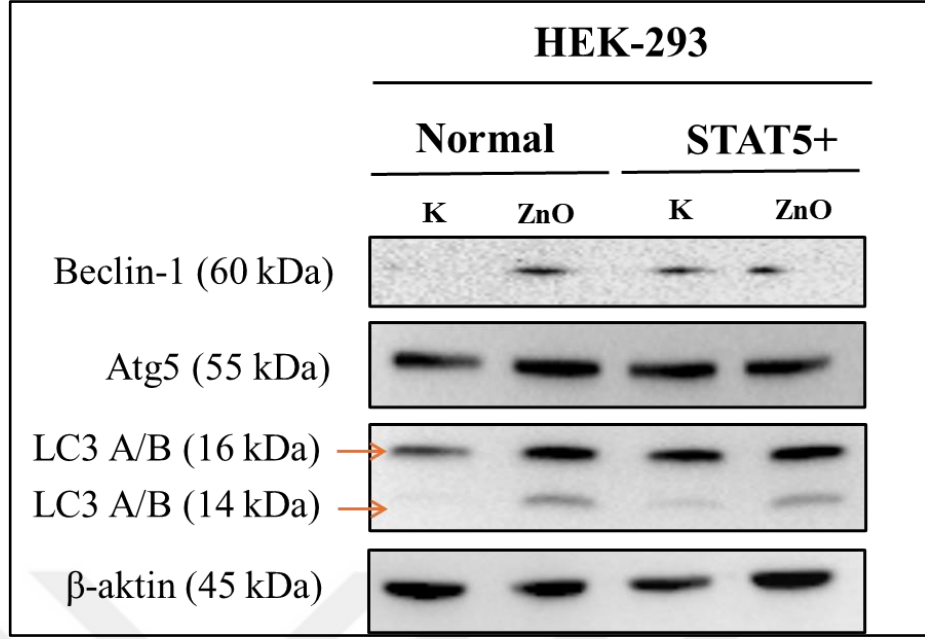
STAT5+ Caki-1 hücreleri incelendiğinde ZnO NP uygulamasıyla kontrol grubuna oranla Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B ifadelerinde artış meydana gelmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4. 38. ZnO NP'nin otofajik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi. Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücre hatlarına 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 µg'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B antikorları ile prolanmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasıyla Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B ifadeleri anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Bununla birlikte kontrole göre ZnO NP uygulamasıyla LC3 A/B proteininin kesilmiş formu da gözlemlenmiştir (Şekil 4.39).

STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise ZnO NP uygulamasıyla kontrole oranla Beclin-1 ve Atg5 ifadesinde anlamlı bir değişim meydana gelmezken, LC3 A/B ifadesi artmıştır. Ayrıca STAT5+ HEK-293 hücrelerine ZnO NP uygulaması kontrole oranla LC3 A/B proteininin kesilmiş formunun ekspresyonunun artmasına neden olmuştur (Şekil 4.39).

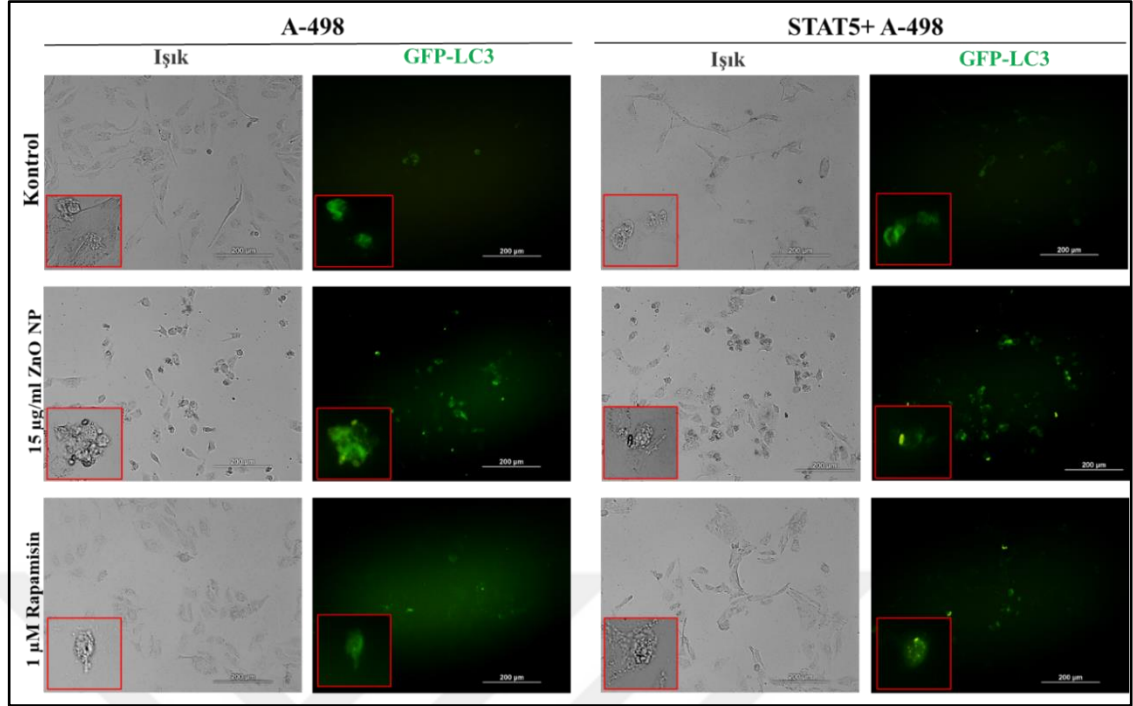


Şekil 4.39. ZnO NP'nin otofajik proteinlerin ekspresyonlarına etkisi. HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücre hatlarına 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanmıştır. Ardından protein izolasyonları gerçekleştirilerek 30 µg'lık protein lizatları %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B antikorları ile problanmıştır. Bu şekil üç bağımsız deneyin temsili bir görüntüdür (n=3).

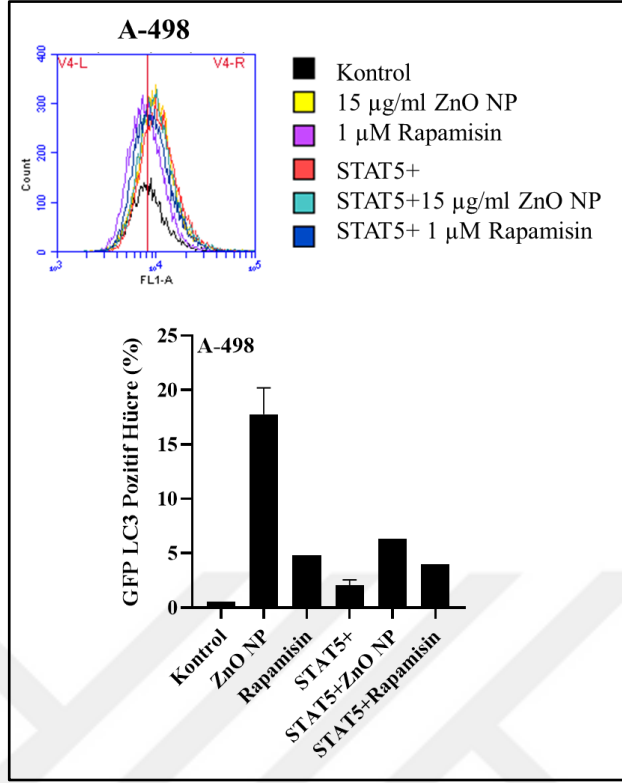
4.4.3. ZnO NP Uygulaması RCC Hücrelerinde LC3 A/B İfadesinde Artışa Neden Olmuştur

Normal ve STAT5+ hücrelere yeşil floresan işaretli GFP-LC3 plazmitleri lipofektamin aracılı olarak 48 saatlik süre ile transfekte edilmiştir. Daha sonra hücrelere 15 µg/ml ZnO NP ve 1 µM Rapamisin uygulanmıştır. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki medya uzaklaştırılarak 1X PBS eklenmiş ve floresan görüntüleme sağlanmıştır. Daha sonra tripsinlenerek kaldırılan hücreler akış sitometrisinde analiz edilmiştir.

A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde kontrol grubuna oranla 15 µg/ml ZnO NP ve 1 µM Rapamisin uygulamalarıyla LC3 ifadesinde artış meydana gelmiştir. Hem A-498 hem de STAT5+ A-498 hücrelerinde 1 µM Rapamisin uygulamasına oranla 15 µg/ml ZnO NP uygulamasında LC3 ifadesi daha fazla artmıştır (Şekil 4.40-4.41).

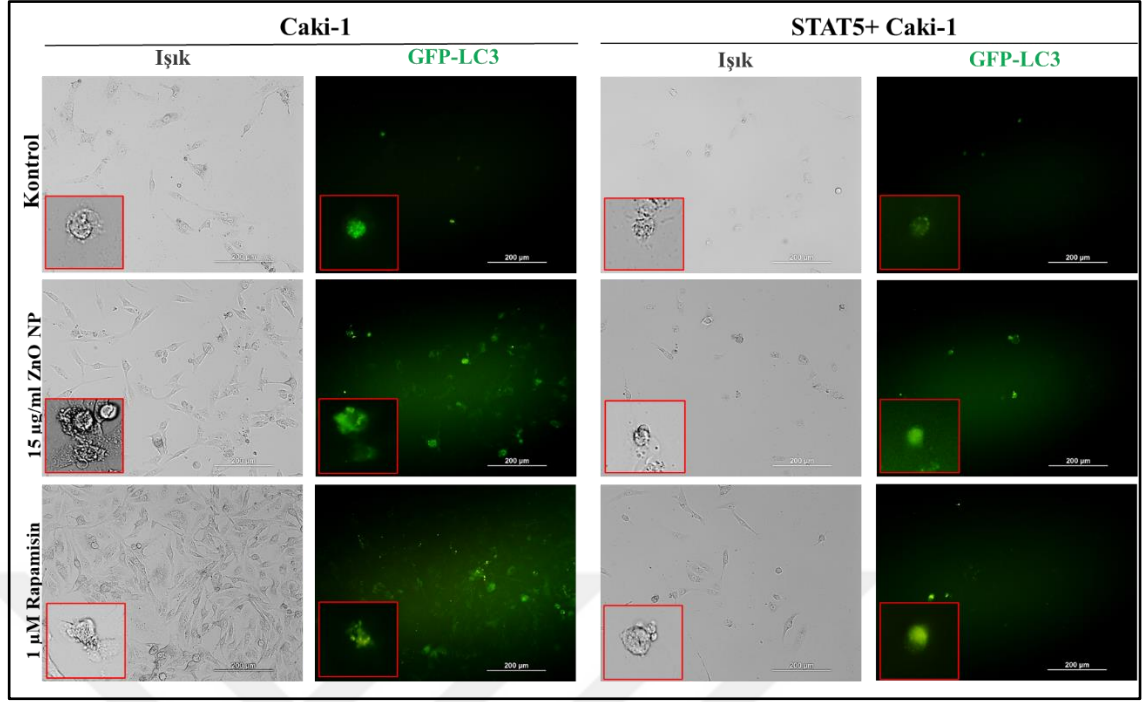


Şekil 4. 40. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine etkisi. İzole edilen GFP-LC3 plazmitleri A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı ile 1:3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oranında 48 saat boyunca transfekte edilmiştir. Hücrelere 48 saat sonra 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO NP ve 1 μM Rapamisin uygulanarak 24 saat inkübe edilmiş ve floresan görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve akış sitometrisinde 104 hücre analiz edilmiştir. Rapamisin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Görüntüler gerçekleştirilen iki deneyin temsili görüntüleridir ($n=2$). Büyütme 20X-40X. Ölçek çubuğu: 200 μm .

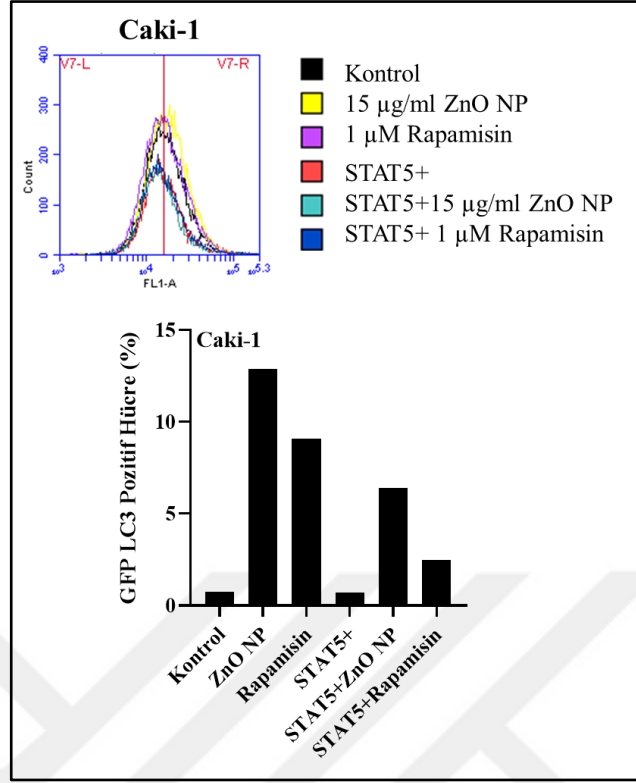


Şekil 4. 41. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine etkisinin akış sitometrisi analiziyle gösterilmesi . Lipofektamin aracılı GFP-LC3 transfeksiyonları gerçekleştirilen A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine 48 saatlik transfeksiyon süresinin ardından 15 µg/ml ZnO NP ve 1 µM Rapamisin 24 saat boyunca uygulanmıştır. Daha sonra floresan görüntüleme gerçekleştirilmiş ve hücreler tripsinlenerek kaldırılmıştır. Akış sitometrisinde 104 hücre FL1-A filtresi kullanılarak analiz edilmiş ve ardından histogram grafik oluşturulmuştur (n=2).

Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde kontrol grubuna oranla 15 µg/ml ZnO NP ve 1 µM Rapamisin uygulamalarıyla LC3 ifadesinde artış meydana gelmiştir. 1 µM Rapamisin uygulaması Caki-1 hücrelerinde STAT5+ Caki-1 hücrelerine oranla LC3 ifadesinde daha fazla artış sağlamıştır (Şekil 4.42-4.43).



Şekil 4. 42. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine etkisi. İzole edilen GFP-LC3 plazmitleri A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı ile 1:3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oranında 48 saat boyunca transfekte edilmiştir. Hücrelere 48 saat sonra 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZnO NP ve 1 μM Rapamisin uygulanarak 24 saat inkübe edilmiş ve floresan görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve akış sitometrisinde 104 hücre analiz edilmiştir. Rapamisin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Görüntüler gerçekleştirilen iki deneyin temsili görüntüleridir ($n=2$). Büyütme 20X-40X. Ölçek çubuğu: 200 μm .

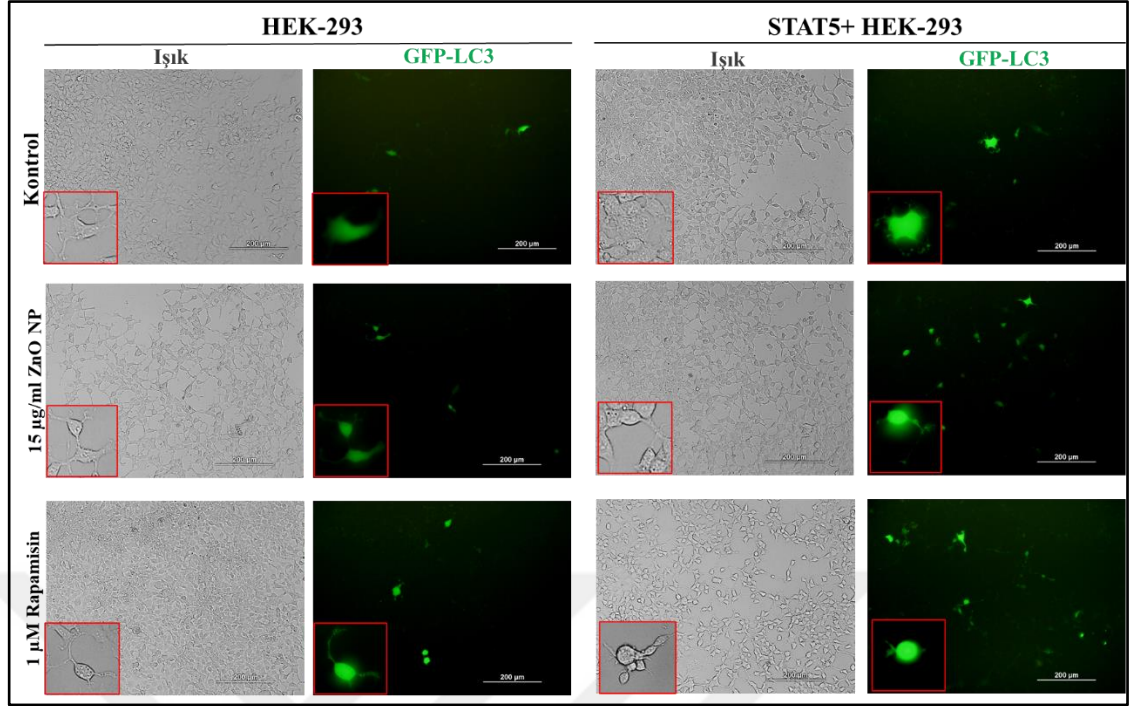


Şekil 4. 43. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerine etkisinin akış sitometrisi analiziyle gösterilmesi Lipofektamin aracılı GFP-LC3 transfeksiyonları gerçekleştirilen Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerine 48 saatlik transfeksiyon süresinin ardından 15 µg/ml ZnO NP ve 1 µM Rapamisin 24 saat boyunca uygulanmıştır. Daha sonra floresan görüntüleme gerçekleştirilmiş ve hücreler tripsinlenerek kaldırılmıştır. Akış sitometrisinde 104 hücre FL1-A filtresi kullanılarak analiz edilmiş ve ardından histogram grafik oluşturulmuştur (n=2).

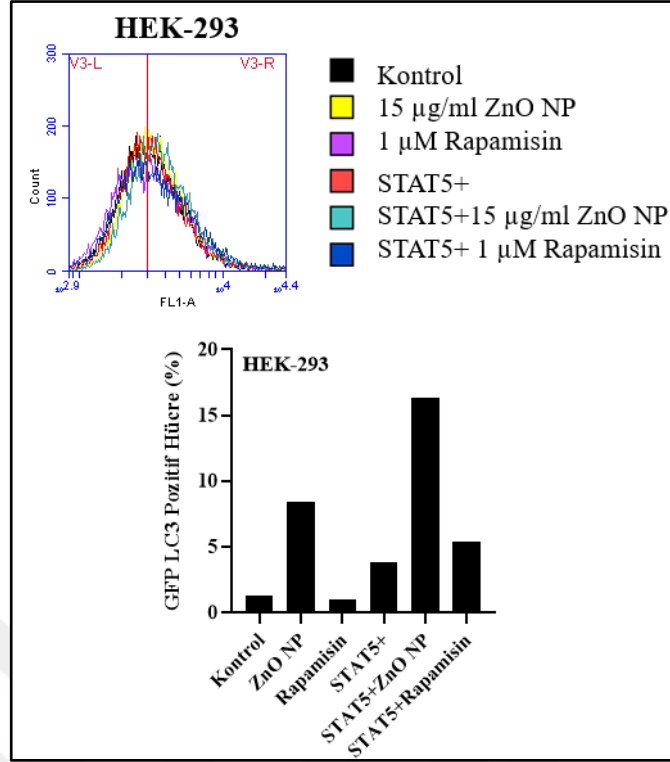
RCC hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında ZnO NP uygulaması A-498 hücrelerinde LC3 ifadesini Caki-1 hücrelerine oranla daha çok arttırmıştır.

HEK-293 hücrelerinde kontrol grubuna oranla ZnO NP ve Rapamisin uygulamalarıyla LC3 ifadesinde artış meydana gelmiştir. Bununla birlikte ZnO NP uygulamasıyla meydana gelen LC3 ifadesindeki artış Rapamisine oranla daha fazladır.

STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise kontrole oranla 24 saatlik ZnO NP ve Rapamisin uygulaması LC3 ifadesinde artışa neden olmuştur. ZnO NP uygulaması Rapamisin uygulamasına ve STAT5+ kontrole oranla LC3 ifadesindeki artışı daha fazla indüklemiştir. Diğer bir taraftan STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamalarıyla meydana gelen LC3 ifadesindeki artış normal HEK-293 hücrelerine oranla daha fazladır (Şekil 4.44-4.45).



Şekil 4. 44. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerine etkisi. İzole edilen GFP-LC3 plazmitleri HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerine lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı ile 1:3 (µg/µl) oranında 48 saat boyunca transfekte edilmiştir. Hücrelere 48 saat sonra 15 µg/ml ZnO NP ve 1 µM Rapamisin uygulanarak 24 saat inkübe edilmiş ve floresan görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve akış sitometrisinde 104 hücre analiz edilmiştir. Rapamisin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Görüntüler gerçekleştirilen iki deneyin temsili görüntüleridir (n=2). Büyütme 20X-40X. Ölçek çubuğu: 200 µm.



Şekil 4. 45. ZnO NP uygulamasının GFP-LC3 plazmidi aktarılan HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerine etkisinin akış sitometrisi analiziyle gösterilmesi Lipofektamin aracılı GFP-LC3 transfeksiyonları gerçekleştirilen HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerine 48 saatlik transfeksiyon süresinin ardından 15 $\mu\text{g/ml}$ ZnO NP ve 1 μM Rapamisin 24 saat boyunca uygulanmıştır. Daha sonra floresan görüntüleme gerçekleştirilmiş ve hücreler tripsinlenerek kaldırılmıştır. Akış sitometrisinde 104 hücre FL1-A filtresi kullanılarak analiz edilmiş ve ardından histogram grafik oluşturulmuştur (n=2).

5. TARTIŞMA

Renal tübüler epitel hücrelerinden köken alarak gelişen ve büyük bir heterojen kanser grubunu kapsayan RCC, böbrekte tespit edilen kanserlerin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Köken aldıkları nefron bölgesine göre sınıflandırılan çeşitli alt tiplere sahip RCC'nin, sağkalım oranı en düşük ve insidansı (%85) en yüksek tipi ccRCC'dir (Hsieh vd., 2017). ccRCC'nin tanımlanmış en iyi risk faktörlerinden biri olan obezite, yağ dokusunun artışıyla karakterizedir. Yağ dokusundaki artışla beraber lipid metabolizmasının regülasyonundaki değişimlerin yanı sıra adipositlerin salgı aktiviteleri de artış göstermektedir. Böylece dokularda büyüme faktörleri ve sitokin salgıları artmaktadır. Salgı aktivitesindeki bu artış, tümör mikroçevresinin oluşumunda önemlidir (Rasha vd., 2019).

STAT5B, normal fizyolojik koşullardaki rolü T hücresi gelişimini modüle etmek, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi hücresel proseslerde sorumlu genlerin regüle edilmesini sağlamaktadır. STAT5'in normal fizyolojik rollerinin yanı sıra, işlev kaybı ya da çoğunlukla yapısal bir aktivasyonla tümör sağkalımını, proliferasyonunu, metastazını ve antikanser tedavilere karşı direnç gelişimini arttırdığı meme, kolorektal, akciğer, prostat, karaciğer ve hematolojik kanserlerde tespit edilmiştir (Smith vd., 2019; Halim vd., 2020). RCC'de ise STAT5b ekspresyonunun mRNA düzeyinde, RCC hastalarından alınan malignant ve sağlıklı doku örnekleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farka sahip olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca RCC'li hastalarda STAT5b ekspresyonları analiz edildiğinde STAT5b ifadesi düşük/orta durumda olan hastalarda düşük sağkalım gözlemlenmiştir (Zhou vd., 2020). Ancak RCC hücreleriyle gerçekleştirilen diğer bir çalışmada STAT5'in çeşitli yolaklar aracılığıyla hücre proliferasyonunu desteklediği belirlenmiştir (Pak vd., 2019). Bu durum STAT5'in RCC'de işlevinin henüz tam olarak belirlenemediğini ve daha fazla çalışma gerektirdiğini göstermektedir. Bu nedenle gerçekleştirilen bu tez çalışmasında RCC hücre hatları olan A-498 ve Caki-1 ile embriyonik HEK-293 hücre hatlarında STAT5B plazmidinin lipofektamin türevli transfeksiyon ajanı kullanılarak transfeksiyonu yoluyla hücrelerde STAT5 ifadesi en az 2 kat arttırılmıştır. Daha sonra kullanılan STAT5B plazmidinin memelide selektif belirteci olan higromisin konsantrasyonu kademeli şekilde arttırılmış ve hücreler STAT5B'yi sürekli olarak yüksek ifade edecek stabil STAT5+ duruma getirilmiştir. Antibiyotik uygulamasının yanı sıra STAT5+

hücrelerin STAT5 ifadeleri her dört pasajda bir immünoiblotlama yoluyla kontrol edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında normal RCC hücrelerine kıyasla STAT5+ RCC hücrelerinde morfolojik özelliklerde farklılıklar tespit edilmiştir. STAT5+ hücre hatlarının daha uzun podlar oluşturduğu ve hücre içindeki vakuol yapılarının arttığı belirlenmiş ve ışık mikroskobuyla analiz edilerek sonuçlar kısmında sunulmuştur. EMT süreci hücresel polaritenin bozulmasını, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini ve hücre–matris yapışmasındaki değişiklikleri içerdiğinden (Roche, 2018) STAT5+ hücrelerdeki uzun pod yapıları STAT5’in EMT ile ilişkili genlerin ifadesinde değişimler meydana getirmesiyle ilişkilendirilmektedir. Prostat kanseri hücreleriyle gerçekleştirilen bir çalışmada Jak2-STAT5a/b sinyalindeki artışın EMT’yi ve kök hücre benzeri yapıyı indüklediği belirlenmiştir. Çalışmada STAT5 ifadesindeki artışla birlikte E-kaderin ifadesi azalırken N-kaderin, vimentin ve Twist1 ifadeleri artış göstermiştir (Talati vd., 2015). Ancak sadece ışık mikroskobunda gerçekleştirilen görüntüleme yöntemi yeterli olmayacağından RCC hücrelerinde STAT5 ifadesinin EMT ile ilişkisi, transkripsiyonel ve translasyonel yöntemler kullanılarak ileri analizlere tabi tutulmalıdır.

Tez çalışmasında kullanılan A-498 ve Caki-1 hücreleri, RCC’nin ccRCC alt tipine mensuptur. Bununla birlikte ccRCC hücreleri şeffaf/berrak bir sitoplazmik içeriğe sahip olmalarıyla karakterizedir. STAT5 ifadesinin bu hücrelerde arttırılmasıyla birlikte uzayan pod yapılarının yanı sıra hücre içindeki sitoplazmik içeriğin berraklığının azaldığı ve vakuol/granül yapılarında artış gözlemlenmiştir. Renal doku örnekleriyle gerçekleştirilmiş başka bir çalışmada mTORC1 geninde meydana gelen genin aktivasyonunu arttırıcı bir mutasyonun RCC dokularına ait hücrelerde eozinofilik ve vakuollü bir sitoplazma oluşumuna sebep olduğu belirtilmiştir (Kapur vd., 2021). Literatürde STAT5 ifadesindeki artışın kanser hücrelerinde sitoplazmik vakuol artışıyla ilişkisine dair kapsamlı bir çalışma bulunmamakla birlikte, mTORC1 ile STAT5 arasında bir bağlantı bulunabileceği gösterilmiştir (Fallone vd., 2023). STAT5 ifadesindeki artışın sitoplazmada meydana getirdiği morfolojik değişimin daha detaylı incelenmesi gerekmektedir.

STAT5’in ifadesinin arttırılmasıyla embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK-293’te benzer şekilde hücre içi vakuollerde artış gözlemlenmemiştir. Daha önce sağlıklı sıçan böbrek dokularıyla gerçekleştirilen bir *in vivo* çalışmada genetik ya da farmakolojik

yolla STAT5 ifadesinin azaltılması, hücrelerde senesensi azaltmıştır (Shi vd., 2019). Bu nedenle STAT5+ HEK-293 hücrelerinde normal HEK-293 hücrelerine kıyasla vakuol sayısında artış olmadığı tahmin edilmektedir. Bununla birlikte sağlıklı hücrelerde normal koşullarda STAT5a/b sinyalinin oldukça kontrol altında tutulduğu belirtilmiştir (Weber vd., 2015).

Literatürde STAT5'in dokuya spesifik olarak onkogen veya tümör baskılayıcı davranabileceği belirtilse de RCC'deki görevi *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda tam olarak henüz tanımlanmamıştır. STAT5'in hedef genleri arasında hücre proliferasyonu, sağkalımı, angiogenez ve invazyon ile ilişkili genler yer almaktadır (Ferbeyre ve Moriggl, 2011; Halim vd., 2020). Bununla birlikte çeşitli kanser tiplerinde gerçekleştirilen çalışmalar STAT5 ifadesindeki artışın hücre sağkalımını, proliferasyonunu ve metastazını arttırmasına, çoklu ilaç direnci geliştirmesine ve apoptozun baskılanmasına neden olduğunu göstermiştir (Halim vd., 2020). STAT5'in çeşitli kanserlerdeki rolleri göz önüne alındığında bu tez çalışmasının bir çıktısı STAT5 ifadesindeki modülasyonun RCC hücrelerinin proliferasyonuna, sağkalımına ve hücre ölüm yollarıyla ilişkili protein ekspresyonlarına etkisinin incelenmesidir. Diğer bir taraftan agresif RCC'nin, geleneksel kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirerek tedavi olanaklarını sınırlaması ve klinikte hasta sağkalımını azaltması sebebiyle yeni nesil terapötiklerin RCC'de incelenmesini gerektirmektedir.

Nanoteknolojinin ortaya çıkışıyla birlikte kanser teşhis ve tedavisinde bir devrim niteliği taşıyan NP'lerin direkt ya da ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımları yaygınlaşmış ve bazı tiplerinin kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır (Gavas vd., 2021; Wiesmann vd., 2020). Günümüzde lipozom, dendrimer gibi organik ya da metal oksit NP'ler gibi inorganik NP'lerin kanser tanı ve tedavisinde kullanımı çeşitli avantajlı yönleri sebebiyle artmıştır. Düşük maliyetli üretimleri ve tedavinin yanı sıra tanı yöntemlerinde kullanıma da olanak sağlamaları sebebiyle metal ve metal oksit NP'ler ön plana çıkmaktadır. Titanyum dioksit, gümüş oksit, bakır oksit gibi metal oksit NP'lerin arasında en yüksek biyouyumluluğu gösteren, en düşük sitotoksositeye sahip ve hali hazırda çeşitli kozmetik ürünlerde kullanılmakta olan ZnO NP'ler daha stabil yapıları ve hassasiyetleri sebebiyle bu çalışmada tercih edilmiştir (Wiesmann vd., 2020; Hanley vd., 2008).

RCC'de geleneksel tedavilere karşı çoklu direnç geliştirilmesiyle tedavi olanaklarının sınırlanması ve hasta sağkalım süresinin azalması sebebiyle yeni teknoloji ürünü

NP'lerin araştırılması önem arz etmektedir. Ancak tedavi süresince çoğu kanser hastasında görülen yaşam kalitesindeki azalma da göz ardı edilmemeli ve kanser hücrelerine spesifik tedavi geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle kanser hücrelerine spesifik etkinlik gösteren ZnO NP'lerin etkisinin STAT5 ifadesi arttırılarak daha agresif karakter kazandırılan RCC hücrelerinde hücre proliferasyonu, sağkalımı, koloni oluşturma potansiyeli ve mitokondriyal membran potansiyeline etkileri açısından incelenmesi bu tez çalışmasının diğer bir çıktısını oluşturmaktadır. RCC hücrelerinin yanı sıra, *in vitro* ortamda ZnO NP'nin sağlıklı hücrelere etkisi de gözlemlenmek amaçlanmıştır. Bu nedenle embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK-293'de de ZnO NP'nin etkisi araştırılmıştır.

Hem normal hem de STAT5+ RCC ve HEK-293 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre canlılığına etkisi MTT sağkalım testi ile belirlenmiştir. Tüm hücre hatları 5, 10, 15, 25, 30, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki ZnO NP'ye 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. MTT testi sonuçlarına göre 5 µg/ml ZnO NP RCC hücrelerinde canlılığın %5 azalmasına neden olurken, 10 µg/ml ZnO NP, RCC hücrelerinde hücre canlılığını yaklaşık %10 oranında azaltmıştır. 15 µg/ml ZnO NP uygulaması ise RCC hücrelerinde %20, HEK-293 hücre hattında ise %42 azalmaya sebep olmuştur. Diğer bir taraftan 25 µg/ml ZnO NP uygulaması A-498 hücrelerinde %55, Caki-1 hücrelerinde %25 ve HEK-293 hücrelerinde %60 oranlarında azalmaya sebep olmuştur. Bu nedenle gerçekleştirilen çalışmada 15 ve 25 µg/ml ZnO NP konsantrasyonları, ZnO NP'nin hücre proliferasyonuna, koloni oluşturma potansiyeline ve mitokondriyal membran potansiyeline etkisinin incelenmesi açısından tercih edilmiştir. Bir çalışmada ccRCC hücre hatları olan 786-O ve 769-P için 20 µg/ml ZnO NP tercih edilmiştir (Zhou ve Cao, 2022). MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ise 24 saatlik ZnO NP uygulaması için inhibitör konsantrasyonu 50 (IC₅₀) değerinin 125 µg/ml olduğu gösterilmiştir (Pouresmaeil vd., 2021).

RCC hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında A-498 hücre hattı Caki-1 hücre hattına oranla ZnO NP'ye daha duyarlıdır. 10 µg/ml ZnO NP konsantrasyonu göz önüne alındığında A-498 hücrelerinde canlılığı %10 azalırken aynı konsantrasyonda Caki-1'de hücre canlılığında azalma olmamıştır. Caki-1 hücrelerinin metastatik karakterde olması ZnO NP'ye karşı daha dirençli olmalarını açıklayabilir (Brodaczewska vd., 2016). ZnO NP'nin normal dokuya etkisini *in vitro* ortamda gözlemlemek amacıyla

kullanılan HEK-293 hücre hattı ise ZnO NP'ye RCC hücrelerine oranla daha duyarlıdır. 15 µg/ml ZnO NP HEK-293 hücrelerinde canlılığını %42 azaltırken RCC hücrelerinde %20 azalmaya neden olmuştur.

STAT5+ RCC hücrelerinde ise 5, 10 ve 15 µg/ml ZnO NP konsantrasyonları hücre canlılığında azalmaya sebep olmamıştır. Normal RCC hücrelerinde özellikle 15 µg/ml ZnO NP konsantrasyonunda hücre canlılığında %20 azalma meydana gelirken STAT5+ RCC hücre canlılığında herhangi bir değişim meydana gelmemesi STAT5+ hücrelerin daha agresif karakter kazanmış olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Diğer bir taraftan STAT5+ HEK-293 hücrelerinde 5 µg/ml ZnO NP uygulaması hücre canlılığında %3 ve 10 µg/ml ZnO NP uygulaması %34 azalmaya sebep olmuştur. 15 µg/ml ZnO NP uygulaması ele alındığında STAT5+ HEK-293 hücrelerinde hücre canlılığı %40 azalırken, normal HEK-293 hücrelerinde aynı konsantrasyondaki ZnO NP uygulaması %42 azalmaya sebep olmuştur. STAT5+ RCC hücrelerine kıyasla STAT5 ifadesindeki artış HEK-293 hücrelerinde ZnO NP'ye karşı bir direnç gelişmesine sebep olmamıştır. Bununla birlikte tüm hücre hatları için daha yüksek konsantrasyonlardaki ZnO NP uygulamaları sitotoksik etki yaratmıştır.

15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamalarının hücre proliferasyonuna etkisi zamana bağlı olarak tripan mavisi boyama ile incelenmiştir. Hücreler 15 ve 25 µg/ml ZnO NP'ye 24-72 saat aralığında maruz bırakılmıştır. MTT testlerini doğrulayacak şekilde A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde 24 saat ZnO NP uygulamalarıyla birlikte hücre sayısı kontrole oranla azalmıştır. 48 ve 72 saat ZnO NP uygulamaları ise normal ve STAT5+ A-498 hücreleri için sitotoksik etki göstermiş ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonu baskılanmıştır. STAT5+ A-498 hücrelerinde 15 µg/ml ZnO NP uygulaması hücre proliferasyon hızını baskılasa da STAT5 ifadesinin artırılması normal A-498 hücrelerine kıyasla ZnO NP'ye direnç geliştirmesine neden olmuştur. 25 µg/ml ZnO NP uygulaması hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermiş ve hücre proliferasyon hızını anlamlı oranda baskılamıştır.

Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ise 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamaları kontrol gruplarına oranla hücre proliferasyonunda azalmaya neden olmuştur. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde normal Caki-1 hücrelerine kıyasla ZnO NP'nin hücre proliferasyonuna etkisi daha azdır. Normal hücrelerle kıyaslandığında, STAT5 ifadesinin artırılması Caki-1 hücrelerinde ZnO NP'ye karşı direnç geliştirilmesine sebep olmuştur.

RCC hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında hem normal hem de STAT5+ A-498 ve Caki-1 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre proliferasyon hızında anlamlı olarak azalmaya sebep olduğu belirlenirken, A-498 hücrelerinin Caki-1 hücrelerine kıyasla ZnO NP uygulamasına daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde 24-72 saat aralığında 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulaması hücre sayısının azalmasına neden olarak hücre proliferasyon hızının azalmasına sebep olmuştur. Diğer bir taraftan normal HEK-293 hücreleriyle kıyaslandığında STAT5+ HEK-293 hücreleri ZnO NP uygulamalarına karşı daha dirençlidir. MTT testi sonuçlarına göre ise 15 µg/ml ZnO NP uygulaması HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde hücre canlılığını sırasıyla %42 ve %40 azalmayla benzer oranlarda etkilemiştir. ZnO NP'nin malignant hücrelere seçici sitotoksosite gösterdiği belirtilse de tez çalışmasında HEK-293 hücrelerinin malignant RCC hücrelerine oranla ZnO NP'ye daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Wiesmann vd., 2020). Buna bağlı olarak gerçekleştirilen bir çalışmada kullanılan ZnO NP'nin nano yapısının hücrelerde farklı yanıtlara sebep olabileceği gösterilmiştir (Wahab vd., 2016).

ZnO NP uygulamalarının hücre proliferasyonu ile birlikte hücre morfolojilerine etkisi ışık mikroskopuyla incelenmiştir. ZnO NP uygulamalarıyla birlikte konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücrelerin tümünde adeziv karakterdeki hücre sayısında azalma gözlemlenmiştir. Diğer bir taraftan hücrelerin normal morfolojik yapıları bozularak yuvarlak şekilli bir morfolojiye geçtikleri tespit edilmiş, bununla birlikte apoptotik yapıdaki hücreler de gözlemlenmiştir. ZnO NP'nin etki mekanizması göz önüne alındığında apoptotik hücrelere rastlanması olası bir durumdur (Wiesmann vd., 2020). Bununla birlikte gingival skuomoz hücreli karsinoma hücre hatlarıyla gerçekleştirilen başka bir çalışmada konsantrasyona bağımlı olarak ZnO NP uygulamalarının hücrelerin morfolojik özelliklerini kaybettiği gösterilmiştir (Wang vd., 2020). Kolon kanseri hücre hatlarında ZnO NP ve alüminyum NP'lerin hücre canlılığı ve morfolojisine etkilerinin karşılaştırmalı olarak sunulduğu bir çalışmada da ZnO NP uygulamasının hücre morfolojisinde değişime sebep olduğu gösterilmiştir (Subramaniam vd., 2019). Başka bir çalışmada ise multipl miyeloma hücrelerinde konsantrasyona bağımlı olarak ZnO NP uygulamasının hücre morfolojisinde hasar meydana getirdiği gösterilmiştir (Li vd., 2020). Meme kanseri hücre hattı MCF7'de de ZnO NP'nin hücrelerde membran bütünlüğünü tahrip ettiği, hücre proliferasyonunu

engellediği ve hücrelerde sitoplazmik yoğunluğun değişmesine neden olduğu gösterilmiştir (Aalami vd., 2020).

ZnO NP protein aktivitesi dengesizliği, ROS oluşumunun indüklenmesi ve DNA hasarına bağlı apoptoz olarak üç temel mekanizmayla hücrelere etki etmektedir (Bisht ve Rayamajhi, 2016). Ayrıca yeni çalışmalar ZnO NP'nin apoptozun yanı sıra nekroz ve otofajiye de neden olduğunu göstermektedir (Wiesmann vd., 2020).

Işık mikroskobu ile ZnO NP etkisinin hücre morfolojilerine etkisi incelenirken, uygulanan NP'lerin özellikle yüksek konsantrasyonlarda ve 48 ve 72. saatlerde medya içerisinde aglomerasyon meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında hazırlanan ana stok ZnO NP solüsyonu sonikasyon yardımıyla çözülerek uygulandığından ZnO NP'nin medya içerisinde zamanla çökmesi beklenen bir durum olsa da hücre proliferasyonunda ve sağkalımında azalmaya sebep olması hücre içine etkili bir biçimde alındığını göstermektedir. Ancak gerçekleştirilen literatür araştırmalarında ZnO NP'nin kullanılan besiyeri içindeki fosfat ile birlikte amorf çinko-karbonat-fosfat çöktürücü oluşturabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte ZnO NP'nin pH 7'de tam çözünmediği ve düşük pH'da çözünerek etki mekanizması geliştirdiği gösterilmiştir. Özellikle zamana bağlı gerçekleştirilen deneylerde hücre sayısının artışıyla birlikte besiyeri içinde karbondioksit miktarına bağlı olarak pH düşeceğinden ZnO NP'nin etkisi farklılık gösterebilir (Bisht ve Rayamajhi, 2016). Bununla birlikte literatürdeki çalışmalar göz önüne alındığında ZnO NP'nin *in vivo*'da kullanımını avantajlı kılan yanı sıra intravenöz yolla uygulanabilecek olmasıdır. Kanın pH'ının 7 olması, ZnO NP'nin sadece hücre içine alındığında asidik lizozomlarda çözünerek etki etmesini sağlayabilir. Bu durum ZnO NP'nin direkt olarak uygulanması dışında bir ilaç ya da gen taşıyıcı sistem olarak avantajlı olduğunu göstermektedir (Wiesmann vd., 2020; Bisht ve Rayamajhi, 2016). ZnO NP'nin RCC ve HEK-293 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı ve hücre proliferasyonunu baskıladığı gözlemlendikten sonra PI boyama ile hücre döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir. 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP uygulanan hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve fiks edilmiştir. Daha sonra PI ile boyanan hücreler akış sitometrisinde 10^4 hücre olacak şekilde analiz edilmiştir. Hem normal hem de STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulamalarıyla birlikte özellikle G2/M fazındaki hücre popülasyonunda artış meydana gelmiştir. ZnO NP uygulaması hücrelerin G2/M fazında tutulu kalmasına neden olarak mitotik aktivitelerini engellemektedir. 15 µg/ml

ZnO NP uygulamasıyla STAT5+ A-498 hücrelerde 15 µg/ml ZnO NP uygulanan normal hücrelere kıyasla G2/M'de tutulu kalan hücre popülasyonu %3,4 daha fazladır. Bununla birlikte STAT5 ifadesi arttırılan kontrol grubuyla, normal hücrelerin kontrol grupları kıyaslandığında STAT5+ A-498 hücrelerinde G2/M fazındaki artış %1 daha fazladır. Diğer bir taraftan A-498 hücrelerindeki benzer olarak Caki-1 hücrelerinde de ZnO NP uygulamasıyla hücre döngüsü G2/M fazında tutulu kalmıştır. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulaması STAT5+ Caki-1 kontrole göre hücre döngüsünün G2/M fazında tutulu kalmasına neden olmuştur. ZnO NP'lerin hücre ölümüne ve ROS oluşumuna yol açtığı ve diğer fazlara kıyasla G2/M fazında hücre içine daha yüksek oranda alındığı, bununla birlikte S ve G2/M fazında hücre döngüsü durmasını indükleyebildiği gösterilmiştir (Patel vd., 2016).

STAT5 transkripsiyon faktörünün hedef genleri arasında yer alan hücre döngüsünü ve proliferasyonunun regülasyonunu sağlayan Cdc25a, siklin A, E ve D1 gibi önemli proteinleri ifade eden genler yer almaktadır (Polak vd., 2019). STAT5 ifadesindeki artışla birlikte hedef genlerin ekspresyonlarında meydana gelen artış hücre döngüsü fazları arasındaki bu değişimi normal ve STAT5+ hücreler için açıklayabilir. Diğer bir taraftan kolorektal kanser hücre hatlarında STAT5'in inhibe edildiğinde G1 fazında hücre döngüsünün tutulu kalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Xiong vd., 2009). ZnO NP'nin hücre döngüsü fazlarına etkisi HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücreleri üzerinde incelendiğinde ise kontrol gruplarına oranla anlamlı bir farkın meydana gelmediği belirlenmiştir.

ZnO NP'nin tek bir hücrenin koloni oluşturma yeteneğine etkisini belirleyebilmek amacıyla koloni formasyon testi gerçekleştirilmiştir. Diğer bir taraftan ZnO NP'nin RCC hücreleri üzerindeki uzun süreli etkisini gözlemlemek amaçlanmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilen 5×10^3 hücreler 24 saat 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu yaklaşık %70-80 konfluent duruma geldiğinde hücreler kristal viyole ile boyanmıştır. A-498 hücre hattında uygulanan 15 ve 25 µg/ml ZnO NP konsantrasyonlarının her ikisi de kontrol grubuna oranla koloni sayılarını azaltmış ve koloni oluşturma yeteneklerini anlamlı derecede baskılanmıştır. 25 µg/ml ZnO NP uygulaması 15 µg/ml ZnO NP'ye kıyasla koloni oluşturma potansiyelini daha fazla baskılamıştır. STAT5+ A-498 hücrelerinde ise 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamalarıyla koloni oluşturma potansiyelleri baskılanmıştır.

STAT5+ A-498 hücreleri ile normal A-498 hücrelerinin kontrol grupları kıyaslandığında koloni çaplarında artış meydana geldiği belirlenmiştir.

Benzer şekilde Caki-1 hücre hattında da 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamaları kontrole oranla koloni oluşturma yeteneklerini baskılamıştır. Bununla birlikte STAT5+ Caki-1 hücrelerinde 15 µg/ml ZnO NP uygulamasıyla koloni sayılarında anlamlı bir değişim meydana gelmezken 25 µg/ml ZnO NP uygulaması koloni sayısını anlamlı bir derecede azaltmıştır. Koloni oluşturma potansiyeli açısından incelendiğinde Caki-1 hücreleri STAT5+ Caki-1 hücrelerine kıyasla ZnO NP uygulamalarına daha duyarlıdır.

Ayrıca STAT5+ Caki-1 hücrelerinde STAT5 ifadesinin artırılması koloni çaplarında artış meydana getirmiştir. RCC hücrelerinde STAT5 ifadesinin artışıyla birlikte koloni çaplarının artması STAT5'in proliferasyon ile ilişkili hedef genlerinin ürünleriyle ilgili olabilir.

786-O ve 769-P ccRCC hücre hatlarıyla gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise 30 µg/ml ZnO NP uygulamasının koloni oluşturma potansiyelini anlamlı oranda baskıladığı belirtilmiştir (Zhou ve Cao, 2022). Ovaryum kanseri hücre hatlarıyla gerçekleştirilen diğer bir çalışmada uygulanan 30 µg/ml ZnO NP'nin koloni oluşturma yeteneğini anlamlı derecede baskıladığı gösterilmiştir (Gu ve Yang, 2023).

HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde her iki konsantrasyonda da ZnO NP'nin koloni oluşturma yeteneğini anlamlı şekilde baskıladığı belirlenmiştir. Normal ve STAT5+ HEK-293 hücreleri karşılaştırıldığında 15 µg/ml ZnO NP uygulaması normal HEK-293 hücrelerde STAT5+ HEK-293'lere kıyasla koloni oluşturma potansiyeli daha az baskılanmıştır. 25 µg/ml ZnO NP uygulamasının etkisi koloni oluşturma yeteneğinin baskılanması açısından 15 µg/ml ZnO NP'ye göre daha fazladır. MTT hücre canlılık testi sonuçlarıyla korele olarak HEK-293 hücrelerine oranla STAT5+ HEK-293 hücreleri 15 µg/ml ZnO NP'ye daha duyarlıdır.

Hücre canlılığı, sağkalımı ve koloni formasyon testlerinin yanı sıra ZnO NP'nin uygulamasının etkileri farklı floresan probalar kullanılarak görüntülenmiştir. ZnO NP'nin hücre ölümüne etkisi PI boyama ile, MMP kaybına etkisi DiOC₆ boyama ile, DNA hasarı DAPI boyama ile ve mitokondriyal fonksiyona etkisi Mitotracker ile belirlenmiştir.

RCC hücre hatlarında 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamalarıyla kontrole oranla ölü hücre sayısındaki artışla bağımlı olarak kırmızı renkli PI ışması da artış göstermiştir.

Diğer bir taraftan ZnO NP'nin DNA hasarı oluşumuna etkisi konsantrasyona bağımlı olarak artış göstermiştir. Benzer şekilde konsantrasyona bağımlı olarak ZnO NP uygulamasıyla MMP kaybında artış gösterilmiştir. Gerçekleştirilen Mitotracker boyama sonuçlarına göre uygulanan ZnO NP ile birlikte kontrole oranla mitokondriyal fonksiyonda azalma meydana gelmiştir. STAT5+ RCC hücrelerinde ise normal RCC hücrelerine benzer olarak konsantrasyona bağımlı şekilde ölü hücre sayısı, DNA hasarı, MMP kaybı ve mitokondriyal fonksiyonda kayıp artış göstermiştir. PI boyama sonuçlarına göre ZnO NP'ye karşı STAT5+ RCC hücreleri normal RCC hücrelerine oranla daha dirençlidir. DNA hasarı açısından incelendiğinde STAT5+ RCC hücrelerinde normal hücrelere kıyasla daha az ışıma görülmüştür. MMP ve mitokondriyal fonksiyon kaybı açısından da ZnO NP'ye karşı normal RCC hücreleri daha duyarlıdır. Diğer bir taraftan RCC hücreleri kendi aralarında kıyaslandığında Caki-1 hücreleri A-498 hücrelerine oranla ZnO NP'ye karşı daha dirençlidir.

HEK-293 ve STAT5+ hücrelerinde ise ZnO NP uygulamalarıyla birlikte konsantrasyona bağımlı olarak hücre ölümüne bağlı PI ışımasında artış meydana gelmiştir. Diğer bir yandan ZnO NP uygulaması konsantrasyona bağımlı olarak MMP kaybında artışa neden olmuştur. Ayrıca DAPI boyama ile birlikte gösterilen DNA hasarı, ZnO uygulamasıyla kontrole oranla artmıştır. Mitotracker boyama ile HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasının mitokondriyal fonksiyonu azalttığı belirlenmiştir. ZnO NP'nin malignant karakterdeki RCC hücrelerinde hücre ölümünü tetiklemesi ancak HEK-293 hücre hatlarında benzer bir etki yaratmaması beklenirken tüm hücre hatlarında ZnO NP uygulaması MMP kaybına ve hücre ölümüne neden olmuştur. Benzer şekilde ZnO NP kuantum noktalarının HeLa ve HEK-293T hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada MMP kaybı ve hücre ölümü her iki hücre hattında da görülmüştür (Yang vd., 2020).

ZnO NP'nin hücreler üzerindeki ROS üretimi aracılı etki mekanizması göz önüne alındığında RCC hücrelerinde ROS üretimini nasıl etkilediği incelenmesi gerekmiştir. Bu nedenle hücreler 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP'ye maruz bırakılmış ve daha sonra DCFH-DA boyaması gerçekleştirilmiştir. Floresan görüntülemenin ardından hücreler tripsinlenerek kaldırılmış ve akış sitometrisinde analiz edilmiştir.

Tüm hücre hatlarında uygulanan 15 µg/ml ZnO NP'nin ROS oluşumunu kontrole oranla indüklediği belirlenmiştir. Bununla birlikte STAT5+ A-498 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulaması, normal A-498 ve HEK-293 hücrelerine ZnO

NP uygulamasına kıyasla ROS oluşumunun daha fazla indüklenmesine neden olmuştur. Lösemi hücreleriyle gerçekleştirilen bir çalışmada STAT5 aktivasyonunun ROS oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Bu durum STAT5'in antioksidan enzimleri kodlayan birkaç genin (katalaz ve glutaredoksin-1) transkripsiyonunu inhibe ederken aynı zamanda NADPH oksidazın transkripsiyonunu arttırmasıyla açıklanmıştır (Mi vd., 2018).

ZnO NP'nin apoptotik hücre ölümüne etkisini belirlemek amacıyla Annexin V/PI boyama ile akış sitometrisinde analiz gerçekleştirilmiştir. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulaması ile birlikte geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonunda anlamlı bir artış meydana gelmiştir. STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulaması apoptotik hücre popülasyonunda anlamlı bir artışa neden olmazken STAT5+ Caki-1 hücrelerinde kontrole oranla apoptotik hücre sayısında %2,8 artış meydana gelmiştir. Bununla birlikte STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulaması nekrotik hücre sayısını da arttırmıştır. HEK-293 hücrelerine 24 saatlik ZnO NP uygulaması erken apoptotik hücre popülasyonunu arttırmıştır. STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise kontrol grubuna oranla anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Başka bir çalışmada ZnO NP uygulamalarının Caki-1, 769P ve 786-O RCC hücre hatlarında apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Wang vd., 2022).

ZnO NP'nin apoptotik protein ifadelerine etkisi immünoiblotlama ile analiz edilmiştir. Normal A-498 hücrelerine ZnO NP uygulamasıyla kesilmiş kaspaz 8 ifadesinde kontrole oranla anlamlı bir değişim meydana getirmezken, kesilmiş kaspaz 3 ifadesinde artış meydana gelmiştir. Kaspaz 8 proteininin kesilmiş formunun ifadesinde kontrole oranla değişim meydana gelmemesi A-498 hücrelerinin ZnO NP uygulamasına yanıt olarak ekstrinsik apoptotik yolağı tercih etmiyor olması olabilir. Bununla birlikte A-498 hücrelerinde her iki apoptotik yolun ortak kaspazı olan kaspaz 3'ün kesilmiş formunda ZnO NP uygulamasıyla meydana gelen intrinsik apoptoz sinyal yolağına bağlı bir apoptotik ölüme uğradığını gösteriyor olabilir. Bununla birlikte ZnO NP'nin intrinsik apoptoz sinyalini indüklediğini gösterebilmek için kaspaz 9 gibi diğer proteinlerin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca Annexin V/PI analizi göz önüne alındığında ZnO NP uygulaması hücrelerde apoptoz ile birlikte nekroza da neden olmuştur. Diğer bir taraftan STAT5+ A-498 hücrelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 8'in kesilmiş formlarının ekspresyonlarında kontrole oranla anlamlı bir

değişim meydana gelmemiştir. STAT5 ifadesinin arttırılması hücreleri apoptoz dışında başka bir hücre ölüm yolağını indüklüyor olabilir.

Hem normal Caki-1 hem de STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulamasıyla kesilmiş kaspaz 3 ve kesilmiş kaspaz 8 ifadelerinde kontrole oranla anlamlı bir değişim meydana gelmiştir. Bu durum Annexin V/PI analizi verilerini destekler niteliktedir.

A-498 ve Caki-1 hücrelerinin ZnO NP uygulamasına farklı yanıt gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte gerçekleştirilen bazı çalışmalarda herhangi bir ajan uygulamasına bağlı olarak A-498 ve Caki-1 hücrelerinin birbirlerinden farklı protein ifadesi gösterebileceği bazı çalışmalarda görülmektedir (Markowitsch vd., 2020; Juengel vd., 2015).

RCC hücrelerine benzer şekilde karaciğer kanseri hücre hattı HepG2’de ZnO NP uygulaması gerçekleştirildiğinde kaspaz 3 ifadesinde artış meydana geldiği gösterilmiştir (Akhtar vd., 2012). Diğer bir çalışmada ise ZnO NP uygulamalarının meme kanseri hücre hatlarında kaspaz-8 aracılı ekstrinsik apoptoz yolağını indüklediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte uygulanan ZnO NP konsantrasyonunun artışıyla birlikte kaspaz 8 ifadesinde artış meydana gelmiştir (Kadhem vd., 2019). ZnO NP uygulamalarının dokuya spesifik olarak hücrelerin apoptozun ekstrinsik ya da intrinsik yolunu tercih edebileceği farklılık göstermektedir. Bununla birlikte ZnO NP’nin ferroptoz, otofaji ya da mitofajiye neden olabileceği de gösterilmiştir (Wiesmann vd., 2020). RCC hücrelerinde ZnO NP’nin hangi hücre ölümüne neden olduğu daha detaylı olarak araştırılmalıdır.

HEK-293 hücrelerinde ise kontrole oranla ZnO NP uygulaması kesilmiş kaspaz 8 ifadesinde kontrole oranla artış meydana getirirken, kesilmiş kaspaz 3 ifadesinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Annexin V/PI analizine göre ise HEK-293 hücrelerine ZnO NP uygulanması hücre popülasyonunun %3,9’unun erken apoptotik durumda bulunmasına neden olmuştur. STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise ZnO NP uygulaması kontrole oranla kesilmiş kaspaz 3 ve kesilmiş kaspaz 8 ifadesini arttırmıştır.

ZnO NP’nin asidik vakuol oluşumuna etkisi Lysotracker boyama ile analiz edilmiştir. RCC ve HEK-293 hücrelerinde bir grup 24 saat boyunca 15 µg/ml ZnO NP’ye, diğer grup ise pozitif kontrol olarak değerlendirilen mTOR inhibitörü 1 µM Rapamisin uygulamasına maruz bırakılmıştır. Daha sonra hücreler Lysotracker ile boyanarak asidik vakuollerin sayı ve büyüklükleri analiz edilmiştir. Normal ve STAT5+ RCC

hücre hatlarında ZnO NP uygulamasıyla birlikte kontrol ve Rapamisin uygulanan gruplara oranla asidik vakuol oluşumunda artış meydana gelmiştir.

RCC hücrelerine benzer şekilde ZnO NP uygulamasının, PC12 hücre hattında otofagozom oluşumunu aktive ederek asidik vakuol sayısında artış meydana getirdiği gösterilmiştir (Liu vd., 2020). Benzer şekilde THP-1 hücre hatlarında ve *in vivo* analizlerde ZnO NP uygulamalarının hücrelerde asidik vakuol oluşumunu indüklediği belirtilmiştir (Cho vd., 2011).

HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise ZnO NP ve Rapamisin uygulamaları benzer şekilde kontrole oranla asidik vakuol sayı ve büyüklüğünü arttırmıştır. Benzer şekilde başka bir çalışmada normal böbrek hücre hattı olan HK-2'ye ZnO NP uygulaması gerçekleştirildiğinde otofajinin tetiklendiği gösterilmiştir (Kim vd., 2023). ZnO NP'nin asidik vakuol oluşumuna etkisinin yanı sıra otofajik protein ifadelerine etkileri immüno blotlama ile analiz edilmiştir. Normal ve STAT5+ hücre hatları 15 µg/ml ZnO NP'ye 24 saat maruz bırakıldıktan sonra protein izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Ardından immüno blotlama gerçekleştirilerek proteinler Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B antikorları ile prolanmıştır.

ZnO NP uygulaması A-498 hücrelerinde kontrole oranla Atg5 ve LC3 A/B ifadesinde artışa sebep olmuştur. Ayrıca ZnO NP uygulamasıyla otofagozom ilişkili protein LC3 A/B'nin kesilmiş 14 kDa'lık formu da gözlemlenmiştir. Otofaji yolağını uyaran sinyalin ardından Beclin-1'in de içinde bulunduğu bir protein kompleksi membran çekirdeklenmesini sağlayarak otofagozom oluşumunu başlatır. Ardından Atg5, Atg12 ve Atg16L proteinleri otofagozom zarının tamamlanmasını sağlar. Daha sonra LC3 A/B proteini kesilerek otofagozomun asidik lizozom ile birleşmesini indükler (Kocatürk ve Gözüaık, 2018). ZnO NP uygulamasıyla birlikte Atg5 ve LC3 A/B ifadesindeki artış hücrelerin otofaji aracılı hücre ölümünü de tercih ettiğini göstermektedir. Diğer bir taraftan ZnO NP'nin LC3 A/B ifadesinde artışa neden olduğu, hücrelere floresan işaretli LC3 plazmidinin transfeksiyonu sağlanarak da gösterilmiştir. Ancak immüno blotlama sonuçlarında dikkat çekici olarak LC3 A/B proteininin kesilmiş formunun gözlemlenmiş olması A-498 hücrelerinde ZnO NP'nin otofajiye neden olduğunun önemli bir göstergesidir. ZnO NP'nin HeLa hücrelerinde otofajiyi indüklediği farklı ZnO NP çeşitleri kullanılarak diğer bir çalışmada gösterilmiştir (Popp ve Segatori, 2019).

STAT5+ A-498 hücrelerinde ise 24 saatlik ZnO NP uygulamasıyla kontrole oranla Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B ifadelerinde anlamlı bir değişim meydana gelmemiştir. Bununla birlikte GFP-LC3 plazmidi aktarılan STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulamasıyla birlikte STAT5+ kontrole oranla LC3 ekspresyonunda artış meydana geldiği gösterilmiştir. Ancak ZnO NP uygulanan normal ve STAT5+ hücreler karşılaştırıldığında STAT5+ A-498 hücrelerinin ZnO NP'ye oluşturan otofajik cevaba karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol olarak uygulanan ve otofajiyi mTOR proteinini inhibe ederek uyaran Rapamisin uygulamasına karşı oluşturulan cevap LC3 ekspresyonu açısından incelendiğinde ZnO NP, A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde daha anlamlı etki göstermiştir. STAT5+ A-498 hücrelerin otofajiye karşı direnç göstermesi STAT5'in çeşitli kanser tiplerinde otofajiyi baskılayabildiğini gösteren çalışmalarla açıklanabilir (Jung vd., 2022).

Caki-1 hücre hattında ZnO NP uygulamasıyla kontrol grubuna oranla Beclin-1, Atg5 ve kesilmiş LC3 A/B formunun ifadesi artmıştır. ZnO NP'nin Caki-1 hücrelerinde otofajiyi tetiklediği immüno blotlamanın yanı sıra GFP-LC3 plazmidi transfeksiyonu yoluyla da gösterilmiştir. ZnO NP uygulamasıyla birlikte kontrol grubuna oranla GFP-LC3 ifadesinde artış meydana gelmiştir. Bununla birlikte pozitif kontrol olarak uygulanan Rapamisin'e oranla ZnO NP'nin etkisi Caki-1 hücrelerinde LC3 ifadesini kontrole oranla daha anlamlı olarak arttırmıştır.

STAT5+ Caki-1 hücreleri incelendiğinde ZnO NP uygulamasıyla kontrol grubuna oranla Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B ifadelerinde artış meydana gelmiştir. İmmüno blotlama sonuçlarına göre STAT5+ A-498 hücrelerinde olduğu gibi STAT5 ifadesindeki artış Caki-1 hücrelerinde otofajiye karşı bir direnç mekanizması geliştirilmesine neden olmamıştır.

Ayrıca GFP-LC3 plazmidi transfeksiyonu ve ZnO NP uygulaması gerçekleştirildiğinde A-498 ile benzer şekilde Caki-1 hücrelerinde de LC3 ifadesinde artış meydana geldiği gösterilerek ZnO NP'nin RCC hücrelerinde otofajiye neden olduğu doğrulanmıştır.

HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasıyla Beclin-1, Atg5 ve LC3 A/B ifadeleri kontrole oranla anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Bununla birlikte kontrole göre ZnO NP uygulamasıyla LC3 A/B proteininin kesilmiş formu da gözlemlendiğinden hücrelerin ZnO NP etkisiyle otofajiye uğradığı belirlenmiştir. ZnO NP'nin nefrotoksositeye etkisinin araştırıldığı ve HEK-293 hücrelerinin kullanıldığı başka bir

çalışmada ZnO NP uygulamasının HEK-293 hücrelerinde otofajiyi indüklediği gösterilmiştir (Lin vd., 2016). LC3 ifadesindeki artış, immünoiblotlamanın yanı sıra GFP-LC3 plazmidi aktarılıp ZnO NP uygulanan HEK-293 hücrelerinde de gösterilmiştir. Bununla birlikte LC3 ifadesi ZnO NP uygulamasıyla STAT5+ HEK-293 hücrelerinde kontrole ve normal HEK-293 hücrelerine oranla anlamlı derecede artış göstermiştir. Ayrıca immünoiblotlamaya göre STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ZnO NP uygulamasıyla LC3 A/B ifadesindeki artış doğrulanmıştır. STAT5+ HEK-293 hücrelerde ZnO NP'nin otofajiyi indüklemiştir. STAT5 ifadesindeki artış ve ZnO NP uygulaması hücrelerde ROS oluşumunu indüklemektedir (Mi vd., 2018). Bununla birlikte hücre içi ROS miktarının artışı hücrelerde otofajiyi tetikleyebilir (Redza-Dutordoir ve Averill-Bates, 2021).

Hücre ölümü göz önüne alındığında RCC hücrelerinin kullanıldığı bu tez çalışmasında çeşitli analiz yöntemleriyle ZnO NP'nin apoptozu ve otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Benzer şekilde ovaryum kanseri hücre hattı SKOV3 ile gerçekleştirilen bir çalışmada ZnO NP'nin hem apoptozu hem de otofajiyi indükleyebileceği belirlenmiştir (Bai vd., 2017).

ccRCC'nin en iyi tanımlanmış risk faktörü obezitedir. Bu nedenle obezite ve ccRCC'nin lipid metabolizmasındaki değişikliklerle ilişkili olması şaşırtıcı değildir. Lipid metabolizması, enerji depolama ve sinyal iletiminde çok önemli olan fonksiyonel bir süreç olarak görev almaktadır. Lipid metabolizmasının düzensizliği, tümörün agresif davranışına katkıda bulunduğu düşünülen ccRCC'de yaygın bir anormalliktir. Sıklıkla ccRCC'de lipid sentezi ve depolanması yukarı regüle edilirken, lipid kullanımı ve oksidasyonu aşağı regüle edilir ve bu durum kolesterol, yağ asitleri ve trigliseritlerin birikmesine neden olur. Lipid metabolizmasının yeniden programlanması, yağ asitlerinin β -oksidasyonunu inhibe ederken hücre zarı sentezini ve hücre çoğalmasını desteklemektedir (Zhu vd., 2023).

Lipitler sadece enerji sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre büyümesini ve proliferasyonunu kontrol eden sinyal molekülleri olarak da işlev görür. Bu nedenle lipid metabolizmasını hedeflemek, ccRCC için potansiyel bir terapötik strateji olarak ortaya çıkmıştır. Lipid metabolizmasında rol oynayan spesifik enzimlerin veya sinyal yollarının belirlenmesi, yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yol açabilir (Zhu vd., 2023).

Son alışmalar miRNA'ların gen ekspresyonunu düzenlemede etkin rol aldığını ve kanser gelişiminde proliferasyon, farklılaşma, metastaz ve apoptoz dahil olmak üzere önemli hücresel süreçleri modüle edebildiklerini göstermiştir. Çeşitli kanser tiplerinde onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak görev alan miR-33a, karsinogenez ile yakından ilişkili olan hücresel kolesterol alımını ve sentezini kontrol eden bir miRNA olduğundan lipit metabolizmasının incelenmesinde tercih edilmiştir (Gao vd., 2020). RCC yağ asit metabolizmasının regülasyonundaki bozulmayla karakterize olduğundan ve heterojen bir yapı gösterdiğinden ZnO NP'nin yağ asit metabolizmasına etkisi de araştırılmıştır. RCC'de yağ asit metabolizmasına STAT5 ifadesindeki artışı ve ZnO NP uygulamalarının etkisi nötral lipit tanecikleri ve lipit metabolizmasında görevli proteinler açısından analiz edilmiştir. Bununla birlikte hem RCC hücre hatlarındaki miR-33a seviyeleri belirlenmiş hem de gerçekleştirilen transfeksiyonun başarısı tespit edilmiştir.

Lipit damlacıkları, triaçilgliserol, kolesterol esterleri ya da ailtransferaz gibi lipojenik enzimleri içerebilirler. Lipit damlacıklarının birikmesi pankreas kanseri, glioblastom ve prostat kanseri ve RCC dahil olmak üzere birçok kanserde tespit edilmiştir (Zhou vd., 2020). Lipit birikiminin baskılanması ya da ailtransferazın inhibe edilmesi kanser hücrelerinde proliferasyonu engelleyebilir. Bu nedenle ZnO NP'nin RCC hücrelerinde lipit birikimini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Ayrıca daha önce pankreas kanseri hücre hatlarında palbociclib'in lipit birikimini azaltarak hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Rencüzoğulları, 2020).

Hücrede nötral lipit taneciklerinin sayı ve boyutlarındaki değişimi incelemek amacıyla 24 saat boyunca 15 g/ml ZnO NP'ye maruz bırakılan normal ve STAT5+ hücreler daha sonra fikse edilerek BODIPY ile boyanmış ve floresan görüntüleme sağlanmışır. A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulaması lipit damlacıklarının boyutlarında kontrole oranla anlamlı bir farka neden olmamıştır. 15 g/ml ZnO NP uygulaması, STAT5+ A 498 hücrelerinde nötral lipit damlacıklarının boyutlarında küçülmeye sebep olmuştur. Benzer şekilde Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ZnO NP uygulaması lipit damlacıklarının boyutlarında küçülme meydana getirmiştir. Benzer şekilde çeşitli anti kanser ajanların uygulanması yağ asit metabolizmasının modülasyonu ile lipit birikimini etkileyebileceği çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir (Germain vd., 2020; Rencüzoğulları vd., 2021). Diğer bir taraftan tez çalışmasında 24 saatlik ZnO NP

uygulamasının kontrol gruplarına oranla HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde lipid damlacıklarının birikiminde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. İlginç bir şekilde tüm hücre hatlarında STAT5 ifadesinin arttırılması lipid damlacıklarının boyutlarında artışa neden olmuştur. Bununla birlikte STAT5 ile lipid metabolizması arasındaki bağlantının daha detaylı incelenmesi gerektiğinden yağ asit metabolizmasında görevli proteinle immünoiblota yardımıyla araştırılmıştır. Ayrıca yağ asit metabolizmasıyla ilişkili proteinler incelenirken, kolesterol metabolizmasının önemli bir regülatörü olan miR-33a mimik edildiği ve hem miR-33a'nın mimik edildiği hem de ZnO NP uygulandığı birer grup hücreden protein izole edilerek çalışmaya dahil edilmiştir.

miR-33a'nın RCC dokularında tümör baskılayıcı olarak davrandığı ve ifadesindeki azalmanın kötü sağkalımla ilişkilendirildiği bilinmektedir (Gao vd., 2020). Bu nedenle çalışmada miR-33a'nın mimik edilmesi tercih edilmiştir. RCC hücre hatlarında normalde miR-33a ifadelerinin belirlenmesi ve mimik transfeksiyonunun başarısı miR-33a'ya spesifik primerler kullanılarak qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Normal koşullarda Caki-1 hücrelerinde A-498 hücre hattına oranla miR-33a seviyeleri daha yüksektir. Ayrıca miR-33a mimik transfeksiyonu gerçekleştirilen A-498 ve Caki-1 hücrelerinde hücre içi miR-33a ifadesi kontrole oranla başarılı şekilde arttırılmıştır.

miR-33a mimik transfeksiyonu ve 24 saatlik ZnO NP uygulamalarının ardından tüm hücre hatlarından protein izole edilerek immünoiblota gerçekleştirilmiştir. Ardından proteinler FASN, ACC, Lipin-1 ve SREBF2 antikorları ile problanmıştır. ccRCC hasta dokularıyla gerçekleştirilen çalışmalarda FASN ekspresyonundaki artışın tümör agresifliği ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmiştir (Zhu vd., 2023). Her iki RCC hücresinin normal ve STAT5+ kontrol gruplarında FASN ifadesindeki artış STAT5 ile hücrelerin daha agresif karakter kazandığını yağ asit metabolizması açısından da göstermektedir.

STAT5 ifadesi arttırılan RCC hücrelerinde yağ asit metabolizmasıyla ilişkili proteinlerin ifadeleri normal hücrelere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. STAT5b ile yağ asit metabolizması arasındaki bu bağlantının daha iyi araştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte STAT5a ifadesinin mide kanserinde artış gösterdiği ve bu durumun yağ asit metabolizması sinyali ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mide kanseri hücre hatlarında STAT5a'nın yağ asidi bağlayıcı protein FABP5'e bağlanarak ifadesini düzenlediği tespit edilmiştir. Ayrıca STAT5a'ya bağımlı FABP5

ekspresyonunun, hücre içi yağ asidi metabolizmasını yeniden programlayarak mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve tümörigenezini desteklediği gösterilmiştir (Dong vd., 2019). Ayrıca karaciğer kanseri hücre hatlarında ve *in vivo* modellerle gerçekleştirilen diğer bir çalışmada STAT5 ifadesindeki artışın lipogenezi desteklediği belirlenmiştir. Bununla birlikte karaciğerde STAT5 ifadesinin arttırılmasının SREBP1, FASN ve ACC proteinlerin ifadelerinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2019).

Diğer bir taraftan A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulaması kontrole oranla ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerinde artışa sebep olmuştur. Normal ve STAT5+ A-498 hücrelerinde FASN ifadesi ZnO NP uygulamasıyla kontrole göre anlamlı bir değişim göstermemiştir. Caki-1 hücrelerine ZnO NP uygulaması tüm yağ asit metabolizması proteinlerinin ifadesini kontrole oranla arttırmıştır. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ise ZnO NP uygulaması yağ asit metabolizması proteinlerinin ifadelerinde kontrole oranla anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir.

A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerinde tek başına miR-33a uygulaması FASN, ACC, SREBF2 ve Lipin-1 ifadelerini kontrole oranla arttırmıştır. STAT5+ A-498 hücrelerinde miR-33a mimik transfeksiyonu yağ asit metabolizması proteinlerinin ifadesinde kontrole oranla anlamlı bir değişim meydana getirmemiştir. Caki-1 hücrelerine miR-33a mimik uygulaması FASN ve Lipin-1 ifadesinde artışa neden olmuştur. STAT5+ Caki-1 hücrelerinde ise miR-33a mimik transfeksiyonu kontrole oranla ACC ve SREBF2 ifadelerinin artmasına, Lipin-1 ifadesinin azalmasına neden olmuştur. miR-33a ve ZnO NP'nin birlikte uygulanması ise normal ve STAT5+ RCC hücrelerinde ifadesi araştırılan tüm proteinlerde kontrole oranla artışa sebep olmuştur. Yağ asidi ve kolesterol biyosentez yollarındaki birçok enzim, onkogenik PI3K/Akt/mTORC1 sinyal yolu veya hücre döngüsü düzenleyicileri tarafından aktive edilen sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinlerin (SREBP) ifadeleri çoğu kanser tipinde transkripsiyon faktörleri tarafından arttırılmaktadır (Zhu vd., 2023).

RCC hücrelerinde ZnO NP ve miR-33a uygulamaları yağ asit metabolizmasıyla ilişkili proteinlerin ifadelerinde artış meydana getirerek yağ asidi sentezini desteklemektedir. Diğer bir taraftan bazı *in vivo* çalışmalar ZnO NP'lerin lipit profillerinde değişime sebep olduğunu ve uzun süreli etkisi göz önüne alındığında kolesterol miktarlarında artışa sebep olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte ZnO NP'lerin konsantrasyona, uygulama yoluna ve maruz kalma süresine bağlı olarak lipit değişikliklerine neden

olduğu bildirilmiştir (Ceballos-Gutiérrez vd., 2021). Ayrıca miR-33a'nın kanser tipine göre sergilediği etki profili farklılık göstermektedir (Gao vd., 2020). miR-33a ve ZnO NP'nin birlikte uygulanması ise hücre hattına göre farklı etkiler yaratmıştır. Dokuya göre değişken yanıtlar sebebiyle yağ asit metabolizması ve ZnO NP arasındaki ilişki daha detaylı olacak şekilde incelenmelidir.

Gerçekleştirilen tüm analizler sonucunda RCC ve HEK-293 hücrelerinde ZnO NP'nin hücre sağkalımını konsantrasyona bağımlı olarak azalttığı belirlenmiştir. STAT5 ifadesi arttırılan RCC hücreleri normal RCC hücrelerine oranla ZnO NP'ye karşı daha dirençlidir. HEK-293 hücrelerinde STAT5 ifadesindeki artışın ZnO NP'ye karşı bir direnç geliştirmesinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Bu durum malignant karakterde olmayan hücrelerde JAK/STAT sinyal yolağının geri besleme mekanizmalarıyla düzgün şekilde regüle edilmesiyle açıklanmıştır. Diğer bir taraftan 15 ve 25 µg/ml ZnO NP uygulamaları hem normal hem de STAT5+ RCC ve HEK-293 hücrelerinde zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu baskılamıştır. STAT5+ RCC hücreleri normal RCC hücre hatlarına kıyasla ZnO NP'nin hücre proliferasyonunu baskılama özelliğinden daha az etkilenmiştir. ZnO NP'nin hücre döngüsü fazlarına etkisi de analiz edilmiştir. RCC ve STAT5+ RCC hücreleri ZnO NP uygulamasıyla hücre döngüsünün G2/M fazında tutulu kalmıştır. HEK-293 ve STAT5+ HEK-293 hücrelerinde ise bu durum söz konusu değildir. RCC hücrelerinin G2/M fazında tutulu kalması, literatürdeki diğer malignant karakterdeki hücre hatlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarla desteklenmiştir. Diğer bir taraftan ZnO NP'nin hücrelere konsantrasyona bağımlı olarak uzun süreli etkisi ve koloni oluşturma potansiyellerine etkisi koloni formasyon testi ile değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen analiz sonucunda 15 ve 25 µg/ml ZnO NP her iki konsantrasyonda da tüm hücre hatlarında koloni oluşturma potansiyelini anlamlı derecede baskılamıştır. Bununla birlikte koloni oluşturma potansiyeline etkisi bakımından 25 µg/ml ZnO NP uygulaması 15 µg/ml ZnO NP uygulamasına oranla daha etkilidir. ZnO NP'nin etkisinin yanı sıra, ilginç bir şekilde STAT5 ifadesi arttırılan hücre hatlarında koloni çaplarında artış meydana gelmiştir. STAT5 ifadesindeki artışın RCC hücrelerinin morfolojilerinde de mezenkimal karakteri indükleyerek uzun podlar oluşturmalarına neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca STAT5 ifadesindeki artış berrak sitoplazmik içeriğin vakuollü bir içerikle değişmesine sebep olmuştur. Her ne kadar literatürde STAT5'in EMT'yi desteklediği gösterilse de RCC hücrelerinde morfolojik değişikliklere neden olduğuyla ilgili daha

ileri araştırmalar gerçekleştirilmelidir. Ayrıca RCC hücrelerinde STAT5 ifadesindeki artış ZnO NP'ye direnç geliştirmede etkili olmuştur. Bu nedenle RCC'de STAT5'in ilaç direnciyle ilişkisi ileride gerçekleştirilecek çalışmalar için önemlidir. ZnO NP'ye verilen yanıtın STAT5 ifadesindeki artış dışında RCC alt tiplerinde de farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Aynı dokudan köken almasına karşın primer A-498 ve metastatik Caki-1 hücre hatlarının uygulanan ZnO NP'ye karşı farklı yanıtlar oluşturması tümör heterojenitesi araştırmaları bakımından önemlidir. ZnO NP'nin hücre ölümüne, MMP kaybına ve DNA hasarına etkisi tez kapsamında floresan probler aracılığıyla da incelenmiştir. ZnO NP tüm hücre hatlarında konsantrasyona bağımlı olarak hücre ölümüne, DNA hasarına ve MMP kaybına neden olmaktadır. Bununla birlikte hücre sağkalımının ve proliferasyonunun araştırıldığı diğer verileri destekler şekilde STAT5+ RCC hücreleri ZnO NP uygulamalarına karşı daha dirençlidir. Ayrıca metastatik Caki-1 ve STAT5+ Caki-1 hücrelerinin primer A-498 ve STAT5+ A-498 hücrelerine oranla ZnO NP'ye daha dirençli olduğu floresan probler aracılığıyla da gösterilmiştir.

Ayrıca ZnO NP'nin RCC'de hücre ölümünü hangi yolla indüklediğini analiz etmek açısından ROS retimi üzerindeki etkisi floresan görüntüleme ve akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Analizlere göre RCC hücrelerinde ZnO NP ROS oluşumunu indüklemektedir. Bununla birlikte STAT5+ hücrelerde ZnO NP uygulaması ROS oluşumunu daha fazla indüklemiştir ve bu durum STAT5 ifadesinde artışın antioksidan enzim üretimine ket vurmasıyla açıklanmıştır.

Literatürdeki alışmalar ZnO NP'nin dokuya spesifik olarak apoptoz, otofaji, nekroz, ferroptoz ya da mitofaji gibi hücre ölüm yolaklarını tercih edebileceğini göstermektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında ZnO NP'nin RCC hücrelerine etkisi apoptoz ve otofaji yolakları açısından incelenmiştir. Apoptoz ve ZnO NP ilişkisi incelendiğinde uygulanan 15 µg/ml ZnO NP konsantrasyonunun hücrelerde nekroza ve apoptoza neden olduğu Annexin V/PI boyama ile gösterilmiştir. Diğer bir yandan ZnO NP uygulamasıyla apoptotik popülasyonlar arasında HEK-293 için anlamlı bir fark gözlemlenememiştir. 15 µg/ml ZnO NP uygulamasının apoptotik proteinlere etkisi ise immnoblottlama ile kesilmiş kaspaz 3 ve kesilmiş kaspaz 8 aracılı olarak değerlendirilmiştir. Normal A-498 hücrelerinde ZnO NP uygulamasıyla kontrole oranla kesilmiş kaspaz 8 ekspresyonunda anlamlı bir değişim meydana gelmezken kesilmiş kaspaz 3'te artış meydana gelmesi A-498'in içsel apoptotik yolağı hücre

ölümü için tercih ettiğini gösteriyor olabilir. Bununla birlikte STAT5+ RCC ve normal Caki-1 hücrelerinde her iki kesilmiş kaspaz formunda da ekspresyon kontrole oranla artmıştır.

Literatürde ZnO NP'nin çeşitli hücre ölüm yollarını indükleyebileceği gösterilmiştir. Bu nedenle apoptotik parametrelerin yanı sıra otofajik parametreler de farklı analiz yöntemleriyle incelenmiştir. Normal ve STAT5+ RCC hücrelerinde ZnO NP uygulamaları otofajiyi indüklemektedir. Kullanılan iki RCC hücre hattında da ZnO NP uygulaması nihai olarak hücre ölümlerini tetiklese de protein ekspresyon seviyeleri gibi parametreler birbirlerinden farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle metastaz durumları farklılık gösterse de aynı dokudan köken alan bu hücre hatlarının farklı yanıtlar oluşturması klinikte tümörün heterojen bir yapı sergileyerek uygulanan anti kanser ajanlara karşı farklı yanıtlar oluşmasını sağlayacak ve tedavi olanaklarını sınırlandıracaktır.

RCC hücrelerinin ZnO NP'ye karşı bu şekilde farklı yanıt oluşturması çeşitli metabolik yolların incelenmesini gerektirmektedir. Diğer bir taraftan tez çalışmasının genel bilgiler kısmında detaylı şekilde açıklandığı üzere ccRCC dokularında lipit birikiminin gözlemlenmesi ve yağ asit metabolizması regülasyonunun bozulmasının böbreklerde lipotoksisiteye neden olarak ccRCC gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca ZnO NP'ye karşı RCC ve HEK-293 hücre hatlarının geliştirdiği farklı yanıtlar yağ asit metabolizmasının incelenmesini indüklemiştir. Bu nedenle öncelikle STAT5 ifadesindeki artışın ve ZnO NP uygulamasının nötral lipit taneciklerine etkisi analiz edilmiştir. Daha sonra lipit metabolizmasının önemli bir regülatörü olan miR-33a aracılı olarak RCC ve HEK-293 hücrelerinde yağ asit metabolizması proteomik açıdan incelenmiştir. Hem normal hem STAT5+ RCC ve HEK-293 hücrelerinde ZnO NP ve miR-33a uygulamaları yağ asidi sentezini indüklemektedir. Diğer bir taraftan STAT5 ifadesindeki artış yağ asit metabolizması proteinlerinin ifadelerinde artışa sebep olmuş ve lipit damlacığı birikiminde baskın bir rol oynamıştır.

Sonuç olarak, RCC hücrelerinde ROS'un artmasını indükleyerek seçici sitotoksisite nedeniyle ZnO NP'nin özellikle otofaji aracılı olmak üzere hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. ZnO NP'nin kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyebileceğini ve ölümünü indükleyebileceği gösteren sonuçlar, ZnO NP nin umut verici bir antikanser ajanı olacağını göstermektedir.

6. KAYNAKÇA

1. “A-498 Cell Line”, American Type Culture Collection (Online). <https://www.atcc.org/products/htb-44> (Erişim: 22.3.2024).
2. “Caki-1 Cell Line”, American Type Culture Collection (Online). <https://www.atcc.org/products/htb-46> (Erişim: 22.3.2024).
3. “Cell Lines in the In Vitro Screen”, National Cancer Institute (Online). https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.htm (Erişim: 22.3.2024).
4. “HEK-293 Cell Line”, American Type Culture Collection (Online). <https://www.atcc.org/products/crl-1573> (Erişim: 22.3.2024).
5. “Papillary Renal Cell Carcinoma”, National Cancer Institute (Online). <https://www.cancer.gov/pediatric-adult-rare-tumor/rare-tumors/rare-kidney-tumors/papillary-renal-cell-carcinoma#:~:text=Papillary%20renal%20cell%20carcinoma%20is,aggressive%20and%20grows%20more%20quickly> (Erişim: 24.02.2024).
6. “STAT5B”, UCSC Genome Browser (Online). https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A42199177%2D42276391&hgside=2133415284_ZrPeXfBz3B0zwwTdJ1qj5UahkJ58 (Erişim: 19.03.2024).
7. Aishajiang, R., Liu, Z., Wang, T., Zhou, L., Yu, D., (2023). “Recent Advances in Cancer Therapeutic Copper-Based Nanomaterials for Antitumor Therapy”. *Molecules* 2023, 28, 2303. <https://doi.org/10.3390/molecules28052303>
8. Alrushaid, N., Khan, F.A., Al-Suhaimi, E.A., Elaissari, A., (2023). “Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Treatment”. *Pharmaceutics* 2023, 15, 1025. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15031025>
9. Amreddy, N., Muralidharan, R., Babu, A., Mehta, M., Johnson, E. V., Zhao, Y. D., Munshi, A., & Ramesh, R. (2015). “Tumor-targeted and pH-controlled delivery of doxorubicin using gold nanorods for lung cancer therapy”. *International journal of nanomedicine*, 10, 6773–6788. <https://doi.org/10.2147/IJN.S93237>

10. Angori, S., Lobo, J., & Moch, H. (2022). “*Papillary renal cell carcinoma: current and controversial issues*”. *Current opinion in urology*, 32(4), 344–351. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000001000>
11. Anjum, S., Hashim, M., Malik, S.A., Khan, M., Lorenzo, J.M., Abbasi, B.H., Hano, C., (2021). “*Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment*”. *Cancers* 2021, 13, 4570. <https://doi.org/10.3390/cancers13184570>
12. Baldim, I., Oliveira, W. P., Kadian, V., Rao, R., Yadav, N., Mahant, S., Lucarini, M., Durazzo, A., Da Ana, R., Capasso, R., Souto, S. B., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). “*Natural Ergot Alkaloids in Ocular Pharmacotherapy: Known Molecules for Novel Nanoparticle-Based Delivery Systems*”. *Biomolecules*, 10(7), 980. <https://doi.org/10.3390/biom10070980>
13. Balzer, M.S., Rohacs, T., Susztak, K., (2022). “*How Many Cell Types Are in the Kidney and What Do They Do?*”. *Annu. Rev. Physiol.* 2022.84:507-531. DOI: 10.1146/annurev-physiol-052521 121841
14. Barata, P. C., Rini, B. I. (2017). “*Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions*”. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(6), 507–524. <https://doi.org/10.3322/caac.21411>
15. Beckermann, K., E., Sharma, D., Chaturvedi, S., Msaouel, P., Abboud, M. R., Allory, Y., Bourdeaut, F., Calderaro, J., de Cubas, A. A., Derebail, V. K., Hong, A. L., Naik, R. P., Malouf, G. G., Mullen, E. A., Reuter, V. E., Roberts, C. W. M., Walker, C. L., Wood, C. G., DeBaun, M. R., Van Poppel, H., ... Rathmell, W. K. (2017). “*Renal Medullary Carcinoma: Establishing Standards in Practice*”. *Journal of oncology practice*, 13(7), 414–421. <https://doi.org/10.1200/JOP.2017.020909>
16. Bildirici, K., Öner, Ü., Işıksay, S., Dündar, E., Kara, E., (1999). “*Sarkomatoid Renal Hücreli Karsinom (3 Olgu Sunumu)*. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi* 5(1-2):39-42
17. Bobulescu, I.A., Pop, L.M., Mani, C., Turner, K., Rivera, C., Khatoon, S., Kairamkonda, S., Hannan, R., Palle, K., (2021). “*Renal Lipid Metabolism Abnormalities in Obesity and Clear Cell Renal Cell Carcinoma*”. *Metabolites* 2021, 11, 608. <https://doi.org/10.3390/metabo11090608>

18. Brachet-Botineau, M., Polomski, M., Neubauer, H. A., Juen, L., Hédou, D., Viaud-Massuard, M. C., Prié, G., & Gouilleux, F. (2020). “*Pharmacological Inhibition of Oncogenic STAT3 and STAT5 Signaling in Hematopoietic Cancers*”. *Cancers*, 12(1), 240. <https://doi.org/10.3390/cancers12010240>
19. Brauch, H., Weirich, G., Klein, B., Rabstein, S., Bolt, H. M., & Brüning, T. (2004). “*VHL mutations in renal cell cancer: does occupational exposure to trichloroethylene make a difference?*”. *Toxicology letters*, 151(1), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.074>
20. Bromberg, J., Darnell, J. E., Jr (2000). “*The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function*”. *Oncogene*, 19(21), 2468–2473. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203476>
21. Calìò, A., Ammendola, S., Brunelli, M., Pedron, S., Gobbo, S., Martignoni, G., (2021). “*Parvalbumin immunohistochemical expression in the spectrum of perivascular epithelioid cell (PEC) lesions of the kidney*”. *Virchows Arch* **478**, 785–791. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02856-y>
22. Chawla, N.S., Sayegh, N., Prajapati, S., Chan, E., Pal, S.K., Chehrizi-Raffle, A., (2023). “*An Update on the Treatment of Papillary Renal Cell Carcinoma*”. *Cancers*, 15, 565. <https://doi.org/10.3390/cancers15030565>
23. Cheng, L. C., Chao, Y. J., Overman, M. J., Wang, C.-, Phan, N. N., Chen, Y. L., Wang, T. W., Hsu, H. P., Shan, Y. S., Lai, M. D. (2020). “*Increased expression of secreted frizzled related protein 1 (SFRP1) predicts ampullary adenocarcinoma recurrence*”. *Scientific reports*, 10(1), 13255. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69899-8>
24. Cheng, Z., Li, M., Dey, R., Chen, Y. (2021). “*Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives*”. *Journal of hematology & oncology*, 14(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0>
25. Chithrani, B. D., Chan, W. C. (2007). “*Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*”. *Nano letters*, 7(6), 1542–1550. <https://doi.org/10.1021/nl070363y>
26. Chu, Q., Han, N., Yuan, X., Nie, X., Wu, H., Chen, Y., Guo, M., Yu, S., & Wu, K. (2014). “*DACH1 inhibits cyclin D1 expression, cellular proliferation and tumor growth of renal cancer cells*”. *Journal of hematology & oncology*, 7, 73. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0073-5>

27. Clark P. E. (2009). “*The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy*”. *Kidney international*, 76(9), 939–945. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.296>
28. Crintea, A., Motofelea, A.C., Sovrea, A.S., Constantin, A.-M., Crivii, C.-B., Carpa, R., Dut u, A.G., (2023). “*Dendrimers: Advancements and Potential Applications in Cancer Diagnosis and Treatment—An Overview*”. *Pharmaceutics* 2023, 15, 1406. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051406>
29. Çalışkan, S., Gökçe, A.M., Gümrükçü, G., Önenek, M., (2015). “*Renal Medullary Carcinoma; A Rare Entity*” *Iran J Med Sci* March 2017; Vol 42 No 2.
30. Çeşmeli, S., Avci, C.B., (2018). “*Application of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles in Cancer Therapies*”. *Journal of Drug Targeting*. DOI: 10.1080/1061186X.2018.152733
31. Dávalos, A., Goedeke, L., Smibert, P., Ramírez, C. M., Warrier, N. P., Andreo, U., Cirera-Salinas, D., Rayner, K., Suresh, U., Pastor-Pareja, J. C., Esplugues, E., Fisher, E. A., Penalva, L. O., Moore, K. J., Suárez, Y., Lai, E. C., & Fernández-Hernando, C. (2011). “*miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9232–9237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102281108>
32. Ding, J., Chen, G., Chen, G., & Guo, M. (2019). “*One-Pot Synthesis of Epirubicin-Capped Silver Nanoparticles and Their Anticancer Activity against Hep G2 Cells*”. *Pharmaceutics*, 11(3), 123. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030123>
33. Dristant, U., Mukherjee, K., Saha, S., & Maity, D. (2023). “*An Overview of Polymeric Nanoparticles-Based Drug Delivery System in Cancer Treatment*”. *Technology in cancer research & treatment*, 22, 15330338231152083. <https://doi.org/10.1177/15330338231152083>
34. Duarte, J., Sharma, A., Sharifi, E., Damiri, F., Berrada, M., Khan, M.A., Singh, S.K., Dua, K., Veiga, F., Mascarenhas-Melo, F., Pires, P.C., Paiva-Santos, A.C., (2023). “*Topical delivery of nanoemulsions for skin cancer treatment*”. *Applied Materials Today* 35. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2023.102001>

35. Elhissi, A. M., Ahmed, W., Hassan, I. U., Dhanak, V. R., & D'Emanuele, A. (2012). "Carbon nanotubes in cancer therapy and drug delivery". Journal of drug delivery, 2012, 837327. <https://doi.org/10.1155/2012/837327>
36. Elmore S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death". Toxicologic pathology, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
37. Eron, S. J., MacPherson, D. J., Dagbay, K. B., & Hardy, J. A. (2018). "Multiple Mechanisms of Zinc-Mediated Inhibition for the Apoptotic Caspases-3, -6, -7, and -8". ACS chemical biology, 13(5), 1279–1290. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00064>
38. Farzin, A., Etesami, A., Quint, J., Memic, A., Tamayol, A., (2020). "Magnetic nanoparticles in cancer therapy and diagnosis". Adv Healthc Mater. May ; 9(9): e1901058. doi:10.1002/adhm.201901058.
39. Fulton, M.D., Najahi-Missaoui, W., (2023). "Liposomes in Cancer Therapy: How Did We Start and Where Are We Now". Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 6615. <https://doi.org/10.3390/ijms24076615>
40. Gao, C., Wei, J., Tang, T., Huang, Z., (2020). "Role of microRNA-33a in malignant cells (Review)". Oncology Letters 20: 2537-2556. DOI: 10.3892/ol.2020.11835
41. Gavas, S., Quazi, S., Karpinski, T.M., (2021). "Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges". Nanoscale Letters 16:173. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03628-6>
42. Govindan, B., Sabri, M.A., Hai, A., Banat, F., Haija, M.A., (2023). "A Review of Advanced Multifunctional Magnetic Nanostructures for Cancer Diagnosis and Therapy Integrated into an Artificial Intelligence Approach". Pharmaceutics 2023, 15, 868. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030868>
43. Grignon, D.J., Che, M., (2005). "Clear Cell Renal Cell Carcinoma". Clin Lab Med 25 (2005) 305–316. doi:10.1016/j.cll.2005.01.012
44. Grignon, D.J., Che, M., (2005). "Clear Cell Renal Cell Carcinoma". Clin Lab Med 25 (2005) 305–316. doi:10.1016/j.cll.2005.01.012
45. Gürses, N., (2013). "Abraxane'in Kanser Hücrelerinin Hücre Kinetiği Parametreleri Üzerine Etkileri". Yüksek Lisans Tezi. Danışman: Mehmet Rıfki Topçul. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

46. Gürsoy, D., Seçinti, İ.E., Hakverdi, S., Görür, S., (2020). “*Renal Cell Carcinoma: Epidemiological Profile and Histopathological Features*”. Bull Urooncol 2020;19:68-73. DOI: 10.4274/uob.galenos.2020.1426
47. Halim, C.E., Deng, S., Ong, M.S., Yap, C.T., (2020). “*Involvement of STAT5 in Oncogenesis*”. Biomedicines 2020, 8, 316; doi:10.3390/biomedicines8090316
48. Hanley, C., Layne, J., Punnoose, A., Reddy, K.M., Coombs, I., Coombs, A., Feris, K., Wingett, D., (2008). “*Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles*”. Nanotechnology. 2008 ; 19(29): 295103–. doi:10.1088/0957-4484/19/29/295103
49. Hirata, H., Hinoda, Y., Nakajima, K., Kawamoto, K., Kikuno, N., Ueno, K., Yamamura, S., Zaman, M. S., Khatri, G., Chen, Y., Saini, S., Majid, S., Deng, G., Ishii, N., & Dahiya, R. (2011). “*Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma*”. International journal of cancer, 128(8), 1793–1803. <https://doi.org/10.1002/ijc.25507>
50. Horiguchi, A., Oya, M., Shimada, T., Uchida, A., Marumo, K., Murai, M., (2002). “*Activation Of Signal Transducer And Activator Of Transcription 3 In Renal Cell Carcinoma: A Study Of Incidence And Its Association With Pathological Features And Clinical Outcome*”. The Journal of Urology, Vol. 168, 762-765.
51. Hosseini, S.M., Mohammadnejad, J., Salamat, S., Beiram Zadeh, Z., Tanhaei, M., Ramakrishna, S., (2023). “*Theranostic polymeric nanoparticles as a new approach in cancer therapy and diagnosis: a review*”. Materials Today Chemistry 29. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2023.101400>
52. Hsieh, J. J., Purdue, M. P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., Heng, D. Y., Larkin, J., & Ficarra, V. (2017). “*Renal cell carcinoma*”. Nature reviews. Disease primers, 3, 17009. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.9>
53. Hsieh, J. J., Purdue, M. P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., Heng, D. Y., Larkin, J., & Ficarra, V. (2017). “*Renal cell carcinoma*”. Nature reviews. Disease primers, 3, 17009. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.9>

54. Hwa, V., Nadeau, K., Wit, J. M., & Rosenfeld, R. G. (2011). “*STAT5b deficiency: lessons from STAT5b gene mutations*”. Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism, 25(1), 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.09.003>
55. Ibrahim, M.A.I., Othman, R., Chee, C.F., Ahmad Fisol, F., (2023). “*Evaluation of Folate-Functionalized Nanoparticle Drug Delivery Systems—Effectiveness and Concerns*”. Biomedicines 2023, 11, 2080. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11072080>
56. Iravani, S., Varma, R.S., (2022). “*Nanosponges for Drug Delivery and Cancer Therapy: Recent Advances*”. Nanomaterials 2022, 12, 2440. <https://doi.org/10.3390/nano12142440>
57. Jan, R., Chaudhry, G., (2019). “*Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics*”. Adv Pharm Bull, 2019, 9(2), 205-218. doi: 10.15171/apb.2019.024
58. Jiang, K., Sun, F., Zhu, J., Luo, G., Ban, Y., Zhang, P., (2019). “*miR-33a inhibits cell growth in renal cancer by downregulation of MDM4 expression*”. Molecular Genetics & Genomic Medicine 2019;7:c833. DOI: 10.1002/mgg3.833
59. Jin, C., Wang, K., Oppong-Gyebi, A., & Hu, J. (2020). “*Application of Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Therapy - A Mini-Review*”. International journal of medical sciences, 17(18), 2964–2973. <https://doi.org/10.7150/ijms.49801>
60. Joudeh, N., & Linke, D. (2022). “*Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists*”. Journal of nanobiotechnology, 20(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
61. Jung, Y.Y., Um, J.-Y., Chinnathambi, A., Govindasamy, C., Sethi, G., Ahn, K.S., (2022). “*Leelamine Modulates STAT5 Pathway Causing ,Both Autophagy and Apoptosis in Chronic Myelogenous Leukemia Cells*”. Biology 2022, 11, 366. <https://doi.org/10.3390/biology11030366>
62. Karthic, A., Roy, A., Lakkakula, J., Alghamdi, S., Shakoori, A., Babalghith, A.O., Emran, T.B., Sharma, R., Lima, C.M.G., Kim, B., Park, M.N., Safi, S.Z., de Almeida, R.S., Coutinho, H.D.M., (2022). “*Cyclodextrin nanoparticles for*

- diagnosis and potential cancer therapy: A systematic review*". Front. Cell Dev. Biol. 10:984311. doi: 10.3389/fcell.2022.984311
63. Kawakami, K., Hirata, H., Yamamura, S., Kikuno, N., Saini, S., Majid, S., Tanaka, Y., Kawamoto, K., Enokida, H., Nakagawa, M., & Dahiya, R. (2009). "*Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer*". Cancer research, 69(22), 8603–8610. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2534>
 64. Kempkensteffen, C., Fritzsche, F. R., Johannsen, M., Weikert, S., Hinz, S., Dietel, M., Riener, M. O., Moch, H., Jung, K., Krause, H., Miller, K., & Kristiansen, G. (2009). "*Down-regulation of the pro-apoptotic XIAP associated factor-1 (XAF1) during progression of clear-cell renal cancer*". BMC cancer, 9, 276. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-276>
 65. Khalifehzadeh, R., Arami, H., (2020). "*Biodegradable Calcium Phosphate Nanoparticles for Cancer Therapy*". Adv Colloid Interface Sci. 2020 May ; 279: 102157. doi:10.1016/j.cis.2020.102157.
 66. Khan, M.J., Ahmad, A., Khan, M.A., Siddiqui, S., (2021). "*Zinc Oxide Nanoparticle Induces Apoptosis in Human Epidermoid Carcinoma Cells Through Reactive Oxygen Species and DNA Degradation*". Biological Trace Element Research (2021) 199:2172–2181. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02323-4>
 67. Kim, W., Gersey, Z., Daaka, Y., (2012). "*Rap1GAP regulates renal cell carcinoma invasion*". Cancer Lett. 2012 July 1; 320(1): 65–71. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.022
 68. Koohi Moftakhari Esfahani, M., Alavi, S. E., Cabot, P. J., Islam, N., & Izake, E. L. (2022). "*Application of Mesoporous Silica Nanoparticles in Cancer Therapy and Delivery of Repurposed Anthelmintics for Cancer Therapy*". Pharmaceutics, 14(8), 1579. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081579>
 69. Krishnan, S.R., George, S.K., (2014). "*Nanotherapeutics in Cancer Prevention, Diagnosis and Treatment*". Pharmacology and Therapeutics, Chapter 8, 235-253. <http://dx.doi.org/10.5772/58419>
 70. Kumar, P., Gajbhiye, K.R., Paknikar, K.M., Gajbhiye, V., (2019). "*Current Status and Future Challenges of Various Polymers as Cancer Therapeutics*".

- Polymeric Nanoparticles as a Promising Tool for Anti-cancer Therapeutics, Chapter 1, 1-20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816963-6.00001-7>
71. Li, W., Li, J., Bao, J., (2012). “*Microautophagy: lesser-known self-eating*”. Cell. Mol. Life Sci. (2012) 69:1125–1136 DOI 10.1007/s00018-011-0865-5
 72. Linders, A. N., Dias, I. B., López Fernández, T., Tocchetti, C. G., Bomer, N., & Van der Meer, P. (2024). “*A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging*”. npj aging, 10(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00135-7>
 73. Linehan, W.M., Walther, M.M., Zbar, B., (2003). “The Genetic Basis of Cancer of The Kidney”. The Journal of Urology, Vol. 170, 2163–2172. DOI: 10.1097/01.ju.0000096060.92397.ed
 74. Lisik, K., Krokosz, A., (2021). “*Application of Carbon Nanoparticles in Oncology and Regenerative Medicine*”. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 8341. <https://doi.org/10.3390/ijms22158341>
 75. Loh, S.N., (2010). “The missing Zinc: p53 misfolding and cancer”. Metallomics, 2010, 2, 442–449. DOI: 10.1039/c003915b
 76. Low, P. S., & Kularatne, S. A. (2009). “*Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer*”. Current opinion in chemical biology, 13(3), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.022>
 77. Luo, Y., Medina Bengtsson, L., Wang, X., Huang, T., Liu, G., Murphy, S., Wang, C., Koren, J., 3rd, Schafer, Z., & Lu, X. (2020). “*UQCRH downregulation promotes Warburg effect in renal cell carcinoma cells*”. Scientific reports, 10(1), 15021. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72107-2>
 78. Ma, Y., Dong, S., Li, X., Kim, B.Y.S., Yang, Z., Jiang, W., (2021). “*Extracellular Vesicles: An Emerging Nanoplatform for Cancer Therapy*”. Front. Oncol. 10:606906. doi: 10.3389/fonc.2020.606906
 79. Mandal, A., Bisht, R., Rupenthal, I.D., Mitra, A.K., (2017). “Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies”. Journal of Controlled Release 248 (2017) 96-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.012>
 80. Masson, D., Rioux-Leclercq, N., Fergelot, P., Jouan, F., Mottier, S., Théoleyre, S., ... Denis, M. G. (2010). “*Loss of expression of TIMP3 in clear cell renal*

- cell carcinoma*". European Journal of Cancer, 46(8), 1430–1437. doi:10.1016/j.ejca.2010.01.009
81. Maurya, H., Kumar, T., Kumar, S., (2018). "*Anatomical and Physiological Similarities of Kidney in Different Experimental Animals Used for Basic Studies*". Journal of Clinical & Experimental Nephrology Vol.3 No.2: 09. DOI: 10.21767/2472-5056.100060
 82. Maurya, H., Kumar, T., Kumar, S., (2018). "*Anatomical and Physiological Similarities of Kidney in Different Experimental Animals Used for Basic Studies*". Journal of Clinical & Experimental Nephrology Vol.3 No.2:09. DOI: 10.21767/2472-5056.100060
 83. Milane, L., Ganesh, S., Shah, S., Duan, Z., Amiji, M., (2011). "Multi-Modal Strategies for Overcoming Tumor Drug Resistance: Hypoxia, Warburg's Effect, Stem Cells, and Multifunctional Nanotechnology". J Control Release, October 30; 155(2): 237–247. doi:10.1016/j.jconrel.2011.03.032
 84. Morris, M. R., & Maher, E. R. (2010). "*Epigenetics of renal cell carcinoma: the path towards new diagnostics and therapeutics*". Genome medicine, 2(9), 59. <https://doi.org/10.1186/gm180>
 85. Mundekkad, D., Cho, W.C., (2022). "*Nanoparticles in Clinical Translation for Cancer Therapy*". Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 1685. <https://doi.org/10.3390/ijms23031685>
 86. Nagashima, Y., Kuroda, N., & Yao, M. (2013). "*Transition of organizational category on renal cancer*". Japanese journal of clinical oncology, 43(3), 233–242. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyt006>
 87. Navai, N., Wood, C. G. (2012). "*Environmental and modifiable risk factors in renal cell carcinoma*". Urologic oncology, 30(2), 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.10.001>
 88. Nayman, A.H., Siginc, H., Zemheri, E., Yencilek, F., Yildirim, A., Telci, D., (2019). "Dual-Inhibition of mTOR and Bcl-2 Enhances the Anti-tumor Effect of Everolimus against Renal Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo". Journal of Cancer, 2019; 10(6): 1466-1478. doi: 10.7150/jca.29192
 89. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., (2018). "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation". Front. Endocrinol. 9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402

90. Oh, N., Park, J.H., (2014). "Endocytosis and Exocytosis of Nanoparticles in Mammalian Cells". *International Journal of Nanomedicine*, 2014;9 (Suppl 1) 51–63. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S26592>
91. Ono, K., Horie, T., Nishino, T., Baba, O., Kuwabara, Y., Yokode, M., Kita, T., Kimura, T., (2015). "*MicroRNA-33a/b in Lipid Metabolism*". *Circ J* 2015; 79: 278 – 284. doi: 10.1253/circj.CJ-14-1252
92. Orlova, A., Wagner, C., de Araujo, E. D., Bajusz, D., Neubauer, H. A., Herling, M., Gunning, P. T., Keserü, G. M., & Moriggl, R. (2019). "*Direct Targeting Options for STAT3 and STAT5 in Cancer*". *Cancers*, 11(12), 1930. <https://doi.org/10.3390/cancers11121930>
93. Özcan, A., Krishnan, B., Truong, L., (2014). "*Renal Tumors*", *Pathobiology of Human Disease*, 2869–2899. doi:10.1016/b978-0-12-386456-7.05415-0
94. Parzych, K.R., Klionsky, D.J., (2014). "*An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation*". *Antioxidants & Redox Signalling* Vol. 20 (3). DOI: 10.1089/ars.2013.5371
95. Patrón-Romero, L., Luque-Morales, P.A., Loera-Castañeda, V., Lares-Asseff, I., Leal-Ávila, M.Á., Alvelais-Palacios, J.A., Plasencia-López, I., Almanza-Reyes, H., (2022). "Mitochondrial Dysfunction Induced by Zinc Oxide Nanoparticles". *Crystals* 2022, 12, 1089. <https://doi.org/10.3390/cryst12081089>
96. Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R-H., Huang, P., (2006). "*Glycolysis inhibition for anticancer treatment*". *Oncogene* (2006) 25, 4633–4646.
97. Peters, I., Eggers, H., Atschekzei, F., Hennenlotter, J., Waalkes, S., Tränkenschuh, W., ... Serth, J. (2012). *GATA5CpG island methylation in renal cell cancer: a potential biomarker for metastasis and disease progression*. *BJU International*, 110(2b), E144–E152. doi:10.1111/j.1464-410x.2011.10862.x
98. Prasad, R., Aiyer, S., Chauhan, D. S., Srivastava, R., Selvaraj, K., (2015). "*Bioresponsive carbon nano-gated multifunctional mesoporous silica for cancer theranostics*". *Nanoscale*. DOI: 10.1039/C5NR06756A
99. Qian, F., Engst, S., Yamaguchi, K., Yu, P., Won, K. A., Mock, L., Lou, T., Tan, J., Li, C., Tam, D., Loughheed, J., Yakes, F. M., Bentzien, F., Xu, W., Zaks, T., Wooster, R., Greshock, J., Joly, A. H. (2009). "*Inhibition of tumor cell growth, invasion, and metastasis by EXEL-2880 (XL880, GSK1363089), a*

- novel inhibitor of HGF and VEGF receptor tyrosine kinases*". Cancer research, 69(20), 8009–8016. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4889>
100. Qian, H., Yang, Y., (2016). "Functional role of autophagy in gastric cancer". Oncotarget Vol. 7, No. 14, 17641-17651.
 101. Rai, D.B., Medicherla, K., Pooja, D., Kulhari, H., (2023). "*Dendrimer Mediated Delivery of Anticancer Drugs for Colon Cancer Treatment*". Pharmaceutics 2023, 15, 801. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030801>
 102. Rashid, M., Schwartz, G.J., (2012). "*Overview, Structure and Function of the Nephron*". Pediatric Critical Care Study Guide: Text and Review. Ed. Steven E. Lucking, Frank A. Maffei, Robert F. Tamburro, Neal J. Thomas. London: Springer. Chapter 6 (s.135-136). DOI: 10.1007/978-0-85729-923-9
 103. Reshma, V.G., Monahan, P.V., (2017). "Cellular interactions of zinc oxide nanoparticles with human embryonic kidney (HEK 293) cells". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 157 (2017) 182-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.069>
 104. Reynolds, J. G., Geretti, E., Hendriks, B. S., Lee, H., Leonard, S. C., Klinz, S. G., Noble, C. O., Lückner, P. B., Zandstra, P. W., Drummond, D. C., Olivier, K. J., Jr, Nielsen, U. B., Niyikiza, C., Agresta, S. V., & Wickham, T. J. (2012). "*HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity*". Toxicology and applied pharmacology, 262(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.04.008>
 105. Rizi, H.A.Y., Shin, D.H., Rizi, S.Y., (2022). "Polymeric Nanoparticles in Cancer Chemotherapy: A Narrative Review". Iran J Public Health, Vol. 51, No.2, Feb 2022, pp.226-239
 106. Roshani, M., Rezaian-Isfahni, A., Lotfalizadeh, M. H., Khassafi, N., Abadi, M. H. J. N., & Nejati, M. (2023). "*Metal nanoparticles as a potential technique for the diagnosis and treatment of gastrointestinal cancer: a comprehensive review*". Cancer cell international, 23(1), 280. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03115-1>
 107. Sánchez-López, E., Guerra, M., Dias-Ferreira, J., Lopez-Machado, A., Ettcheto, M., Cano, A., Espina, M., Camins, A., Garcia, M. L., & Souto, E. B. (2019). "*Current Applications of Nanoemulsions in Cancer*

- Therapeutics*". *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 9(6), 821. <https://doi.org/10.3390/nano9060821>
108. Sell, M., Lopes, A. R., Escudeiro, M., Esteves, B., Monteiro, A. R., Trindade, T., & Cruz-Lopes, L. (2023). "Application of Nanoparticles in Cancer Treatment: A Concise Review". *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 13(21), 2887. <https://doi.org/10.3390/nano13212887>
 109. Semenza, J. C., Ziogas, A., Largent, J., Peel, D., & Anton-Culver, H. (2001). "Gene-environment interactions in renal cell carcinoma". *American journal of epidemiology*, 153(9), 851–859. <https://doi.org/10.1093/aje/153.9.851>
 110. Shapiro, D.D., Virumbrales-Muñoz, M., Beebe, D.J., Abel, E.J., (2022). "Models of Renal Cell Carcinoma Used to Investigate Molecular Mechanisms and Develop New Therapeutics". *Front. Oncol.* 12:871252. doi: 10.3389/fonc.2022.871252
 111. Shen, J., Yang, D., Zhou, X., Wang, Y., Tang, S., Yin, H., Wang, J., Chen, R., & Chen, J. (2019). "Role of Autophagy in Zinc Oxide Nanoparticles-Induced Apoptosis of Mouse LEYDIG Cells". *International journal of molecular sciences*, 20(16), 4042. <https://doi.org/10.3390/ijms20164042>
 112. Shenoy, N., Vallumsetla, N., Zou, Y., Galeas, J.N., Shrivastava, M., Hu, C., Susztak, K., Verma, A., (2015). "Role of DNA methylation in renal cell carcinoma". *Journal of Hematology & Oncology* (2015) 8:88. DOI 10.1186/s13045-015-0180-y
 113. Sheoran, S., Arora, S., Samsonraj, R., Govindaiah, P., Vuree, S., (2022). "Lipid-based nanoparticles for treatment of cancer". *Heliyon* 8 (2022) e09403. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09403>
 114. Shuch, B., Amin, A., Armstrong, A. J., Eble, J. N., Ficarra, V., Lopez-Beltran, A., Martignoni, G., Rini, B. I., & Kutikov, A. (2015). "Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity". *European urology*, 67(1), 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.04.029>
 115. Shuch, B., Amin, A., Armstrong, A.J., Eble, J.N., Ficarra, V., Lopez-Beltran, A., Martignoni, G., Rini, B.I., Kutikov, A., (2014). "Understanding Pathologic Variants of Renal Cell Carcinoma: Distilling Therapeutic

- Opportunities from Biologic Complexity*". Eur Urol, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2014.04.029>
116. Sievers, E.L., Senter, P.D., (2013). "Antibody-Drug Conjugates in Cancer Therapy". Annu. Rev. Med. 2013. 64:15–29. doi: 10.1146/annurev-med-050311-201823
 117. Singh, S., (2019). "Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity". Toxicology Mechanisms and Methods, 29:4, 300-311, DOI: 10.1080/15376516.2018.1553221
 118. Song, C., Jun, S. Y., Hong, J. H., & Ahn, H. (2007). "Transforming growth factor-beta downregulates interleukin-2-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 in human renal cell carcinoma". Journal of cancer research and clinical oncology, 133(7), 487–492. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0192-2>
 119. Song, Z., Li, Z., Han, W., Zhu, C., Lou, N., Li, X., Luo, G., Peng, S., Li, G., Zhao, Y., & Guo, Y. (2020). "Low DAPK1 expression correlates with poor prognosis and sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma". Aging, 13(2), 1842–1858. <https://doi.org/10.18632/aging.103638>
 120. Spadavecchia, J., Movia, D., Moore, C., Maguire, C. M., Moustauoui, H., Casale, S., Volkov, Y., & Prina-Mello, A. (2016). "Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer: from synthesis to proof-of-concept in vitro studies". International journal of nanomedicine, 11, 791–822. <https://doi.org/10.2147/IJN.S97476>
 121. Suarez, C., Marmolejo, D., Valdivia, A., Morales-Barrera, R., Gonzalez, M., Mateo, J., Semidey, M.E., Lorente, D., Trilla, E., Carles, J., (2022). "Update in collecting duct carcinoma: Current aspects of the clinical and molecular characterization of an orphan disease". Front. Oncol. 12:970199. doi: 10.3389/fonc.2022.970199
 122. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery". Advanced drug delivery reviews, 99(Pt A), 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>

123. Sun, C. Q., Arnold, R., Fernandez-Golarz, C., Parrish, A. B., Almekinder, T., He, J., Ho, S. M., Svoboda, P., Pohl, J., Marshall, F. F., & Petros, J. A. (2006). “*Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma*”. *Cancer research*, 66(17), 8542–8549. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0294>
124. Sun, C. Q., Arnold, R., Fernandez-Golarz, C., Parrish, A. B., Almekinder, T., He, J., Ho, S. M., Svoboda, P., Pohl, J., Marshall, F. F., & Petros, J. A. (2006). “*Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma*”. *Cancer research*, 66(17), 8542–8549. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0294>
125. Sun, L., Liu, H., Ye, Y., Lei, Y., Islam, R., Tan, S., Tong, R., Miao, Y. B., & Cai, L. (2023). “Smart nanoparticles for cancer therapy”. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 418. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01642-x>
126. Sun, M., Lughezzani, G., Perrotte, P., Karakiewicz, P.I., (2010). “*Treatment of metastatic renal cell carcinoma*”. *Nat. Rev. Urol.* 7, 327–338. DOI: 10.1038/nrurol.2010.57
127. Tang, L., Li, J., Pan, T., Yin, Y., Mei, Y., Xiao, Q., Wang, R., Yan, Z., & Wang, W. (2022). “*Versatile carbon nanoplatforms for cancer treatment and diagnosis: strategies, applications and future perspectives*”. *Theranostics*, 12(5), 2290–2321. <https://doi.org/10.7150/thno.69628>
128. Tanner, G.A., (2009). “*Kidney Function*” *Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine, Renal Physiology and Body Fluids*, Third Edition. Ed. Rodney A. Rhoades ve David R. Bell. Chapter 22. Çin: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 978-0781768528
129. Taşkiran, A., Özdil, B., Tutak, I., Çalık Kocatürk, D., (2021). “*Hücre Ölümü*”. *Hücre Sinyal Yolakları Temel Yolaklar ve Mekanizmalar*. Ed. Hüseyin Aktuğ. Bölüm IV/39-41. İstanbul: İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd. Şti. ISBN: 978-625-7291-49-1

130. Temiz, M., (2024). “*Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinomada Yağ Asit Metabolizması İlişkili AMPK ve miR-33a İfadelerinin Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkisinin TCGA Veri Setinde ve Hücre Hatlarında Moleküler Düzeyde Analizi*”. Doktora Tezi, Danışman: Özge Rencüzoğulları. T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
131. van Vlodrop, I. J., Baldewijns, M. M., Smits, K. M., Schouten, L. J., van Neste, L., van Criekinge, W., van Poppel, H., Lerut, E., Schuebel, K. E., Ahuja, N., Herman, J. G., de Bruïne, A. P., & van Engeland, M. (2010). “*Prognostic significance of Gremlin1 (GREM1) promoter CpG island hypermethylation in clear cell renal cell carcinoma*”. The American journal of pathology, 176(2), 575–584. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090442>
132. Villalobos Gutiérrez, P.T., MuñozCarrillo, J.L., Sandoval Salazar, C., Viveros Paredes, J.M., Gutiérrez Coronado, O., (2023). “*Functionalized Metal Nanoparticles in Cancer Therapy*”. Pharmaceutics 2023, 15, 1932. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071932>
133. Vimala, K., Shanthi, K., Sundarraj, S., & Kannan, S. (2017). “*Synergistic effect of chemo-photothermal for breast cancer therapy using folic acid (FA) modified zinc oxide nanosheet*”. Journal of colloid and interface science, 488, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.067>
134. Walid, F., Shehzad, A., Khan, T., Kim, Y.Y., (2010). “*MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials*”. Biochimica et Biophysica Acta 1803 1231-1243. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013
135. Wang, Y., Wei, X, Zhang, C., Zhang, F., Liang, W., (2010). “*Nanoparticle delivery strategies to target doxorubicin to tumor cells and reduce side effects*”. Therapeutic Delivery 1(2), 273–287.
136. Wei, L., Wang, J., Chen, A., Liu, J., Feng, X., Shao, L., (2017). “*Involvement of PINK1/parkin-mediated mitophagy in ZnO nanoparticle-induced toxicity in BV-2 cells*”. International Journal of Nanomedicine 2017:12 1891–1903. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S129375>
137. Wiesmann, N., Tremel, W., Brieger, J., (2020). “*Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine*”. J.Mater. Chem. B, 2020, 8, 4973. DOI: 10.1039/d0tb00739k

138. Williams G.M., Lynch, D.T., (2023). “Renal Oncocytoma”. StatPearls[Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537263/>
139. Wilson, K.M., Cho, E., (2016). “Obesity and Kidney Cancer”, Obesity and Cancer. Ed. T. Pischon, K. Nimptsch. Recent Results in Cancer Research 208, DOI 10.1007/978-3-319-42542-9_5
140. Wingelhofer, B., Neubauer, H. A., Valent, P., Han, X., Constantinescu, S. N., Gunning, P. T., Müller, M., & Moriggl, R. (2018). “Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer”. Leukemia, 32(8), 1713–1726. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0117-x>
141. Xin, J., Xu, R., Lin, S., Xin, M., Cai, W., Zhou, J., Fu, C., Zhen, G., Lai, J., Li, Y., & Zhang, P. (2016). “Clinical potential of TCF21 methylation in the diagnosis of renal cell carcinoma”. Oncology letters, 12(2), 1265–1270. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4748>
142. Yamamura, S., Kawakami, K., Hirata, H., Ueno, K., Saini, S., Majid, S., & Dahiya, R. (2010). “Oncogenic functions of secreted Frizzled-related protein 2 in human renal cancer”. Molecular cancer therapeutics, 9(6), 1680–1687. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0012>
143. Yan, X., Yang, Y., Sun, Y., (2021). “Dendrimer Applications for Cancer Therapies”. Journal of Physics: Conference Series, 1948 (2021) 012205. DOI: 10.1088/1742-6596/1948/1/012205
144. Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., Wu, S., Deng, Y., Zhang, J., Shao, A., (2020). “Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance”. Front. Mol. Biosci. 7:193. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00193
145. Ye, Y. W., Jiang, Z. M., Li, W. H., Li, Z. S., Han, Y. H., Sun, L., Wang, Y., Xie, J., Liu, Y. C., Zhao, J., Tang, A. F., Li, X. X., Guan, Z. C., Gui, Y. T., & Cai, Z. M. (2012). “Down-regulation of TCF21 is associated with poor survival in clear cell renal cell carcinoma”. Neoplasma, 59(6), 599–605. https://doi.org/10.4149/neo_2012_076
146. Zhou, L., Li, Y., Li, Z., & Huang, Q. (2020). “Mining therapeutic and prognostic significance of STATs in renal cell carcinoma with bioinformatics

- analysis*". Genomics, 112(6), 4100–4114.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.06.032>
147. Rasha, F., Ramalingam, L., Gollahon, L., Rahman R.L., Rahman, S.M., Menikdiwela, K., Moustaid-Moussa, N. (2019). "*Mechanisms linking the renin-angiotensin system, obesity, and breast cancer*". Endocrine-Related Cancer 26, R653–R672
 148. Smith, M.R., Satter, L.R.F., Vargas-Hernández, A., (2023). "*STAT5b: A master regulator of key biological pathways*". Front Immunol. 2023 Jan 23;13:1025373. doi: 10.3389/fimmu.2022.1025373.
 149. Pouresmaeil, V., Haghighi, S., Raeisalsadati, A.S., Neamati, A., Homayouni-Tabrizi, M., (2021). "*The Anti-Breast Cancer Effects of Green-Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles Using Carob Extracts*". Anticancer Agents Med Chem. 2021;21(3):316-326. doi: 10.2174/1871520620666200721132522. PMID: 32698752.
 150. Brodaczewska, K.K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C., Czarnecka, A.M., (2016). "*Choosing the right cell line for renal cell cancer research*". Mol Cancer 15, 83 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0565-8>
 151. Fallone, L., Walzer, T., Marçais, A., (2023). "*Signaling Pathways Leading to mTOR Activation Downstream Cytokine Receptors in Lymphocytes in Health and Disease*". Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 12736. <https://doi.org/10.3390/ijms241612736>
 152. Ferbeyre, G., Moriggl, R., (2011). "*The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes*". Biochimica et Biophysica Acta 1815 (2011) 104-114. doi:10.1016/j.bbcan.2010.10.004
 153. Harir, N., Pecquet, C., Kerenyi, M., Sonneck, K., Kovacic, B., Nyga, R., Brevet, M., Dhennin, I., Gouilleux-Gruart, V., Beug, H., Valent, P., Lassoued, K., Moriggl, R., Gouilleux, F., (2007). "*Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. Blood*". 2007 Feb 15;109(4):1678-86. doi: 10.1182/blood-2006-01-029918.
 154. Kapur, P., Gao, M., Zhong, H., Rakheja, D., Cai, Q., Pedrosa, I., Margulis, V., Xu, L., Kinch, L., Brugarolas, J., (2021). "*Eosinophilic*

- Vacuolated Tumor of the Kidney: A Review of Evolving Concepts in This Novel Subtype With Additional Insights From a Case With MTOR Mutation and Concomitant Chromosome 1 Loss*". Adv Anat Pathol. 2021 Jul 1;28(4):251-257. doi: 10.1097/PAP.0000000000000299.
155. Pak, S., Kim, W., Kim, Y., Song, C., Ahn, H., (2019). "*Dihydrotestosterone promotes kidney cancer cell proliferation by activating the STAT5 pathway via androgen and glucocorticoid receptors*". Journal of Cancer Research and Clinical Oncology (2019) 145:2293–2301 <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02993-1>
 156. Polak, K.L., Chernosky, N.M., Smigiel, J.M., Tamagno, I., Jackson, M.W., (2019). "*Balancing STAT Activity as a Therapeutic Strategy*". Cancers 2019, 11, 1716; doi:10.3390/cancers11111716
 157. Roche, J., (2018). "*The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer*". Cancers 2018, 10, 52; doi:10.3390/cancers10020052
 158. Shi, M., Yang, S., Zhu, X., Sun, D., Sun, D., Jiang, X., Zhang, C., Wang, L., (2019). "*The RAGE/STAT5/autophagy axis regulates senescence in mesangial cells. Cell Signal*". 2019 Oct;62:109334. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.05.019.
 159. Talati, P.G., Gu, L., Ellsworth, E.M., Gironde, M.A., Trerotola, M., Hoang, D.T., Leiby, B., Dagvadorj, A., McCue, P.A., Lallas, C.D., Trabulsi, E.J., Gomella, L., Aplin, A.E., Languino, L., Fatatis, A., Rui, H., Nevalainen, M.T., (2015). "*Jak2-Stat5a/b Signaling Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem-Like Cell Properties in Prostate Cancer*". Am J Pathol. 2015 Sep;185(9):2505-22. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.04.026.
 160. Weber, A., Borghouts, C., Brendel, C., Moriggl, R., Delis, N., Brill, B., Vafaizadeh, V., Groner, B., (2015). "*Stat5 Exerts Distinct, Vital Functions in the Cytoplasm and Nucleus of Bcr-Abl+ K562 and Jak2(V617F)+ HEL Leukemia Cells*". Cancers 2015, 7, 503-537; doi:10.3390/cancers7010503
 161. Xiong, H., Su, W.Y., Liang, Q.C., Zhang, Z.G., Chen, H.M., Du, W., Chen, Y.X., Fang, J.Y., (2009). "*Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells*". Lab Invest. 2009 Jun;89(6):717-25. doi: 10.1038/labinvest.2009.11.

162. Zhou, X., Cao, T., (2022). “Zinc Oxide Nanoparticle Inhibits Tumorigenesis of Renal Cell Carcinoma by Modulating Lipid Metabolism Targeting miR-454-3p to Repressing Metabolism Enzyme ACSL4”. Hindawi Journal of Oncology Volume 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2883404>
163. Bisht, G., Rayamajhi, S., (2016). “ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent”. Nanobiomedicine (Rij). Jan 1;3:9. doi: 10.5772/63437
164. Rencüzoğulları, O., (2020). “Potential Role of CDK4/6 Inhibition-Targeted Mechanisms As A Novel Therapeutic Strategy In Pancreatic Cancer Cells”. Doktora Tezi, Danışmanlar: Prof. Dr. Dilek Telci Temeltaş & Prof. Dr. Elif Damla Arısan. T.C. Yeditepe Üniversitesi
165. Rencüzoğulları, O., Yerlikaya, P.O., Gürkan, A.Ç., Arısan, E.D., Telci, D., (2022). “Palbociclib negatively regulates fatty acid synthesis due to upregulation of AMPK α and miR-33a levels to increase apoptosis in Panc-1 and MiaPaCa-2 cells”. Biotechnol Appl Biochem. Feb;69(1):342-354. doi: 10.1002/bab.2113.
166. Patel, P., Kansara, K., Senapati, V.A., Shanker, R., Dhawan, A., Kumar, A., (2016). “Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells”. Mutagenesis. Jul;31(4):481-90. doi: 10.1093/mutage/gew014. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27034448.
167. Germain, N., Dhayer, M., Boileau, M., Fovez, Q., Kluza, J., Marchetti, P., (2020). “Lipid Metabolism and Resistance to Anticancer Treatment”. Biology 2020, 9, 474; doi:10.3390/biology9120474
168. Wang, L.S.W., Lee, C.H., Lin, M.S., Chi, C.W., Chen, Y.J., Wang, G.S., Liao, K.W., Chiu, L.P., Wu, S.H., Huang, D.M., Chen, L., Shen, Y.S., (2020). “ZnO Nanoparticles Induced Caspase-Dependent Apoptosis in Gingival Squamous Cell Carcinoma through Mitochondrial Dysfunction and p70S6K Signaling Pathway”. Int J Mol Sci. Feb 26;21(5):1612. doi: 10.3390/ijms21051612
169. Subramaniam, V.D., Ramachandran, M., Marotta, F., Banerjee, A., Sun, X.F., Pathak, S., (2019). “Comparative study on anti-proliferative potentials of zinc oxide and aluminium oxide nanoparticles in colon cancer cells”. Acta Biomed. May 23;90(2):241-247. doi: 10.23750/abm.v90i2.6939.

170. Zhu, H., Wang, X., Lu, S., Ou, K., (2023). “*Metabolic reprogramming of clear cell renal cell carcinoma*”. *Front. Endocrinol.* 14:1195500. doi: 10.3389/fendo.2023.1195500
171. Wahab, R., Kaushik, N., Khan, F., Kaushik, N.K., Choi, E.H., Musarrat, J., Al-Khedhairy, A.A., (2016). “*Self-Styled ZnO Nanostructures Promotes the Cancer Cell Damage and Suppresses the Epithelial Phenotype of Glioblastoma*”. *Sci Rep.* Jan 28;6:19950. doi: 10.1038/srep19950
172. Li, T., Weng, J., Zhang, Y., Liang, K., Fu, G., Li, Y., Bai, X., Gao, Y., (2019). “*mTOR direct crosstalk with STAT5 promotes de novo lipid synthesis and induces hepatocellular carcinoma*”. *Cell Death Dis.* Aug 14;10(8):619. doi: 10.1038/s41419-019-1828-2
173. Mi, T., Wang, Z., Bunting, K.D., (2018). “*The Cooperative Relationship between STAT5 and Reactive Oxygen Species in Leukemia: Mechanism and Therapeutic Potential*”. *Cancers (Basel).* Sep 27;10(10):359. doi: 10.3390/cancers10100359
174. Popp, L., Segatori, L., (2019). “*Zinc Oxide Particles Induce Activation of the Lysosome–Autophagy System*”. *American Chemical Society ACS Omega* 2019, 4, 573–581. doi:10.1021/acsomega.8b01497
175. Kim, B., Kim, G., Jeon, S., Cho, W.S., Jeon, H.P., Jung, J., (2023). “*Zinc oxide nanoparticles trigger autophagy-mediated cell death through activating lysosomal TRPML1 in normal kidney cells*”. *Toxicol Rep.* Apr 25;10:529-536. doi: 10.1016/j.toxrep.2023.04.012
176. Ceballos-Gutiérrez, A., Rodríguez-Hernández, A., Álvarez-Valadez, M.d.R., Limón-Miranda, S., Andrade, F., Figueroa-Gutiérrez, A., Díaz-Reval, I., Apolinar-Irbe, A., Castro-Sánchez, L., Alamilla, J.; et al. (2021). “*ZnO Nanoparticles Induce Dyslipidemia and Atherosclerotic Lesions Leading to Changes in Vascular Contractility and Cannabinoid Receptors Expression as Well as Increased Blood Pressure*”. *Nanomaterials*, 11, 2319. <https://doi.org/10.3390/nano11092319>
177. Yang, Y., Song, Z., Wu, W., Xu, A., Lv, S., Ji, S., (2020). “*ZnO Quantum Dots Induced Oxidative Stress and Apoptosis in HeLa and HEK-293T Cell Lines*”. *Front. Pharmacol.* 11:131. doi: 10.3389/fphar.2020.00131

178. Li, Z., Guo, D., Yin, X., Ding, S., Shen, M., Zhang, R., Wang, Y., Xu, R., (2020). “*Zinc oxide nanoparticles induce human multiple myeloma cell death via reactive oxygen species and Cyt-C/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 signaling pathway in vitro*”. Biomed Pharmacother. Feb;122:109712. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109712.
179. Wang, X., Li, D., Xia, Z., Teng, L., Chen, Y., Meng, J., Changfu, L., (2022). “Zinc oxide nanoparticles promotes ferroptosis to repress cancer cell survival and inhibits invasion and migration by targeting miR-27a-3p/YAP axis in renal cell carcinoma”. Arabian Journal of Chemistry, 15, 103753. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103753>
180. Markowitsch, S.D., Schupp, P., Lauckner, J., Vakhrusheva, O., Slade, K.S., Mager, R., Efferth, T., Haferkamp, A., Juengel, E., (2020). “*Artesunate Inhibits Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells through Cell Cycle Arrest and Induction of Ferroptosis*”. Cancers (Basel). Oct 27;12(11):3150. doi: 10.3390/cancers12113150.
181. Juengel, E., Kim, D., Makarevic, J., Reiter, M., Tsaour, I., Bartsch, G., Haferkamp, A., Blaheta, R.A., (). “*Molecular analysis of sunitinib resistant renal cell carcinoma cells after sequential treatment with RAD001 (everolimus) or sorafenib*”. J. Cell. Mol. Med. Vol 19, No 2, 2015 pp. 430-441. doi: 10.1111/jcmm.12471
182. Akhtar, M.J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M.M., Ahmad, J., Alrokayan, S.A., (2012). “*Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species*”. Int J Nanomedicine. 2012;7:845-57. doi: 10.2147/IJN.S29129
183. Kadhem, H.A., Ibraheem, S.A., Jabir, M.S., Kadhim, A.A., Taqi, Z.J., Florin, M.D., (2019). “*Zinc Oxide Nanoparticles Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via Caspase-8 and P53 Pathway*”. Nano Biomed Eng, 11(1): 35-43. doi: 10.5101/nbe.v11i1
184. Liu, Z., Lv, X., Xu, L., Liu, X., Zhu, X., Song, E., Song, Y., (2020). “*Zinc oxide nanoparticles effectively regulate autophagic cell death by activating autophagosome formation and interfering with their maturation*”. Part Fibre Toxicol. Sep 18;17(1):46. doi: 10.1186/s12989-020-00379-7

185. Cho, W.S., Duffin, R., Howie, S.E., Scotton, C.J., Wallace, W.A., Macnee, W., Bradley, M., Megson, I.L., Donaldson, K., (2011). “*Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes*”. Part Fibre Toxicol. Sep 6;8:27. doi: 10.1186/1743-8977-8-27
186. Bai, D.P., Zhang, X.F., Zhang, G.L., Huang, Y.F., Gurunathan, S., (2017). “*Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells*”. Int J Nanomedicine. Sep 5;12:6521-6535. doi: 10.2147/IJN.S140071.
187. Lin, Y.F., Chiu, I.J., Cheng, F.Y., Lee, Y.H., Wang, Y.J., Hsu, Y.H., Chiu, H.W., (2016). “*The role of hypoxia-inducible factor-1 α in zinc oxide nanoparticle-induced nephrotoxicity in vitro and in vivo*”. Part Fibre Toxicol. Sep 27;13(1):52. doi: 10.1186/s12989-016-0163-3
188. Kocaturk, N.M., Gozuacik, D., (2018). “*Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System*”. Front. Cell Dev. Biol. 6:128. doi: 10.3389/fcell.2018.00128
189. Aalami, A.H., Mesgari, M., Sahebkar, A., (2020). “*Synthesis and Characterization of Green Zinc Oxide Nanoparticles with Antiproliferative Effects through Apoptosis Induction and MicroRNA Modulation in Breast Cancer Cells*”. Hindawi Bioinorganic Chemistry and Applications Volume 2020, <https://doi.org/10.1155/2020/8817110>
190. Dong, S.R., Ju, X.L., Yang, W.Z., (2019). “*STAT5A reprograms fatty acid metabolism and promotes tumorigenesis of gastric cancer cells*”. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019;23:8360-8370.
191. Pak, S., Kim, W., Kim, Y., Song, C., Ahn, H., (2019). “*Dihydrotestosterone promotes kidney cancer cell proliferation by activating the STAT5 pathway via androgen and glucocorticoid receptors*”. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 145:2293–2301 <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02993-1>
192. Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A., (2021). “*Interactions between reactive oxygen species and autophagy: Special issue: Death*

- mechanisms in cellular homeostasis*". Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. Jul;1868(8):119041. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119041
193. Shi, M., Yang, S., Zhi, X., Sun, D., Sun, D., Jiang, X., Zhang, C., Wang, L., (2019). "*The RAGE/STAT5/autophagy axis regulates senescence in mesangial cells*". Cellular Signalling 62 (2019) 109334.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.05.019>
 194. Weber, A., Borghouts, C., Brendel, C., Moriggl, R., Delis, N., Brill, B., Vafaizadeh, V., Groner, B., (2015). "*Stat5 Exerts Distinct, Vital Functions in the Cytoplasm and Nucleus of Bcr-Abl+ K562 and Jak2(V617F)+ HEL Leukemia Cells*". Cancers 2015, 7, 503-537;
doi:10.3390/cancers7010503
 195. Yu, K.N., Yoon, T.J., Minai-Tehrani, A., Kim, J.E., Park, S.J., Jeong, M.S., Ha, S.W., Lee, J.K., Kim, J.S., Cho, M.H., (2013). "*Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation*". Toxicol In Vitro. Jun;27(4):1187-95.
doi: 10.1016/j.tiv.2013.02.010

7. EKLER

7.1. EK A: Cihaz Listesi

Tablo 7. 1 Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
Yüksek Hızlı Santrifüj	5430 R	Eppendorf
Mini Santrifüj	CR-1512	CAPP
Mini Spin	Fisherbrand 15358266	ThermoFisher Scientific
Silindir Döndürücü	SRT9D	Stuart
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart
Çalkalayıcı	GyroTwister	Labnet
Çalkalamalı Inkübatör	Excella E25	New Brunswick Scientific
Buz Makinesi	AF80	Scotsman
Distile Su Cihazı	TankPE030	Merck Millipore
Ultra Saf Su Cihazı	Direct-Q 5UV	Merck Millipore
Dondurucu (-80°C)	Innova U725	New Brunswick Scientific
Derin Dondurucu	ULTF	ARCTIKO
Üstten Donduruculu Buzdolabı	KSU40631NE	Bosch
Su Banyosu	BM302	Nüve
Buharlı Sterilizatör	OT 90L	Nüve
Isıtıcı Blok	HB120-S	DLAB
Kuru Hava Sterilizatör	FN120	Nüve
pH Metre	Seven Easy	Mettler Toledo
pH Metre	Orion STAR A211	Thermo Scientific
Mikroplaka Okuyucu	iMark™	BioRad
Mikrodalga Fırın	MD 595	Arçelik
Hassas Terazî	LE6202S	Sartorius
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Akış Sitometrisi		BD Accuri C6

Otoklav	OT032	Nüve
Spektrofotometre	N80	Implen
Sonikatör	UW2070	Bandelin
Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	CFX Connect	BioRad
Termal Döngüleyici	MJMini	BioRad
Kemiluminesans Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP 1708280	BioRad
PCR Stripleri ve Kapakları	AB-0783	Thermo Scientific
Güç Kaynağı	PowerPac Basic	BioRad
Dikey jel elektroforez sistemi	Mini Protean Tetra Cell 1658004	BioRad
Transfer sistemi	TransBlot Turbo 10016505C	BioRad
UV Transillüminatör Görüntüleme Cihazı	GelDoc XR	BioRad
Sıvı Azot Tankı	Arpege 40	Air Liquid
PVDF Membran 0,45 µm	10600023	GE Healthcare
Mikropipet (10 µl)	KH11049	CAPP
Mikropipet (100µl)	KF10926	CAPP
Mikropipet (1000µl)	MH 10337	CAPP
Pipet ucu (10 µl)	5030010	CAPP
Pipet ucu (200 µl)	4130075	CAPP
Pipet ucu (1000 µl)	5130130	CAPP
Hücre Kazıyıcı	541070	Greiner Bio-One
Polietilen Eppendorf Tüp 1,5 ml	510150	CAPP
Polietilen Eppendorf Tüp 2 ml	510200	CAPP

7.2. EK B: Hücre Kültürü Donanım Listesi

Tablo 7. 2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
Santrifüj	NF 200	Nüve
CO ₂ İnkübatör	HeraCell 150i 51026280	Thermo Scientific
CO ₂ İnkübatör	HeraCell 150	Thermo Scientific
Laminar Flow	HeraSafe KS 12	Thermo Scientific
Hemositometre	40441	Assistent Germany
Floresan Mikroskop	IX71	Olympus
Invert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
Optik Mikroskop	TH4-200	Olympus
Otomatik Hücre Sayacı	EVE™	NanoEntek
Falkon tüp 50 ml	91050	TPP
Falkon tüp 15 ml	91015	TPP
Falkon tüp 15 ml	5100015	CAPP
6-kuyucuklu plaka	92006	TPP
12-kuyucuklu plaka	92012	TPP
96-kuyucuklu plaka	92096	TPP
25 cm ² hücre kültür kabı	90026	TPP
75 cm ² hücre kültür kabı	90076	TPP
60 mm hücre kültür kabı	93060	TPP
100 mm hücre kültür kabı	93100	TPP
Serolojik pipet (5 ml)	94005	TPP
Serolojik pipet (10 ml)	94010	TPP
Mikropipet (100-1000 µl)	HiPette 7030511014	DLAB
Mikropipet (10-100 µl)	HiPette 7030511008	DLAB
Mikropipet (0,5-10 µl)	HiPette 7030511004	DLAB
Falkon tüp 15 ml	91015	TPP
Falkon tüp 50 ml	91050	TPP
0,22 µm şırınga filtresi	99722	TPP
Kriyovial tüp	5042000C	CAPP
Enjektör (Yeşil uç iğneli)	6944425888871, 21G	Astraject
A-498	HTB-44™	ATCC
Caki-1	HTB-46™	ATCC
HEK-293	CRL-1573™	ATCC
DMEM	41966-029	Gibco
EMEM	320-026-CL	Multicell
MEM Eagle	P04-08056	PAN BioTech
FBS	10500-064	Gibco
10X PBS	P04-53500	PAN BioTech
1X PBS	PBS500	EcoTech Biotechnology
1X Trypsin-EDTA (%0,25)	SH40003.01	HyClone
Penisilin-Streptomisin	P06-07100	PAN Biotech
100X Antimikotik-Antibiyotik Solüsyonu	450-115-EL	Multicell

Transfeksiyon Ajanı	15081	Intron Biotechnology
Transfeksiyon Ajanı	Canfast™ T0083	Canvax
MTT	M2003	Sigma Aldrich
Tripan Mavisi	EBT-001	NanoEnTek
Çinko Oksit Nanopartikülleri <50 nm partikül boyutu	677450	Sigma Aldrich
Rapamisin	1292	Tocris
Higromisin	A2813-100MG	Biomatik
miRCURY LNA™ miRNA Mimic	HSA-MIR-33A-5P	Qiagen
STAT5 plazmidi	167800	AddGene
GFP-LC3 plazmidi	11546	AddGene
Triton-X100	T8787-100ML	Sigma
Paraformaldehit	K47706405-623	Merck
BODIPY	D3922	Thermo Scientific
CM-H2DCF-DA	C6827	Invitrogen
DAPI	D1306	Invitrogen
DiOC ₆	2129966	Fluka
Mitotracker® Red CMXRos	M7512	Invitrogen
LysoTracker® Red DND- 99	L7528	Invitrogen
Propidium Iodide	A2261	AppliChem

7.3. EK C: Kimyasal Listesi Tablo

Tablo 7. 3.1. Kullanılan Kimyasalların Listesi

Adı	Ürün Kodu	Firma
Akrilamid/Bis-Akrilamid (%30 çözelti, 37.5:1)	A3699	Sigma Aldrich
Amonyum persülfat (APS)	A3678	Sigma Aldrich
N,N,N',N'- Tetra methylethylenediamine (TEMED)	A1148	AppliChem
Tris Hidroklorür	648317	CALBIOCHEM
Tris Baz	A2264	AppliChem
Bromofenol mavisi	A2331	AppliChem
Bradford reagent	23200	Thermo Scientific
BSA	500-0007	BioRad
Coomassie brilliant blue	500-0006	BioRad
Luminol	A8511	Sigma Aldrich
Skim Milk Powder	1172	BioFroxx
p-Kumarik Asit	CP008	Sigma Aldrich
Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Scientific
Laemmli Tamponu	S3401	Sigma Aldrich
1 kb DNA Ladder	GeneRuler SM0311	Thermo Scientific

Asetik Asit	27225	Sigma Aldrich
Agaroz Tip 1	121853	Merck Millipore
6X DNA Loading Dye	R0611	Thermo Scientific
Ponceau S	A2935	AppliChem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	1177GR100	BioFroxx
Glisin	A600560-0500	Sangon Biotech
Glisin	GB0235	BioBasic
Tween-20	1275KG001	BioFroxx
Hidrojen Peroksit %35	1086001000	Merck Millipore
DMSO	D5879	Sigma Aldrich
DEPC	A0881	AppliChem
Etanol	TK.200650	Teksoll
Etanol Absolute	32221	Merck Millipore
2-Propanol	1096342500	Merck Millipore
Kloroform	A2279	AppliChem
Metanol	24229	Sigma Aldrich
2-Merkaptoetanol	S4805940517	Merck Millipore
Sodyum Klorür (NaCl)	A2942	AppliChem
Hidroklorik Asit	1.00319	Merck Millipore
EDTA	A3452	Sigma Aldrich
Kristal Viyole	FN1048735	Merck Millipore
M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi	78505	ThermoFisher Scientific
Proteaz İnhibitör Kokteyli	87786	ThermoFisher Scientific
Proteaz İnhibitör Tablet (EDTA içermez)	A32955	ThermoFisher Scientific
RNase free dH2O	129112	Qiagen
Gliserol	GB0232	BioBasic
eBioscience Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	BMS500F1-100	Invitrogen
C6 Flow Cytometer Starter Kit	653160	BD Bioscience
miRNeasy Mini Kit	217004	Qiagen
miRCURY LNA RT Kit	2431	Qiagen
ZYMOPure Plasmid Miniprep Kit	D4211	ZYMO Research
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	K0502/K0503	Thermo Scientific
LB Agar	A7459	AppliChem
LB Broth Lennox	LBL405.1	BioShop
Amfisilin	P60-083910	PAN Biotech
Kanamisin	A1493,005	AppliChem
RNase A	EN0531	Thermo Scientific
Proteinaz K	D3001-2	Zymo Research
Propidium Iodide	51-6621E	BD Bioscience

20000X RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu	21140	Intron Biotechnology
--	-------	----------------------

Tablo 7. 3.2. SDS-PAGE Jel Hazırlama İçeriği (1 Jel)

Jel Yüzdesi Çözeltili	%10	%12	%15	Yükleme Jeli (Üst Jel)
dH ₂ O	2,05 ml	1,7 ml	1,2 ml	1,5 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	-
0,5M Tris-HCl (pH 6.8)	-	-	-	625 µl
%10 SDS	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
Akrilamid/bisakrilamid	1,65 ml	2 ml	2,5 ml	335 µl
%10 APS	40 µl	40 µl	40 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	2,5 µl

Tablo 7. 3.3. Kullanılan Antikorlar

Antikor Adı	Katalog Numarası	Firma Adı
Anti-rabbit IgG HRP-linked	7074	Cell Signaling Technology
Anti-mouse IgG HRP-linked	7076	Cell Signaling Technology
β-Aktin	664804	BioLegend
STAT5	D2O6Y	Cell Signaling Technology
FASN	C20G5	Cell Signaling Technology
ACC	C83B10	Cell Signaling Technology
SREBF2	STJ190141-200	St John's Laboratory
Lipin-1	D2W9G	Cell Signaling Technology
Kaspaz-3	D3R6Y	Cell Signaling Technology
Kaspaz-8	D35G2	Cell Signaling Technology
Beclin-1	D40C5	Cell Signaling Technology
LC3 A/B	D3U4C	Cell Signaling Technology
Atg5	D5F5U	Cell Signaling Technology

Tablo 7. 3.4. Kullanılan Primer Dizileri

miR-33a	5' TGGATATCCACACCAGGGTCCGAGGTATTCGGTGTGGATATCCATGCAATG 3'
RNU6B	5' CACGGAAGCCCTCACACCGTGTCTGTTTC 3'

7.4. EK D: Kullanılan Tamponların İçeriği

- **Rapamisin (10 mM)**

1 mg Rapamisin 110 µl DMSO'da çözündürülür. Kullanmadan önce 1:10 seyreltilir.

- **Higromisin (50 mg/ml)**

50 mg higromisin tartılır ve 1 ml distile suda çözündürülerek -20°C'de saklanır.

- **Çinko Oksit Nanopartikül Solüsyonu (1 mg/ml)**

Hassas terazide tartılan 1 mg ZnO NP'nin üzerine 1 ml FBS içermeyen medya eklenir. Kullanmadan önce sonikasyon yöntemiyle çözündürülür. Karanlıkta +4°C'de saklanır.

- **%10 (w/v) Amonyum Persülfat (10 ml)**

1 g APS tartılarak 10 ml distile suda çözündürülür, alikotlanarak -20°C'de saklanır.

- **Yağsız Bloklama sütü (%5, 50 ml)**

2,5 gram yağsız süt tozu tartılır, üzerine 50 ml TBS-Tween eklenerek çözündürülür.

- **10X TBS (pH 8, 1L)**

12,11 g tris ve 86,6 g NaCl tartılarak 700 ml distile su eklenir. pH 8'e ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanır. Kullanmadan önce 1:10 seyreltilir.

- **1X TBS-Tween (500 ml)**

500 ml 1X TBS ile 500 µl Tween-20 karıştırılarak oda sıcaklığında saklanır.

- **1X PBS (1L)**

Temin edilen 10X PBS distile su ile 1:10 seyreltilerek hazırlanır. Hücre kültüründe kullanılacaksa otoklavlanır ve 0,22 µm filtreden geçirilerek alikotlanır.

- **Bradford Reaktifi (1L)**

100 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250) tartılır, 50 ml %95 etanol ve 100 ml %85 fosforik asit eklenir. Daha sonra hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak karanlıkta +4°C'de saklanır. Kullanmadan önce 0,22 µm filtreden geçirilerek alikotlanır.

- **Etanol (%70, 1L)**

700 ml etanole 300 ml distile su eklenir.

- **Hücre Besiyeri**

Temin edilen DMEM ve EMEM besiyerlerine %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin eklenir. Daha sonra 0,22 µm filtreden geçirilir ve +4°C’de saklanır.

- **10X Transfer Tamponu (1L, pH 8,3)**

33 g tris ve 144 g glisin tartılarak 500 ml distile suda çözündürülür. Daha sonra pH 8,3’e ayarlanır ve son hacim 1 litreye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanır. Kullanmadan önce 100 ml 10X transfer tamponu, 150 ml metanol ve 750 ml distile su ile 1X’e dilue edilir. 1X transfer tamponu +4°C’de saklanır.

- **10X SDS-PAGE Yürütme tamponu (1L)**

30,3 g tris, 114 g glisin ve 1 g SDS tartılarak 500 ml distile suda çözündürülür. pH 8,3’e ayarlandıktan sonra son hacme tamamlanır ve oda sıcaklığından saklanır. Kullanmadan önce 1X’e dilue edilir ve +4°C’de saklanır.

- **LB Agar (1L)**

Üreticinin talimatına göre 15 g LB agar tartılarak 1 litre distile suda çözündürülür. Ardından otoklavlanır ve uygun sıcaklığa gelince gereken antibiyotik eklenerek aseptik koşullar altında petri kaplarına dökülür, donduktan sonra parafilmlenerek +4°C’de saklanır.

- **LB Broth (1L)**

Üreticinin talimatına göre 20 g LB broth tartılarak 1 litre distile suda çözündürülür. Ardından otoklavlanır ve uygun sıcaklığa gelince aseptik koşullar altında gereken antibiyotik eklenerek +4°C’de saklanır.

- **1,5 M Tris-HCl (150 ml, pH 8,8)**

27.23 g tris baz 80 ml distile su içerisinde çözündürülür ve pH 8,8’e ayarlanır. Ardından son hacme tamamlanır ve otoklavlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

- **0,5 M Tris-HCl (100 ml, pH 6.8)**

6 g tris baz 60 ml distile su içerisinde çözündürülür ve pH 6,8’e ayarlanır. Ardından son hacme tamamlanır ve otoklavlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

- **5X TBE (1L)**

54 g tris baz, 27,5 g borik asit, 20 ml (pH 8) 0,5 M EDTA ve 800 ml distile su çözündürülür. Daha sonra çözelti son hacme tamamlanır. Kullanmadan önce 1X’e distile su ile dilue edilir.

- **Hücre Dondurma Medyası**

9 ml FBS içerisine 1 ml DMSO eklenerek 0,22 µm filtreden geçirilerek alikotlanır ve -20°C’de saklanır.

- **Kemilüminesans Membran Görüntüleme Çözeltisi (ECL çözeltileri)**

Membranların görüntülenmesi için ECL A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlanır. ECL A çözeltisi için 9 ml distile su, 1 ml 1M Tris-HCl pH 8,5, 90 µl kumarik asit ve 200 µl luminol eklenir. ECL B çözeltisi için 9 ml distile su, 1 ml 1M Tris-HCl pH 8,5 ve 10 µl H₂O₂ eklenir. Çözeltiler karanlıkta tutularak taze şekilde karıştırılarak kullanılır.

- **Bovine Serum Albumin (1,5 µg/ml, 10 ml)**

0,015 g BSA tartılır ve 10 ml distile suda çözündürülür. Ardından 0,22 µm filtreden geçirilerek alikotlanır ve +4°C’de saklanır.

- **Kristal Viyole (10 ml)**

0,05 g kristal viyole tartılarak 2,5 ml saf metanolde çözündürülür ve distile su ile son hacme tamamlanır.

- **Kumarik Asit (10 ml)**

0,15 g kumarik asit 10 ml etanolde çözündürülerek +4°C’de saklanır.

- **5X Laemmli Tamponu (10 ml)**

2 ml 1,5 M pH 6,8 Tris-HCl, 0,5 ml %1 bromofenol mavisi, 5 ml gliserol, 2,5 ml β-merkaptoetanol ve 2 g SDS ile birlikte hazırlanarak alikotlanır ve +4°C’de saklanır.

- **Luminol (10 ml)**

0,44 gram luminol tartılır ve 10 ml DMSO’da çözündürülerek hazırlanır. Daha sonra karanlıkta ve -20°C’de saklanır.

- **%10 SDS (100 ml)**

10 g SDS tartılarak 100 ml distile suda çözülür.

- **Mild Strip Tamponu (1L, pH 2,2)**

15 g glisin ve 1 g tartılır, 10 ml Tween-20 ve 800 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Daha sonra 5M HCl eklenerek pH 2,2’ye ayarlanır ve hacim 1 litreye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

- **Memeli Hücre Lizis Tamponu (CLB)**

10 ml M-PER memeli protein ekstraksiyon reaktifi içerisine 1X olacak şekilde proteaz inhibitör kokteyli ya da bir adet EDTA içermeyen proteaz tableti eklenir. Daha sonra alikotlanarak +4°C’de saklanır.

- **DEPC dH₂O (1L)**

1 ml DEPC 1 litre distile su içerisinde oda sıcaklığında ve çeker ocak altında yaklaşık 2 saat boyunca karıştırılarak otoklavlanır.

- **Ponceau S Solüsyonu (500 ml)**

25 ml glacial asetik asit 400 ml distile su ile karıştırılır. 0,5 mg tartılan ponceau S tetrasodyum tuzu karışıma eklenir ve çözünene kadar karıştırılır. Ardından son hacme tamamlanır.

- **%4 Paraformaldehit (100 ml)**

4 g paraformaldehit tartılarak 100 ml 1X PBS ile eklenir. Ardından üzerine 10M NaOH eklenerek 60°C’de çözülür. Daha sonra pH 7,4 olacak şekilde ayarlanır ve +4°C’de saklanır.

- **%0,1 (v/v) Triton-X100 (100 ml)**

1 ml %10 Triton-X100 100 ml distile su içine eklenir.

- **MTT Solüsyonu (20 ml)**

0,1 g MTT tartılarak 20 ml 1X PBS ya da distile suda çözündürülür. Ardından 0,22 µm filtreden geçirilerek alikotlanır. Karanlıkta ve -20°C’de saklanır.

- **FBS’in İnaktivasyonu**

Temin edilen FBS 56±3°C ısıtılmış sıcak su banyosuna alınarak 30 dakika boyunca inaktivasyon sağlanır. Daha sonra alikotlanır ve -20°C’de saklanır.

- **5M KOH Solüsyonu (100 ml)**

28 g KOH tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözülür.

- **5M HCl Solüsyonu (100 ml)**

40 ml distile su üzerine 43,64 ml HCl yavaşça eklenir. Daha sonra distile su ile son hacme tamamlanır.