



**EKZOSOM TABANLI İLAÇ TAŞIMA SİSTEMİNİN
GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE KULLANIM
POTANSİYELİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* DENEYSEL
MODELLERDE ARAŞTIRILMASI**

SIDIKA GENÇ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Zeynep ÇAKIR

Co-Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Doktora Tezi-2021

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EKZOSOM TABANLI İLAÇ TAŞIMA SİSTEMİNİN
GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE KULLANIM
POTANSİYELİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* DENEYSEL
MODELLERDE ARAŞTIRILMASI**

Sıdika GENÇ

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zeynep ÇAKIR
Co-Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

**ERZURUM
2021**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ	XVII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sinir Sistemi.....	3
2.1.1. Glial Hücreler	3
2.1.1.1. Makroglialar.....	5
2.2. Kanser ve Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri	7
2.2.1. Beyin Kanserleri	9
2.2.1.1. Beyin Kanserinin Kökeni ve Tarihçesi	13
2.2.1.2. Beyin Kanseri Türleri	13
2.3. Glioblastoma Multiforme	16
2.3.1. GBM'nin Klinik Belirtileri.....	17
2.3.2. GBM’de Uygulanan Rutin Tedaviler	18
2.3.3. Temozolomid (TMZ)’nin GBM Tedavisindeki Yeri.....	19
2.3.4. Kullanılan Yeni Tedavi Yöntemleri	20
2.4. Nanopartiküler Sistemler	22
2.4.1. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	22
2.4.1.1. PLGA	23

2.5. Eksozomlar	24
2.5.1. Eksozomların Biyogenezi	24
2.5.2. Kanser Eksozomlarının Başlıca Görevleri.....	26
2.6. Eksolimer	28
3. MATERYAL VE METOT.....	30
3.1. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu	30
3.1.1. Eksozom İzolasyonu	30
3.1.2. Eksolimer Üretimi.....	30
3.1.3. Eksozom ve Eksolimer Karakterizasyonu	31
3.1.3.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	31
3.1.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....	31
3.2. Temozolamid Eksolimer Yüklenmesi	32
3.2.1. Mikroakışkan Cihazların İmalatı	32
3.2.2. Nanokapsüllerin İmalatı.....	33
3.2.3. Zeta Potansiyeli.....	34
3.2.4. Salım Profili	34
3.3. İn-Vitro Çalışmaları	35
3.3.1. Hücre Kültürü	35
3.3.1.1. Primer Nöron Kültürü.....	35
3.3.1.2. T98 G Kültürü.....	35
3.3.2. Sitotoksite Analizleri.....	36
3.3.2. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) Analizi	36
3.3.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitelerinin Ölçümleri	37
3.3.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitelerinin Ölçümleri	37
3.3.5. Oksidan ve Antioksidan Aktivite Analizleri.....	37

3.3.5.1. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK), Toplan Oksidan Sayısı (TOS) ve Hücredeki Oksidatif Stresin Varlığının Tespiti	37
3.3.6. Real Time PCR Analiz	38
3.3.6.1. Genetik Material Elde Edilişi	38
3.3.6.2. RNA İzolasyon	39
3.3.6.3. cDNA Sentezi	39
3.3.6.4. Gen Ekspresyonu	40
3.3.7. Flow Stometri	40
3.4. <i>İn vivo</i> Çalışmalar	40
3.4.1. <i>İn vivo</i> Kanser Modelinin Oluşturulması	40
3.4.2. Histokimyasal Analizler	41
3.5. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Eksozom Karakterizasyonu ve İçerik Tayini.....	43
4.1.1. TEM.....	43
4.1.2. AFM.....	43
4.2. Temozolamid Eksozom Yüklenmesi	44
4.2.1. Zeta Potansiyeli.....	44
4.2.2. Salım Profili	46
4.2.3. TEM.....	48
4.3. <i>İn-Vitro</i> Çalışmaları.....	48
4.3.1. MTT Analizi	48
4.3.1.1. Nöron Hücrelerine Ait MTT Sonuçları	48
4.3.1.2. T98-G Hücrelerine Ait MTT Sonuçları	51
4.3.2. LDH Aktivitelerinin Ölçümleri	54

4.3.2.1. Nöron Hücrelerine Ait MTT Sonuçları	54
4.3.3. T98-G Hücrelerine Ait LDH Sonuçları	56
4.3.4. GR Aktivitelerinin Ölçümleri	58
4.3.4.1. Nöron Hücrelerine Ait GR Sonuçları	58
4.3.4.2. T98-G Hücrelerine Ait GR Sonuçları	60
4.3.5. Antioksidan Aktivitesi Ölçümü	62
4.3.5.1. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)	62
4.3.5.2. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS)	67
4.3.6. Real Time PCR Analiz	71
4.3.6.1. L1CAM Gen Ekspresyonu	71
4.3.6.2. Kaspas 8 Gen Ekspresyonu	73
4.3.6.3. B2M Gen Ekspresyonu	74
4.3.6.4. MGMT Gen Ekspresyonu	76
4.3.6.5. PTEN Gen Ekspresyonu	77
4.3.6.6. TP-53 Gen Ekspresyonu	78
4.3.7. Flow Stometri Sonuçları	80
4.3.7.1. Nöron Hücrelerine Ait Flow Stometri Sonuçları	80
4.3.7.2. T98-G Hücrelerine Ait Flow Stometri Sonuçları	85
4.4. <i>İn vivo</i> Çalışmalar	90
4.4.1. <i>İn vivo</i> Kanser Modelinin Histopatolojik İncelenmesi	90
5. TARTIŞMA	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	101
KAYNAKLAR	102
EKLER	117
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	117

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	118
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	119
EK-4. TEZ ADI/ KONUSU DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU	120



TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalında yapılmıştır. Öncelikle tezimin hazırlanma sürecinde tecrübe ve katkılarından faydalandığım çok değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Zeynep ÇAKIR'a, bu çalışma sürecinde sunmuş olduğu kapsamlı laboratuvar imkanları ile bilgilerini ve hayat tecrübesini esirgmeden yol gösteren Co-danışmanım olan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu'na en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Doktora eğitimim ve tezim boyunca her türlü bilgi birikimini paylaşarak akademik hayatıma ışık tutan, gelişmemi sağlayan, her daim yanımda olan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ'ye ve bu yolculukta bana eşlik eden değerli arkadaşım Arş. Gr. Yeşim YENİ'ye teşekkürü borç bilirim. Tıbbi Farmakoloji ABD hocalarıma ve tüm asistan arkadaşlarıma tüm içtenliğimle şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmayı TDK-2020-8442 BAP proje numarasıyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim. Doktora eğitimim süresince maddi desteklerinden dolayı YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Programı ile Yükseköğretim Kurumu (YÖK)'e ve 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Burs Programı ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Beni dünyaya getirip bugünlere kadar emek veren, şefkat ve merhametiyle her koşulda yanımda olan değerli annem ve babama ve bu zorlu yolculukta destekçim olan sevgili eşime teşekkür ederim. Hayatımın her anında olduğu gibi tezimin hazırlanmasında da yardımlarını esirgemediklerinden ötürü değerli kardeşlerime minnettarım.

Meşakkatli olan bu yolda yürürken minicik bedenleri ve kocaman yürekleriyle hayatımı renklendiren, Berilsu; ruhum, ilk sevincim ve Bilge Duru'm; bugünüm, umudum, iki çiçeğim bu zorlu yolculukta bana gösterdiğiniz çocuk sabrınızdan dolayı minik yüreğinizden öperim. Siz olmadan bu yolda devam edemezdim, tüm çabalarım ve tüm adımlarım sizin için. Ömrümle birlikte bu tezi size atfediyorum.

Sıdika GENÇ

ÖZET

Ekzosom Tabanlı İlaç Taşıma Sisteminin Glioblastoma Tedavisinde Kullanım Potansiyelinin *in Vitro* ve *in Vivo* Deneysel Modellerde Araştırılması

Amaç: Çalışmamızda *in vivo* ve *in vitro* ortamında Truva atı gibi kullanılarak ekzosom veziküllerine kemoteropetik ajanların yüklenmesi ile yeni ilaç taşıyıcı sistem oluşturulması ve bu taşıyıcı sistem ile GBM kanser tedavisi yapılması amaçlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmamız *in vitro* ve *in vivo* kısımlarından oluşmaktadır. *in vitro* kısmında; T-98G hücre hattından eksozomlar izole edilerek karakterizasyon deneyleri (TEM, zetapotansiyeli ve topografik görüntüleme) yapılmıştır. Karakterize edilen eksozomlara Temazolamid ilaç emdirilmiştir. Daha sonra ilaç salım, MTT, LDH, TAK, TOS, GR, Flow Stometri, yanı sıra genetik analizi yapılmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. *in vivo* çalışmamızda ise glioblastoma ratlarda sırtta injekte edilerek beyin kanser modeli oluşturulmuş, deney sonunda histopatolojik inceleme yapılmıştır.

Bulgular: MTT sonuçlarına göre nöron hücrelerinde en fazla canlılık oranında düşüş TMZ 800 ng/ml grubunda gözlemlendi (%38). T98-G hücre hattında ise en fazla azalma Eksolimer-TMZ 800 ng/ml konsantrasyonunda görüldü. Flow stometri, LDH, GR, TAS ve TOS analizlerinden elde ettiğimiz sonuçlar MTT ile korelasyon gösterdi. Kaspaz 8 geni nöron ve T98-G hücrelerinde TMZ 800 ng/ml grubunda up-regüle olmuştur. PTEN gen ekspresyonunda anlamlı değer bulunmazken L1CAM, MGMT ve B2M genlerinde nöron hücrelerinde Eksozom 200 ng/ml grubunda ekspresyon seviyesi artarken T98-G hücrelerinde Eksolimer-TMZ 800 ng/ml grubunda düşüş görüldü. TP53 gen seviyesi sadece T98-G hücre hattında Eksolimer-TMZ 800 ng/ml grubunda artış göstermiştir. *in vivo* çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz histopatolojik görüntülere göre Eksolimer-TMZ 200 µg/ml grubunda kanser bölgesinde anlamlı derecede azalma olduğu tespit edildi.

Sonuç: Özel moleküllere sahip eksozom ile nanoteknolojinin birleştirilmesi ve kansere hedeflendirilmesi kanser tedavisine yeni bir bakış açısı getirecektir. Bu yönleriyle çalışmamız literatüre yeni bir bilgi sunacaktır.

Anahtar Kelimeler: Eksozom, glioblastoma, real -time PCR, TEM

ABSTRACT

Investigation of the Exosome-Based Drug Delivery System Potential in the Treatment of Glioblastoma *in vitro* and *in vivo* Experimental Models

Aim: In our study, it was aimed to create a new drug delivery system by loading chemotherapeutic agents into exosome vesicles by using it like a Trojan horse *in vivo* and *in vitro* and to treat GBM cancer with this carrier system.

Materials and Methods: Our study consists of *in vitro* and *in vivo* parts. In the *in vitro* part; Exosomes were isolated from the T-98G cell line and characterization experiments (TEM, zetapotential and topographic imaging) were performed. The characterized exosomes were impregnated with Temazolamide. Then drug release, MTT, LDH, TAK, TOS, GR, Flow Stometry, as well as genetic analysis were performed and statistically evaluated. In our *in vivo* study, glioblastoma was injected into the back of rats and a brain cancer model was created, and histopathological examination was performed at the end of the experiment.

Results: According to MTT results, the highest decrease in neuron cell viability was observed in the TMZ 800 ng/ml group (38%). In the T98-G cell line, on the other hand, the highest decrease was observed at the Exolimer-TMZ 800 ng/ml concentration. Our results from flow stometry, LDH, GR, TAS and TOS analyzes correlated with MTT. Caspase 8 gene was up-regulated in the TMZ 800 ng/ml group in neurons and T98-G cells. No significant value was found in PTEN gene expression. While the expression level of L1CAM, MGMT and B2M genes increased in the Exosome 200 ng/ml group in neuron cells, a decrease was observed in the Exolymer-TMZ 800 ng/ml group in T98-G cells. The TP53 gene level increased only in the Exolimer-TMZ 800 ng/ml group in the T98-G cell line. According to the histopathological images we obtained as a result of our *in vivo* study, it was determined that there was a significant decrease in the cancer area in the Exolimer-TMZ 200 µg/ml group.

Conclusion: Combining the exosome with special molecules and nanotechnology and targeting it to cancer will bring a new perspective to cancer treatment. With these aspects, our study will provide new information to the literature.

Keywords: Exosome, glioblastoma, real-time PCR, TEM

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AANN	: Amerikan Association of Neuroscience Nurses
ABD	: Amerikan Birleşik Devleti
AC	: Alternatif temas
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
BCNU	: Karmustin
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
BSL	: Biyohibrit sistem laboratuvarı
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CCD:	: Yük bağlaşımlı aygıt
CCR6+	: CC kemokin reseptörü tip 6
CD4+	: CD4 (farklılaşma kümesi 4)
CDCL3	: Döteryumlanmış kloroform
CDKN2A	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
DC	: Statik mod
DMEM	: Dulbeco ile modifiye edilmiş kartal ortamı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPBS	: Dulbecco's phosphate-buffered saline
ECM	: Hücre dışı matrisi
EDTA	: Edilendiamintetraasetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EV	: Hücre dışı veziküller

FBS	: Fetal bovin serumu
GBM	: Glioblastoma Multiforme
GR	: Glutasyon Redüktaz
HBSS	: Hanks balanced salt solution
ILV	: İntroluminal veziküller
KBB	: Kan beyin beriyeri
LDH	: Laktat dehidrogenaz
lnRNA/lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA
MG	: Malign gliomlar
MGMT	: DNA-onarıcı enzim
miRNA	: Mikro RNA
MMP9	: Matrix metaloproteinaz
MPS	: Monoküler fagosit sistemi
mRNA	: Mesajcı RNA
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
MS	: Multipl skleroz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MVB	: Multiveziküler gövde
NBM	: Nöro bazal medyum
NC	: Nanokapsül
NP	: Nanopartikül
PCV	: Prokarbozin lomustin ve vinkristin
PDMS	: Polidimetilsiloksan

PEG	: Polietilen glikol
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
pH	: Power of hydrogen
PLGA	: Poly (lactic-co-glycolic acid
PSS	: Periferik sinir sistemi
PTEN	: Fosfat ve tensin homologu
RES	: Retikuloendoteryal
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Radyasyon tedavisi
RTCA	: xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi
SAM	: Trimetiletoksi silan
SDS	: Sodyumlaorilsülfat
SPECT-SPECT/BT	: Foton emisyon tomografi
TAK	: Toplam antioksidan kapasitesi
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TGF-α	: Transformasyon büyüme faktörü
TH17+	: T helper 17
TMZ	: Temozolomid
TOS	: Toplam oksidan sayısı
T98-G	: Glioblastoma multiform
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kadın ve erkekte ölüm oranlarına ve yeni gelişen vakalara göre kanser türleri	9
Şekil 2.2. Beyin Kanseri ile ilişkili semptomlar ve oranları.....	11
Şekil 2.3. GBM ve diğer beyin tümörlerini tespit etmek için mevcut görüntüleme tekniklerine yol açan önemli keşiflerin ve olayların zaman çizelgesi.	13
Şekil 3.1. Eksolimer üretim aşamaları.....	30
Şekil 3.2. Bir kılıf akışı kullanarak THF'de Pluronic, PDMS-PEG ve TMZ'nin akışını hidrodinamik olarak odaklamak için kullanılan t-şekilli çapraz bağlantı mikroakışkan cihazının şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.1. Eksozoma ait TEM görüntüsü.....	43
Şekil 4.2. Eksozomların AFM topografisi.....	44
Şekil 4.3. İzole edilen eksozomların AFM ile karakterizasyonu.....	44
Şekil 4.4. Eksolimere ait zeta potansiyeli (dnm)	45
Şekil 4.5. Eksolimere ait zeta potansiyeli (mv)	45
Şekil 4.6. pH 5.8'de Eksolimer-TMZ konjugasyonunun kümülatif salım profil grafiği	46
Şekil 4.7. pH 6'da Eksolimer-TMZ konjugasyonunun kümülatif salım profil grafiği...	47
Şekil 4.8. pH 5.8'de Eksolimer-TMZ konjugasyonunun kümülatif salım profil grafiği.	47
Şekil 4.9. Eksolimer+TMZ enkapsülasyonuna ait TEM görüntüsü	48
Şekil 4.10. Kontrol ve pozitif kontrollere (eksozom, polimer, eksolimer ve polimer eksozom (200ng/ml)) ait MTT sonuçları.	49
Şekil 4.11. Kontrol ve farklı dozlarda TMZ (50,100,200,400 ve 800 ng/ml) ait MTT sonuçları.	50

Şekil 4.12. Kontrol ve farklı dozlarda Eksolimer-TMZ (50,100,200,400 ve 800 ng/ml)	
ait MTT sonuçları.	51
Şekil 4.13. Kontrol ve pozitif kontrollere (eksozom, polimer, eksolimer ve polimer	
eksozom (200ng/ml)) ait MTT sonuçları.	52
Şekil 4.14. Kontrol ve farklı dozlarda TMZ (50,100,200,400 ve 800 ng/ml) ait MTT	
sonuçları.....	52
Şekil 4.15. Kontrol ve farklı dozlarda Eksolimer+TMZ (50,100,200,400 ve 800 ng/ml)	
ait MTT sonuçları	53
Şekil 4.16. Kontrol (Negatif Kontrol), Pozitif Kotrol (Eksozom 200 ng/ml, Polimer,	
Eksolimer 200 ng/ml, Polimer + TMZ 200 ng/ml) gruplarının 24 ve 72	
saatlerine ait LDH sonuçları	54
Şekil 4.17. Kontrol, TMZ 50 ng/ml, TMZ 100 ng/ml, TMZ 200 ng/ml, TMZ 400 ng/ml,	
TMZ 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72.saatlerine ait LDH sonuçları	55
Şekil 4.18. Kontrol, Eksolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800	
ng/ml gruplarının 24 ve 72.saatlerine ait LDH sonuçları.	55
Şekil 4.19. Kontrol (Negatif Kontrol), Pozitif Kotrol (Eksozom 200 ng/ml, Polimer,	
Eksolimer 200 ng/ml, Polimer + TMZ 200 ng/ml) gruplarının 24 ve 72	
saatlerine ait LDH sonuçları	56
Şekil 4.20. Kontrol, TMZ 50 ng/ml, TMZ 100 ng/ml, TMZ 200 ng/ml, TMZ 400 ng/ml,	
TMZ 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72.saatlerine ait LDH sonuçları..	57
Şekil 4.21. Kontrol, Eksolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800	
ng/ml gruplarının 24 ve 72.saatlerine ait LDH sonuçları.	57
Şekil 4.22. Kontrol (Negatif Kontrol), Pozitif Kotrol (Eksozom 200 ng/ml, Polimer,	
Eksolimer 200 ng/ml, Polimer + TMZ 200 ng/ml) gruplarının 24 ve 72	
saatlerine ait GR sonuçları	58

Şekil 4.23. Kontrol, TMZ 50 ng/ml, TMZ 100 ng/ml, TMZ 200 ng/ml, TMZ 400 ng/ml, TMZ 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72. saatlerine ait GR sonuçları.....	59
Şekil 4.24. Kontrol, Eksolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72. saatlerine ait GR sonuçları.	60
Şekil 4.25. Kontrol (Negatif Kontrol), Pozitif Kontrol (Eksozom 200 ng/ml, Polimer, Eksolimer 200 ng/ml, Polimer + TMZ 200 ng/ml) gruplarının 24 ve 72 saatlerine ait GR sonuçları.....	60
Şekil 4.26. Kontrol, TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72. saatlerine ait GR sonuçları.	61
Şekil 4.27. Kontrol, Eksolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72. saatlerine ait GR sonuçları.	62
Şekil 4.28. Kontrol ve Pozitif kontrol grubuna ait TAK testi sonuçları.	63
Şekil 4.29. Kontrol ve TMZ grubuna ait TAK testi sonuçları.....	63
Şekil 4.30. Kontrol ve Eksolimer+TMZ grubuna ait TAK testi sonuçları.	64
Şekil 4.31. Kontrol ve Pozitif kontrol grubuna ait TAK testi sonuçları.	65
Şekil 4.32. Kontrol ve TMZ grubuna ait TAK testi sonuçları.....	66
Şekil 4.33. Kontrol ve Eksolimer+TMZ grubuna ait TAK testi sonuçları.	66
Şekil 4.34. Kontrol ve pozitif kontrol gruplarına ait TOS testi sonuçları.	67
Şekil 4.35. Kontrol ve TMZ grubuna ait TOS testi sonuçları.	68
Şekil 4.36. Kontrol ve Eksolimer+TMZ grubuna ait TOS testi sonuçları.....	69
Şekil 4.37. Kontrol ve pozitif kontrol gruplarına ait TOS testi sonuçları.	69
Şekil 4.38. Kontrol ve TMZ grubuna ait TOS testi sonuçları.	70
Şekil 4.39. Kontrol ve Eksolimer+TMZ grubuna ait TOS testi sonuçları.....	71
Şekil 4.40. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.....	72
Şekil 4.41. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	72

Şekil 4.42. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	73
Şekil 4.43. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	74
Şekil 4.44. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	75
Şekil 4.45. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	75
Şekil 4.46. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	76
Şekil 4.47. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	77
Şekil 4.48. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	78
Şekil 4.49. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	78
Şekil 4.50. Nöron Hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	79
Şekil 4.51. T98 hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları.	80
Şekil 4.52. 24 Saat sonrası Nöron hücrelerine ait kontrol gruplarının flow sitometri analizi.	81
Şekil 4.53. 72 saat sonrası Nöron hücrelerine ait kontrol gruplarının flow sitometri analizi.	81
Şekil 4.54. 24 saat sonrası Nöron hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları.	82
Şekil 4.55. 72 saat sonrası Nöron hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları.	83
Şekil 4.56. 24 saat sonrası Nöron hücre hattına ait farklı dozlardaki Eksolimer+TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları.	84
Şekil 4.57. 72 saat sonrası Nöron hücre hattına ait farklı dozlardaki Eksolimer+TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları.	84
Şekil 4.58. 24 saat sonrası T98-G hücre hattına ait kontrol gruplarının flow sitometri analizi.	85

Şekil 4.59. 72 saat sonrası T98-G hücre hattına ait kontrol gruplarının flow sitometri analizi.	86
Şekil 4.60. 24 saat sonrası T98-G hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları.	87
Şekil 4.61. 72 saat sonrası T98-G hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları.	87
Şekil 4.62. 24 saat sonrası T98-G hücre hattına ait farklı dozlardaki Eksolimer+ TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları.	89
Şekil 4.63. 72 saat sonrası T98-G hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları.	90
Şekil 4.64. <i>In vivo</i> rat glioblastoma modeline karşı kullanılan tedavilerin sonucu.	91

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 2.1. Farklı Beyin Kanseri Tiplerinde Gözlenen Belirti ve Semptomlar	12
--	----



1. GİRİŞ

Glioblastoma Multiforme (GBM), tüm primer beyin ve merkezi sinir sistemi neoplazmalarının %16'sını içeren en yaygın primer malign beyin tümörüdür. ¹ İnsidans oranı 100.000 popülasyonda 3,2 bireydir. Bu bireylerde lokasyon olarak kanser; frontal (%25), temporal (%20), pariyetal (%13) ve oksipital (%30) olmak üzere beynin her dört lobunda ve bazen de beyin sapında, beyincikte ve omurilikte (%12) görülmektedir. ²

Glioblastomalar dört farklı evreden oluşmaktadır. Birinci ve ikinci evreler genellikle iyi huylu astrositomalardan meydana gelmektedir. Üçüncü ve dördüncü evreler kötü huylu glioblastomaları kapsamaktadır. ³

Eksozomlar, immün hücreler ve tümör hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salınmaktadır. Bu veziküller, multivesiküler endozomlar içinde üretilir ve plazma zarı yoluyla salınırlar. ⁴ Kanser hücrelerinden salınan eksozomların çapı 30 ila 100 nm arasında değişmektedir. Salınan eksozomlar içerik olarak; proteinler (onkoproteinler, tümör baskılayıcı proteinler ve transkripsiyonel düzenleyiciler dahil)⁵, lipidler (fosfatidilkolinler, fosfatidiletanolaminler ve fosfatidilserin dahil)⁶, DNA (tek iplikli DNA, genomik DNA, XX DNA ve retrotranspozon elementler dahil)⁷ ve RNA'lar⁸ (haberci RNA'lar [mRNA'lar], uzun kodlayıcı olmayan RNA'lar [lncRNA'lar]⁹, mikroRNA'lar [miRNA'lar (direnc genleri dahil)] ve diğer kodlamayan RNA'lar [ncRNA'lar]¹⁰ dahil) gibi çeşitli biyoaktif molekülleri taşımaktadır. ⁶

Eksozomlar Sitokinlere benzer şekilde akyuvarları premetastatik tümör dokusuna toplayabilir, böylece tümör metastazları ve hücre büyümesini desteklemek için hücre dışı matrisi (ECM) yeniden şekillendirirler. ¹¹ Bu nedenle Matrix metaloproteinaz-9 (MMP9), transformasyon büyüme faktörü β (TGF- β) / Smad sinyal yolunu aktive ederler ve bu yolla ECM bozulmasında anahtar rol oynarlar. ¹² Ayrıca tümör kaynaklı eksozomlar immün yanıtta rol oynarlar. Efektör T hücrelerinin aktivasyonunu baskılar, aktive T-

hücrelerinin apoptozunu tetikler ve metastatik hücrelerin tümör immün gözetiminden kaçmasına yardım ederler.¹³ Bunlara ek olarak tümör kaynaklı eksozomlar ilaç direncini düzenleyerek tümörün ilerlemesini teşvik ederler. Bu ilaç direnci mekanizmaları; (1) tümör hücreleri antikanser ilaçlarını metabolize etmek için eksozom sekresyonunu kullanabilir; (2) eksozomal moleküler kargolar, onkogenik hedeflere bağlanmak için antikanser ilaçlarla, özellikle de antikor bazlı ilaçlarla rekabet edebilir, böylece terapötik etkilerini azaltabilir ve (3) eksozomlar, ilaca dirençli hücrelerden ilaca duyarlı hücrelere ilaç direncinin lateral transferine katkıda bulunurlar.¹⁴

Kimyasal ve biyomoleküler ilaçların terapötik etkinliğini arttırmak amacıyla kullanılan nano ölçekli ilaç dağıtım sistemleri günümüzde büyük önem taşımaktadır.¹⁵ Bununla birlikte, bu taşıma sistemlerinin bazı zorlukları bulunmaktadır. Bunlar; maddelerin sitotoksitesi ve retiküloendotelyal sistem (RES) veya mononükleer fagosit sistemi (MPS) tarafından hızla ortamdan uzaklaştırılmasıdır.¹⁶ Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu veziküllerin modifikasyonu sonucu ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabileceğini ve bu yöntemle geliştirilen ilaç taşıma sisteminin diğer yöntemlerden daha avantajlı olacağı üzerine durulmaktadır. Fakat henüz ilaç taşıma sistemi olarak eksozomların kullanımına yönelik çalışmalar literatürde çok az mevcuttur. Bulunan bu çalışmalar ise çoğunlukla derleme şeklindedir.¹⁷

Bu bilgilerden ve literatürdeki bu eksiklikten yola çıkarak *in vivo* ve *in vitro* ortamında kemoteropatik ajanların Truva atı olarak kullanılan eksozom veziküllerine yüklenmesi ile yeni ilaç taşıyıcı sistem oluşturmayı planlamaktayız. Bununla birlikte geliştirilen yeni ilaç-immünoaktif taşıma sistemi yardımı ile ilaç direncini ortadan kaldırmak ve tedavi etkinliklerini arttırmak düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, bir organizmanın çevresi ile iletişimini sağlayan karmaşık ağlardan meydana gelmektedir. Çevresel uyaranlara karşı gelişen duyuşal bileşenler ve iskelet, düz kaslar ve kalp kasının kontrolünü sağlayan motor bileşenler başta olmak üzere glandüler sekresyonların kontrolü, duyuşal girdilere ya da alınan uyaranlara uygun motor tepkilerin oluşumu bu sistem ile koordine edilir, saklanır ve işlenir.¹⁸

Sinir sistemi, beyin, beyincik, beyin sapı ve medulla spinalis'ten (omurilik) oluşan merkezi sinir sistemi ve medulla spinalisten çıkarak tüm vücuda dağılan sinir ağlarından oluşan çevresel sinir sistemi olmak üzere iki bölümde incelenmektedir. Periferik sinir sisteminde fibroblastlar, uydu hücreleri, Schwann hücreleri ve kan damarları tarafından desteklenmektedir. Merkezi sinir sisteminde ise sinir hücreler glia ve kan damarları tarafından desteklenmektedir.¹⁸

Merkezi sinir sistemi “Nöron (%10)” ve “Glial (%90)” hücrelerden meydana gelmektedir. Sinir sisteminin temel iletken elementi olan nöron hücresi bir gövde, dendrit ve aksondan oluşmaktadır. Hücre gövdesi hücresel işlevlerin gerçekleşmesi için hayati önem taşıyan birçok (çekirdek ve çekirdekçik de dahil olmak üzere) organelli içermektedir. Bu nedenle sinir hücresinin tropik merkezi olarak kabul edilmektedirler. Dendritler hücre gövdesinden uzanır ve nöronun alıcı yüzeyini arttırırken aksonlar ise merkezi sinir sistemindeki sıvılardan izole eden miyelin adı verilen lipoprotein zarla kaplıdır ve hücre gövdesini terk ederek diğer hücrelerle bağlantıyı sağlar. Glia hücreleri ise nöronlara destek görevi yapan hücrelerdir.¹⁹

2.1.1. Glial Hücreler

Glial hücreler ilk olarak Rudolf Virchow, Santiago Ramón y Cajal ve Pío del Río-Hortega gibi 19. yüzyılın önde gelen nörobilimcileri tarafından "Nervenkitt" (Almanca

sinir yapıştırıcısı kelimesi) olarak tanımlanmıştır. Zamanla, bilim adamları bu hücrelerin olası ek rolleri hakkında spekülasyon yapmaya başladılar fakat diğer rolleri belirlemek için birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, glial hücrelerin tüm özellikleri henüz tam olarak bilinmemektedir.²⁰

Glial hücreleri nöronların etrafını saran hücreler topluluğudur ve genel olarak nöronlara fiziki destek, besin ve oksijen sağlamak ile görevlidirler.²¹ Ayrıca atıkların uzaklaştırılması, nöronlar arası iletişimi, patojenik faktörlerin ortadan kaldırılmasından ölen hücre ve nöronların temizlenmesine kadar birçok görevi bulunmaktadır. Glial hücreleri nöron hücreleri gibi ektodermden köken almaktadır. Buna rağmen birçok yönden birbirinden oldukça farklıdırlar. En önemli farklılıkları; glial hücreleri mitoz evreyi tamamlayarak bölünebilme yeteneklerini korumuşken, nöron hücrelerinde bölünme siklusu post-mitotik evrede kalmıştır bu nedenle bölünme yeteneklerini kaybetmişlerdir.^{22, 23}

Embriyogenezin ilk aşamasında, glial hücreler farklı prekürsör moleküller salgılayarak nöron göçüne ve nöronların lokalizasyonuna rehberlik ederler. Bunun yanı sıra akson ve dendrit gelişiminde katkıda bulunurlar²⁴. Glial hücrelerinin dinamik yapısı ve plastisitesi diğer hücrelerden farklıdır. Nöron hücrelerinin aksine glia hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisi daha esnektir. Bu plastisite MSS içerisinde, gliaları kemokin sinyallerine göre göç edebilmelerini sağlamaktadır.²⁵

MSS'de iki tür glia hücresinden meydana gelmektedir (Makroglia ve Mikroglia olmak üzere) PSS ise Schwann hücrelerinden oluşmaktadır. Beyinde bulunan glial hücrelerinin neredeyse tamamı (%85-90) Makroglia hücrelerinden çok az bir kısmı (%10-15) ise mikroglia hücrelerinden oluşturmaktadır. Makroglialar embriyonik dönemde ektodermden, mikroglialar ise hematopoetik dokudan gelişmişlerdir. Bunların aksine

omurilikte bulunan Schwann hücreleri ve satellit hücreleri ise nöronal krestten gelişmişlerdir.

2.1.1.1. Makroglialar

A. Astrositler

Astrositler sinaptik nörotransmitter seviyelerini kontrol eder ve nöronlar etrafında iyonik homeostazı sürdürerek verimli sinaptik sinyal iletimine izin verir. Endfeet adı verilen süreçlerle serebral kan damarlarını kaplarlar ve kan beyin bariyerinin bir parçasıdır. Kan beyin bariyeri (KBB) homeostazisini düzenlerler, Damar genişliğinin kontrolü ve nöronal faaliyetlere göre kan akımını da yine astrositler gerçekleştirmektedirler. Nöronlara metabolik ve enerjik destek sağlarlar. Ek olarak, astrositler sinaptik yarıktaki nöroaktif moleküller- gliotransmitterler- salabilir ve sinaptik sinyali güçlendirebilir.²⁶

Ayrıca, nörotransmitter reseptörlerine sahiptirler ve bir astrositten diğerine boşluk kavşakları yoluyla yayılan kalsiyum dalgaları ile birbirleriyle iletişim kurarlar. Bunlar dışında embriyonik dönemde çeşitli sitokin ve hormon salgılayarak nöron göçü ve lokalizasyonunu düzenlerler. Astrositlerin hücre zarında bulunan çeşitli nörotransmitter ve hormon reseptörlerine bağlanmaktadır. Nöronal Ca^{++} iyon yolağını aktif hale getirip nöron-astrosit ilişkisini düzenlemektedirler. Bununla birlikte salgılanan nörotransmitterlerin salgılandıkları nörona geri dönmesini sağlayarak nöronal ileti döngüsünü sağlamaktadırlar.

Hepatik ensefalopati, depresyon, Alzheimer, hafıza kaybı, nöronal dejenerasyon ve rejenerasyon, ruhsal ve davranışsal bozukluklar, Multipl Skleroz (MS), amiotrofik lateral skleroz (ALS) ve diğer metabolik hastalıklarla ilişkilidirler. Bu hastalıklar dışında en ölümcül hastalıklardan biri olan “gliomalar (en yaygın beyin kanseri türü olan

Glioblastomlarda dahil olmak üzere))” astrosit kaynaklı hastalıkların başında gelmektedir.

Astrositler farklı morfolojik özelliklere sahiplerdir (protoplazmik ve fibröz). Bu farklı yapılara sahip olmalarına rağmen görevleri benzerlik gösterir. Görünüm olarak protoplazmik astrositler; gri cevherde bulunurlar ve çok sayıda kısa ve kalın uzantılara sahiplerdir.²⁷ Bu uzantılar hücre gövdesinden başlayarak nöronların sinaptik bölgelerine kadar uzanırlar.²⁸

B. Oligodendro glialar

Oligodendrositler, makro gliaların %15’ini oluşturmaktadırlar. Bu hızlı bir saltatory iletimi sağlamak için aksonları yalıtın ve aksonlara trofik destek veren miyelin kılıfının üretiminden sorumludurlar.²⁹ Myelinleşme sonucunda iyon kanallarının nöron etrafında kümeleşmesine neden olur. Bu sayede elektriksel iletinin hızının artmasına olanak tanırırlar. Olası hasar durumunda eğer myelin kılıf yapısında bozulma oluyorsa hastalıkların gelişmesine (örneğin multipl skleroz ve kalıtsal nöropati) neden olmaktadır. Bu hastalıkların başında sinir sistemi otoimmün hastalıkları gelmektedir.³⁰

C. Ependimal hücreler

Makroglia hücrelerinin %5’i Ependimositlerden oluşmaktadır. Bu hücreler ventriküllerin çeperini kaplar ve beyin omurilik sıvısını üretilip ventriküllere salınımını gerçekleştirirler. Bu işlevleri sayesinde beyin basıncını sabit tutarlar ve mekanik olarak beyni darbelerden korurlar.³¹

D. Radyal Glia hücreleri

Radyal hücreler nöroepitel hücrelerden meydana gelmektedirler buna rağmen bölünme yetenekleri nispeten daha düşüktür. Radyal glia hücreleri, progenitör olarak nöronların göçünde görev alırlar ve nöron hücrelerinin yerleşimi tamamlandıktan sonra protoplazmik astrositlere dönüşürler.

E. Schwann hücreleri

Oligodendrositlerin PSS'de bulunan hücre tipidir. Yalıtımından sorumlu olan oligodendrositlerin PSS'de ki hücre tipleridirler. Sinaps oluşumunda yardımcı hücre tipidir.³²

F. Mikroglia hücreleri

Mikroglialar MSS hücrelerinin %10-15'ini teşkil ederler. Diğer tüm glial hücreler gibi ektodermal dokudan değil, sadece gelişim sırasında beyni dolduran yolk-sac progenitörlerinden kaynaklanırlar.³³ Mezodermden gelişen ve hematopoetik kökene sahip olan mikroglialar dikdörtgen yapılı, heterojen görünümlü ve makroglialara oranla daha küçük hücrelerdir. Mikroglialar, erken embriyonik dönemde makrofajlardan köken alırlar ve fagosit özelliği ve göç edebilme yeteneğine sahiptirler.⁴ Bu hücreler, beyin dokusunda olası hasar ve enfeksiyon durumunu inceler, hasar varsa çoğalıp hasarlı hücreleri ve ölü hücreleri yok ederler. Fakat bu hücrelerin fagositik özelliği normal immun sisteminde bulunan makrofajlar kadar iyi değildir. Buna rağmen özellikle sinir sisteminin gelişim sıralarında anormal sinaptik oluşumları sahip hücrelerin ortamdan uzaklaştırırlar ve sinapsların yeniden şekillenmesini ve nöronal ağın yapılanmasını sağlarlar. Mikroglialar birçok dejeneratif nöronal hastalık durumunda aktifleştirdiği tespit edilmiştir ancak aktif hale gelen mikrogliaların bu hastalıkların iyileşme sürecine nasıl katkı sağladıkları henüz tam olarak bilinmemektedir.³³

2.2. Kanser ve Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri

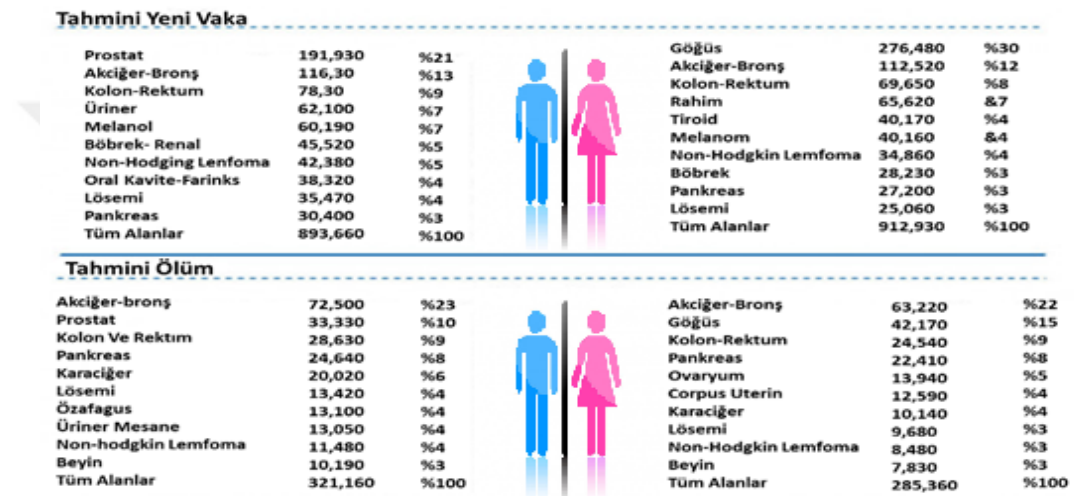
Kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında hücrelerin hızlı ve kontrolsüz bölünmesidir ve herhangi bir organ veya vücut yapısından kaynaklanan ve büyümeyi durdurma yeteneğini kaybetmiş küçük hücrelerden oluşmaktadır. İnsan vücudundaki sağlıklı hücreler, yaşlanmaya başladıkça, çeşitli sinyaller ve yollar ile programlı bir şekilde ölüme sürüklenmekte ve yerini yeni oluşan hücrelere bırakmaktadırlar. Ancak

kanser hücrelerinde kromozomal anormallikler ve genomik kararsızlık (instabilite) göstermelerinden dolayı, hücre çoğalması, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hücre-hücre bağlantılarını kontrol eden özel genlerde mutasyonlar meydana gelmektedir. Bunun sonucu hücrenin anormal bir şekilde çoğalmasına neden olmaktadır.³⁴ Bu anormal oluşumlar sonucunda hücrede, translokasyon, anöploidi, kromozom kaybı, DNA çoğalması (amplifikasyonu) ve delesyonlar gibi oldukça önemli ve büyük genetik kusurların oluşumu gözlemlenir. Oluşan bu yeni hücreler kontrolsüz bölünme göstererek tümör oluşumunu başlatırlar.³⁵ Normal bir hücrenin kanserli bir hücreye dönüştürülmesi, muhtemelen kanserin oluşumunda çok kritik bir olay değildir; daha ziyade vücudun bağışıklık hücrelerinin sayıca az olduklarında yeni oluşan kanser hücrelerini tanıyıp yok edememesinden kaynaklanmaktadır.

Tümörlerin diğer dokulara ve organlara yayılması durumuna bağlı olarak benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Benign tümörler, çevre dokulara veya vücudun farklı bölgelerine yayılma özelliği göstermeden, oluştukları bölgelerde kalma eğilimi göstermelerine rağmen malign tümörler çevre dokulara veya kan ve lenf dolaşım sistemi aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine taşınarak çoğalmaları (metastaz) ile karakterize edilmektedirler.^{34, 36} Oluşan tümörlerin yayılması ise kanser ölümlerinin %90'ını oluşturmaktadır.³⁷

Yüz yıl önce kanser çok yaygın değildi; bununla birlikte, son birkaç on yıldan beri, muhtemelen değişen yaşam tarzımız, alışkanlıklarımız ve artan yaşam beklentimiz nedeniyle insidansı endişe verici bir şekilde artmaktadır. Gelişen tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen kanser korkulan 20 hastalıktan biri olmakla birlikte kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra, sebebi bilinen ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır.³⁸ 2018 yılında Uluslararası Kanser Araştırması Ajansı'nın yayınladığı verilerine göre; dünya çapında kanser vakaları 18,1 milyona ve kansere bağlı ölüm

oranına yükselerek 9,6 milyona ulaştığı ortaya konulmuştur. Dünyadaki en önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasında kanserinde olduğu belirtilen raporda, her 5 erkekten 1'inde ve her 10 kadından 1'inde yeni kanser teşhisi konulduğu vurgulanmıştır. Bunun yanı sıra kanser teşhisi konulmuş hastalardan her 8 erkekten 1'i ve her 11 kadından 1'i hayatını kaybettiği tespit edilmiştir. Yine Uluslararası Kanser Araştırması Ajansı verilerine göre 5 yıllık kanser prevelansının 43,8 milyona ulaştığı tahmin edilmektedir (Şekil 2.1).^{39, 40}



Şekil 2.1. Kadın ve erkekte ölüm oranlarına ve yeni gelişen vakalara göre kanser türleri

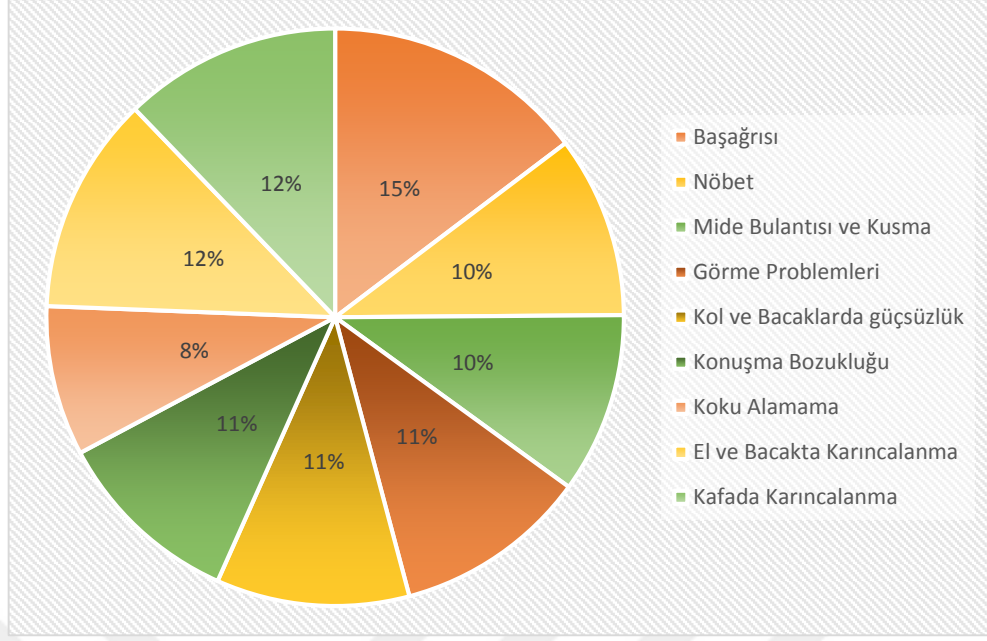
2.2.1. Beyin Kanserleri

Beyin tümörlerinin görülme sıklığı diğer kanser türlerine nazaran daha az olmakla birlikte ölüm oranı oldukça yüksek olan bir kanser türüdür. 2020 yılına ait verilere göre, tüm dünyada görülen beyin tümörleri, tüm kanser olgularının yaklaşık %7'lik kısmını ve ölüm oranında %3 ünü oluşturduğu gösterilmiştir.⁴¹ Ayrıca yapılan birkaç çalışmaya göre, Amerika da her yıl 100.000 insanın yaklaşık olarak yirmisinde beyin tümörü tanısı konmaktadır. Beyin dokularında meydana gelen anormal ve kontrolsüz büyüme sonucunda beyin tümörleri oluşmaktadır.^{42, 43} Beyin tümörleri primer ve sekonder olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Primer beyin tümörü genellikle nöroglial dokudan, beynin kendi kan damarlarından, hipofizden, meninkslerden ve kaynak dokuya göre

adlandırılan sinir liflerinden köken alarak beyinde başlar. Beyinde lenfatik kanallar bulunmadığından dolayı metastaz görülme sıklığı düşüktür. Metastaz gözlenen primer beyin tümörlerinde, genellikle BOS (Beyin Omirilik Sıvısı), serebral kandolaşımı, kranial cerrahi ve yapay shuntlar aracılığıyla diğer dokulara yayılım gözlenmektedir⁴⁴. Sekonder beyin tümörü diye adlandırılan metastatik beyin tümörü ise, vücudun herhangi bir yerinde başlayıp daha sonra beyine yayılma eğilimi gösteren beyin tümörleridir.⁴⁵⁻⁴⁷ Özellikle arteriyel dolaşım aracılığıyla yayılan göğüs, akciğer, kolon, pankreas, böbrek ve cilt kanserleri sekonder beyin tümörüne neden olmaktadır.

Beyin tümörlerinin neden olduğu genel belirti ve semptomlar;

- Giderek daha sık ve daha şiddetli hale gelen baş ağrıları
- Nedeni bilinmeyen mide bulantısı veya kusma
- Görme sorunları (çift görme, bulanık görme, çift görme veya periferik görme kaybı gibi)
- Kol ve bacaklarda giderek artan his veya hareket kaybı
- Denge ve konuşmada güçlük yaşanması
- Günlük konularda karışıklıklar ve kişilik veya davranış bozukluğu
- Özellikle nöbet öyküsü olmamasına rağmen kişide gelişen ani nöbetler ve
- İşitsel sorunlar şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 2.2, Tablo 2.1.).



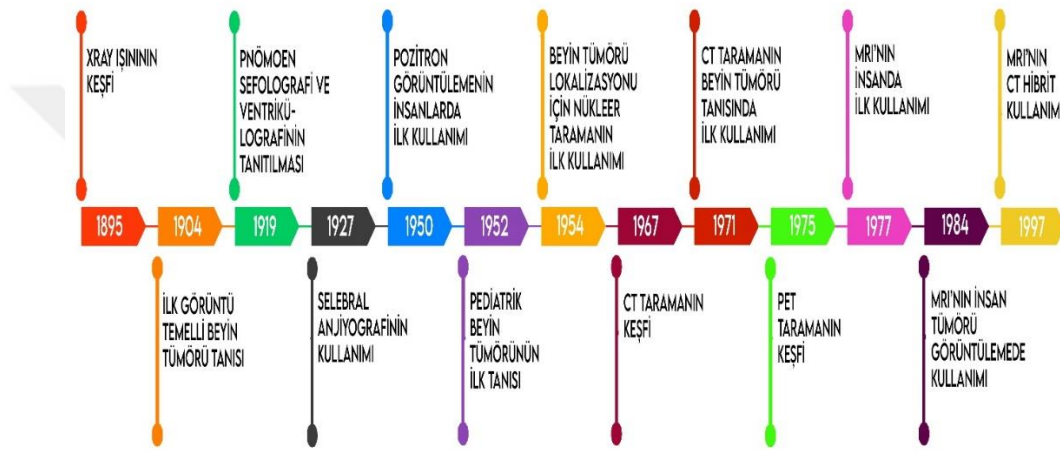
Şekil 2.2. Beyin Kanseri ile ilişkili semptomlar ve oranları

Tablo 2.1. Farklı Beyin Kanseri Tiplerinde Gözlenen Belirti ve Semptomlar

Sıra No	Beyin Türleri	Kanseri	Semptomlar	
			Çocuk ^{48, 49}	Yetişkin ⁴⁹
1	Astrozitoma		Sabah erken saatlerde başlayan baş ağrıları, zamanla kötüleşen kusma, ataksi, papilödem, nöbetler, fokal nörolojik defisit, hidrosefali, görme azalması, hipofiz disfonksiyonu	Bozulmuş denge, bulantı, kusma, kilo değişikliği, kişilik ve davranış değişikliği, baş ağrısı, yorgunluk, iştah kaybı
2	Beyin Glioma	Kökhücre	kranial sinir VI ve VII felçleri ve Hidrosefali	Çift görmeye yol açan göz hareketlerinde anormallikler, yüzde güçsüzlük veya duyu değişiklikleri, yutma gücü ve ses kısıklığı, baş ağrısı, bulantı, kusma ve yürümede dengesizlik Vücudun bir tarafında zayıf koordinasyon da oluşabilir.
3	Craniopharyngioma		Baş ağrısı, görme bozuklukları ve şeker hastalığına bağlı olmayan diyabet	Obezite, gelişim geriliği, görme bozukluğu ve şişmiş optik sinir
4	Ependymoma		Baş ağrısı, kusma, ataksi, kafa içi basınç artışı, nöbetler	Kafatasında artan basınç, baş ağrısı, papilödem, kusma, mide bulantısı, nöbetler, davranış şekli, hafıza bozukluğu, bunama, hafıza bozukluğu, motor fonksiyon bozukluğu vb.
5	Germ cell tumors		Olağandışı susuzluk, sık idrara çıkma, erken ergenlik veya görme değişiklikleri	Baş ağrısı, bozulmuş görme hormonu ile ilgili sorunlar
6	Glioblastoma		Baş ağrısı, kusma veya kafa karışıklığı, zihinsel değişiklikler, artan uyku, hafıza kaybı	Kalıcı baş ağrıları, görme bozukluğu (çift veya bulanık görme), mide bulantısı, kusma, iştahsızlık, ruh hali veya kişilik değişiklikleri, düşünme ve öğrenme yeteneğinde değişiklikler, hafıza kaybı, nöbetler, kas ağrıları ve zayıflığı, konuşma bozukluğu
7	Glioma		Vücudun ve/veya yüzün bir tarafında hareket edememe, denge kaybı, yürüme, görme ve işitme sorunları, sabah baş ağrısı, mide bulantısı ve kusma, olağandışı uyku hali, davranışta, öğrenmede güçlük	Baş ağrısı, bulantı, kusma, görme sorunları, göz hareketlerinde zorluk, yüz plazisi, halsizlik, uyuşma, ruh hali değişikliği, nöbetler, ağrı, görme bozukluğu, yazma gücü, vücudun bir tarafında felç, konuşmada sorun, hafıza koordinasyon ve denge
8	Medulloblastoma		1 yaşından küçük çocuklarda bulantı, kusma, baş ağrısı, ataksi, baş boyutunda artış, uyuşukluk	Baş ağrısı, mide bulantısı, kusma, uyuşukluk ile sonuçlanan kafa içi basınç artışı; uzuvların dengesizliği ve zayıf koordinasyonu; ve olağandışı göz hareketi.
9	Meningioma		Baş ağrısı, kusma, sakarlık, el yazısı ve diğer motor becerilerle ilgili sorunlar, görme sorunu	Baş ağrısı, bir tarafta güçsüzlük, nöbetler, kişilik ve davranış değişiklikleri ve kafa karışıklığı
10	Mixed glioma		Baş ağrısı, hasta olma hissi, nöbetler (uyuma) koordinasyon sorunları	Baş ağrısı ve mide bulantısı ile sonuçlanan kafa içi basıncının artması
-11	Oligodendroglioma		Kişilik, duyu ve harekette değişiklikler, kafa içi basınç artışı, baş ağrısı, kusma ve nöbetler	Nöbet, baş ağrısı, halsizlik, davranış değişiklikleri veya uyku hali

2.2.1.1. Beyin Kanserinin Kökeni ve Tarihçesi

Beyin kanseri 1873'te Gupta Longati (Rus bilim adamı) tarafından ilk olarak keşfedilmiştir. Sözde iyi huylu bir tümörden ölen bir kişinin beynini gözlemlerken kötü huylu bir tümör olduğunu keşfetmiştir.⁵⁰ 1879'da William Macewen tarafından Dura mater'in (Meningiomlar) mantar tümörünü çıkarmak suretiyle ilk başarılı tümör cerrahisi yapılmıştır. 1895'in sonlarında ise Fedor Krause, intrakraniyal tümörleri lokalize etmeye yardımcı olması için X-ışınlarını kullanmıştır (Şekil 2.3).^{51, 52}



Şekil 2.3. GBM ve diğer beyin tümörlerini tespit etmek için mevcut görüntüleme tekniklerine yol açan önemli keşiflerin ve olayların zaman çizelgesi. BT, bilgisayarlı tomografi; MRI, manyetik rezonans görüntüleme; PET, pozitron emisyon tomografisi.

2.2.1.2. Beyin Kanseri Türleri

Primer beyin tümörleri, beynin kendisinden veya beyni örten zarlar (meninksler), kraniyal sinirler, hipofiz bezi veya epifiz bezi gibi ona yakın dokulardan kaynaklanmaktadır. Birincil beyin tümörleri, normal hücrelerin DNA'larında meydana gelen hatalar (mutasyonlar) sonucunda başlar. Bu mutasyonlar, hücrelerin artan oranlarda büyümesine ve bölünmesine olanak tanıyarak sağlıklı hücrelerin normal süreci olan apoptotik süreci engelleyerek yaşamlarını sürdürmesine olanak tanımaktadırlar.

İyi huylu beyin kanseri, nadiren etraflarındaki dokuları yayan ve istila eden, belirgin sınırlar sergileyen ve çok yavaş büyüyen hücelere sahip olan bir kanserdir. İyi

huylu beyin tümörünün örnekleri arasında hipofiz tümörleri, meningiomlar ve astrositomlardır. Malign beyin kanseri ise beynin ve omuriliğin diğer kısımlarını kolayca işgal eden, belirgin sınırları olmayan ve hızla büyüyen hücrelere sahip olan bir kanserdir. Malign tipteki beyin kanseri örnekleri arasında yüksek dereceli astrositomlar, oligodendrogliomlar vb. yer almaktadır.

A. Primer beyin kanseri türleri

1. Beyin sapı gliomu: Genellikle üst beyin sapında (orta beyin veya tectum), orta beyin sapında (pons) ve alt beyin sapında (serviko-medüller) oluşur. 5-40 yaş aralığındaki çocuklarda ve erişkinlerde yaygındır.⁵³

2. Kraniofarengjiyom: Hipofiz sapının yakınında bulunan küçük hücre yuvalarından kaynaklanan bir tümördür. 45 yaşından sonra erişkinlerde tüm primer beyin kanserlerinin %2-5'ine oluşturmaktadır ve çocuklarda da görülmektedir. Adamantinomatöz ve papiller kraniofarengjiyom olmak üzere iki tip kraniofarengjiyom vardır.⁵³

3. Germ hücreli tümörler: Beynin epifiz veya suprasellar bölgelerinden kaynaklanan bir tümör türüdür. Çocuk beyin tümörlerinde yaklaşık %1-3 ve 11-30 yaş arası genç erişkinlerde de ortaya çıktığı bulunmuştur.⁵³

4. Glioma: Glial hücreler olarak adlandırılan, beynin destekleyici veya yapışkan benzeri dokularından kaynaklanan bir tümöre glioma adı verilir. Tümörlere yol açan üç tip glial hücre vardır, yani astrositler, oligodendrositler ve ependimal hücreler.⁵³

5. Astrositom: Beynin serebrum kısmında bulunan astrosit adı verilen yıldız şeklindeki hücrelerden kaynaklanan bir tümördür. Astrositom farklı derecelerde sınıflandırılır:

Derece I: Pilositik astrositom: Juvenil pilositik olarak da adlandırılan, genellikle iyi huylu olan ve çoğunlukla çocuklarda ve 20 yaşındaki genç erişkinlerde görülen

gliomaların %5-6'sından sorumlu olan yavaş büyüyen bir tümördür. Sinir ("optik glioma"), hipotalamus, talamus, bazal ganglionlar, serebral hemisferler ve serebellum (yani bir serebellar astrositom) yakınındaki optik kiazma bölgelerinde bulunur.

Derece II: Diffüz astrositom/ İnfiltratif astrositomlar / Düşük dereceli astrositom: Çoğunlukla beynin serebrum bölgesinde ortaya çıkar. İnfiltratif astrositomun ayrıca bazal gangliyonlar, beyin sapı, beyincik, omurilik ve MSS'nin diğer bölgelerinde meydana geldiği bildirilmektedir.

Derece III: Anaplastik astrositom: "Malign astrositom" olarak da adlandırılır, bir hücre karışımından oluşur ve erkeklerde görülme sıklığı 45 yaş ve üstü kadınlara göre daha yaygındır.

Derece IV: Glioblastomalar: "Glioblastoma multiforme" olarak da adlandırılır, hızlı büyüyen bir tümördür ve genellikle 50 ila 70 yaş arası yetişkinlerde beynin loblarında (frontal ve temporal loblar) görülür.⁵³ **Bu tez çalışmasında da bu beyin kanser türü üzerine araştırma yapılmıştır.**

6. Ependimom: Beynin karıncıklarını ve merkezi omurilik bölgesini döşeyen ependimal hücrelerden kaynaklanan bir tümördür. Bu tip birincil tümörün ortaya çıkması yetişkinler ve çocuklar için çok nadirdir.⁵³

7. Oligodendroglioma: Oligodendrositlerden kaynaklanan bir tümör türüdür. Ayrıca, tümörlerin çoğalma eğilimine bağlı olarak farklı derecelerde sınıflandırılır. Oligodendroglioma çoğunlukla genç ve orta yaşlı erişkinlerde ve çok nadiren çocuklarda görülür.⁵³

8. Medulloblastom: Daha çok beynin serebellum kısmında oluşan bir tümördür. MSS'nin diğer bölgelerine yayılan ve o bölgelerde büyüme eğilimi gösteren bir tümördür.⁵³

9. Meningiom: Menenjlerin araknoid maddesinden kaynaklanan bir tümör türüdür ve kadınlarda erkeklere göre daha yaygındır.⁵³

Derece I: İyi huylu bir meningioma-yavaş büyüyen tümör.

Derece II: Atipik menenjiyom-hızlı büyüyen tümör, tekrarlama eğilimi gösterir.

Derece III: Anaplastik veya malign meningiolar-malign, yakındaki beyin dokularında yayılma eğilimi gösterir.

2.3. Glioblastoma Multiforme (GBM)

Her yıl, 100.000 kişiden yaklaşık 5-6 yeni vaka teşhis edilmektedir. Vakaların yaklaşık %80'i malign gliomlar (MG'ler) oluşturmaktadır. GBM, MG vakalarının %54,4'ünü oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki insidansı 100.000'de 3 civarında tahmin edilirken, yılda 10.000'den fazla vaka teşhis edilmektedir. Ortalama tanı yaşı 64 olup, erkeklerde kadınlara göre 1,5 kat, beyazlarda siyahlara göre 2 kat daha sıktır.⁵³ İnsidans oranı son 20 yılda radyolojik tanı yöntemlerinin gelişmesiyle beraber arttığı tespit edilmiştir.⁵⁴ GBM'ler genellikle beyinde meydana gelse de beyin sapı, beyincik ve omurilikte de nadiren görülebilmektedirler. Tüm primer gliomaların yüzde altmış biri beynin dört lobunda meydana gelir: frontal (%25), temporal (%20), parietal (%13) ve oksipital (%3) (American Association of Neuroscience Nurses [AANN], 2014). İlk zamanlarda, GBM'lerin yalnızca glial hücrelerden oluştuğu düşünülse de, yeni çalışmalarda nöral kök hücre benzeri hücrelerden de oluşabileceği gösterilmiştir.⁵⁵

GBM, genellikle primer ve sekonder GBM olmak üzere iki farklı klinik formda tanımlanmaktadır.⁵⁶ Primer ve sekonder formlar bazı moleküler farklılıklar gösterse de aynı yollar üzerinden etkilendiğinden ve mevcut standart tedaviye benzer şekilde yanıt verdiğinden, nihai sonuç hemen hemen aynıdır. Primer GBM, en yaygın form olarak (yaklaşık %95) yaşlı hastalarda daha sık görülmektedir. GBM sıklıkla, değiştirilmiş EGFR'yi (EGFRvIII olarak bilinir) kodlayan amplifiye, mutasyona uğramış epidermal

büyüme faktörü reseptörüne (EGFR), fosfat ve tensin homologu (PTEN) mutasyonları ve kromozom 10q kaybı ile ilişkilidir. GBM yaygın olarak MDM2 geninin amplifikasyonuna (p53 inhibitörü için kodlar), PTEN mutasyonlarına ve Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A)'nın homozigot delasyonlarına sahip oldukları tespit edilmiştir.^{56, 57} Bu anormallikler öncelikle iki ana hücresel sistemin -büyüme faktörü aracılı sinyal yolları ve hücre döngüsü- anormal düzenlenmesine yol açar ve artan hücre proliferasyonu, apoptoz inhibisyonu, invazyon ve anjiyogeneze rol oynar.⁵⁷ MGMT, guaninin O6 konumundan alkil gruplarını uzaklaştıran ve bu şekilde alkilleyici ilaçların (temozolomid veya nitrosureas) etkilerini hafifleten bir onarım genidir.^{58, 59} Gen promotörünün metilasyonu ile meydana gelen MGMT geni (DNA-onarıcı enzim) tarafından üretilen proteinin gösterilmemesi, DNA onarımının azalmasına ve alkaloid ilaçların daha fazla etkiye sahip olmasına izin veren alkil gruplarının birikmesine neden olur.⁵⁸

2.3.1. GBM'nin Klinik Belirtileri

GBM'nin klinik belirtileri tipik olarak beyin ilgili bölgesinin fonksiyonel yönü ile ilgilidir. Belirli bölgelerdeki tümörler, kalıcı zayıflık, uyuşukluk, görme kaybı veya dil değişikliği gibi belirgin semptomlara neden olur. Beynin diğer bölgelerindeki tümörler, yürütücü işlev bozukluğu, duygudurum bozuklukları, yorgunluk ve hafif hafıza bozuklukları gibi daha ince semptomlara neden olabilir. Bu tür tümörler sıklıkla frontal lob, temporal lob veya korpus kallozumda bulunmaktadır. Nöbetler, yeni GBM tanısı konan hastaların yalnızca küçük bir kısmında (yaklaşık %25) meydana gelir ve tipik olarak hastalığın seyri boyunca antikonvülzanlarla kontrol edilmesi kolaydır.⁶⁰

GBM olgularında 3 mekanizma ile ilk semptomlar ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bunlar; kitle etkisine bağlı olarak peritümöral ödem, hidrocefaliye bağlı intrakranial basınç artışı, normal doku yıkımı sonucu fokal nörolojik bozukluklar ve kortikal irritasyon sonucunda nöbetleri kapsar. Semptomlar ise baş ağrısı, bulantı, kusma, diplopi,

papil ödem, mental değişiklikler ve letarjidir. Beyin parankimi ağrıya duyarlı değildir. Bundan dolayı baş ağrısı, meninkslerde kan damarlarıyla ilişkili olan, ağrıya duyarlı sinir uçlarının irritasyonu ve lokal gerilimi sonucu gelişebileceği gibi, tümörün basıya neden olabilecek kritik hacme ulaşması sonucu, intrakraniyal basınç artışı ile ilişkili olarak da ortaya çıkabilir. Sıklıkla bölgesel olma özelliği taşır ve genellikle tümörün yerleşimi hakkında bilgi verir. Mental değişiklikler primer veya metastatik frontal ve temporal lob tümörlü hastalarda çok sık görülen ortak bir bulgudur.^{60, 61} Frontal lob tümörlerinde anosmi, kişilik değişiklikleri, hallusinasyonlar bulunur (14,15).

2.3.2. GBM’de Uygulanan Rutin Tedaviler

Halihazırda GBM tedavisi standart yaklaşım, maksimum cerrahi rezeksiyon radyasyon tedavisi (RT) ve tıbbi yönetim/kemoterapinin dikkate alınmasını içermektedir. Ayrıca nöbetler, beyin ödemi, enfeksiyonlar, depresyon, bilişsel işlev bozukluğu, yorgunluk ve venöz tromboembolizmin semptomatik tedavisini de içeren çoklu tedavi yöntemi uygulanmaktadır. En iyi terapötik hedef, daha bireyselleştirilmiş bir bakış açısının peşinden gitmektir. Bu nedenle tedavi, tanı zamanı, yeni başlangıç veya nüks durumu ve hastanın yaşı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. GBM hastalarının çoğu, altı hafta boyunca haftada beş kez radyoterapinin yanı sıra günlük oral temozolomidden oluşan cerrahi rezeksiyondan sonra standart bir tedaviyi izlemektedir. Klinik veya radyolojik progresyonu olan hastalarda çeşitli tedavi yaklaşımları değerlendirilmiştir. Yüksek dereceli gliomların multidisipliner yönetiminin bir parçası olarak, seçilen hastalarda daha ileri cerrahi, uygunsa yeniden ışınlama, sistemik kemoterapi ve klinik deney katılımı yer almaktadır.^{62, 63} Çoğu hasta yeniden ameliyat veya yeniden ışınlama için uygun olmadığından klinik araştırmaya katılım en iyi seçenek olarak görülmektedir. Yüksek dereceli gliomalar için kemoterapi seçenekleri (tek ajan olarak verilir) Temozolomid, Bevacizumab, karboplatin, irinotekan, karmustin (BCNU), etoposid ve prokarbazin,

lomustin ve vinkristin (PCV) kombinasyonunu içermektedir. Tüm bu gelişmelere rağmen GBM kaynaklı kanserlerde (yaşam süresi 6 aydan maksimum 5 seneye uzatılsa da) ölüm oranı hala yüksek seyretmektedir ve yeni tedavilerin geliştirilmesi günümüzün en büyük ihtiyaçlarındandır.⁶⁴

2.3.3. Temozolomid (TMZ)'nin GBM Tedavisindeki Yeri

Temozolomid (TMZ), (kimyasal adı 3-metil-4-oksoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksamid)⁶⁵ merkezi sinir sistemine iyi bir penetrasyon özelliğine sahip oral bir alkilleyici ajandır. Dakarbazinin bir imidazotetrazin türevidir. %96-100 biyoyararlanımına sahiptir ve Guanin (N7-Guanin ve N3 Adenin) üzerindeki O6 pozisyonunun metilasyonunu desteklemektedir. 1999 yılında malign gliomalara karşı kullanım için onaylanmıştır. Aside dayanıklı, %100 oral biyoyararlanıma izin veren stabil bir katıdır, bu nedenle birçok antikanser ilacıyla karşılaştırıldığında uygulaması basittir. Emilim hızlıdır ve en yüksek plazma konsantrasyonu 0.33-2 saat içinde elde edilir. Biyodağılım mükemmeldir (Vd 17 Lm⁻²) ve C etiketli ön ilacın kullanıldığı PET çalışmaları, kan-beyin bariyeri penetrasyonunun doğrudan kanıtını sağlamıştır.⁶⁶

Başlıca yan etkileri arasında mide bulantısı ve mielosupresyon (genellikle düşük trombosit sayısı) görülmektedir. Genellikle, her dozdan 30-60 dakika önce bir oral 5-HT₃ antagonisti verilmektedir. Doz genellikle cerrahi kaviteye 6 haftalık bölgesel radyoterapi ile eş zamanlı olarak günde 75 mg/m² ile başlatılır ve ardından 150 mg/m² idame dozu ile 6 adjuvan siklusu şeklinde verilmektedir.⁶⁷ Eşzamanlı RT ve TMZ, 14,6 aylık bir medyan genel sağkalım (OS) ve %26,5'lik 2 yıllık sağkalım oranı ile sonuçlanmaktadır.

Birçok GBM'nin Temozolomide karşı içsel veya kazanılmış direnci vardır. MGMT gen promotörü metilasyonu ve dolayısıyla genin susturulması ve aşağı regülasyonu, GBM'de temozolomid tedavisine direncin önemli bir mekanizmasıdır. MGMT, guaninin O6 konumundan alkil gruplarını uzaklaştıran ve bu şekilde alkilleyici

ilaçların (temozolomid veya nitrosureas) etkilerini hafifleten bir onarım genidir.⁵⁸ MGMT'nin metilasyonu, GBM vakalarının %30-60'ında bulunur ve alkilleyici ajanlarla tedavi edildiğinde olumlu bir sonuçla ilişkilidir.⁶⁸ Bu direnci sağlayan ortak bir mekanizmaya MGMT aracılık eder. Bu genin promotörü metillenirse, glioma hücreleri temozolomide daha duyarlı hale gelmektedir.

GBM için yeni tedavilerin adanmış onlarca yıllık araştırmalar çoğunlukla geç evre hastalığında başarısızlıkla sonuçlanmıştır.^{69, 70} GBM'de başarılı terapötik gelişimin önündeki birçok potansiyel engel olduğu öne sürülmüştür, ancak başarısızlığın nedenleri büyük ölçüde bilinmemektedir. Genel sorunlar, GBM'nin ve onun konak organı olan beyin benzersiz özellikleriyle ilgilidir. GBM'li hastalarda anormal kan damarları ve heterojen ilaç dağılımına yol açabilecek nekroz alanları vardır. Tümör, ilaçların girişini fiziksel olarak kısıtlayan veya aktif olarak ilaçları dışarı pompalayan sağlam bir kan-beyin bariyeri ile ilişkilidir. Bu direnci aşmak için yeni teknolojiler ve ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

2.3.4. Kullanılan Yeni Tedavi Yöntemleri (Nanoteknolojik Yöntemler)

Nanoteknoloji, maddenin atomik ve moleküler düzeyde yönlendirilmesi ve özelliklerinin değiştirilmesi yoluyla, yeni yapıların oluşturulmasıdır. Nanoteknolojide kullanılan materyaller genel olarak 1-1000 nanometre (nm) boyutlarındadır.⁷¹ Nanoteknoloji, çeşitli disiplinler arasında birçok köklü etkiler yaratmış olup, en önemli uygulama alanlarından biri sağlıktır. Nanotıp, patolojik süreçlerin erken saptanması, önlem alınması ve hedefe yönelik tedaviler gibi tıbbi amaçlar için, organik ya da sentezlenmiş nano-ölçekli materyallerin, kimyasal, fiziksel, elektriksel, optik ve biyolojik özelliklerinden yararlanılması olarak tanımlanabilir.⁷² Nanoteknolojinin tıpta en önemli kullanım alanı, “kanseri tanı ve tedavisi”, yani sıklıkla “teranostik veya teragnostik” olarak dile getirilen uygulamalarıdır. Nanopartiküller biyolojik bariyerlerin üstesinden

gelerek, tanı, tedavi, hastalığın ve tedavi yanıtının takibini kolaylaştırabilmektedir. Bu amaçla “nanoteknoloji” ve “nükleer tıp” birlikteliği, birçok çalışma ve araştırmalar ile başta tümör mikro çevresi olmak üzere, nükleer tıp teknikleri ile tek foton emisyon tomografi (SPECT, SPECT/BT) ve pozitron emisyon tomografi (PET, PET/BT) görüntüleme, tedavi ve yeni nanopartiküler ilaç taşıyıcıların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.⁷³

Nanotıpın yanında getirdiği artılar; multifonksiyonel nanoterapötik üretimi, aynı sistem içerisinde farklı hedefleme sistemleri, akıllı ve kontrollü ilaç salımı, işaretleyici moleküllerin tasarlanması ve tedavinin takibi gibi çeşitli alanlarda yararların sağlanabilmesidir⁷⁴. Hedeflenmesi gereken organa spesifik olarak ilaç taşınması için ilaç tasarımı günümüzün en önemli sıkıntısı haline gelmiştir. Vücutta normal olarak bulunan bariyerler, kan dolaşım sistemi, farklı organ özellikleri ve ilacın lokalizasyonu aşılması gereken sıkıntılardan bazılarıdır. Ancak Nanotıp teknolojisiyle tasarlanıp üretilen ilaç yan ve toksik etkilerinin azaltılması ve aynı zamanda görüntülenmesini sağlayan birçok fonksiyonel nanosistemlerin geliştirilmesine ön ayak olmuştur. Tasarlanan nanosistemler arasında lipozomlar, miseller, nanoemülsiyonlar, polimerik ve lipid nanopartiküler sistemler, sıvı kristaller, nanokristaller, dendrimerler en popüler olanlarıdır.^{75, 76}

Nanosistemler yardımıyla hidrofilik ve hidrofobik ilaç etkin maddelerini, farklı proteinleri, aşılarda kullanılan antijenleri, biyolojik makromolekülleri vb. maddelerin yeniden yapılandırılıp enkapsüle edilerek etkin bir şekilde taşıyabilmektedir. Farklı sistemlere örneğin tümör dokularına, damar ve lenfatik sisteme, akciğerlere, karaciğere, dalağa ve beyne özel hedeflendirilme ve istenilen süre boyunca dolaşımda kalmaları sağlanabilmektedir. Diğer taraftan hassas olan ve hayati önem taşıyan organlarda özellikle santral sinir sisteminde ilaç taşıyıcı sistemler daha da ön plana çıkmaktadır.

Biyolojik bariyerleri geçmesi zor olan ve yan etki bakımından sıkıntılı olan etkin maddeler için nanosistemler büyük değer taşımaktadır. ^{77, 78}

2.4. Nanopartiküler Sistemler

Biyoparçanabilme nanopartiküller sistemler ilaç taşınımı için ideal sistemlerdir. ⁷⁹ Nanopartiküller, 10–1000 nm boyutlarında olan, enkapsüle/adsorbe halde etkin madde içeren katı kolloidal partiküllerdir. ^{80,81}

Nanopartiküler sistemler çoğunlukla lipid veya biyoparçalanabilir polimer kullanılarak hazırlanabilirler. Farklı özelliklerdeki etkin maddelerin yanı sıra, proteinler/peptitler, genetik materyallerin ilgili hedef dokuya hedeflendirilmesi amacıyla nanopartiküler sistemlerden faydalanılmaktadır. ⁸²

İlaç taşıyıcı sistemlerde çok yaygın olarak kullanılan taşıyıcı sistem polimerik taşıyıcılardır ama bunların yanı sıra: nanokapsüller, miseller, konjugatlar ve nanokompozitler de farklı etkin maddeler ve ajanlar için formüle edilmiştir. ⁸³⁻⁸⁶

2.4.1. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Albümin, poli-akrilamid ve poli-metil metakrilat, poly (lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanopartikül hazırlanmasında kullanılmıştır. Biyolojik olarak parçalanmayan nanoparçacıklar vücutta toksik etki yaparlar ve protein temelli polimerler de alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedirler. Ayrıca sentezlenen polimerlerde bazen toksik özellikteki olan monomerlerin birikmesi gözlemlenmiştir. Bu nedenle, farklı özellikli doğal polimerlere yönelik çalışmalar hız kazanmıştır ⁸⁷ ve birçok çalışmada PLGA tabanlı taşıyıcı sistemler kullanılmaya başlamışlardır.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında diğer bir en önemli parametre yüzey modifikasyonudur (yüzey alanının geniş olması veya farklı materyallerle kaplanması). Artırılmış yüzey alanı nanoparçacıklar da aynı zamanda hem avantaj hem de dezavantaj olarak ortaya çıkabilmektedir. Artırılan yüzey alanı üretim sırasında parçacıkların agrege

olmasına neden olur veya yüzeyi modifiye nanopartiküler sistemler immün sistem uyarılmasını engelleyebilmektedir. Örneğin polietilen glikol (PEG) ile yüzey modifikasyonu, parçacıkların fagosit hücreleri tarafından tanımlanamamasına neden olarak nanoparçacıkların daha uzun süre kan dolaşımında kalabilmelerine izin vermiştir.⁸⁸⁻⁹⁰

Polimer örnekleri

Sentetik polimerler Poli laktid, PLGA, Poli ϵ -kaprolakton, Poli izobütilsiyanoakrilat, Poli izoheksilsiyanoakrilat, Poli n-bütilsiyanoakrilat, Poli akrilat, Poli metakrilat

Doğal polimerler Kitosan, Aljinat, Jelatin, Albümin,

2.4.1.1. PLGA

Bioparçalanır polimerler uzun süreli veya kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar. PLGA parçalandıktan sonra laktik asit, glikolik aside yani biyomoleküllere dönüşür, bu yüzden ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.^{78, 90, 91}

PLGA, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin polimerizasyonu sonucu üretilmektedir. Polimeri oluşturan monomerlerin farklı oranlarda karıştırılarak değişik molekül ağırlığında, farklı fiziko- kimyasal özelliklere sahip PLGA polimeri elde edilebilmektedir.^{82, 92, 93} Bu özelliği kullanarak hastalığa bağlı ilaç salım sistemleri modifiye edilebilmektedir.⁹⁰ Örneğin yüksek oranda glikolid içermesi ve molekül ağırlığının düşük olması parçalanma oranını ve hızını artırmaktadır.⁷⁸

PLGA FDA tarafından insanlar üzerinde kullanımının onaylı olması, üretimlerinin kolaylığı ve karakteristiklerindeki çok yönlülüğünden dolayı polimerik taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. PLGA nanopartikülleri hidrofilik ve hidrofobik etkin maddeleri için uygun taşıyıcı sistemlerdir.^{94, 95}

PLGA nanopartikülleri; oral, intravenöz, inhalasyon yoluyla uygulanabilmektedir. PLGA nanopartikülleri damar yoluyla sistemik olarak uygulandığı zaman RES (Reticular Endotelial System) karaciğerde bulunan fagositik hücreler tarafından sistemik dolaşımdan uzaklaştırılır ama hücrelere geldiği zaman endositoz yoluyla alınmakta ve sitoplazmada toplanmaktadır. Vücutta metabolitlerine ayrıldıktan sonra sitrik asit döngüsüne girer ve CO₂ ve H₂O moleküllerine ayrıştırılır. Glikolik asidin fazlası ise böbreklerden itrah edilir.⁹⁶

2.5. Eksozomlar

Eksozomlar, immün hücreler ve tümör hücreleri dahil olmak üzere tüm hücre tipleri tarafından salınmaktadır. Fakat tümör hücreleri normal hücrelere göre daha fazla eksozom salgılamaktadır. Eksozom'lar, ilk keşfedildiklerinde gereksiz hücre malzemeleri “çöp torbası” olarak kabul edilmişlerdir.⁴ Ancak, eksozomların, hücreler arası iletişim, bağışıklık sistemi modülasyonu, hücre büyümesinin zenginleştirilmesi, enerji yollarının bakımı ve hücre içi kargoların serbest bırakılması yoluyla virüslerin yayılması (örn., Tümör kaynaklı ncRNA'lar¹⁰ dahil olmak üzere proteinler⁵, lipidler⁶, DNA⁷ ve RNA'lar⁸) gibi birçok önemli biyolojik fonksiyondan sorumlu olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır.

2.5.1. Eksozomların Biyogenezi

Hücre dışı veziküller (EV'ler), hücreler tarafından aktif olarak salınan çeşitli, nano ölçekli membran veziküller için genel bir terimdir. Bu veziküller biyogenezlerine göre eksozomlar, mikro veziküller ve apoptotik cisimler olmak üzere üç geniş alt popülasyonda sınıflandırılırlar.⁹⁷ Hücre zarının dışa doğru tomurcuklanması ve bölünmesiyle üretilen mikroveziküller ve apoptotik cisimlerin aksine, eksozomlar endolizozomal yoldan aşamalı bir şekilde oluşturulmaktadır^{98, 99}. Biyogenez süreci aşağıdaki adımlar olarak açıklanabilir:

İlk olarak plazma zarından endositoz vasıtasıyla erken endozomların hücre içi oluşumu başlar. Daha sonra, Golgi aygıtının yardımıyla, endozomun lümeninin içindeki sınırlayıcı zarın iç kısmına doğru tomurcuklanır. Bu vasıtaıyla küçük mikro keseler birikerek, (her bir küçük keseye intraluminal veziküller (ILV) denilir) bir multiveziküler gövde (MVB) oluşturur (geç endozomlar haline döner). MVB'ler sonraki süreçte hücre dışına salınırlar. Ekzositoz sürecinin başlaması Rab guanozin trifosfataza (GTPazlar) (RAB27A, RAB11 ve RAB31) bağlı olduğunu göstermiştir.¹⁰⁰

Fakat ILV'den MVB dönüşüm sürecinin tamamlanmasıyla beraber birçok biyoaktif madde taşıyabilmektedirler:

- 1- Sitosolik proteinler (onkoproteinler, tümör baskılayıcı proteinler ve transkripsiyonel düzenleyiciler dahil),
- 2- Lipitler (fosfatidilkolinler, fosfatidiletanolaminler ve fosfatidilserin dahil),
- 3- DNA (tek iplikli DNA ve genomik DNA)
- 4- RNA'lar (mRNA, lncRNA, miRNA ve ncRNA'lar)^{21- 23. 101}

Ayrıca Eksozom dış yüzeyinde de farklı biyolojik maddeler taşıyabilmektedirler örn proteinleri, tetraspaninleri, integrinleri, immünomodülatör proteinleri gibi.

Eksozomlar, bilgi iletimini iki farklı yolla yapmaktadırlar. Bu yolların birisi eksozom membranında yer alan farklı liganlar ve proteinlerdir. Diğer yolak ise eksozom içinde bulunan farklı proteinler ve biyoaktif maddelerden oluşmaktadır. Böylece alıcı hücreler; plazma membranı ile membranöz etkileşimler yoluyla veya eksozomların hücre ile etkileşimi takiben yük salımı vasıtasıyla sinyal iletimine aracılık etmektedir.¹⁰² Bu sayede MVB'den türetilen eksozomal membran, aynı anda birden fazla hücre yüzeyi reseptörü ile bağlantı kurabilme ve doğrudan hücre-hücre temasını yüksek oranda simüle etmektedir.¹⁰³

2.5.2. Kanser Eksozomlarının Başlıca Görevleri

1. Anjiyogenez

Kanserin gelişimini ve ilerlemesini belirleyen faktörlerden biri yeterli oksijen ve besin kaynağıdır.¹⁰⁴ Tümör gelişiminin ilk aşamasında, tümör mikroçevresindeki kan damarları oldukça kötü organize edilmiştir. Bu nedenle hücrelerin beslenmesi için; dolaşımdaki progenitör hücreler, kemik iliğinden türetilen hematopoietik hücreler (vaskülojenez) ve kanser hücreleri (vaskülojenik taklit ve kanser hücrelerinin transdiferansiasyonu) kullanılarak tümör yapısında yeni kan damarları oluşmaktadır.¹⁰⁵ Farklı hücre tipleri arasındaki iletişime aracılık eden çok sayıda biyomolekülün taşıyıcıları olarak eksozomlar, anjiyogenez sürecinde de önemli bir rol oynamaktadırlar. Eksozomlar, mRNA, miRNA ve proteinler gibi çok sayıda pro- ve anti-anjiyogenik faktör taşıyarak, endotelial hücreler tarafından tübül oluşumunu sağlar.¹⁰⁶

2. Tümör Metastazı

Eksozomların, tümör büyümesini ve metastazını açık bir şekilde kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Tümör kaynaklı eksozomlar aslında basit hücresel atık olmalarından ziyade, hücre-hücre iletişimi için mesajlar göndererek, tümör mikro-ortamını yeniden şekillendirmede rolleri olan hücre dışı organeller gibi davranırlar.¹⁰⁷ Eksozomlar ilk olarak proinflamatuvar fenomenlerini indükleyerek metastazı başlatırlar. Bu durum proteinlerin ve miRNA'ların inflamatuvar varmış gibi davranmasına neden olur ve tümör mikroçevresindeki kötü huylu hücrelerin proliferasyonuna, anjiyogenezine ve metastazına katkıda bulunmak için inflamatuvar CCR6+ (CC kemokin reseptörü tip 6), CD4+ (CD4 (farklılaşma kümesi 4) ve Th17+(T helper 17) 'nin, spesifik tümör bölgelerine alınmasını sağlar. İkincisi, tümör kaynaklı eksozomlar premetastatik kitle oluşumunun anahtar bir özelliği olarak vasküler sızıntıya aracılık eder.¹¹ Eksozomlar Sitokinlere benzer şekilde akyuvarları premetastatik tümör dokusuna toplayabilir,

böylece tümör metastazları ve hücre büyümesini desteklemek için hücre dışı matrisi (ECM) yeniden şekillendirirler. Bu nedenle Matrix metaloproteinaz-9 (MMP9), transformasyon büyüme faktörü β (TGF- β) / Smad sinyal yolunu aktive ederler ve bu yolla ECM bozulmasında anahtar rol oynarlar.¹² Üçüncüsü, tümör kaynaklı eksozomlar immün yanıtta rol oynar. Efektör T hücrelerinin aktivasyonunu baskılar, aktive T-hücrelerinin apoptozunu tetikler ve metastatik hücrelerin tümör immün gözetiminden kaçmasına yardım ederler.¹³ Dördüncü olarak, tümör kaynaklı eksozomlar ilaç direncini düzenleyerek tümörün ilerlemesini teşvik ederler. Bu ilaç direnci mekanizmaları; (1) tümör hücreleri antikanser ilaçlarını metabolize etmek için eksozom sekresyonunu kullanabilir; (2) eksozomal moleküler kargolar, onkogenik hedeflere bağlanmak için antikanser ilaçlarla, özellikle de antikor bazlı ilaçlarla rekabet edebilir, böylece terapötik etkilerini azaltabilir ve (3) eksozomlar, ilaca dirençli hücrelerden ilaca duyarlı hücrelere ilaç direncinin lateral transferine katkıda bulunurlar.¹⁴

3. Eksozomlar Menşeli İlaç Direnci:

İlaç direnci, kanser tedavisi için büyük bir zorluktur. Bazı çalışmalar, eksozomların, dirençli fenotipi alıcı hücrelere taşıyarak o hücrelerinde kemoterapiye karşı direnç geliştirmelerine olanak sağlamaktadır. Eksozomların aracılık ettiği miRNA'lar ve lncRNA'lar dahil ncRNA'ların taşınmasının, kanser hücrelerinin direnç kazanmalarına neden olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, Weiner-Gorzel K ve ark. yumurtalık kanserinde miR-433'ün eksozom transferi ile hücresel yaşlanmanın indüklendiğini ve bunun sonucunda paklitaksel direncini artırdığını göstermişlerdir.¹⁰⁸ Ayrıca Xu CG ve ark. yaptıkları araştırmada meme kanserinde (MCF-7) ile ilişkili lncRNA ürotelyal kanserinin eksozomal transferi, östrojen reseptörü pozitif MCF-7 hücrelerinde mTOR sinyal yoluyla tamoksifen direncini artırabildiği söylenmiştir.¹⁰⁹ Başka bir çalışmada ise lncRNA

UCA1'in ekzozomal transferi ayrıca, Wnt sinyal yolunu aktive ederek mesane kanseri hücrelerinin kemo dirençliliğini de artırdığı gözlemlenmiştir.¹¹⁰

Eksozomlar ve İlaç Taşıma Sistemi Kimyasal ve biyomoleküler ilaçların terapötik etkinliğini arttırmak amacıyla kullanılan nano ölçekli ilaç dağıtım sistemleri günümüzde büyük önem taşımaktadır.¹⁵ Bununla birlikte, bu taşıma sistemlerinin bazı zorlukları bulunmaktadır. Bunlar; maddelerin sitotoksitesi ve retikuloendotelial sistem (RES) veya mononükleer fagosit sistemi (MPS) tarafından hızla ortamdan uzaklaştırılmasıdır.¹⁶ Eksozomlar, immün hücreler ve tümör hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salınan nanoboyutlu veziküllerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu veziküllerin modifikasyonu sonucu ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabileceğini ve bu yöntemle geliştirilen ilaç taşıma sisteminin diğer yöntemlerden daha avantajlı olacağı üzerine durulmaktadır. Fakat henüz ilaç taşıma sistemi olarak eksozomların kullanımına yönelik çalışmalar literatürde çok az mevcuttur. Bu bilgilerden ve literatürdeki bu eksiklikten yola çıkarak *in vivo* ve *in vitro* ortamında kemoteropatik ajanların Truva atı olarak kullanılan eksozom veziküllerine yüklenmesi ile yeni ilaç taşıyıcı sistem oluşturmayı planlamaktayız.

2.6. Eksolimer

Eksolimer kelimesi bizim çalışmamızdan (eksozom ve polimer birleşmesinden) ortaya çıkmaktadır. Eksozom ve polimerlerin ayrı ayrı ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasının avantajlarının yanı sıra bazı kısıtlamaları da beraberlerinde getirmektedirler. Fakat çalışmamız nedeni ile ortaya çıkan yeni nesil taşıyıcı sistem bu limitasyonları büyük ölçüde kapatmaktadır. Özellikle eksosomların izolasyon zorluğu, parçacık çapı ve genel olarak taşıdıkları toksik maddeler nedeni ile ilaç taşınım sistemlerine uygun olmamakla beraber, biyopolimerlerin de spesifik bir taşınım sağlayamadıkları birçok çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızda bu sorunları aşabilmek

için yeni bir metod kullanılmıştır. Kısaca eksozom bir çözücü yardımıyla parlanmış ve sadece zar kısmı çözünür duruma getirilmiştir. Sonra mikroakışkan bir sistem yardımıyla ilaç, polimer ve eksozom zarı kullanılarak 20 nm çapında bir parçacık elde edilmiştir. Bu tez çalışmasının literatüre büyük katkı sağlayacağına ve antikanser çalışmalarına yeni bakış açısı getireceğine inanmaktayız.



3. MATERYAL VE METOT

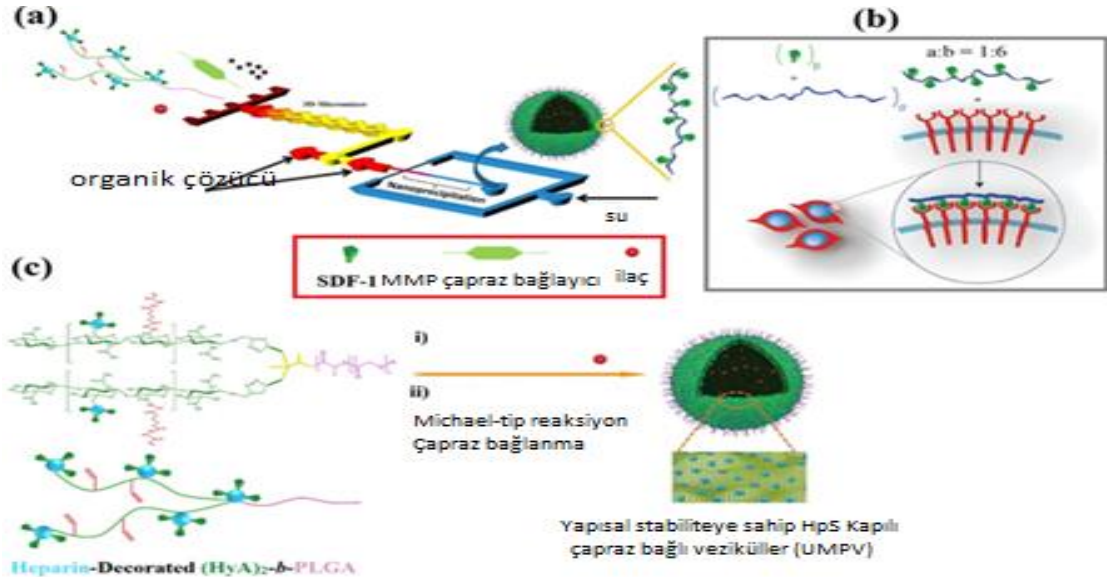
3.1. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.1.1. Eksozom İzolasyonu

Eksozom elde edeceğimiz T98G hücreleri hücre kültürü ortamına ekilmiştir ve %70 konfluense ulaştıktan sonra flask Hanks'Balanced Salt solution (HBSS) ile üç kere yıkanarak ortamdaki Fetal bovin serumu (FBS) kalıntısı uzaklaştırılmıştır. Hücreler 48 saat boyunca FBS olmayan medyuma bekletilmiştir. 48. saatin sonunda flask içerisinde bulunan sıvı alınarak çeşitli santrifüj işlemlerine tabii tutulmuştur. İlk olarak 10 dakika boyunca 300g'de santrifüj edilen sıvının Süpernatantı alınarak sırasıyla 2000g ve 10000g'de 10'ar dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra tekrar süpernatant alınarak ultrasantrifüj işlemi yapılmıştır. Tüm santrifüj işlemleri 4 C°'de gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Eksolimer Üretimi

Eksolimer üretimi Sahand Technical Üniversitesi Polimer Fakültesi ile ortaklaşa yapılmıştır. Üretim prosedürü şematize olarak aşağıda anlatılmıştır.



Şekil 3.1. Eksolimer üretim aşamaları

3.1.3. Eksozom ve Eksolimer Karakterizasyonu

3.1.3.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu veya TEM çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Elektronların örnek ile etkileşimleri sonucu oluşan görüntü büyütülür ve floresans ekran, fotoğrafik film katmanı ya da CCD (Yük bağlaşımlı aygıt) kamera gibi bir sensör üzerine odaklanır. Eksozomlar bakır ızgaralar üzerine monte edildi, immün reaksiyonu stabilize etmek için 5 dakika boyunca soğuk DPBS içinde %1 glutaraldehit ile sabitlendi, steril damıtılmış su içinde yıkandı, pH 7'de 5 dakika boyunca uranil-oksalat çözeltisi ile karşılaştırıldı ve metil selüloz ile gömüldü. Fazla selüloz çıkarıldı ve numuneler kalıcı koruma için kurutuldu. 80 kV'luk bir voltajda eksozom örneklerinin görüntülenmesi için TEM kullanıldı.

3.1.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

AFM, elektrikli piezo üzerine monte edilmiş esnek bir konsol üzerine yerleştirilmiş keskin bir piramidal uç içerir. Yaklaşma aşamasında, numune yüzeyi Van Der Waals kuvvetleri aracılığıyla uç ile etkileşime girer. Çekici kuvvetler, konsolun numune yüzeyine doğru sapmasını indükler. Bununla birlikte, konsol yüzeyle temas ettiğinde, giderek artan bir itme kuvveti, konsolu yüzeyden iter. Bu reaksiyon Pauli itmesi olarak bilinir. Konsol saptırma konsol arka, yansıyan lazer ışın demetinin yönünü değiştirir ince olarak sapma ile doğru bir ölçüm sağlar. Bu algılama yöntemine optik ışın algılama denir. AFM, statik veya dinamik modda çalışır. DC modu olarak adlandırılan statik modda, ölçülen konsol sapması sabit tutulur. Gerçekten de yükseklik konumu sabit tutulur veya geri besleme denetleyicisi tarafından kontrol edilir. Bununla birlikte, aralıklı temas modu veya alternatif temas modu (AC modu) olarak da bilinen dinamik modda, prob, rezonansa yakın kullanıcı tanımlı bir genlik ve frekansta salınır, uç-numune

etkileşimi ise rezonansı etkiler. Bu mod, daha büyük uç-yüzey ayrımı (yani temassız rejim) nedeniyle daha hassas topografya bilgisi elde etme imkanı sunar.¹¹¹

3.2. Temozolamid Eksolimer Yüklenmesi

3.2.1. Mikroakışkan Cihazların İmalatı

Mikroakışkan cihazlar, standart bir mikro kalıplama işlemi kullanılarak poli(dimetilsiloksan) (PDMS) ile üretildi. Ana kalıpları yapmak için silikon levhalar, SU-8 ışıkla sertleştirilebilir epoksi (Microchem, Inc.) ile 60 µm kalınlığa kadar döndürülerek kaplandı. 4 inç silikon gofret üzerinde negatif ana kalıp elde etmek için Inha Üniversitesi Biyohibrit Sistem Laboratuvarı'nda (BSL) pişirme, litografi ve geliştirme prosedürleri gerçekleştirilmiştir. SU-8'deki yüzey çatlaklarını ortadan kaldırmak için levhar 150 °C'de tavlandı. Termal tavlamanın gerçekleştirilmesinden sonra, elde edilen kalıpların yüzeyleri, 40 dakika boyunca buhara maruz bırakılarak kendiliğinden monte edilen bir tek tabakalı (SAM) trimetiletoksi silan (Sigma) ile kaplandı. SAM, PDMS'nin kalıba yapışmasını önlemektedir. PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) monomeri ve sertleştirme maddesi 10:1 ağırlık oranında karıştırıldı, kalıp üzerinde gözeneklendi, desikatörlerde gazı alındı ve 1 saat boyunca 80 °C'de bir fırında (Memmert) kürlendi. Sertleştikten sonra, PDMS kalıptan çıkarıldı ve giriş / çıkış delikleri 150 µm çapında bir zımba kullanılarak delindi. PDMS daha sonra oksijen plazması (100 mW, 1 dakika; Diener electronic GmbH) kullanılarak bir cam slayta bağlandı. PDMS tabanlı mikroakışkan cihazda, biri THF'deki PDMS-PEG solüsyonu için, diğeri ise nötr pH'lı su için iki giriş vardı. Akış odaklı çapraz kavşakta iki su akışı elde etmek için su akışı ikiye bölündü. Karıştırma kanalı 150 µm genişliğinde, 60 µm yüksekliğinde ve 1 cm uzunluğundaydı. Fluorescein sodyum (1 mg·mL⁻¹, Sigma) ve sudan oluşan sulu çözelti, stabil akış hızları aralığını belirlemek için akışları kontrol etmek için kullanıldı (Şekil 1(a)'da (iç metin) gösterildiği gibi).

3.2.2. Nanokapsüllerin İmalatı

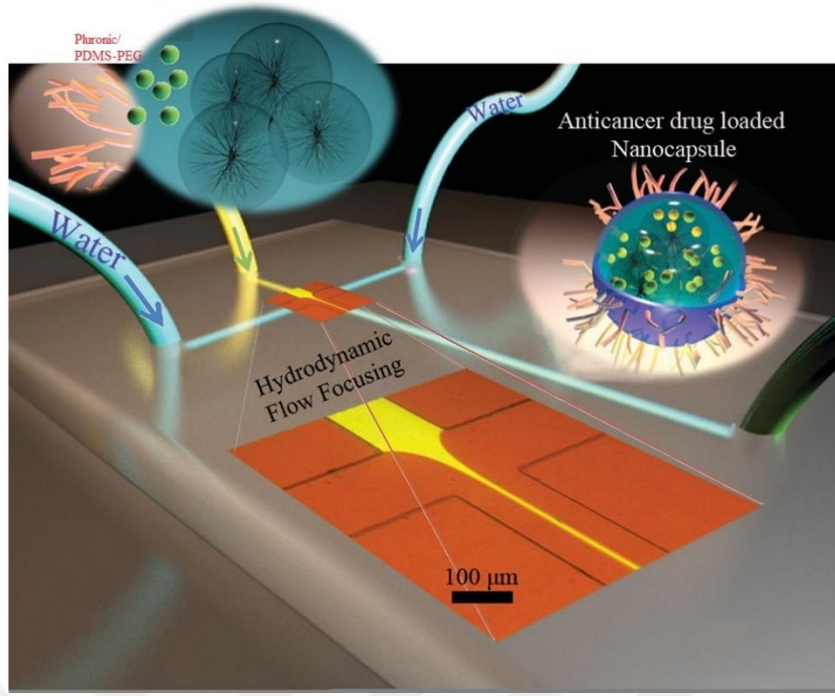
Nanokapsüllerin (NK'ler) toplu sentezi için, uygun koşullar altında THF içindeki PDMS-PEG çözeltisi hazırlandı. Nano-çöktürme ve NK'lerin oluşumu, bu çözeltinin kuvvetli karıştırma altında suya damla damla eklenmesiyle gerçekleştirildi.

İlaç yüklü NK'ler için, Temazolomid (T2577, Sigma-Aldrich), CDCL₃(Döteryumlanmış kloroform) içinde çözündürüldü ve polimerik (PDMS-PEG ve Pluronic® F-127) solüsyonu ile karıştırıldı. NK'lerin hazırlanmasında, önceki paragrafta açıklanan prosedürün aynısı kullanılmıştır.

Nanokapsüllerin (NK'ler) mikroakışkan sentezi için, THF içindeki PDMS-PEG/Pluronic çözeltisi, karıştırılan koşullar altında hazırlandı ve daha sonra ana akış olarak mikroçipe verildi. Su akışları, çözücü olmayan bir madde olarak hareket eder ve yanal akış karıştırma sırasında kendi kendine birleşmeyi sağlar. Odaklanma derecesini ve dolayısıyla karıştırma süresini değiştirmek için polimer ve su akışları arasındaki akış oranı Şırınga Pompaları kullanılarak kolayca ayarlanabilir.

İlaç yüklü NK'ler için, TMZ, polimerik çözelti ile karıştırılmış ağırlıkça %5, 10, 15 ve %20'lik dört farklı başlangıç yüklemesinde THF içinde çözündürüldü.

Kontrol numuneleri olarak, 0.076 sabit akış oranında polimer olmadan Pluronic F127 ve TMZ karışımı (ağırlıkça %10'luk başlangıç yükleme ağırlığında) kullanıldı.



Şekil 3.2. Bir kılıf akışı kullanarak THF'de Pluronic, PDMS-PEG ve TMZ'nin akışını hidrokinamik olarak odaklamak için kullanılan t-şekilli çapraz bağlantı mikroakışkan cihazının şematik gösterimi

3.2.3. Zeta Potansiyeli

Hazırlanan formülasyonlarının partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve ZP değerleri Malvern Zetasizer Nano ZSP cihazı (Malvern Ins. Ltd. İngiltere) kullanılarak saptanmıştır. Hem partikül büyüklüğü ve dağılımı hem de zeta potansiyeli ölçümleri 25 °C'de NP süspansiyonlarının ultra saf su ile 30 kat seyreltilmesi ile tespit edilerek sonuçlar ortalama $\pm$ SS olarak verilmiştir.¹¹²

3.2.4. Salm Profili

Bu analiz Sahand Technical Üniversitesi Polimer Fakültesi'de gerçekleştirilmiştir. Mikrofluidik sistem ile Eksolimer-TMZ ilaç bağlanması işlemi esnasında belirli aralıklarla reaksiyon içeriğinden örnekler alındı, numune içeriğinde serbest ilaç miktarı farklı pH'lar da spektrofotometrik olarak belirlendi. Her uygulama için ayrı ayrı UV visible spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapıldı.

Spektrofotometrik ölçümler ile sentezde kullanılan ilacın kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bunun için ne kadar ilaç içerdiği bilinen ilaç çözeltisinin seri dilüsyonunun UV visible spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapıldı.

3.3. İn-Vitro Çalışmaları

3.3.1. Hücre Kültürü

3.3.1.1. Primer Nöron Kültürü

Çalışmada korteks nöronlarının elde edilmesi için Sprague Dawley cinsi yeni doğmuş 24 saati doldurmamış sıçan yavrusu kullanılmıştır. Sıçanlar hızlıca dekapite edildikten sonra çıkarılan dokular 5 mL Hanks'Balanced Salt solution (HBSS) solüsyonuna aktarılarak bistüri yardımıyla makro parçalanma ve daha sonra Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (%0.25 tripsin-%0.02 EDTA) ile mikro parçalama yapılmıştır. Sonra, hücreler 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Dibe çöken hücreler hücresel medyum (%88 NBM (Nöro bazal medyum, Gibco, USA), %10 FBS (Fetal sıçır solüsyonu, Gibco, USA), %2 B-27 (Supliment, Thermo Fisher, Germany), %0,1 antibiyotik (Penicillin–Streptomycin) ve amfotrisin B (Thermo Fisher, Germany) eklenmiştir. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C'e sıcaklıkta, 3 gün ara ile besiyeri değiştirilerek 10 gün inkübe edilmiştir.

3.3.1.2. T98 G Kültürü

Çalışmamız için T98 hücre hattı, Atatürk Üniversitesi (Erzurum, Türkiye) tıbbi Farmakoloji bölümünden elde edilmiştir. Kısaca, hücre süspansiyonu, 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir. Hücreler, taze ortam (% Dulbeco ile modifiye edilmiş kartal ortamı (DMEM), Fetal bovin serumu (FBS) %15, %B27 2 ve antibiyotik% 1 (penisilin, streptomisin ve amphotrisin B) ile yeniden süspanse edilerek, hücreler 25 cm²'lik flaskta toplanmıştır. (Corning, ABD) ve inkübatörde depolanmıştır (%5 CO₂; 37 ° C). Flaskın %80'i hücre ile kaplanınca Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)

(%0.25 tripsin-%0.02 EDTA) ile kaldırılarak 96 well plate'lere ekim yapılmış ve uygulama yapmak üzere inkübasyona bırakılmıştır.

3.3.2. Sitotoksisite Analizleri

3.3.2. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

Analizi (Sitotoksisite Analizi)

Materyallerin sitotoksisitelerinin belirlenmesi için, 'direkt temas test metodu' uygulanmış, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazilyum bromid içeren MTT maddesi ile (Sigma Aldrich inc, St. Louis, USA) değerlendirme yapılmıştır. MTT testi ile sitotoksisiteyi belirlemek için 1 ml PBS içinde 5 mg MTT tozu olacak şekilde karışım hazırlanarak 0.20 µm'lik steril filtreden (Corning, Wiessbaden, Almanya) geçirilmiş ve dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra +4 °C'de kullanılacağı zamana kadar bekletilmiştir. İnkübe edilen hücrelerin ortam sıvıları çekildikten sonra, daha önceden hazırlanmış olan örnekler her kuyucuğa yerleştirilerek 24, 48 ve 72 saat süreyle 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Böylece, kullanılan materyallerin 24, 48 ve 72 saat sonundaki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

MTT maddesinin uygulanması sonucu oluşan formazan kristallerini çözünür duruma getirmek için 99.4 ml dimetilsülfoksit (DMSO), 0.6 ml (HCl) ve 10 g sodyumlaürilsülfat (SDS) içeren karışımdan 100 µl / kuyucuk olacak şekilde ilave edilmiştir ve 4 saat süreyle tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Bu işleminin ardından absorbans, (optik yoğunluk) spektrofometrede (µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek) 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Veriler SPSS analiz sonrası grafikler halinde sunulmuştur.

3.3.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitelerinin Ölçümleri

Hazır eliza kit olarak alınmıştır. Alınan kitler yardımıyla liz edilen hücreler protokole uygun olarak hazırlanarak sonuçlar spektrofotometrik yöntemle tespit edilmiştir.

3.3.4. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitelerinin Ölçümleri

Hazır eliza kit olarak alınmıştır. Alınan kitler yardımıyla liz edilen hücreler protokole uygun olarak hazırlanarak sonuçlar spektrofotometrik yöntemle tespit edilmiştir.

3.3.5. Oksidan ve Antioksidan Aktivite Analizleri

3.3.5.1. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK), Toplan Oksidan Sayısı (TOS) ve Hücredeki Oksidatif Stresin Varlığının Tespiti

TAK düzeyi tespitinde, 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6- sülfonat = ABTS+) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksiolan antioksidan kapasitesi tespit edilmiştir. Tespit işleminde Rel Assay Diagnostics® (Sigma, USA) firması tarafından üretilen TAK ticari kitleri kullanılmıştır.

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standart 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standart 2 Solüsyonu: 10 ml

30 µl örnek içeren kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan eklenerek 660'nmde ilk absorbands okunmuştur. Daha sonra aynı kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme sonunda 660'nmde ikinci absorbands değeri okutulmuştur. Elde edilen absorbands değerleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden TAK düzeyleri tespit edilmiştir.

Toplam Oksidant Status (TOS) tespitinde, numunede bulunan oksidantların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızda Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS kitleri kullanılmıştır.

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standart 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standart 2 Solüsyonu: 10 ml

75 µl plazma örneğinin bulunduğu kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek

530 nm’de ilk absorbansı okutulmuştur. Daha sonra aynı küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. Bekletilmiş, bekleme sonunda 530 nm’de ikinci kez absorbansı okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv. /L cinsinden tespit edilmiştir.

Hücredeki oksidatif stres, Toplam oksidant sayısının toplam antioksidan sayısına oranı olarak hesap edilecektir.

3.3.6. Real Time PCR Analiz

3.3.6.1. Genetik Material Elde Edilişi

48'lik platelerin medyumunu alınacak ve PBS’le yıkandıktan sonra her kuyucuğa 0,2 cc Trypsin/EDTA eklendi ve 5 dakika 1:1 oranında FBS ilave edilecek ve flaskın solüsyonunda yüzen hücreleri steril tüpe alarak 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet oluşturan hücrelerin, üst sıvısı atıldıktan sonra hücre pelleti RNA izolasyon ve cDNA sentezi için işleme alındı.

3.3.6.2. RNA İzolasyon

İzolasyon Qiagen RNA izolasyon kitiyle yapılmıştır. Pellet halinde tüpün dibine çöken hücrelere 1cc Qiazole solüsyonu ilave edilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 200µl kloroform ilave edilecek ve 15 saniye çalkalanmış ve 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler 12,000 g de 15 dakika boyunca 4 derece ısıda santrifüj edilmiştir. En üst kısımda duran renksiz sıvı başka bir tüpe aktarılarak 1:1 oranında etanol alkol ilave edilmiş ve 5 saniye vortekslenmiştir. Örnekten 700µl alınarak toplama tüpüne konulmuş ve kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 15 saniye 8,000g de santrifüj edilmiştir. Bu aşama 1 kere daha tekrarlanmıştır. 700µl RW1 solüsyonu RNeasy kolonuna ilave edilmiştir. Kolonunun kapağı kapatılmış ve 15 saniye 8,000g de santrifüj edilmiştir. Sonra 500 µl RPE RNeasy kolonuna ve 15 saniye 8,000g de santrifüj edilmiştir. Sonra 500 µl RPE RNeasy kolonuna ilave edilmiş ve 2 dakika 8,000g de santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra RNeasy kolonuna yeni bir 1.5cc lik tüpe yerleştirilerek 30-50µl RNasefree su ilave edilip kapağı kapandıktan sonra 1 dakika 8,000g de santrifüj edildi.

3.3.6.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için genomic DNA wipeoutbuffer 7x solüsyonundan 2µl artı RNA 1µg ve RNasefree su toplam 14µl olacak şekilde hazırlanmıştır ve 2 dakika boyunca 42 derecede tutularak tekrar buza konulmuştur. Sonra reverse transcription master mix 1 µl, Quantscript RT buffer 5x 4 µl, RT primer mix 1 µl ve RNA 14 µl toplam 20 µl karıştırılmış ve RTPCR cihazına yerleştirilmiştir. 15 dakika 42 derecede, 3 dakika 95 derecede ısı verilerek cDNA oluşumu gerçekleştirilmiştir ve sonunda oluşan cDNA'lar -20 dereceye kaldırıldı.

3.3.6.4. Gen Ekspresyonu

MGMT (Rn00563462), L1cam (Rn00493049), Kaspaz 8 (Rn01440170), Tp 53 (Rn00755717), Pten (Rn00477208) ve B2M (Hs00187842) gen primerleri ticari olarak alınmıştır. Bu aşamada her strip (tüp) içine 1,5 µl primer prop, 3 µl cDNA, 3 master mix ve 12.5 µl saf su ilave edilerek son hacim 20 µl gelecek şekilde ayarlanmıştır. 95 °C’de 600 saniye bekletildikten sonra 95 derecede 10 saniye ve 60 derecede 30 saniye toplam 45 döngü yapıldı.

3.3.7. Flow Stometri

Flow stometri, hücre kültüründe gerçekleştirilen uygulamaların ardından hücrelerin apoptoz ile mi, yoksa nekrotik şekilde de öldüğünü tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla Annexin V-FITC boyasından faydalanıldı. İşlem Annexin V/PI Apoptosis Detection Kit ile gerçekleştirildi. Kit bileşenleri oda sıcaklığında bekletildi. Ardından Annexin V Binding Buffer 10 kat dilüe edilerek 1x buffer elde edildi. 1x PBS ile 1x10⁶ hücre/ml oranında hücreler hazırlandı. Toplanan hücreler 2 kez PBS ile 300 g’de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Ardından hücre peleti 100 µl 1x Annexin Binding Buffer ile sulandırıldı.

100 µl hücre süspansiyonuna 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında karanlık koşullarda inkübe edildi. Akabinde 400 µl 1x Annexin Binding Buffer eklendi. Flow sitometri cihazında 1 saat içinde analiz edildi.

3.4. *In vivo* Çalışmalar

3.4.1. *In vivo* Kanser Modelinin Oluşturulması

Çalışmamızda modelin oluşturulması için 96 adet 200-250 gr ağırlığında yetişkin erkek Spague Dawley cinsi ratlar kullanılmıştır. İmmün sistemi baskılamak amacıyla bir hafta boyunca siklosporin kullanılmıştır. İmmün sistemi baskılandıktan sonra hayvanlar anestezi altına alınmıştır. Sterotaksi cihazı ile ratların sırtlarına glioblastoma hücreleri

enjekte edilmiştir. 1 ay boyunca kanser hücrelerinin o bölgede tutunması ve büyümesi beklenmiştir. Model oluşturulduktan sonra tedaviye başlanmıştır. Temozolomide ve temozolomid yüklü eksolipozom ile tedavi edilerek sonuçlar patolojik olarak değerlendirildi.

3.4.2. Histokimyasal Analizler

Patolojik değerlendirmeler için deney hayvanları anestezi altında sakrifiye edilerek tüm deney gruplarında kanser enjekte edilen bölgeye ait doku alınmıştır. Bu dokular formalinde muhafaza edildi. Formalinde 24 saat bekleyen dokular tesbit olduktan sonra kasetlere alındı ve takip cihazına konuldu. Takip cihazında kasetlere alınan dokular 4 aşamadan geçirildi;

1. Formalin aşaması; 3 saat bekletildi
2. Ksilol aşaması; 3 saat bekletildi
3. Alkol le muamale aşaması; 3 saat bekletildi
4. Parafin aşaması; 3 saat bekletildi.

Parafinleme yapılan takip dokularına bloklama yapıldı. Daha sonra bloklar soğutulmaya bırakıldı. Bloklar soğutulduktan sonra mikrotom (Leica RM2245, Almanya) cihazına alınarak 0,5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitler 800C' lik etüvde 40 dk bekletildi ve doku etrafındaki parafinlerin eritilmesi sağlandı. Daha sonra 30 dakika süreyle ksilol da bekletilerek sadece doku kalması sağlandı. Lam üzerindeki dokular Hematoksilen Eozin (HE) ile boyandı. Boyama da sırasıyla, ksilol, alkol, su, hematoksilen (5 dk), su, asit, alkol, su, amonyak, su, eozin, su, alkol, aseton ve ksilol le muamele edildi. Lamin üzerine 2 damla entellen damlatılarak lamel kapatıldı ve 10 dakika kadar beklendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, SPSS 20.0 Windows programı ile analiz edilerek ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma parametrik ve non parametrik testlere tabi tutularak One Way Anova, Wilcoxon ve Kruskal Wallis testleri uygulanmış $P<0.05$ 'den daha anlamlı olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

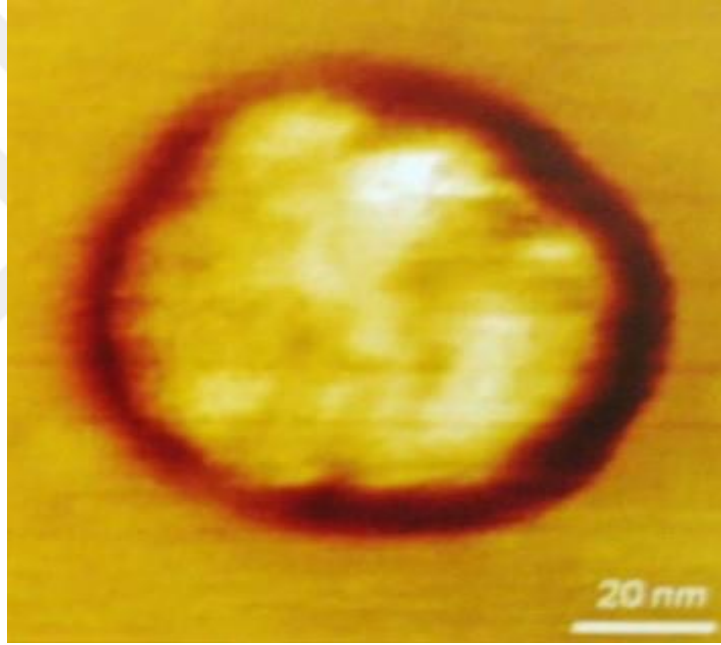


4. BULGULAR

4.1. Eksozom Karakterizasyonu ve İçerik Tayini

4.1.1. TEM

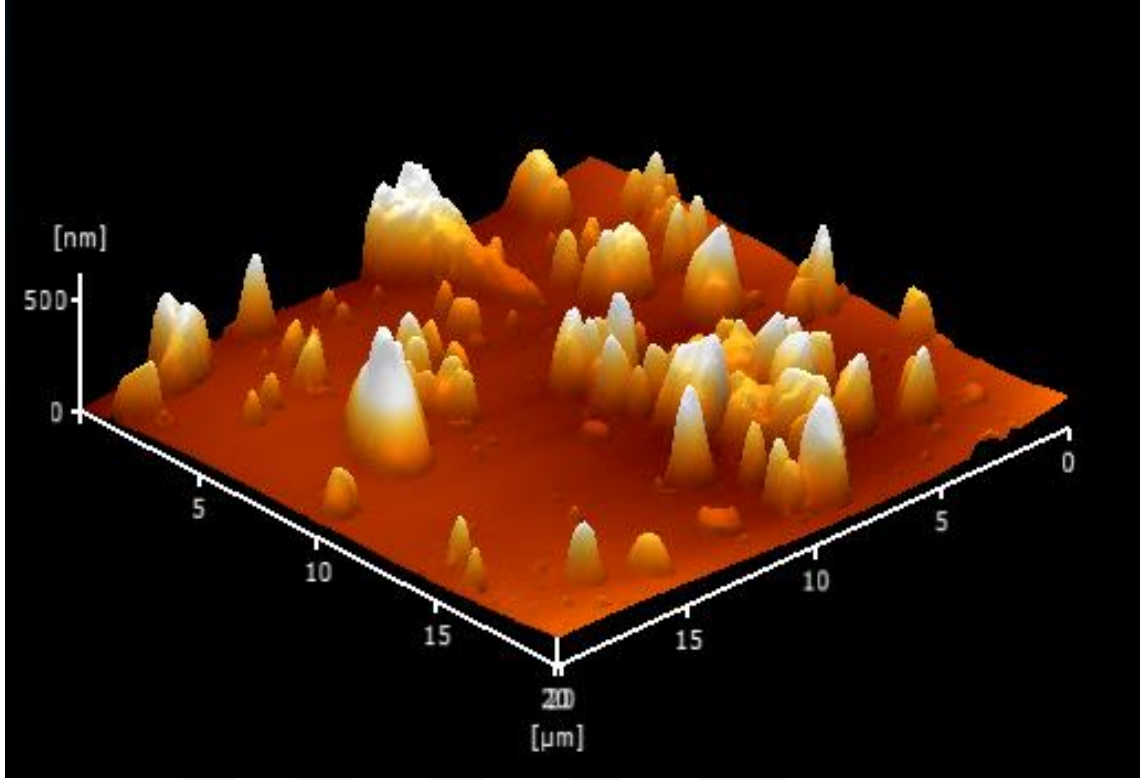
TEM görüntüleri eksozomların boyutunun 20 nm olduğunu göstermiştir. Nanoparçacık doğrulama için kabul edilen iyi bir teknik olan TEM görüntüleme kullanarak parçacıklarımızın çaplarının eksozomlar (40-150 nm) için beklenen aralıkta olduğunu gözlemledik. Ayrıca görüntüden elde edilen veriler doğrultusunda Eksozomların küresel şekilli, dairesel formda yapılar olduğu tespit edildi. (Şekil 4.1).



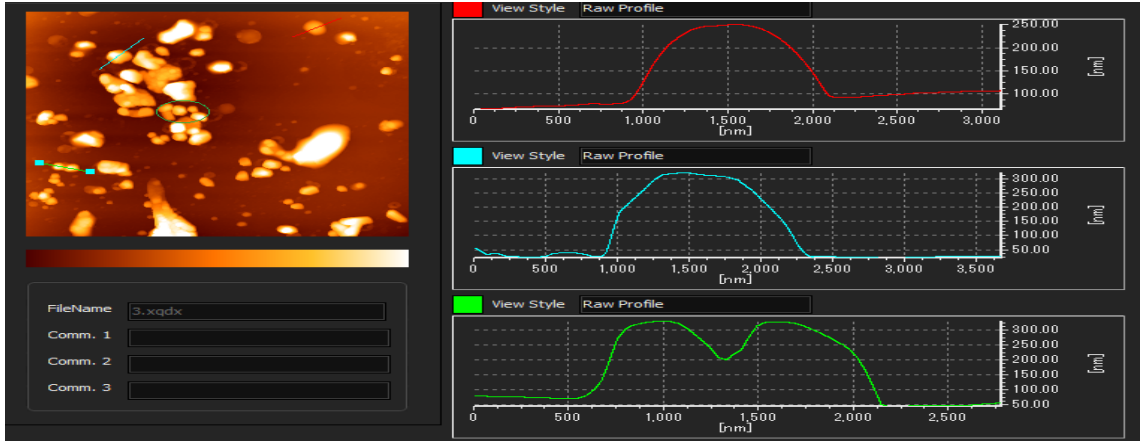
Şekil 4.1. Eksozoma ait TEM görüntüsü

4.1.2. AFM

Eksozoma ait elde edilen Atomik Kuvvet Mikroskobu görüntü Şekil 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. Görüntüden elde edilen veriler doğrultusunda eksozomların küresel şekilli, dairesel formda yapılar olduğu tespit edilmiştir. AFM işlemi ile 20 nm-200nm arasında farklı boyutlara sahip eksozom yapılarının olduğu belirlendi.



Şekil 4.2. Eksozomların AFM topografisi. Tüm AFM ölçümleri 2 μ m x 2 μ m tarama alanından alınmıştır



Şekil 4.3. İzole edilen eksozomların AFM ile karakterizasyonu

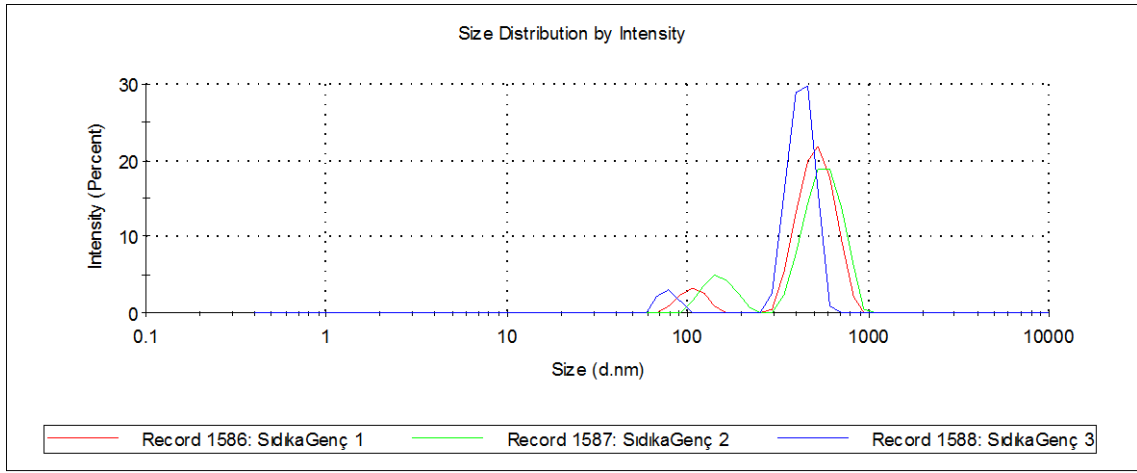
4.2. Temozolamid Eksozom Yüklenmesi (Eksolimer-TMZ)

4.2.1. Zeta Potansiyeli

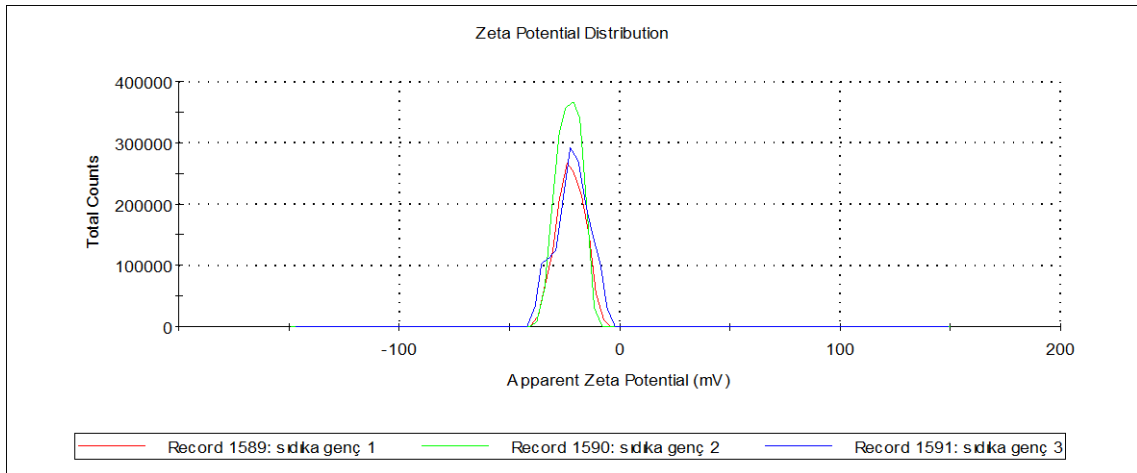
TMZ yüklü Eksolimer boyutu yaklaşık $77,97 \pm 2.2$ nm olarak bulundu. TMZ-Eksolimerin ortalama zeta potansiyeli $-22,4 \pm 0,51$ mV'ye eşitti. Partikül boyutu ve

polidispersite indeksi, uygun nano-ilaç dağıtım sistemlerinin hazırlanması için temel faktörlerdir; bu sistemlerin toksisitesine ve dağıtım kabiliyetine katkıda bulunurlar. Bu amaçla, doğru boyut 10 ile 200 nm arasında olmalıdır, çalışmamızda bileşenlerin uygun seçimi, oranları ve hazırlama yöntemi nedeniyle 77 nm değeri bu aralıktadır.

Bu aralık dışında bazı bölgelerde liyofilizasyon işleminden kaynaklı olarak meydana gelen agregasyon sonucunda bazı boyutlar $835 \pm 63,15$ olarak tespit edilmiştir. AFM sonuçlarımızda da bu agregasyon gözlemlenirken parçacık boyutunun 20-200nm arasında olduğu tespit edildi. TEM sonucunda ise bu boyutun 20 nm olduğu doğrulandı.



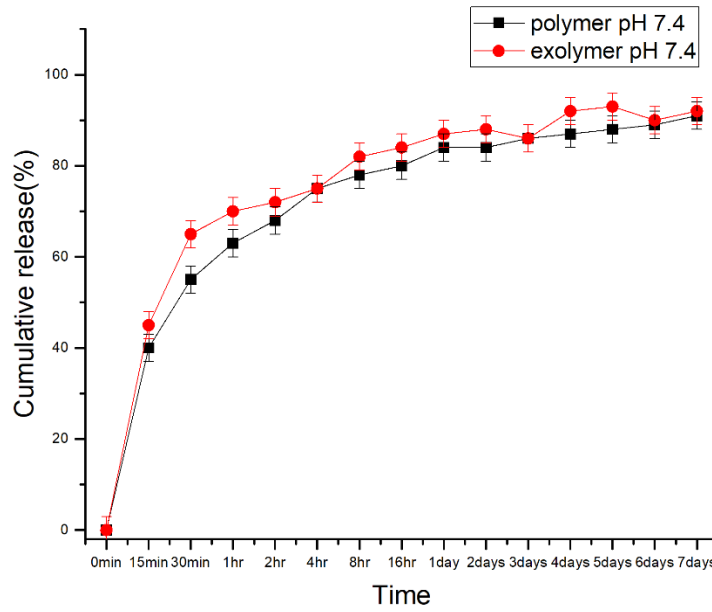
Şekil 4.4. Eksolimere ait zeta potansiyeli (dnm)



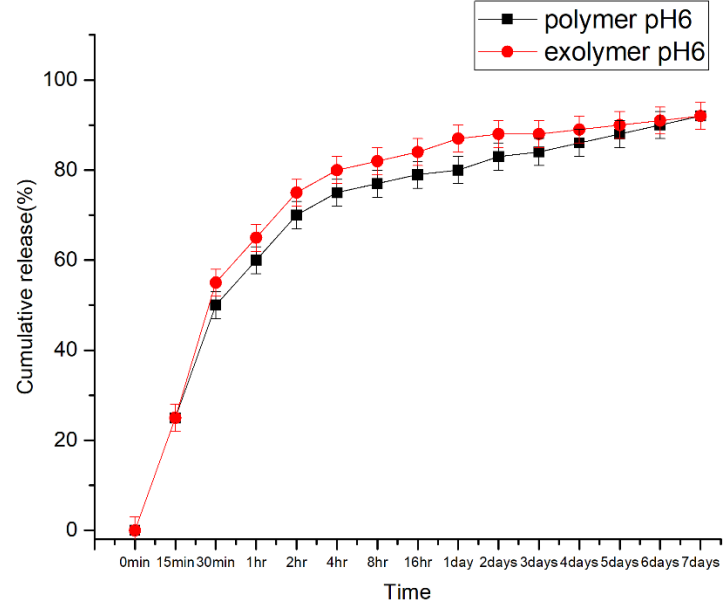
Şekil 4.5. Eksolimere ait zeta potansiyeli (mv)

4.2.2. Salım Profili

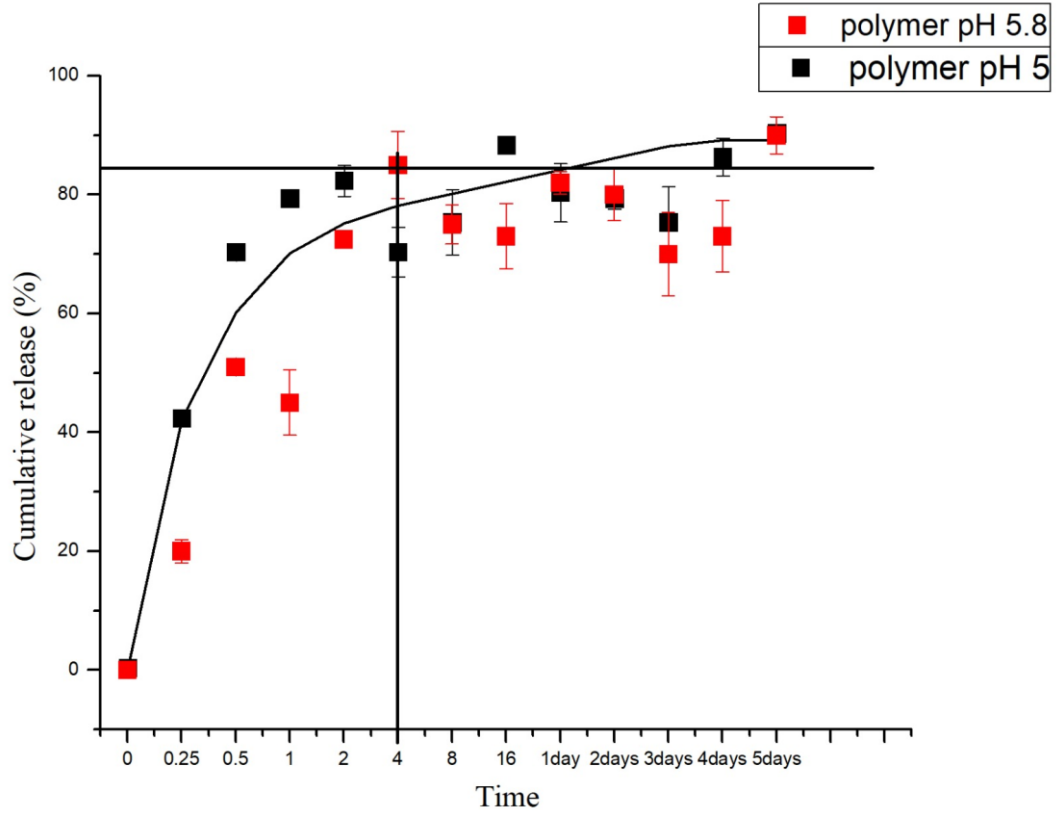
Eksolimer içerisine konjuge edilmiş ilacın salım profilinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen farklı pH'da (5,6 ve 7,4) spektrofotometrik ölçüm neticesinde elde edilen kümülatif grafik Şekil 4.6-4.8'de verildi. Buna göre 24 saatte 5.8 pH'da ilaç salımı 1,6µg/ml olarak bulundu. İlk 24 saatlik dilimde ilgili ilacın %80'i salınmış ve üç gün sonunda salınım neredeyse tamamlanmıştır fakat pH 6-7 arasında ilaç salınımında azalma gözlenmiş ve bununla birlikte ilaç salınımı 7 gün boyunca devam etmiştir. Bu özellikte ilacımızın asidik ortamda çözündüğünü göstermektedir.



Şekil 4.6. pH 5.8'de Eksolimer-TMZ konjugasyonunun kümülatif salım profil grafiği



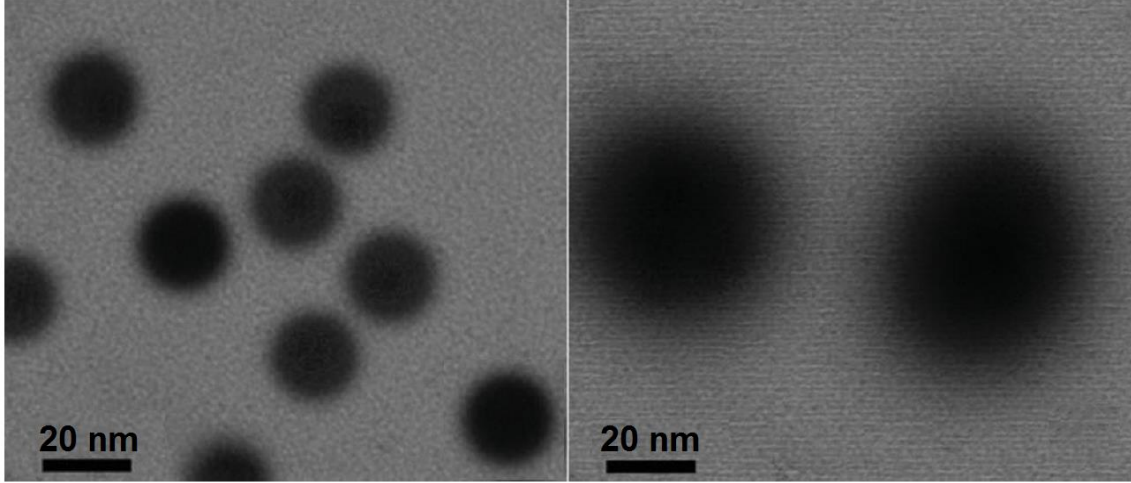
Şekil 4.7. pH 6'da Eksolimer-TMZ konjugasyonunun kümülatif salım profil grafiği



Şekil 4.8. pH 5.8'de Eksolimer-TMZ konjugasyonunun kümülatif salım profil grafiği.

4.2.3. TEM

Enkapsülasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra tekrar TEM görüntüsü alınarak yeni formülasyonumuzun boyutunun 20 nm olduğu tespit edildi.



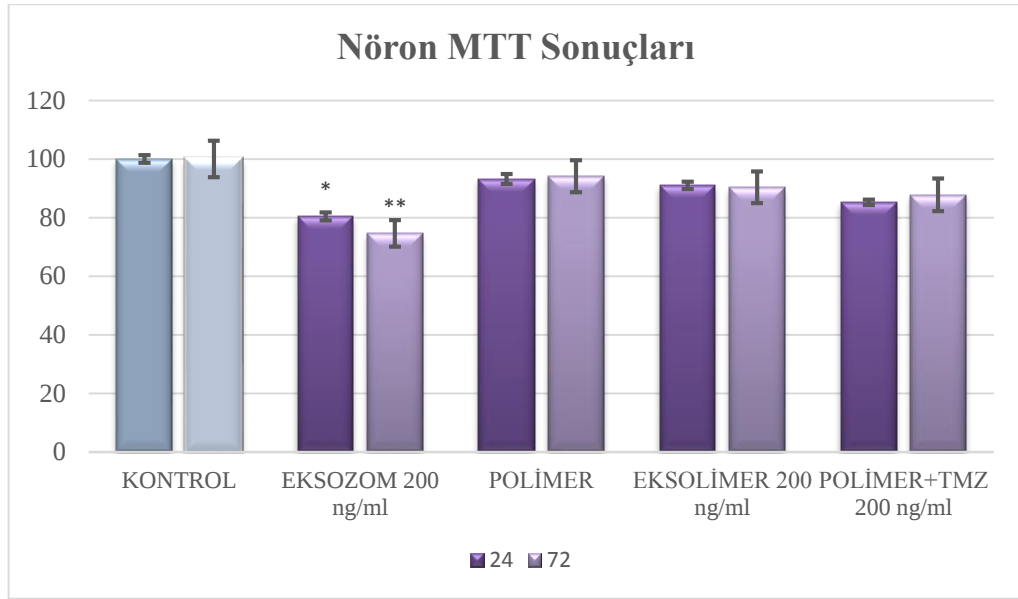
Şekil 4.9. Eksolimer+TMZ enkapsülasyonuna ait TEM görüntüsü

4.3. İn-Vitro Çalışmaları

4.3.1. MTT Analizi (Sitotoksisite Analizi)

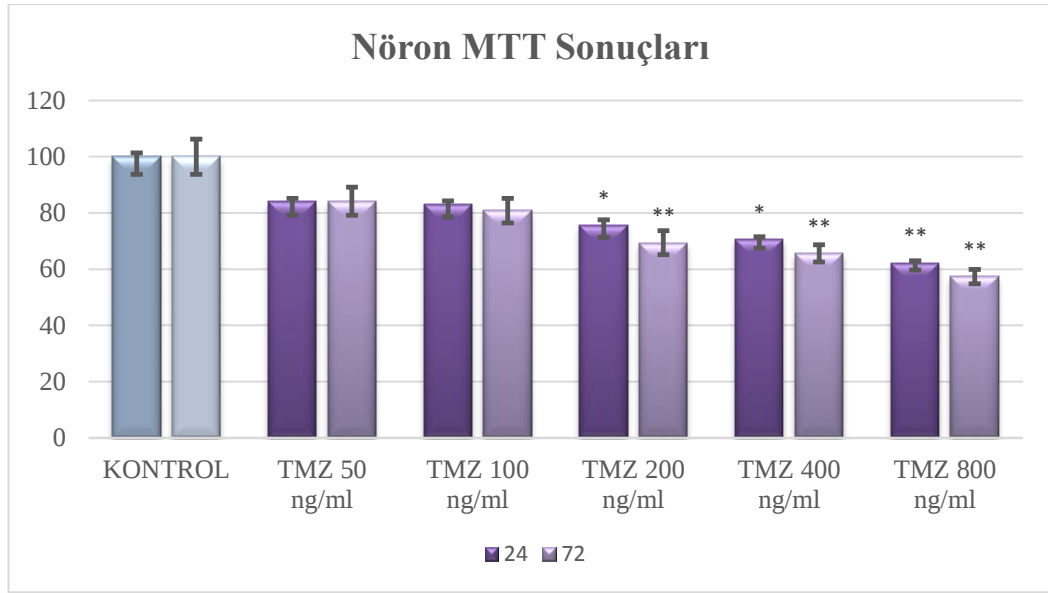
4.3.1.1. Nöron Hücrelerine Ait MTT Sonuçları

Primer nöron kültüründe 24 ve 72 saat sonunda uygulama gruplarına (Eksozom, Polimer, Polimer-TMZ, Eksolimer, TMZ ve Eksolimer-TMZ) ait sitotoksisite sonuçları MTT testi ile ortaya konulmuş ve hücre canlılığı grafiği Şekil 4.10-4.12’de verildi. Çalışma grupları kontrol ve Hücre canlılığı kontrol grubunda (negatif kontrol) hücre canlılığı 100 olarak kabul edildi. Pozitif kontrol grupları (Eksozom, Polimer, Polimer-TMZ ve Eksolimer) arasında en az hücresel canlılığa sahip grup Eksozom 200 ng/ml’de gözlemlendi. Hücre canlılığı 24. Saatte $80,38 \pm 1,3373$ iken 72 saat sonunda ise hücre canlılığı %26 düşerek $74,62 \pm 4,549$, olarak tespit edildi. Eksozom 200 ng/ml kontrol grubuna göre 24 saat sonrasında istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0,05$) 72 saat sonrasında ise çok anlamlı ($P < 0,01$) olarak bulundu. Diğer gruplar arasında istatistiksel bir anlam bulunmamaktadır (Şekil 4.10).



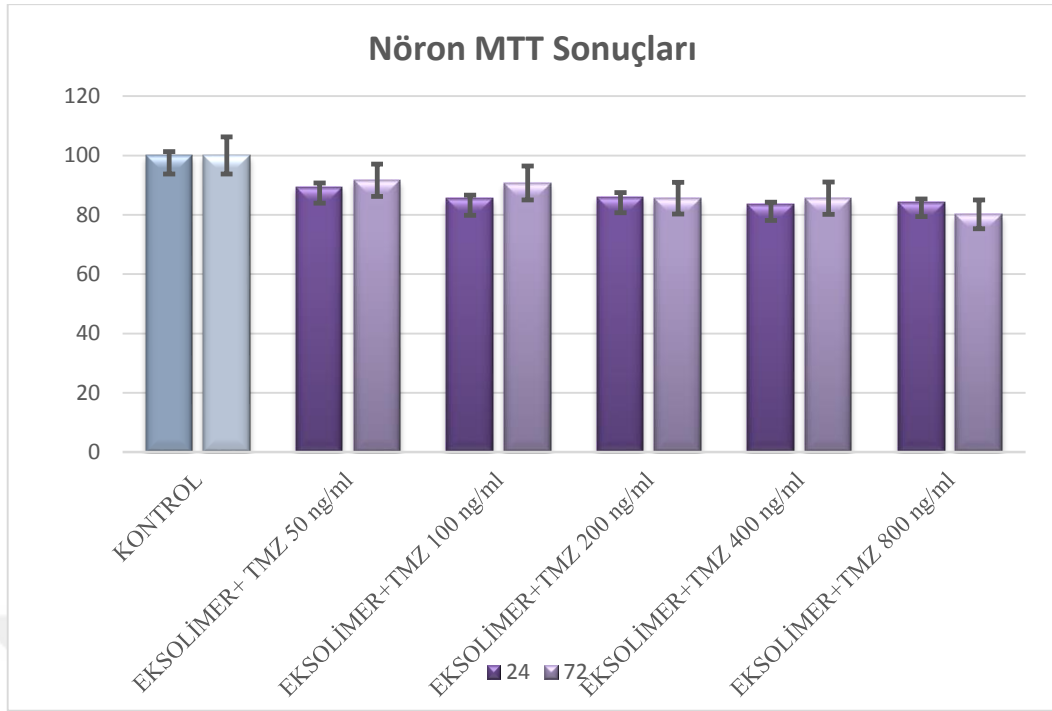
Şekil 4.10. Kontrol ve pozitif kontrollere (eksozom, polimer, eksolimer ve polimer eksozom (200ng/ml)) ait MTT sonuçları. (Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla yüzde (%) değerler olarak ifade edilmiştir. * $P<0,05$ değerler önemli, ** $P<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

Farklı dozlarda uygulanan TMZ ait MTT sonuçlarına göre ise canlılık oranı doza bağlı olarak azalmıştır. 24 saatlik uygulama sonrasında canlılık oranı sırasıyla TMZ 50 ng/ml’de $84,11 \pm 1,30$, TMZ 100 ng/ml’de $82,94 \pm 1,04$, TMZ 200 ng/ml’de $75,57 \pm 1,29$, TMZ 400 ng/ml’de $70,56 \pm 1,99$ ve TMZ 800 ng/ml’de $62,25 \pm 0,74$ olarak belirlendi. 72 saatlik uygulama sonrasında ise sırasıyla $84,15 \pm 4,98$, $80,84416 \pm 4,36$, $69,4056 \pm 4,24$, $65,62188 \pm 3,075$ ve $57,33017 \pm 2,561$ olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak bulundu ($P<0,05$), ($P<0,01$).



Şekil 4.11. Kontrol ve farklı dozlarda TMZ (50,100,200,400 ve 800 ng/ml) ait MTT sonuçları. (Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla yüzde (%) değerler olarak ifade edilmiştir. * $P < 0,05$ değerler önemli, ** $P < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

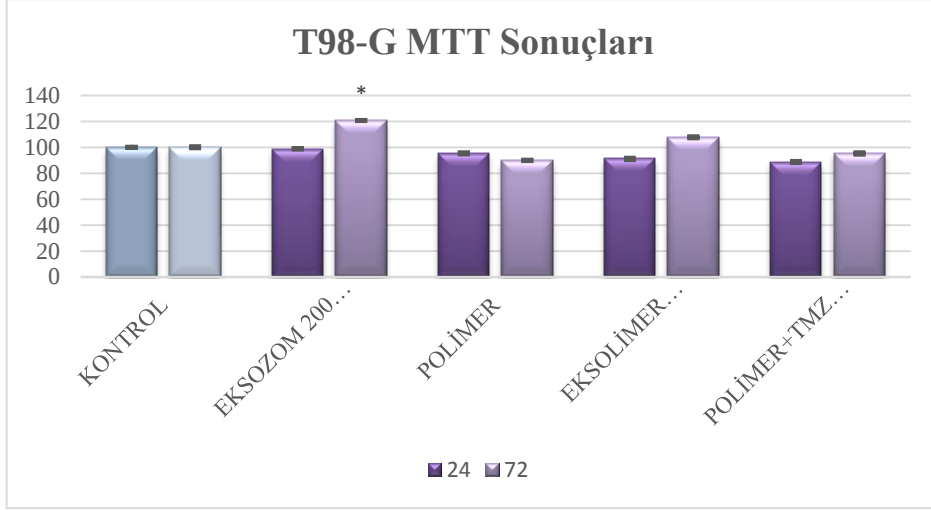
Eksolimer + TMZ (50, 100, 200, 400, 800 ng/ml) grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir (Şekil 4.12). 24 saatlik ve 72 saatlik sonuçlar sırasıyla 50 ng/ml'de $89,34 \pm 1,36$, $91,65 \pm 6,25$, 100 ng/ml'de $85,63 \pm 0,99$, $90,73 \pm 5,75$, 200 ng/ml'de $86,01 \pm 1,44$, $83,51 \pm 0,70$, 400 ng/ml'de $85,60 \pm 5,44$, ve 800 ng/ml $84,20 \pm 1,17$, $80,11 \pm 4,84$ olarak bulundu ($P > 0,05$). Bu sonuçlarımız yeni taşıyıcı olarak kullandığımız eksolimerin salım profili ile korelasyon göstermektedir. Salım profiline göre daha nötr ortamda ilaç salınımı 7 gün boyunca sürdüğü gözlenmiştir. Bu durum Temozolomid'in nöron hücreleri üzerinde meydana getirdiği nörotoksik etkiyi taşıyıcı sistemimiz ile ortadan kaldırdığını ortaya koymuştur.



Şekil 4.12. Kontrol ve farklı dozlarda Eksolimer-TMZ (50,100,200,400 ve 800 ng/ml) ait MTT sonuçları. (Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla yüzde (%) değerler olarak ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$))

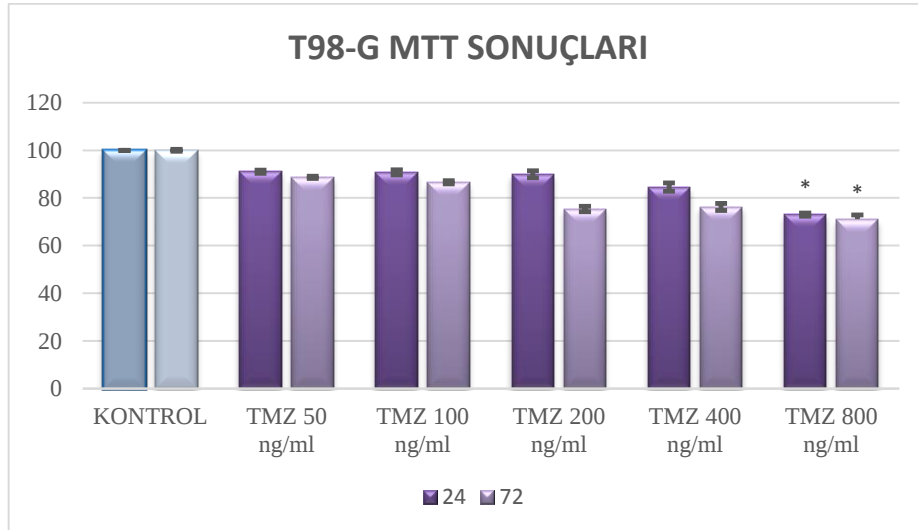
4.3.1.2. T98-G Hücrelerine Ait MTT Sonuçları

T 98-G 24 ve 72 saat sonunda uygulama gruplarına (Eksozom, Polimer, Polimer-TMZ, Eksolimer, TMZve Eksolimer-TMZ) ait sitotoksosite sonuçları Şekil 4.13-4.15’de verildi. Kontrol grubuna kıyasla Eksozom 200 ng/ml grubunda hücre canlılığı %21 arttığı tespit edildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre T98-G kanser hücrelerine ait eksozomların kanser proliferasyonunu artırdığını gözlemledik. Salgılandığı hücreye ait eksozomların hücre proliferasyonunu ve hücre migrasyonunu artırdığı yönünde çalışmalar mevcuttur¹¹³. Bizim sonuçlarımızda literatürle korelasyon göstermektedir.



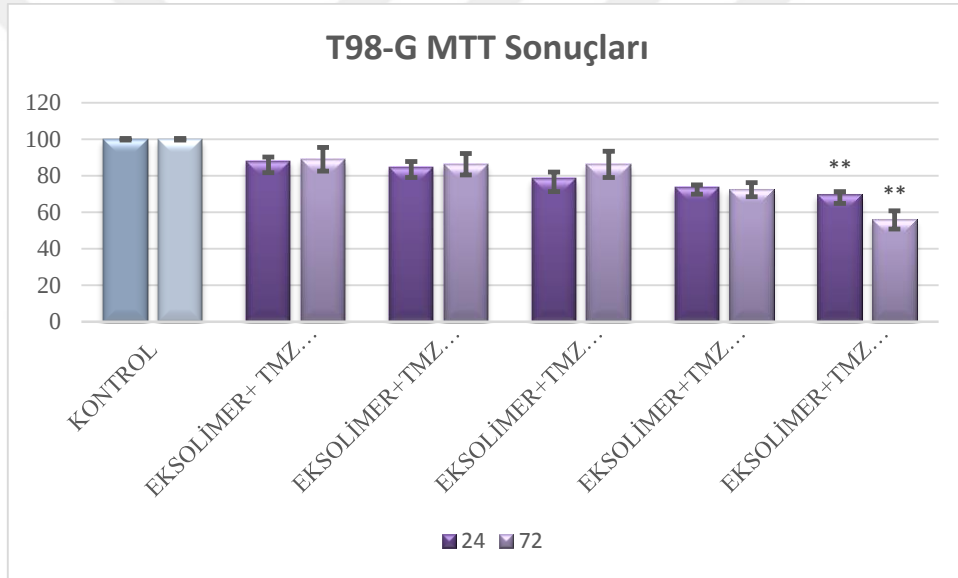
Şekil 4.13. Kontrol ve pozitif kontrollere (eksozom, polimer, eksolimer ve polimer eksozom (200ng/ml)) ait MTT sonuçları. (Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla yüzde (%) değerler olarak ifade edilmiştir. Elde edilen verilerde sadece Eksozom grubu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($P < 0,05$))

Farklı dozlarda uygulanan TMZ ait MTT sonuçlarına göre ise canlılık oranı doza bağlı olarak her iki saatte de azalma göstermiştir (Şekil 4.14). 24 ve 72 saatlik uygulama sonrasında canlılık oranı en fazla (%29) TMZ 800 ng/ml’de azalmıştır ve sırasıyla $72,99 \pm 1,78$ ve $71,06 \pm 0,6438$ olarak belirlenmiştir. TMZ 800 ng/ml grubuna ait sonuçlar kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak bulunmuştur ($P < 0,05$).



Şekil 4.14. Kontrol ve farklı dozlarda TMZ (50,100,200,400 ve 800 ng/ml) ait MTT sonuçları yüzde (%) değerler olarak ifade edilmiştir. (* $P < 0,05$ değerler önemli, ** $P < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir olarak işaretlenmiştir).

Eksolimer+TMZ grubu kontrol grubuna göre her iki saatte de hücre canlılığını oldukça azaltmıştır. Eksolimer+TMZ 50 ng/ml’de hücre canlılığı 24 ve 72 saatte sırasıyla $88,11 \pm 2,1776$ ve $89,34 \pm 6,5328$ olarak bulundu. Eksolimer+TMZ 100 ng/ml’de $84,83 \pm 2,925$ ve $86,27 \pm 5,85$, Eksolimer+TMZ 200 ng/ml’de $78,46 \pm 3,56$ ve $86,19 \pm 7,13$, Eksolimer+TMZ 400 ng/ml’de $73,70 \pm 1,28$ ve $72,29 \pm 3,86$ olarak bulundu. Her iki saatte de en fazla sitotoksositeye Eksolimer+TMZ 800 ng/ml grubu neden olmuştur. Hücre canlılığını sırasıyla %39 ve %45 azaldı. Elde edilen değerler $69,66 \pm 2,33$ ve $55,77 \pm 6,99$ olarak tespit edildi. Sonuçlar istatistiksel olarak $P < 0,05$ ve $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı bulundu (Şekil 4. 15).



Şekil 4.15. Kontrol ve farklı dozlarda Eksolimer+TMZ (50,100,200,400 ve 800 ng/ml) ait MTT sonuçları yüzde (%) değerler olarak ifade edilmiştir. (* $P < 0,05$ değerler önemli, (* $P < 0,05$ değerler önemli, ** $P < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir olarak işaretlenmiştir).

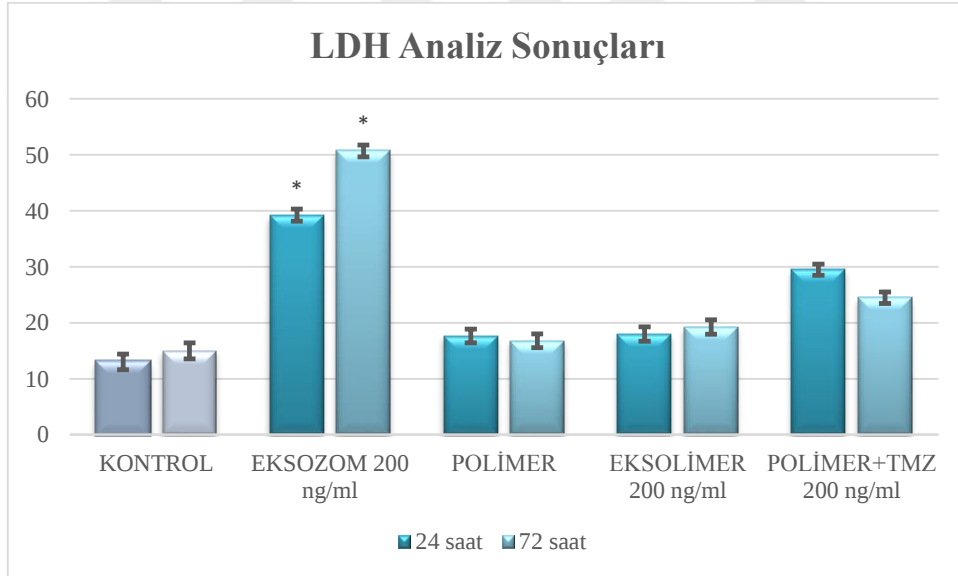
Nöron hücreleri ve T98-G hücrelerine ait MTT analiz sonuçlarımız Eksolimer taşıyıcı sisteminin kanser hücrelerine sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, salım profilinin nötr ortamlarda ve nispeten bazik ortamlarda daha yavaş salınma özelliğinden dolayı, TMZ ilacının nöron hücrelerinde meydana getirdiği hasarı engellediği tespit edildi.

4.3.2. LDH Aktivitelerinin Ölçümleri

4.3.2.1. Nöron Hücrelerine Ait MTT Sonuçları

Hücre ölümünü değerlendirmek için hücre içi bir enzim olan LDH aktivitesi ölçülmüştür ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.15-20 arasında verildi. Kontrol grubu 10 olarak kabul edilmiş LDH seviyesi arttıkça hücresel ölüm oranı gösterildi.

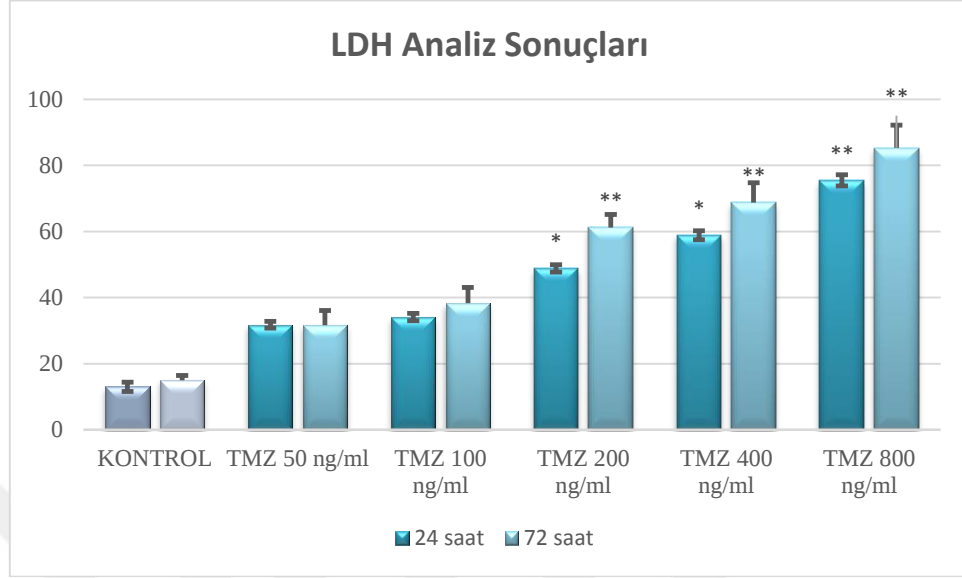
Nöron hücrelerinde her iki saatte de elde edilen sonuçlara göre kontrol ve pozitif kontrol grupları arasında sadece Eksozom 200 ng/ml grubunda anlamlı sonuç bulunmaktadır ($P<0,05$). Kontrol değeri 24 saatte $13\pm1,4$ ve 72 saate $15\pm0,74$ olarak bulundu. Eksozom 200 ng/ml değeri ise yaklaşık 3 kat artarak $39,22\pm1,06$ ve $50,7\pm0,94$ 'a ulaşmıştır (Şekil 4.16). Eksozomun nöronlar üzerinde etkisi MTT ile korelasyon göstermiştir.



Şekil 4.16. Kontrol (Negatif Kontrol), Pozitif Kontrol (Eksozom 200 ng/ml, Polimer, Eksolimer 200 ng/ml, Polimer + TMZ 200 ng/ml) gruplarının 24 ve 72 saatlerine ait LDH sonuçları

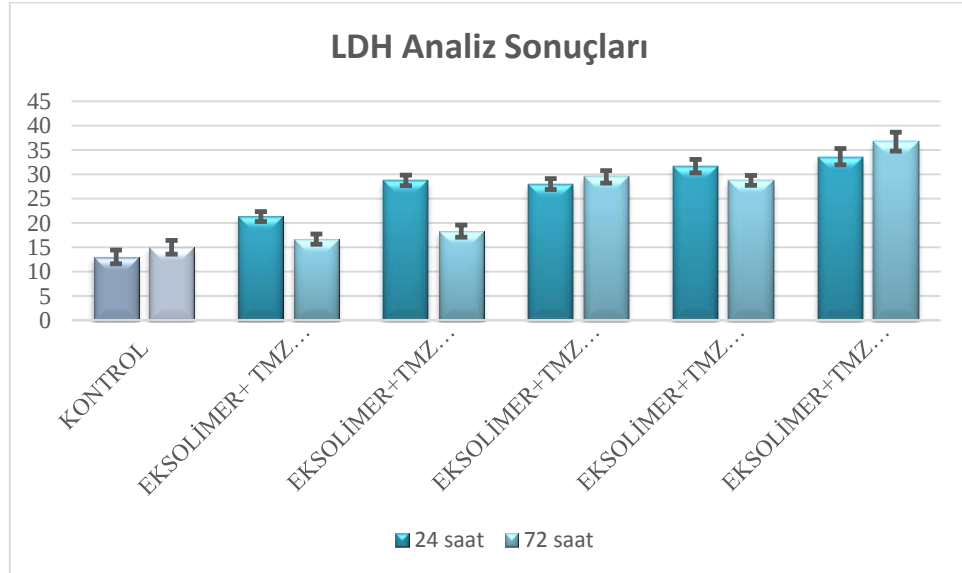
TMZ grubunda LDH aktivitesi en fazla TMZ 400-800 ng/ml grupları arasında görüldü. 24 saat sonucu $58,9\pm1,37$ ve $68,8\pm1,68$ iken 72 saat sonucu $75,5\pm6,02$ ve $85,3\pm 6,88$ olarak bulundu. En yüksek dozda LDH aktivitesi neredeyse 6 kat artış

göstermiştir. Temozolomidin nöron hücreleri üzerindeki nörotoksik etkisi MTT sonuçlarıyla benzer çıkmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Kontrol, TMZ 50 ng/ml, TMZ 100 ng/ml, TMZ 200 ng/ml, TMZ 400 ng/ml, TMZ 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72.saatlerine ait LDH sonuçları ((* $P < 0,05$ değerler önemli, ** $P < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir olarak işaretlenmiştir)

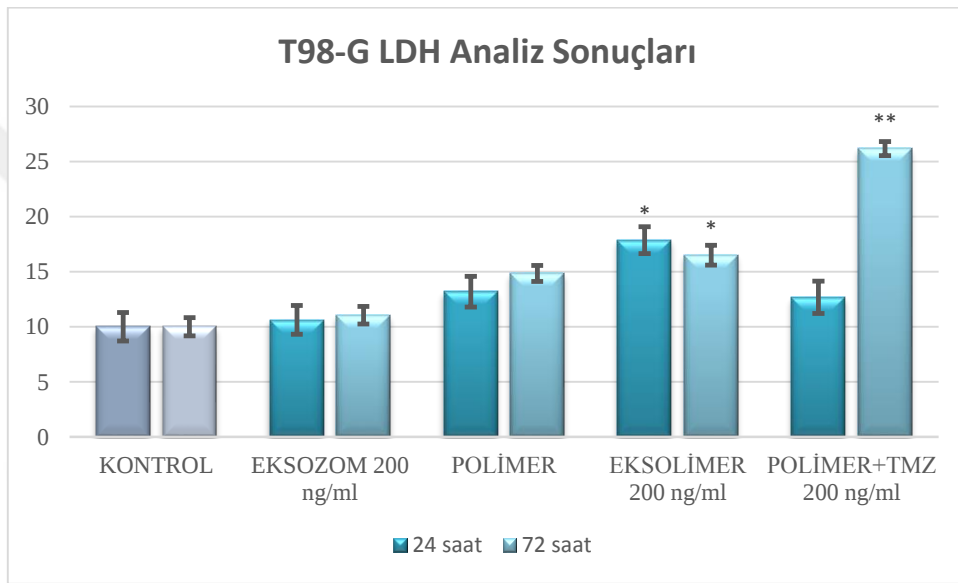
MTT ile benzer şekilde nöron hücrelerinde eksolimer ile kapsüllenmiş TMZ grubunda LDH seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır.



Şekil 4.18. Kontrol, Eksolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72.saatlerine ait LDH sonuçları ((* $P < 0,05$ değerler önemli, ** $P < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir).

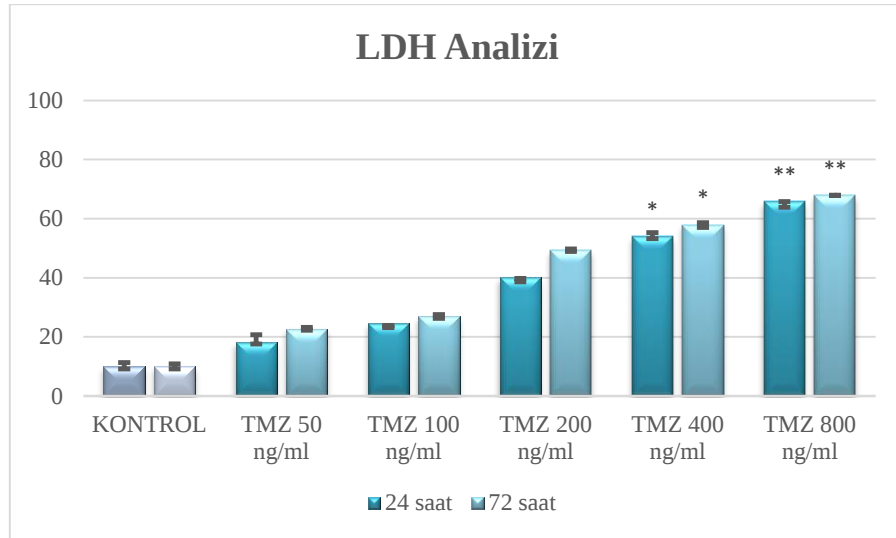
4.3.3. T98-G Hücrelerine Ait LDH Sonuçları

T 98-G hücre hattında ise kontrol grubuna kıyasla Eksozom 200 ng/ml, Polimer, Eksolimer 200 ng/ml ve Polimer + TMZ 200 ng/ml gruplarının laktat dehidrogenaz aktivitesini artırdığı fakat anlamlı bir farklılık ortaya çıkmadığı bulundu. Bu rağmen Polimer + TMZ 200 ng/ml (72.saat) grubunda kontrole kıyasla az miktarda olsa fark gözlenmedi. Fakat gözlemlenen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.19).



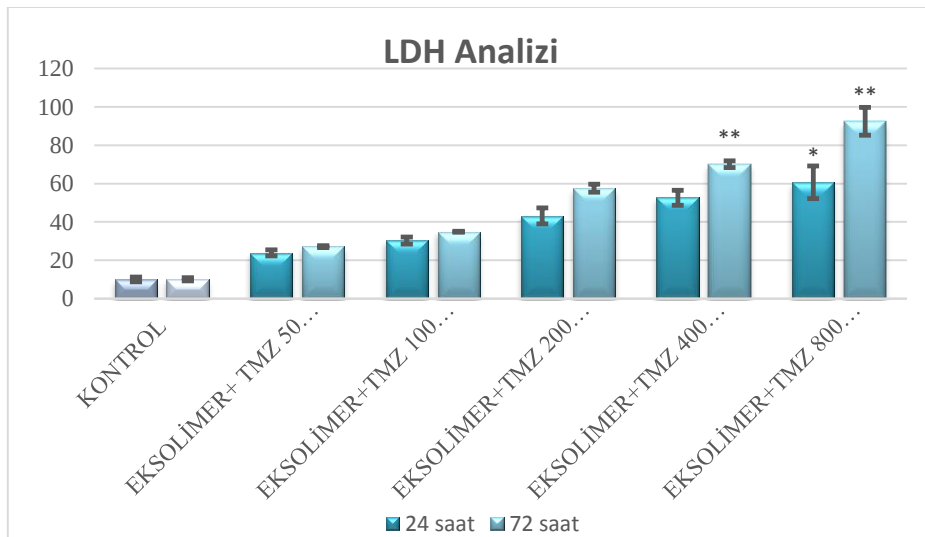
Şekil 4.19. Kontrol (Negatif Kontrol), Pozitif Kontrol (Eksozom 200 ng/ml, Polimer, Eksolimer 200 ng/ml, Polimer + TMZ 200 ng/ml) gruplarının 24 ve 72 saatlerine ait LDH sonuçları

MTT sonuçlarına benzer şekilde anlamlı gruplar TMZ 400 ve 800 ng/ml dozlarında gözlemlendi (Şekil 4.120). Hem 24 hemde 72 saatte kontrole kıyasla üç kat daha sitotoksik olduğu gözlemlendi ($P<0,05$, $P<0,01$).



Şekil 4.20. Kontrol, TMZ 50 ng/ml, TMZ 100 ng/ml, TMZ 200 ng/ml, TMZ 400 ng/ml, TMZ 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72.saatlerine ait LDH sonuçları. (* $P<0,05$ değerler önemli, ** $P<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir).

TMZ 800 ng/ml’ de anlamlı sonuç bulunsa da Eksolimer ile kapsüle edilmiş olan TMZ grubunda (Eksolimer+TMZ 400-800ng/ml) sırasıyla sonuçlar 24 ve 72 saatte sırasıyla $52,6 \pm 3,8$ ve $60,7 \pm 1,74$ ve $70,0 \pm 8,59$ ve $92,5 \pm 7,23$ olarak bulundu ve sonuç neredeyse kontrol ile kıyaslandığında 10 kat arttığı gözlemlendi (Şekil 4.18). Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$, $P<0,01$).



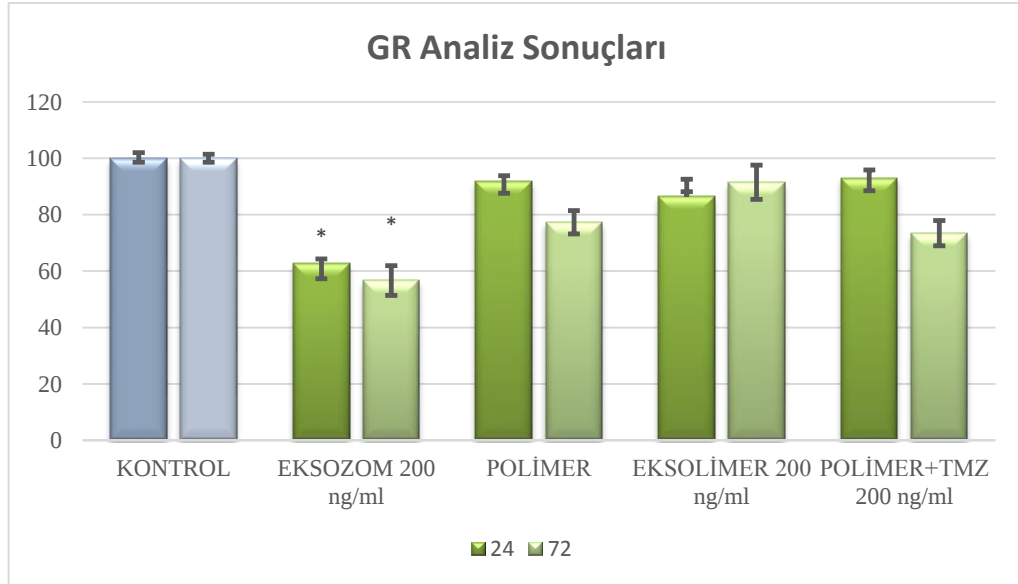
Şekil 4.21. Kontrol, Eksolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72.saatlerine ait LDH sonuçları. ((* $P<0,05$ değerler önemli, ** $P<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir)

4.3.4. GR Aktivitelerinin Ölçümleri

4.3.4.1. Nöron Hücrelerine Ait GR Sonuçları

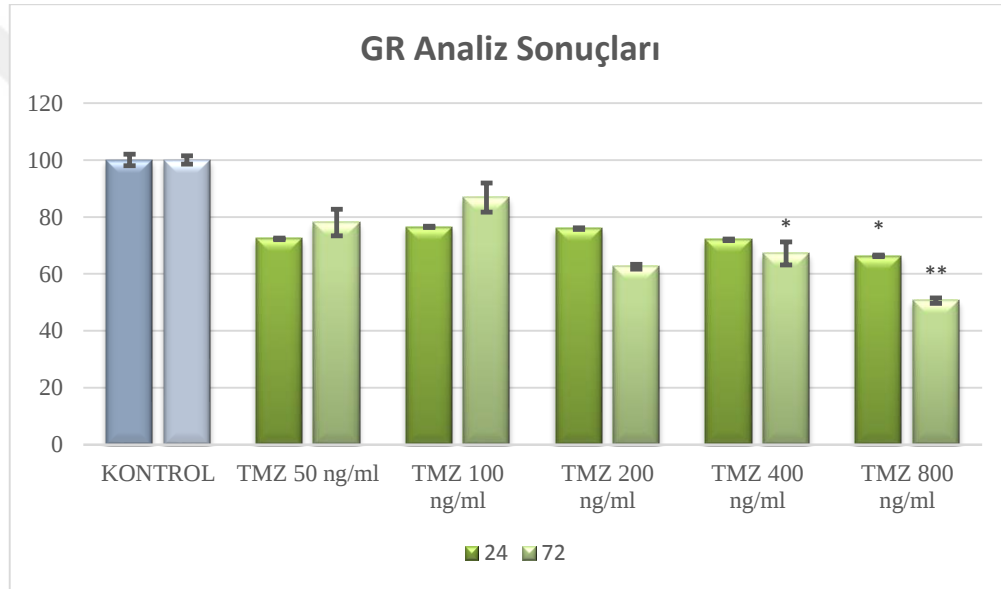
Glutasyon redüktaz (GR), yeterli hücre içi GSH (Glutasyon) seviyelerinin korunmasına yardımcı olarak esas olarak hücre içinde oksidatif hasarın önlenmesinde rol oynayan bir homodimerik flavoproteindir.

Nöron hücrelerinde bu homodinamiğin korunması oldukça önemlidir. Kontrol grubunda GR en yüksek seviyede gözlemlenmiş ve 100 olarak kabul edilmiştir. Tüm gruplar kontrol ile kıyaslandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi (4.22-24). Eksozomların içeriğindeki kansere özel bilgilerin varlığı nedeniyle nöron hücresine uygulandığında glutasyon seviyesinde anlamlı derecede azalma meydana geldi. 24 ve 72 saat sonunda Eksozom 200ng/ml dozunda GR seviyesi $62,56 \pm 1,57$ ve $56,64 \pm 4,88$ olarak bulundu ve neredeyse %40 azalma meydana gelmiştir. Bu sonuçlar MTT ve LDH değerleriyle de korelasyon göstermektedir. Diğer kontrol gruplarında anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.

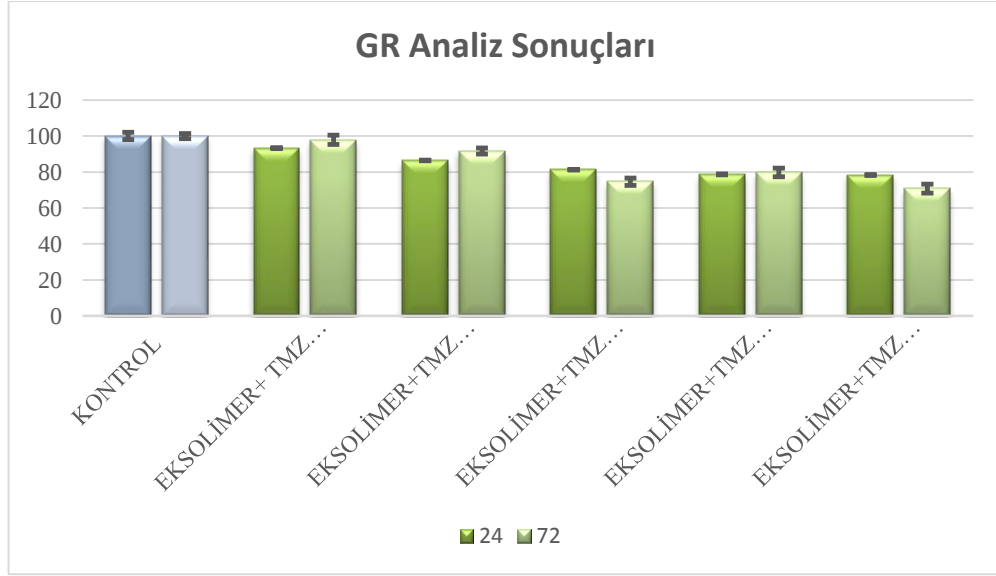


Şekil 4.22. Kontrol (Negatif Kontrol), Pozitif Kotrol (Eksozom 200 ng/ml, Polimer, Eksolimer 200 ng/ml, Polimer + TMZ 200 ng/ml) gruplarının 24 ve 72 saatlerine ait GR sonuçları

Temozolomid'e ait yüksek dozlarda GR seviyeleri MTT ve LDH ile benzer şekilde anlamlı olarak azalmıştır. Özellikle 400 ve 800 ng/ml dozlarında bu değerler 100'den 24 saatte sırasıyla $72,003 \pm 0,2941$ ve $67,17 \pm 0,3286$ ' düştüğü, 72 saate ise $66,33 \pm 4,06$ ve $50,61 \pm 0,96$ 'e kadar düştüğü gözlemlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$, $P < 0,01$) (Şekil 4.23). Bunun aksine enkapsüle edilen Eksolimer+TMZ grubunda GR seviyesi anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Sadece Eksolimer+TMZ 800 ng/ml grubunda 72 saate GR seviyesi $70,73 \pm 2,531$ 'e kadar gerilemiştir (Şekil 4. 23).



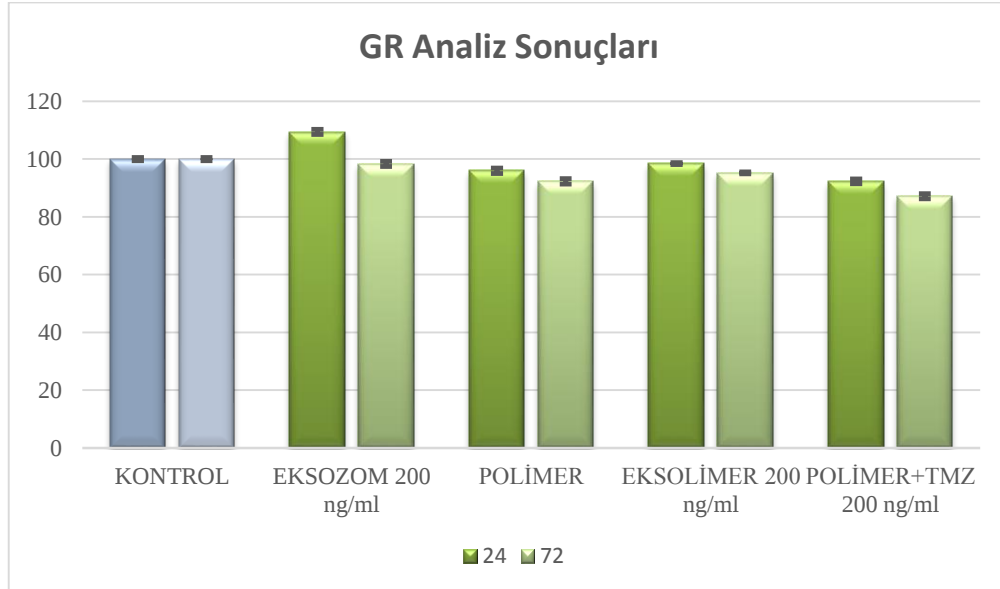
Şekil 4.23. Kontrol, TMZ 50 ng/ml, TMZ 100 ng/ml, TMZ 200 ng/ml, TMZ 400 ng/ml, TMZ 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72. saatlerine ait GR sonuçları. (* $P < 0,05$ değerler önemli, ** $P < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir).



Şekil 4.24. Kontrol, Eksolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72. saatlerine ait GR sonuçları. (* $P < 0,05$ değerler önemli, ** $P < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir)

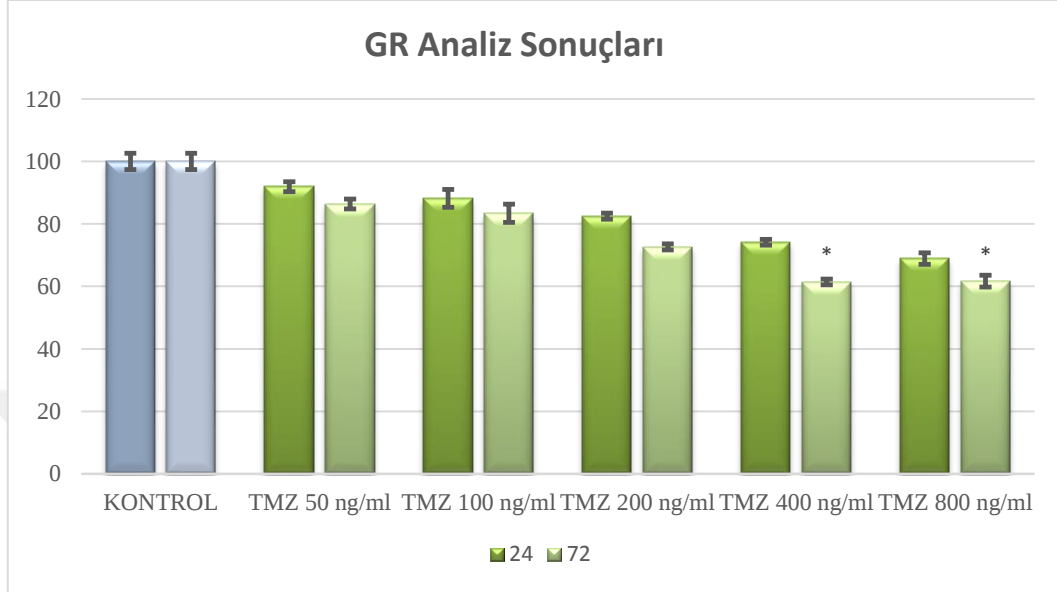
4.3.4.2. T98-G Hücrelerine Ait GR Sonuçları

T98-G hücrelerinde kontrole kıyasla pozitif kontrollerde GR seviyesinde anlamlı bir değişiklik oluşmamış neredeyse kontrol ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 2.25).



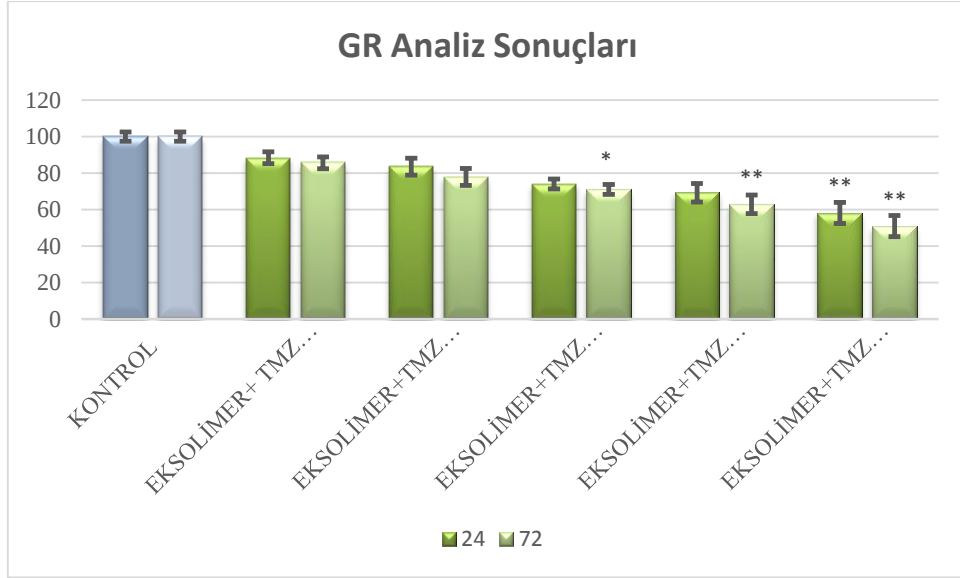
Şekil 4.25. Kontrol (Negatif Kontrol), Pozitif Kontrol (Eksozom 200 ng/ml, Polimer, Eksolimer 200 ng/ml, Polimer + TMZ 200 ng/ml) gruplarının 24 ve 72 saatlerine ait GR sonuçları

Pozitif kontrollerin aksine TMZ yüksek dozunun her iki saatine de GR seviyesi $61,43 \pm 0,921$ ve $61,69 \pm 1,868$ düzeyine düşmüştür. Ve sadece bu grupta istatistiksel anlam bulunmuştur ($P < 0,05$).



Şekil 4.26. Kontrol, TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml) gruplarının 24 ve 72. saatlerine ait GR sonuçları. (* $P < 0,05$ değerler önemli, ** $P < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir)

T98-G hücre hattına ait GR sonucunda da MTT ve LDH seviyelerine paralel şekilde oldukça azalmıştır. Özellikle 72. Saatte Eksolimer+TMZ 400 ve 800 ng/ml konsantrasyonlarında canlılık seviyesi sırasıyla $58,125 \pm 6,66$ ve $50,95 \pm 5,79$ olarak tespit edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$, $P < 0,01$).



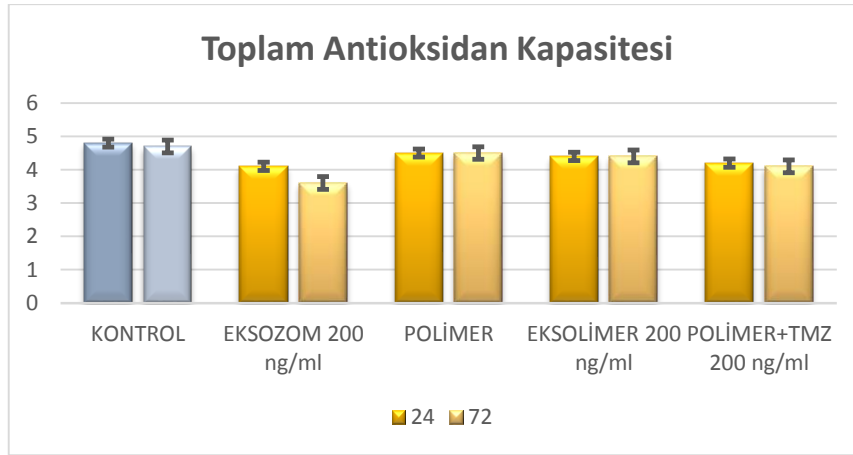
Şekil 4.27. Kontrol, Eksolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml gruplarının 24 ve 72. saatlerine ait GR sonuçları. (* $P<0,05$ değerler önemli, ** $P<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir)

4.3.5. Antioksidan Aktivitesi Ölçümü

4.3.5.1. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)

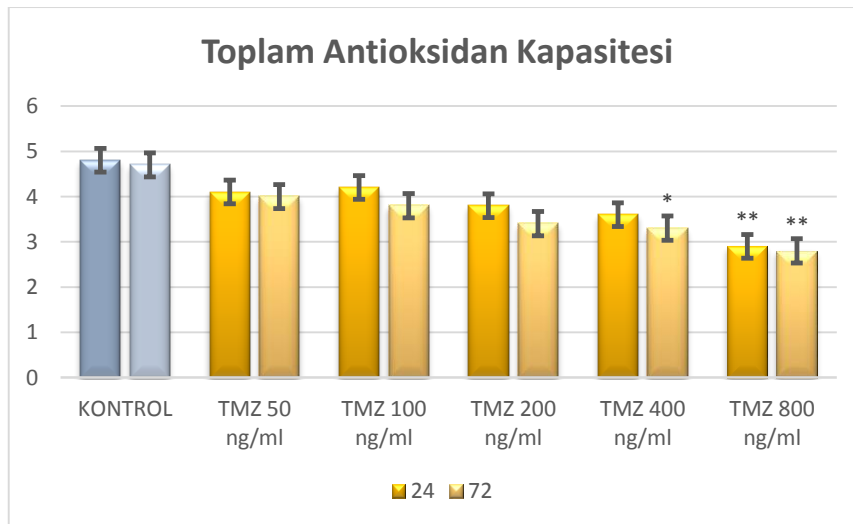
A. Nöron Hücrelerine Ait Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)

Nöron hücrelerinde 24 ve 72 saat sonunda uygulamaların total antioksidan etkileri üzerine sonuçları, TAS testi ile ortaya koyuldu ve bulgular Şekil 4.28-30'da verildi. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun total antioksidan etkinlik değeri $4,8\pm0,22$ ve $4,7\pm0,54$ olarak tespit edildi. Pozitif kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Pozitif kontrollerin değerleri sırasıyla Eksozom 200ng/ml $4,3\pm*,12$ ve $4,5\pm0,33$, Polimer 200ng/ml $4,1\pm0,92$ ve $4,4\pm0,0,1$, Eksolimer 200ng/ml $4,1\pm0,21$ ve $4,1\pm0,14$ ve Polimer+TMZ $4,2\pm0,23$ ve $3,9\pm0,12$ olarak bulundu (Şekil 4.28).



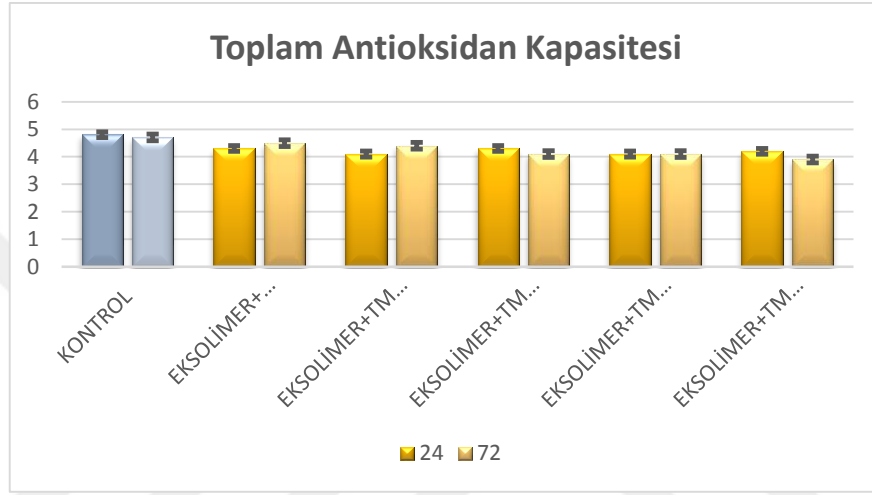
Şekil 4.28. Kontrol ve Pozitif kontrol grubuna ait TAK testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolTroloxEq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir

TMZ grubunda TAK değerleri doza bağlı olarak giderek azaldı. 24 saat sonunda TMZ 400 ng/ml dozuna ait TAK değeri $3,6\pm0,21$ 'e düşerken 72 saat sonunda $2,9\pm0,12$ olarak tespit edildi. Bununla birlikte TAK seviyesinde en fazla azalma TMZ 800 ng/ml konsantrasyonunda gözlemlendi. 24 saatin sonunda bu değer $2,9\pm0,21$ iken 72 saat sonunda $2,8\pm0,14$ olarak gözlemlendi. Elde edilen veriler TMZ grubunun nörotoksik etkisini MTT ile körele bir şekilde ortaya koymaktadır ve bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$), ($P<0,01$).



Şekil 4.29. Kontrol ve TMZ grubuna ait TAK testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolTroloxEq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir

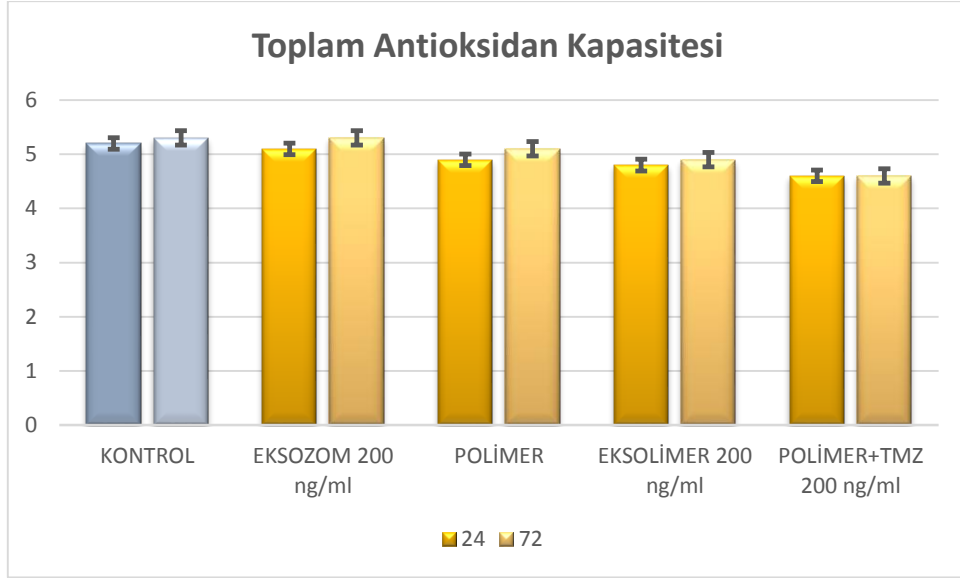
Eksolimer ile enkapsüle edilen TMZ grubu yine ilacımızın salım özelliğinden yola çıkarak nöronlarda antioksidan etkinliği kontrole kıyasla neredeyse hiç değiştirmemiştir. 24 saat sonunda en yüksek konsantrasyon olan Eksolimer+TMZ 800ng/ml'e ait TAK değeri $4,2\pm 21$ bulunurken 72 saat sonunda $3,9\pm 0,12$ olarak tespit edildi. Diğer konsantrasyona ait veriler ise kontrol ile neredeyse aynı bulundu. Elde edilen bulgular istatistiksel bir öneme sahip değildir ($P>0,05$), (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Kontrol ve Eksolimer+TMZ grubuna ait TAK testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolTroloxEq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

B. T98-G Hücrelerine Ait Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)

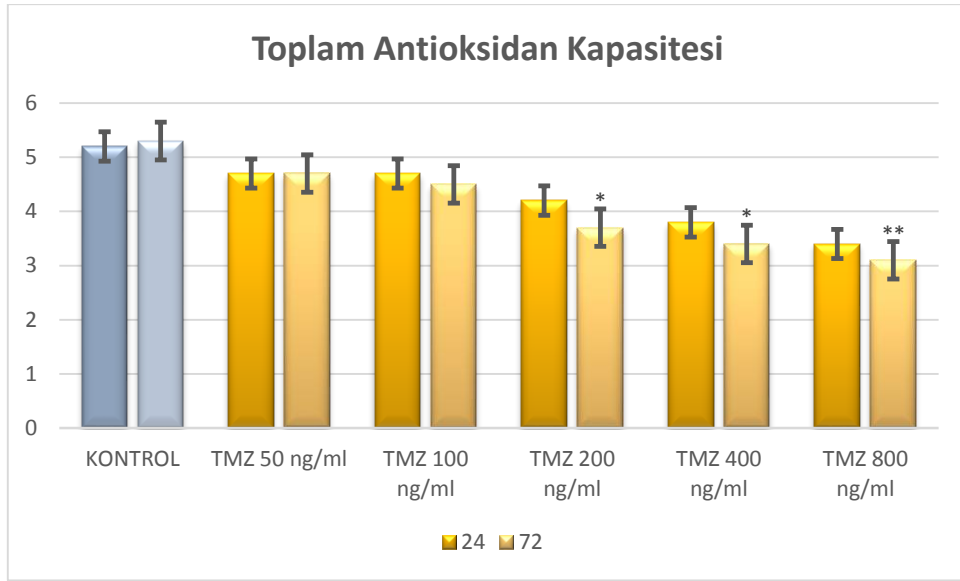
T98-G Şekil 4.30-32 arasında verildi. Kontrol ve pozitif kontrol değerleri oldukça birbirine yakın çıkmış olup istatistiksel bir öneme sahip değildir (Şekil 4.31). Kontrol grubunun 24 saat sonunda TAK değeri $5,2\pm 0,31$ iken 72 saat sonunda $5,3\pm 0,01$ olarak bulundu. Pozitif grup içerisinde en düşük değer Polimer+TMZ 200 ng/ml grubuna aittir ve her iki saatte değeri aynı olup sırasıyla $4,6\pm 0,111$ ve $4,6\pm 0,032$ olarak bulundu. Kontroller içerisinde anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P>0,05$).



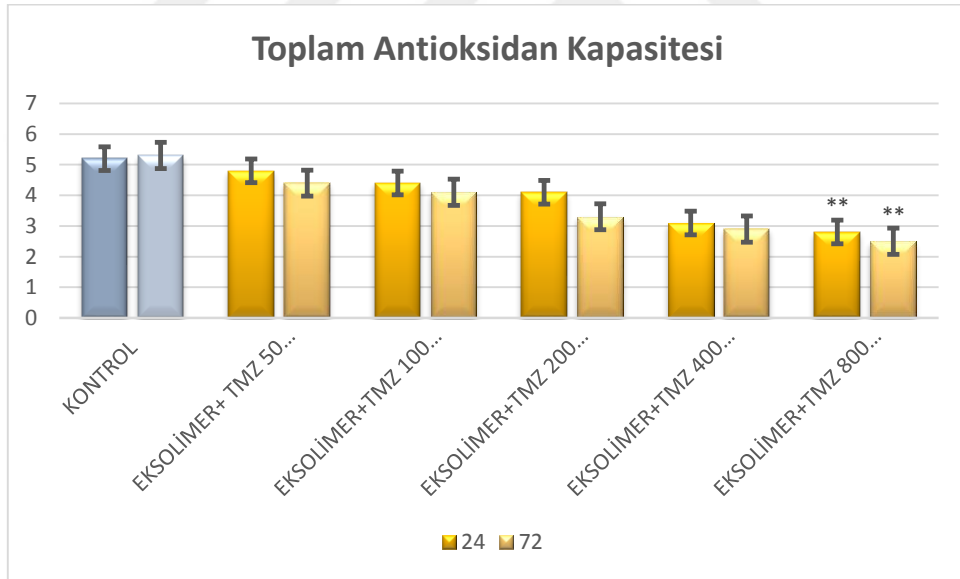
Şekil 4.31. Kontrol ve Pozitif kontrol grubuna ait TAK testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolTroloxEq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

TMZ grubu MTT ve diğer sitotoksisite testleri ile korele bir şekilde T98-G kanser hattı üzerinde anlamlı bir farklılık oluşturmamasına rağmen aynı dozda uygulanan Eksolimer enkapsülasyon formülasyonuna göre daha az etki göstermektedir (Şekil 4.32). TMZ 400 ng/ml ve TMZ 800 ng/ml değerleri kontrolle kıyaslandığında anlamlı sonuç çıkmaktadır. TAK seviyesi 24 saatte sırasıyla $3,8\pm0,125$ ve $3,4\pm0,09$ olarak bulunurken 72 saat sonunda $3,4\pm0,056$ ve $3,1\pm0,21$ olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

Eksolimer+TMZ grubunda düşük dozdan yükek doza doğru sırasıyla 24 saat sonunda elde edilen değerler $4,8\pm0,1$, $4,4\pm0,04$, $4,1\pm0,06$, $3,1\pm0,3$ ve $2,8\pm0,89$ olarak bulunurken 72 saat sonunda $4,4\pm0,21$, $4,1\pm0,032$, $3,3\pm0,43$, $2,9\pm0,12$ ve $2,5\pm0,076$ olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre kontrole kıyasla neredeyse yarı katı kadar TAK düzeyinde düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.33). Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$ ve $p<0,01$).



Şekil 4.32. Kontrol ve TMZ grubuna ait TAK testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolTroloxEq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

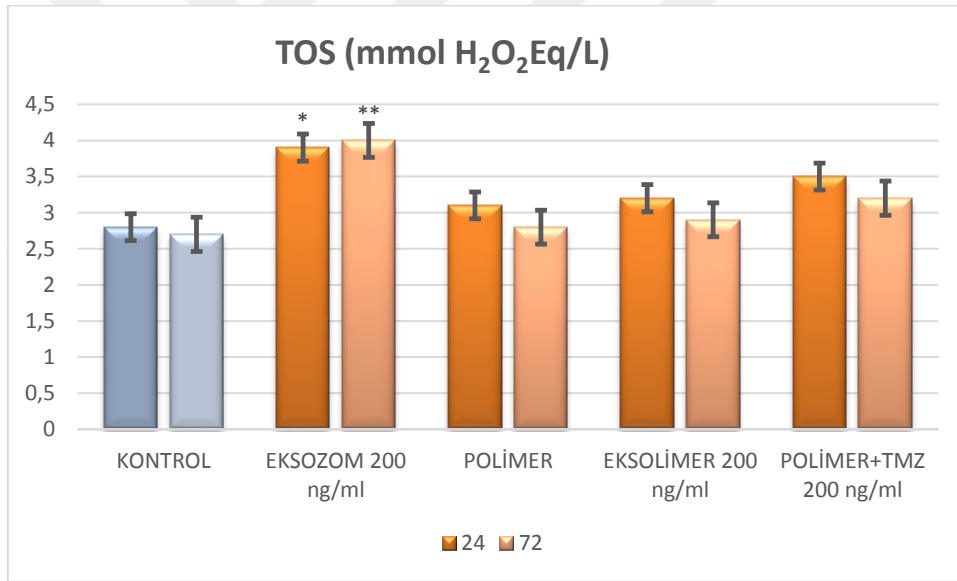


Şekil 4.33. Kontrol ve Eksolimer+TMZ grubuna ait TAK testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolTroloxEq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

4.3.5.2. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS)

A. Nöron Hücrelerine Ait TOS Değerleri

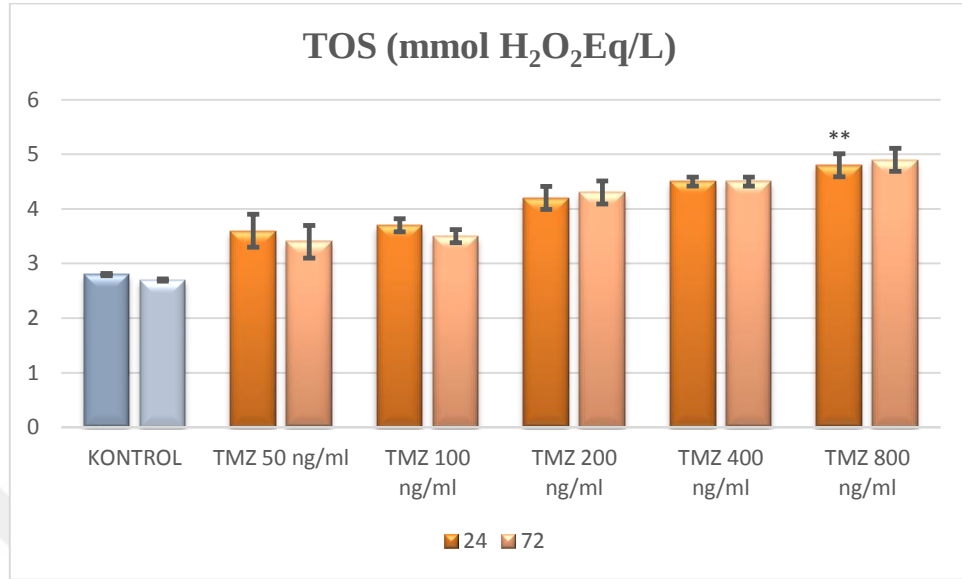
Nöron hücrelerinde 24 ve 72 saat sonunda uygulama gruplarının meydana getirdiği total oksidan etkileri TOS testi ile ortaya koyuldu. Nöron hücresine ait total oksidan test bulguları Şekil 4.34-36'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun total oksidan etkinlik değeri 24 saat sonunda $2,8 \pm 0,06$ olarak tespit edildi, 72 saatte ise $2,7 \pm 0,21$ olarak bulundu. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 ve 72. saatlerin sonunda Eksozom 200ng/ml grubunun nöron hücrelerini oksidatif hasara sürüklediği gözlemlenirken ($p < 0,05$) diğer pozitif kontrol gruplarında anlamlı bir farklılık oluşmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.34. Kontrol ve pozitif kontrol gruplarına ait TOS testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolH₂O₂Eq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ değerler önemli, ** $p < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

TMZ 800 ng/ml dozunda 24 saat sonunda $2,8 \pm 0,06$ 'de $4,8 \pm 0,12$ 'ye kadar yükseldiği gözlemlendi. Bununla birlikte 72 saate de $2,7 \pm 0,21$ 'den $4,9 \pm 0,034$ olduğu tespit edildi. TMZ Nöron hücreleri üzerindeki oksidatif stresi neredeyse iki kat kadar artırmıştır. Buda hücrelerin apoptotik yolağa sokulmasının nedenini açıklamaktadır. Elde

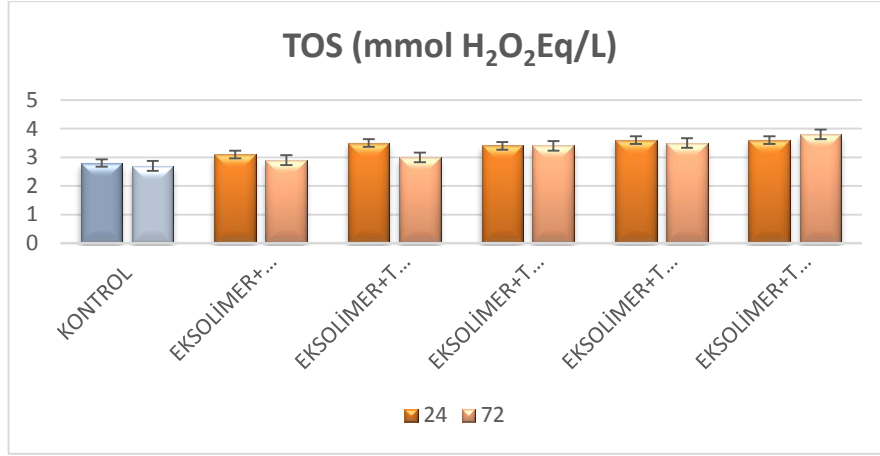
edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ve $p<0,05$ değerler önemli, $** p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Kontrol ve TMZ grubuna ait TOS testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolH₂O₂Eq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ değerler önemli, $** p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

Diğer sonuçlarımıza benzer şekilde Eksolimer enkapsüllü TMZ nöron hücrelerine toksik etki çok az göstermiştir. Oksidan seviyesinde artış tek başına kullanılan TMZ ile kıyaslandığında neredeyse yok denecek kadar azdır. Kontrol değeri $2,8\pm0,06$ ' iken yüksek doz Eksolimer+TMZ grubuna ait oksidan değeri $3,6\pm0,2$ 'ye kadar yükseldiği gözlemlendi. Bununla birlikte 72. saate de benzer şekilde $2,7\pm0,21$ 'den $3,8\pm0,041$ olarak bulunmuş ve oksidan seviyesinin düşük düzeyde kalması hedefe yönelik geliştirdiğimiz ilacın etkinliği göstermektedir (Şekil 3. 36).

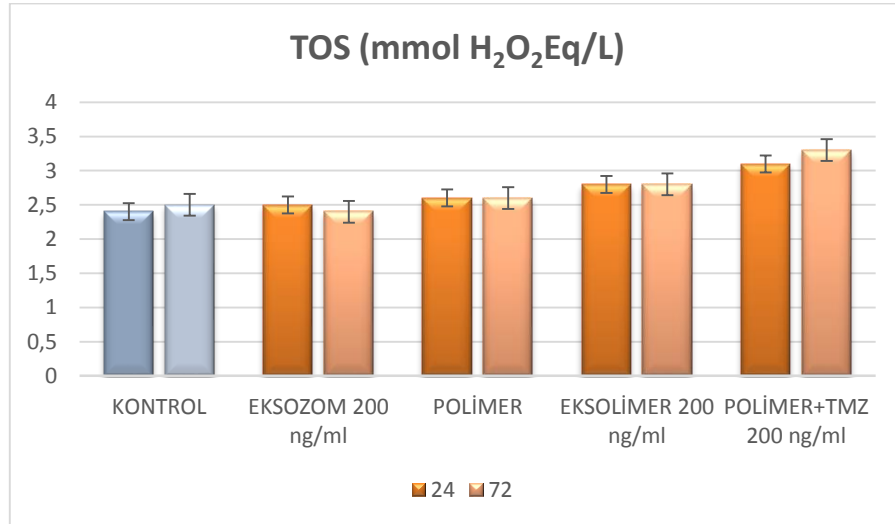
Noronlar üzerinde elde ettiğimiz bulgular geliştirdiğimiz yeni nesil ilacın olası yan etkisinin minimum seviyede tutulmasını sağladığını göstermiştir.



Şekil 4.36. Kontrol ve Eksolimer+TMZ grubuna ait TOS testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolH₂O₂Eq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * p<0,05 değerler önemli, ** p<0,01 değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

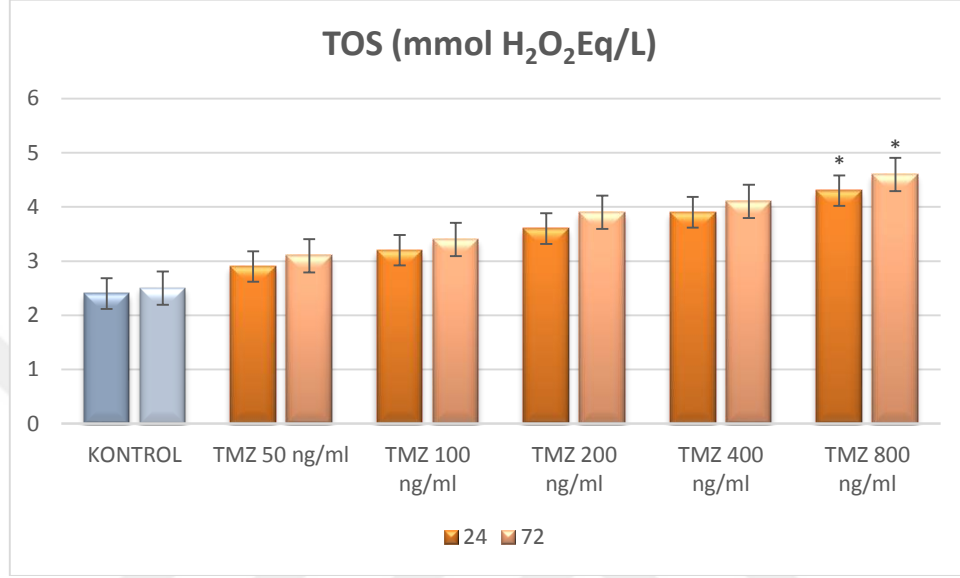
B. T98-G Hücrelerine Ait TOS Değerleri

Kontrol grubuna kıyasla eksozom 200 ng/ml, polimer ve eksolimer 200 ng/ml gruplarının hem 24 hem de 72. saatlerde T-98G hücre hattında oksidatif stresi artırdığı fakat anlamlı bir fark olmadığı gözlenmedi. Fakat polimer + TMZ 200 ng/ml grubunun 72. saatinde kontrol grubuna kıyasla oksidatif stresin 1,32 kat arttığı tespit edildi. Bu sonuç diğer verilerimizle çok uyuşmasa da anlamlı bir farklılık ortaya çıkmamıştır.



Şekil 4.37. Kontrol ve pozitif kontrol gruplarına ait TOS testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolH₂O₂Eq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * p<0,05 değerler önemli, ** p<0,01 değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

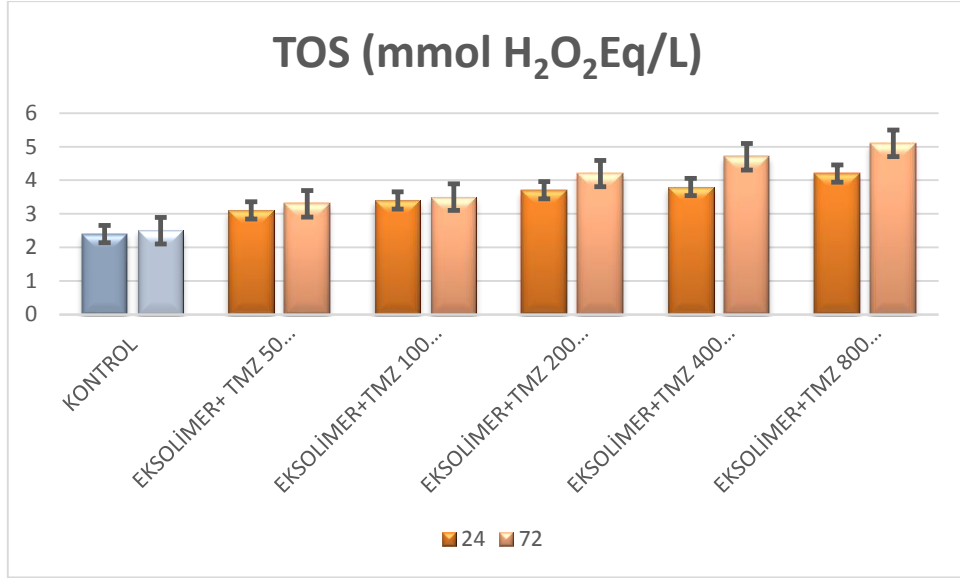
Kontrol grubuna kıyasla TMZ gruplarının (50, 100, 200, 400 ve 800ng/ml) artan doza bağılı olarak hem 24 hem de 72. saatlerde oksidatif stresi artırdığı sonucu elde edildi. Kontrol grubuna kıyasla 72 saat sonra en anlamlı sonuç oksidatif stresi sırasıyla 1,64 ve 1,84 kat artıran TMZ 400 ve TMZ 800ng/ml gruplarında tespit edildi.



Şekil 4.38. Kontrol ve TMZ grubuna ait TOS testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolH₂O₂Eq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * p<0,05 değerler önemli, ** p<0,01 değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.

Eksolimer + TMZ (50, 100, 200, 400 ve 800ng/ml) gruplarının artan doza bağılı olarak 24 ve 72. saatlerde oksidatif stresi artırdığı, T-98G hücre canlılığını olumsuz etkilediği ve hücre ölümüne sürüklediği Şekil 4.38 ile gösterildi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Eksolimerin artan doza bağılı olarak TMZ etkinliğini olumlu yönde artırdığını ortaya koymaktadır. Kontrol grubuna göre en anlamlı sonuç 72. saatin sonunda oksidatif stresi 2,04 kat artıran Eksolimer + TMZ 800ng/ml grubunda bulundu.

Hem nöronlar üzerindeki hem de T98-G üzerindeki etkinliği göz önünde bulundurulunca ilacın eksolimer ile enkapsüle olması öngörüldüğü gibi birçok avantajı birlikte sunmuştur. Ayrı ayrı birçok dezavantaja sahip bu iki sistem bir araya gelerek birbirlerinin gücünü artırmış ve böylece ilacın etkinliği de buna paralel olarak artmıştır.



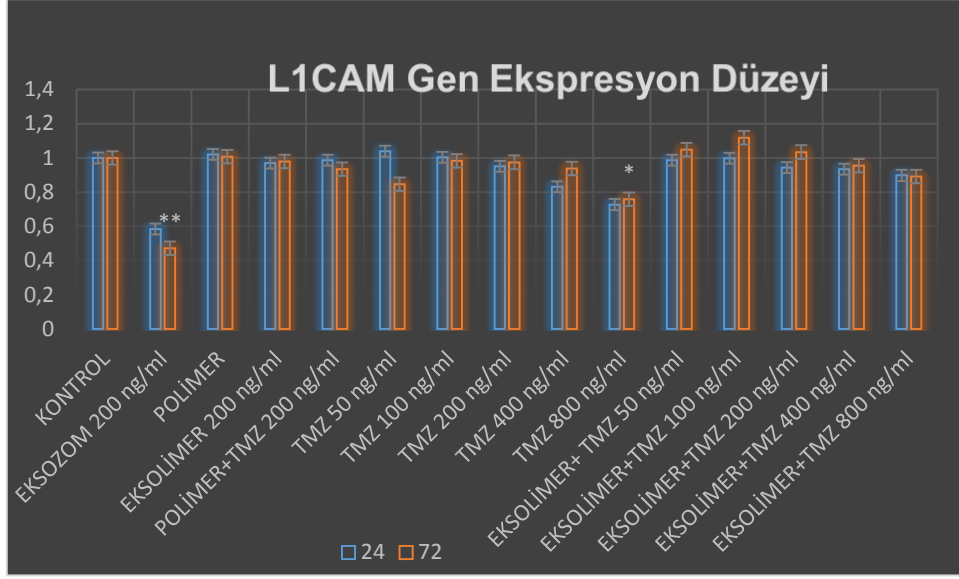
Şekil 4.39. Kontrol ve Eksolimer+TMZ grubuna ait TOS testi sonuçları. Şekildeki veriler kontrol grubu ile kıyasla mmolH₂O₂Eq/L cinsinden değerler olarak ifade edilmiştir. * p<0,05 değerler önemli, ** p<0,01 değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir

4.3.6. Real Time PCR Analiz

4.3.6.1. L1CAM Gen Ekspresyonu

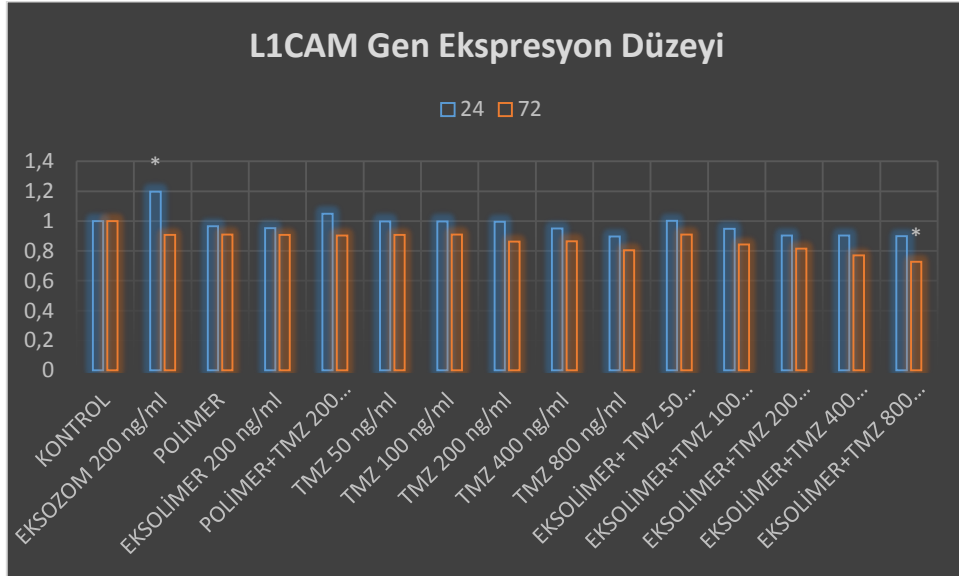
B2cam olarak da bilinen L1, L1CAM geni tarafından kodlanan L1 protein ailesinin bir transmembran protein üyesidir. Bu protein, hücre göçü, yapışma, nörit büyümesi, miyelinasyon ve nöronal farklılaşmada güçlü bir etkisi olan bir nöronal hücre yapışma molekülüdür.

Nöron hücreleri üzerinde gerçekleştirilen Real-Time PCR sonucuna göre eksozomların her iki saatte de gen regülasyonu Şekil 4.40'ta verildi. Eksozoma 200 ng/ml grubuna ait veriler $0,47 \pm 0,12$ olarak bulundu ve çok anlamlı olduğu tespit edildi. Bunun dışında TMZ 800 ng/ml grubunda da 24 saatin sonucu $0,72 \pm 0,031$ ve $0,75 \pm 0,08$ olduğu tespit edildi. Gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen verilerin kontrolle kıyaslandığında istatistiki olarak çok anlamlı ($p < 0,01$) oldukları kaydedildi (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

Nöron hücrelerinin aksine T98-G grubunda Eksozom 200 ng/ml’de $1,19\pm0,075$ olarak bulundu. Bunun dışında Eksozom+TMZ 800 ng/ml grubunda $0,89\pm0,009$ ve $0,72\pm0,016$ olarak bulundu. Elde edilen bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$, $p<0,01$).

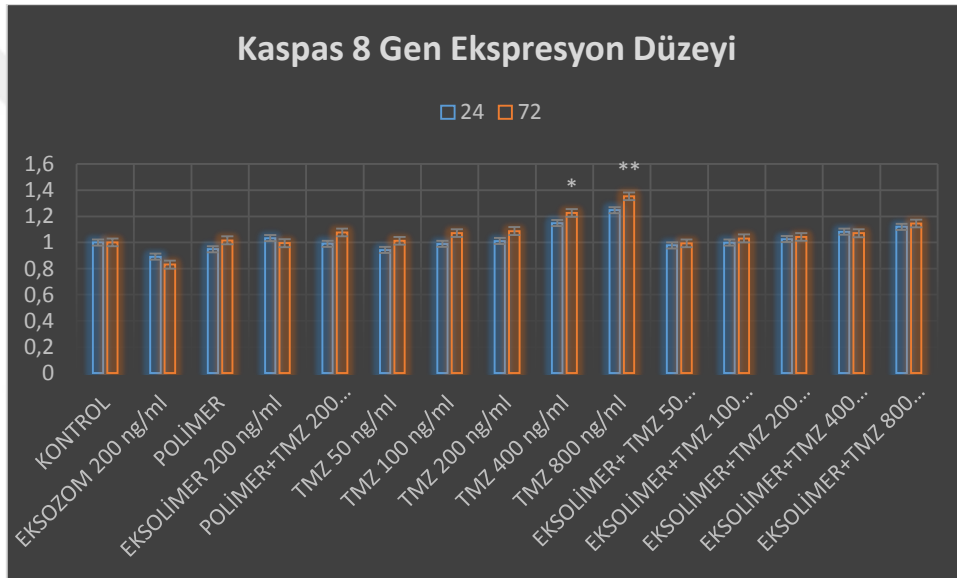


Şekil 4.41. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

4.3.6.2. Kaspas 8 Gen Ekspresyonu

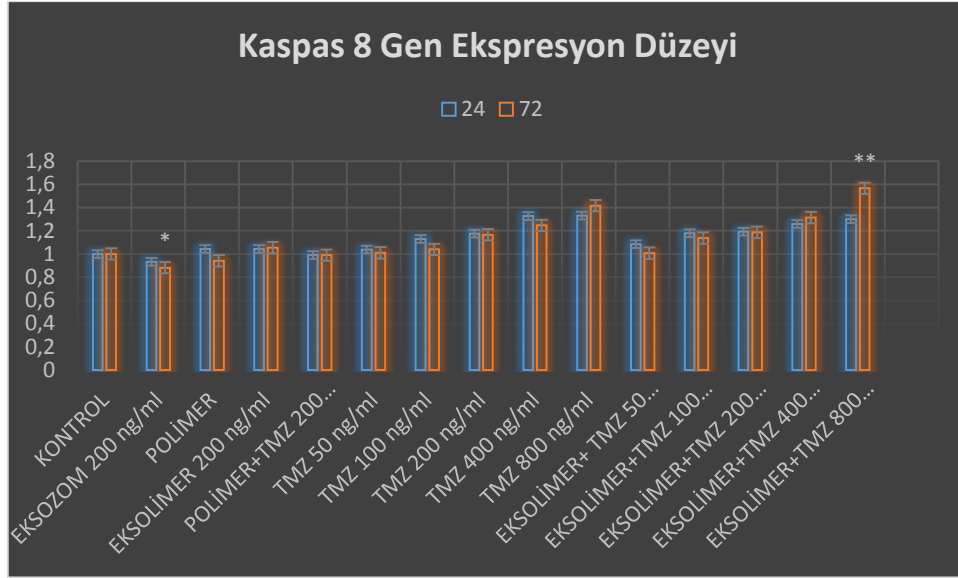
Apoptoz üzerine yapılan çalışmalar, bunu moleküler yollar tarafından kontrol edilen “programlanmış” bir hücre ölümü olarak tanımlamışlardır. Kaspaz-8, dışsal apoptozu başlatıcı kaspazıdır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre nöron hücrelerinde TMZ 800 ng/ml grubunda Kaspas 8 gen regülasyonu en yüksek seviyede gözlemlendi. 24 saat sonunda $1,24 \pm 0,07$ olarak bulunurken 72 saat sonunda $1,35 \pm 0,033$ olarak bulundu. Elde edilen bu veriler istatistiksel olarak çok anlamlıdır ($p < 0,05$, $p < 0,01$)



Şekil 4.42. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p < 0,05$ değerler önemli, ** $p < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

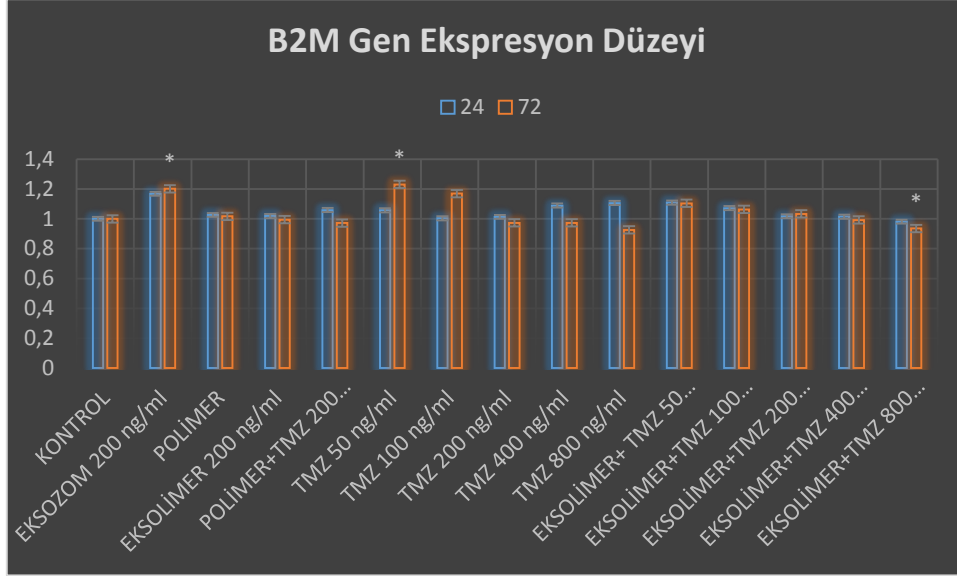
Nöron hücrelerinin aksine T98-G hücre hattında en yüksek ekspresyon Eksolimer+TMZ 800 ng/ml grubunda gözlemlendi. 24 saat sonunda $1,30 \pm 0,013$ 'ken 72 saatte biraz daha artış göstererek $1,56 \pm 0,064$ olarak gözlemlendi sonuçlar çok anlamlı olarak bulundu. Bu değerlere en yakın değer TMZ 800 ng/ml grubunda görüldü ($1,41 \pm 0,012$) ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p < 0,05$ değerler önemli, ** $p < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

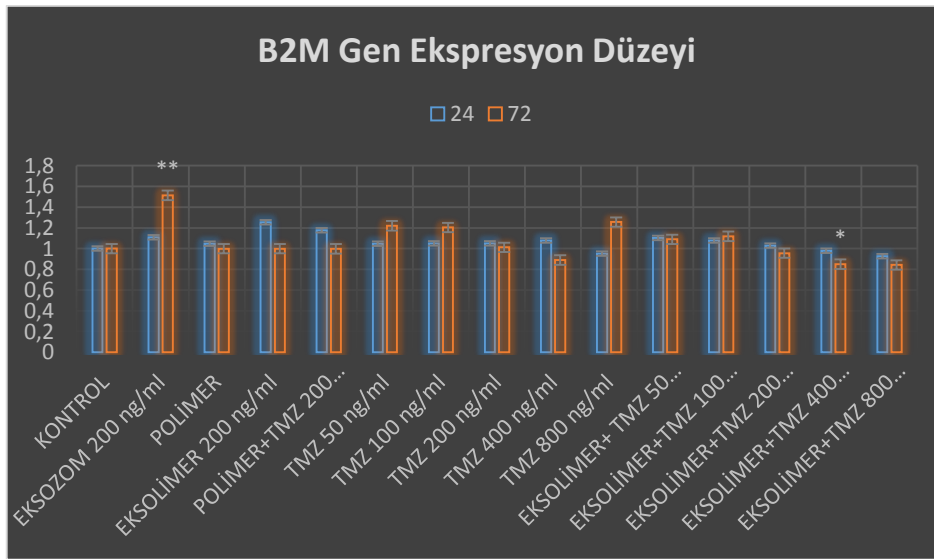
4.3.6.3. B2M Gen Ekspresyonu

B2M gen düzeyinin aşırı ekspresyonu, insan gliomalarında malignite ile ilişkilidir. Nöron hücrelerinde yaptığımız RT-PCR'da elde ettiğimiz sonuçlara göre Eksozom 200ng/ml grubunda B2M gen düzeyinde artış gözlemlendi. 24 saatin sonunda bu grupta B2M düzeyi kontrole kıyasla $1,16 \pm 0,071$ olarak bulunurken 72 saat sonunda $1,2 \pm 0,011$ olarak gözlemlendi (Şekil 4.44). Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kanser hücrelerinde eksozom aracılı metastaz yayılımı son dönemde yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır. Elde ettiğimiz bu sonuçlarda bize eksozomun nörotoksik etkinliği olduğunu yanı sıra kanser belirteçlerininide taşıdığını gösterdi.



Şekil 4.44. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

Eksozomlar hücreler arası iletişimde oldukça önemli role sahiptirler. Özellikle kanser hücrelerinin metastazı ve anjiyogenez süreçlerinde aktif rol aldıkları düşünülmektedir. T98-G hücrelerinde B2M düzeyi nöron hücresine benzer şekilde Eksozom 200 ng/ml grubunda oldukça yüksek seyretmektedir (Şekil 4.45). 24 saat sonunda $1,11\pm0,06$ olarak gözlemlenirken 72 saat sonunda $1,51\pm0,0320$ olarak tespit edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$ ve $p<0,01$).



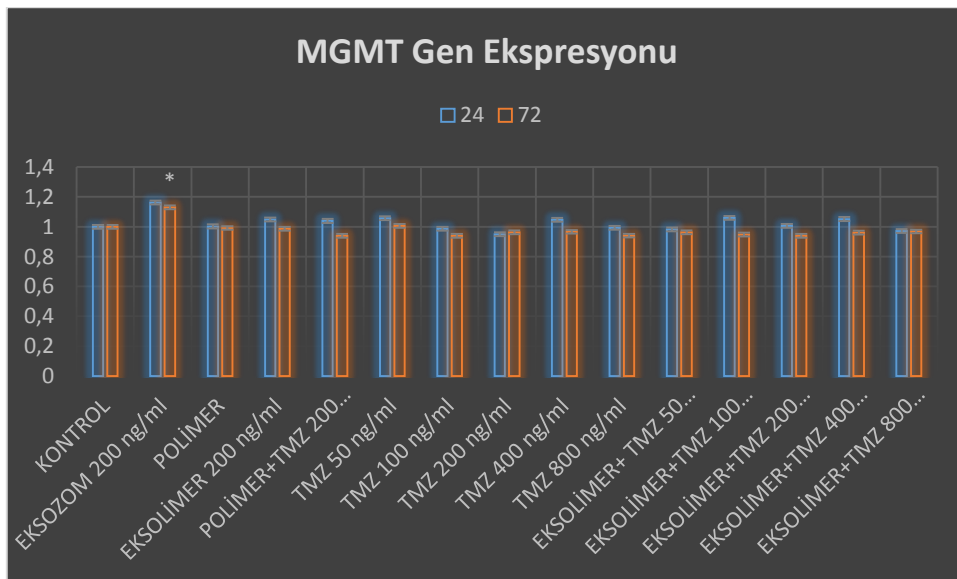
Şekil 4.45. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p<0,05$ değerler önemli, ** $p<0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

4.3.6.4. MGMT Gen Ekspresyonu

MGMT geni kemoterapotiklere karşı direnç mekanizmasında rol alan önemli bir gendir. Nöron hücrelerinde MGMT geninin varlığı araştırılan çalışmalarda negatif olduğu bulundu.

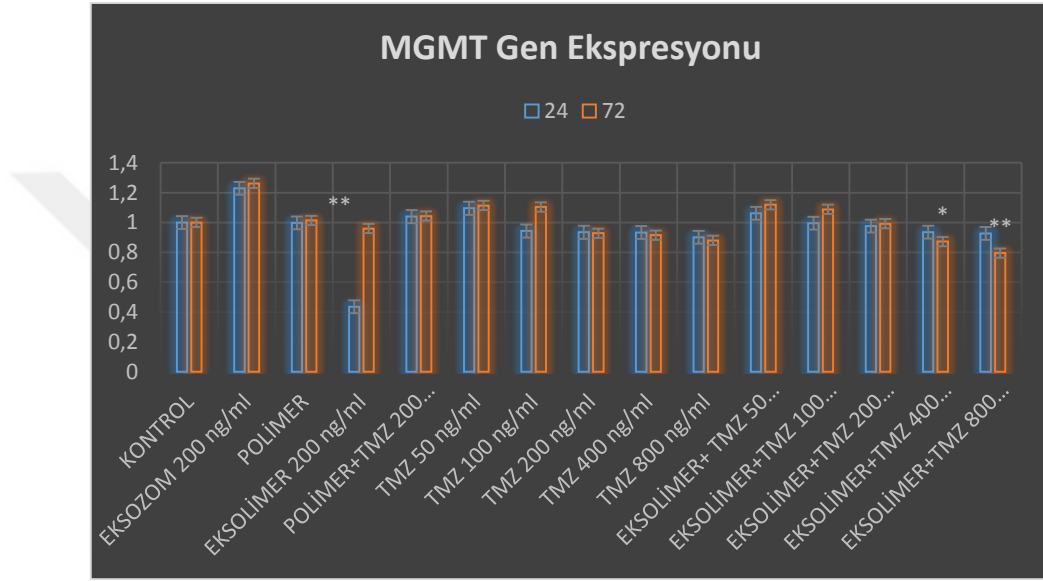
MGMT geni RT-PCR sonuçlarımıza göre neredeyse tüm gruplarda anlamlı bir sonuç çıkmadı (Eksozom 200 ng/ml hariç). Nöronlara dışarıdan uyguladığımız Eksozom tıpkı GBM kanseri varmış gibi davrandı. Elde edilen veiller 24 saat sonunda $1,16 \pm 0,018$ olarak bulunmuşken 72 saat sonunda bu değer $1,13 \pm 0,023$ olmuştur. Eksolimerin yapısı eksozomdan oluşmaktadır. Bu nedenle eksolimerin uygulanan gruplarda bu değer düşmüş olması ancak ilacımızın etkili olacağını gösterecektir. Aksi durum ilacımızın gücü diğer testlerde ne kadar kanıtlanırsa da kendi içerisindeki direnç geni ile ilacın etkin gücünü yok sayacaktır.

İlginç bir şekilde yaptığımız analiz sonucunda MGMT ekspresyonu neredeyse Eksolimer grubunda ($1,04 \pm 0,083$ ve $0,98 \pm 0,069$) kontrol ile benzer olarak bulundu. Benzer şekilde Eksolimer+ TMZ grubu tüm konsantrasyonlarında da kontrole göre anlamlı bir farklılık bulunmadı.



Şekil 4.46. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p < 0,05$ değerler önemli, ** $p < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

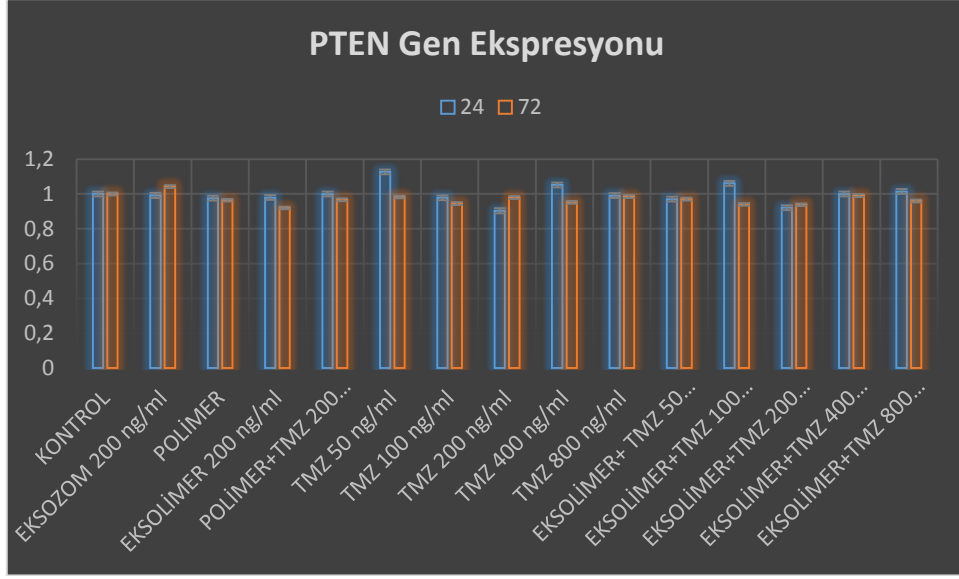
T98-G hücrelerinden elde edilen veillerde MGMT gen ekspresyonu en fazla Eksozom 200 ng/ml olduğu gözlemlendi. 24 saat sonunda kontrol grubuna kıyasla $1,22 \pm 0,098$ iken 72 saat sonunda $1,26 \pm 0,017$ olarak bulundu. Buna karşın Eksolimer+TMZ grubunda düşük doza doğru giderek CT değeri azalmaya başladı. En fazla düşüş Eksolimer 800 ng/ml’de 24 saat sonunda $0,92 \pm 0,063$ ve $0,79 \pm 0,05$ olarak bulundu.



Şekil 4.47. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p < 0,05$ değerler önemli, ** $p < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

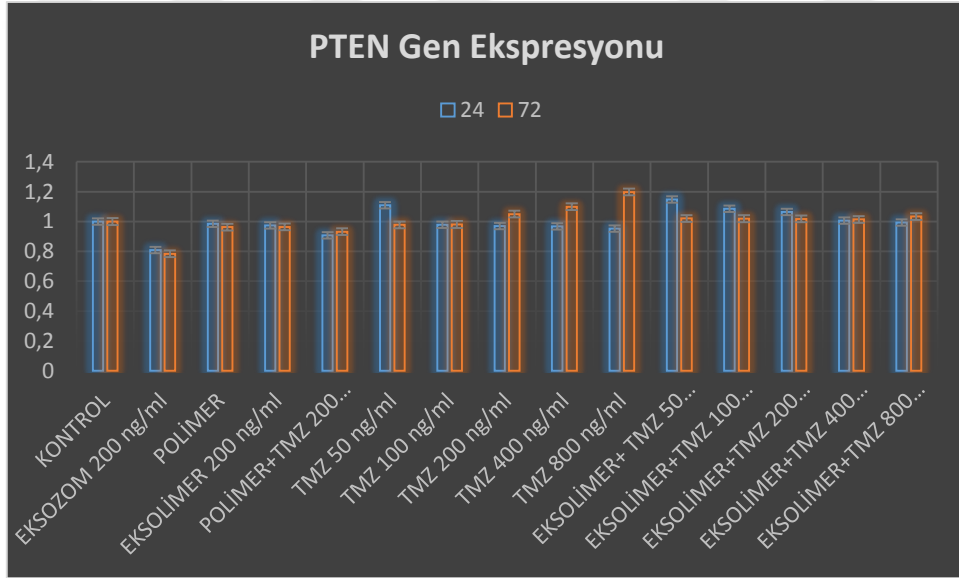
4.3.6.5. PTEN Gen Ekspresyonu

Nöron hücrelerinde yapılan RT-PCR analizine göre tüm gruplar içerisinde anlamlı bir sonuç gözlemlenmedi.



Şekil 4.48. Nöron hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* p<0,05 değerler önemli, ** p<0,01 değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

T98-G hücrelerinde ise sadece Eksozom 200 ng/ml grubunda $0,8 \pm 0,095$ ve $0,78 \pm 0,0406$ olarak görülmüştür (Şekil 4.49). Sadece eksozom grubunda p<0,05 olarak bulunmuş olup, diğer gruplar arasında anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (p>0,05).

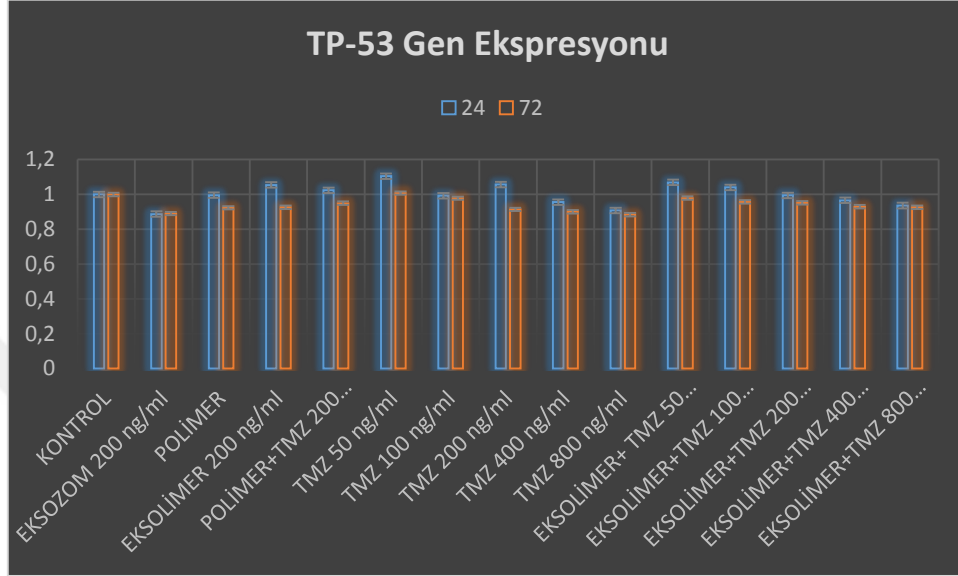


Şekil 4.49. T98-G hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* p<0,05 değerler önemli, ** p<0,01 değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

4.3.6.6. TP-53 Gen Ekspresyonu

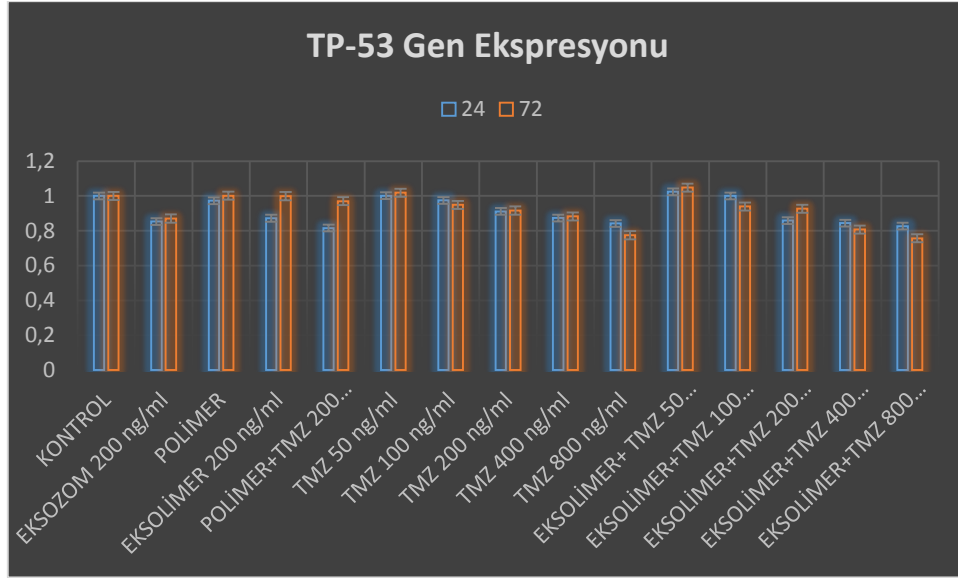
TP-53 (tümör önleyici p53 olarakta bilinmektedir) hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve birçok organizmada kanseri baskılamada görev alan çok

önemli bir proteindir. Nöron hücrelerinde RT-PCR sonuçlarımıza göre eksozom uygulana grupta yine bu genin ekspresyonunda düşüş gözlemlendi. 24 saat sonunda $0,88 \pm 0,0072$ olarak, 72 saat sonunda ise $0,89 \pm 0,025$ olarak gözlemlendi. Eksozomlar tıpkı kanser gibi nöron hücresinde tümör süpresyonunu baskılamış ve nöronal hasar meydana getirmiştir.



Şekil 4.50. Nöron Hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p < 0,05$ değerler önemli, ** $p < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

P53 geni tumor supresyon genidir. Glioblastoma kanserinden elde edilen veriler 4.51’de gösterildi. Verilerimize baktığımızda P53 gen ekspresyonu Eksozom grubunda düştüğü diğer kontrol gruplarında ise negatif kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gözükmemektedir. Tedavi gruplarımızda ise doza bağımlı olarak ekspresiyon seviyesi artmaktadır.



Şekil 4.51. T98 hücrelerine ait real time PCR testi sonuçları. (* $p < 0,05$ değerler önemli, ** $p < 0,01$ değerleri çok önemli olarak işaretlenmiştir.)

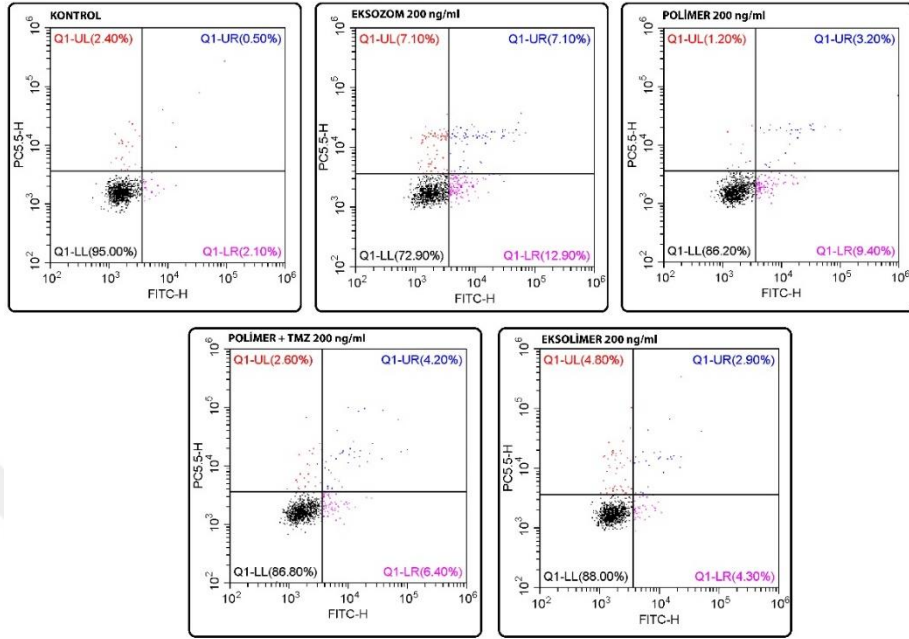
4.3.7. Flow Stometri Sonuçları

4.3.7.1. Nöron Hücrelerine Ait Flow Stometri Sonuçları

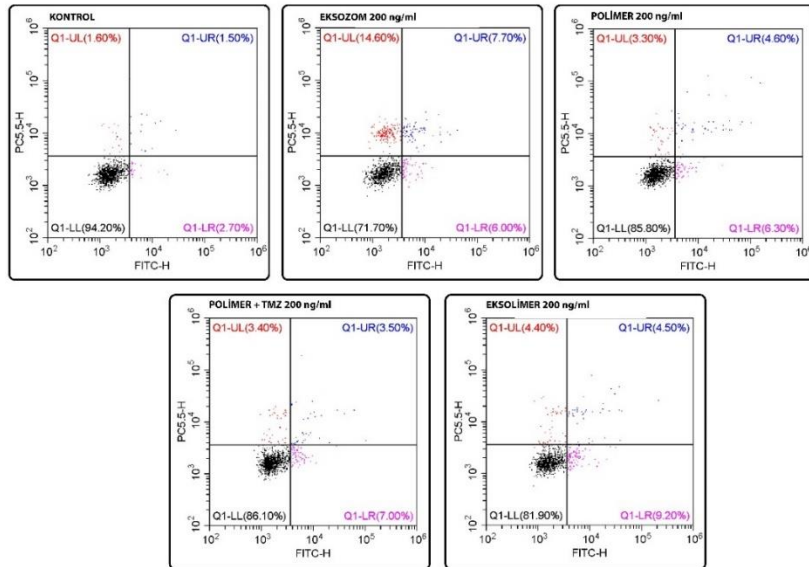
Nöron hücre hattında hem kontrol grupları hem de TMZ ve Eksolimer+TMZ grubuna ait 24 ve 72 saat sonunda hücre ölümünün hangi şekilde olduğuna dair etkileri, anneksin FITC flow sitometri analizi ile ortaya koyuldu.

24 saat sonunda nöron hücre hattına ait flow sitometri bulguları grafiği Şekil 4.52-4.57’de verildi. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun hücre canlılığı oranı $95,00 \pm 0,12$ olarak tespit edildi. Kontrol grubundan erken apoptoz seviyesi $2,10 \pm 0,15$ olurken, geç apoptotik hücre seviyesi $0,50 \pm 0,23$ oldu. Kontrol grubunda nekrotik hücre yüzdesi ise $2,40 \pm 0,21$ olarak kaydedildi. 72 saat sonunda ise bu değerler sırasıyla $94,20 \pm 0,33$, $2,70 \pm 0,19$, $1,50 \pm 0,053$ ve $1,60 \pm 0,41$ olarak gözlemlendi. Pozitif gruplarda (Polimer, Eksolimer ve Polimer+TMZ) ise kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Fakat Eksozom grubunda canlılık oranı 24 saat sonunda $88,00 \pm 0,29$ ’a gerilerken 72. saat sonunda $71,70 \pm 13$ olarak gözlemlendi. Erken apoptoz seviyesi sırasıyla; $12,90 \pm 0,08$ ve $6,00 \pm 0,12$ bulunurken,

geç apoptoz seviyesi $7,10 \pm 0,12$ ve $7,70 \pm 0,71$ olduğu bulundu. Eksozom grubunda nekrotik hücre yüzdesi $7,10 \pm 0,54$ ve $14,60 \pm 0,31$ olarak gözlemlendi.

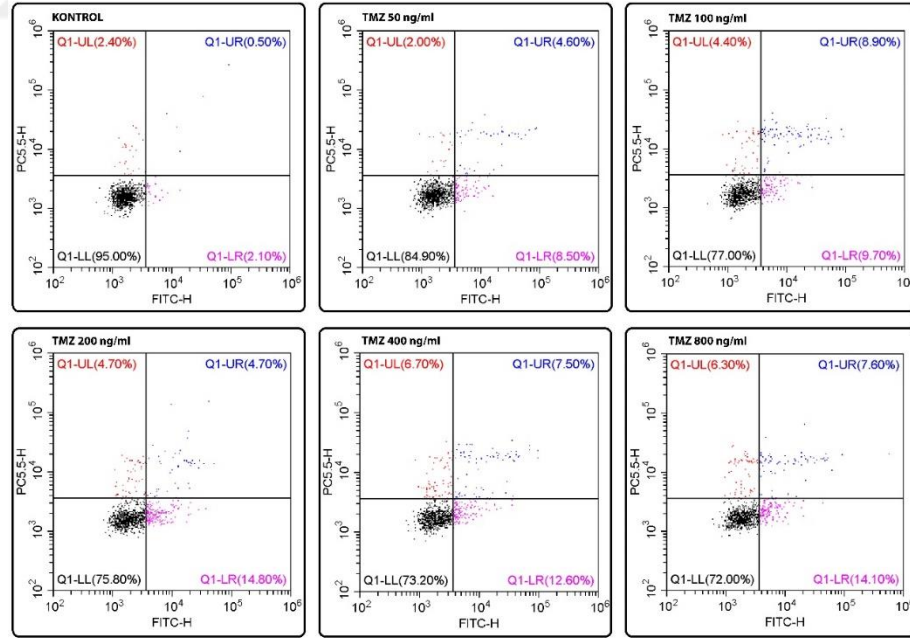


Şekil 4.52. 24 Saat sonrası Nöron hücrelerine ait kontrol gruplarının flow sitometri analizi. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

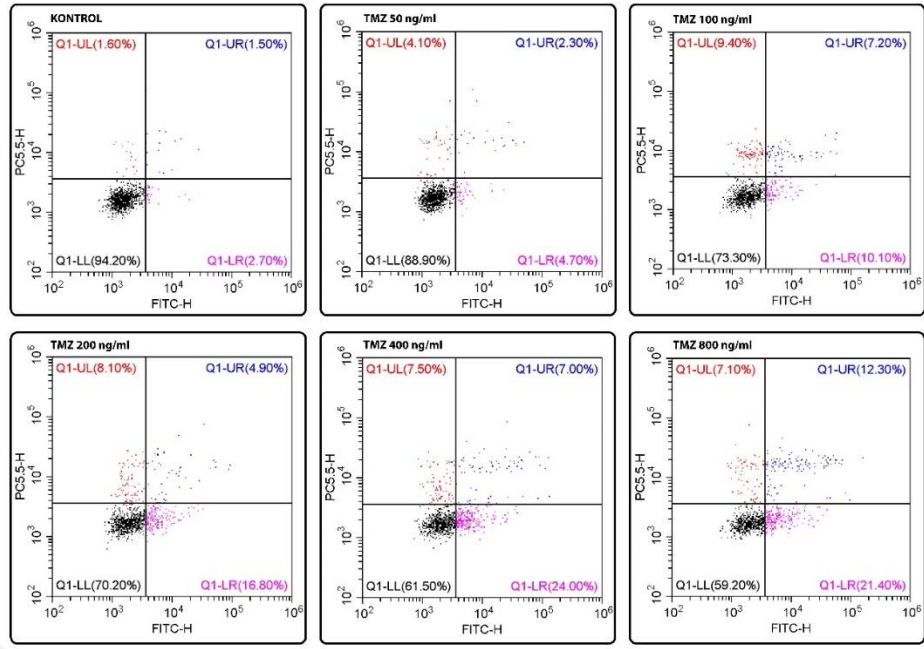


Şekil 4.53. 72 saat sonrası Nöron hücrelerine ait kontrol gruplarının flow sitometri analizi. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

TMZ grubunda 24 ve 72 saat sonrasında nöron hücrelerinde canlılık değişimi Şekil.4.54 ve Şekil 4.55’de verildi. 24 saat sonrasında canlılık oranı TMZ 50 ng/ml grubunda $84,90 \pm 0,06$, 100 ng/ml grubunda $77,00 \pm 0,15$, 200 ng/ml grubunda $75,80 \pm 0,32$, 400 ng/ml grubunda $73,20 \pm 0,01$ olarak bulundu. 72 saat sonunda ise bu değerler daha da düştü. 50 ng/ml grubunda bu değer $88,90 \pm 0,07$, 100 ng/ml grubunda $73,30 \pm 0,45$ 200 ng/ml grubunda $70,20 \pm 0,31$, 400 ng/ml grubunda $61,50 \pm 43$ olarak gözlemlendi. Canlılık oranı en fazla TMZ 800 ng/ml grubunda düştü ve canlılık oranı 24 ve 72 saate göre sırasıyla $72,00 \pm 0,50$ ve $59,20 \pm 0,45$ olarak tespit edildi. Elde edilen veriler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p \leq 0,05$). Buna ek olarak 24 ve 72 saat sırasıyla TMZ 800 ng/ml erken apoptoz seviyesi $14,10 \pm 0,17$ ve $21,40 \pm 0,65$ olurken, geç apoptotik hücre seviyesi $7,60 \pm 0,53$ ve $12,30 \pm 0,21$ olarak bulundu. TMZ 800 ng/ml grubunda nekrotik hücre yüzdesi ise $6,30 \pm 0,43$ ve $7,10 \pm 0,33$ olarak kaydedildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($p < 0,01$).

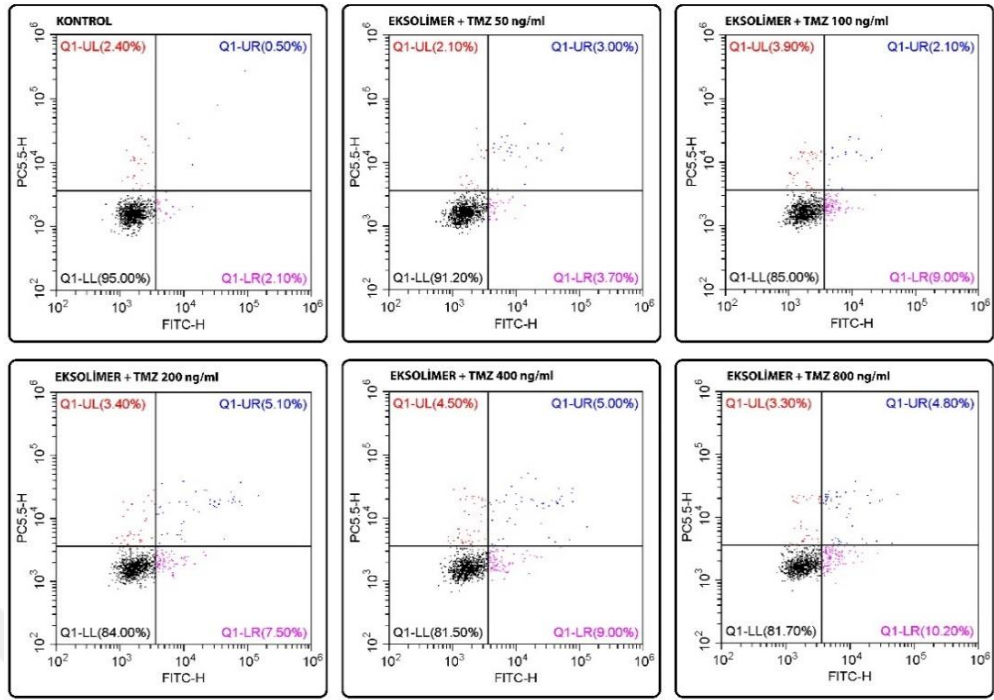


Şekil 4.54. 24 saat sonrası Nöron hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

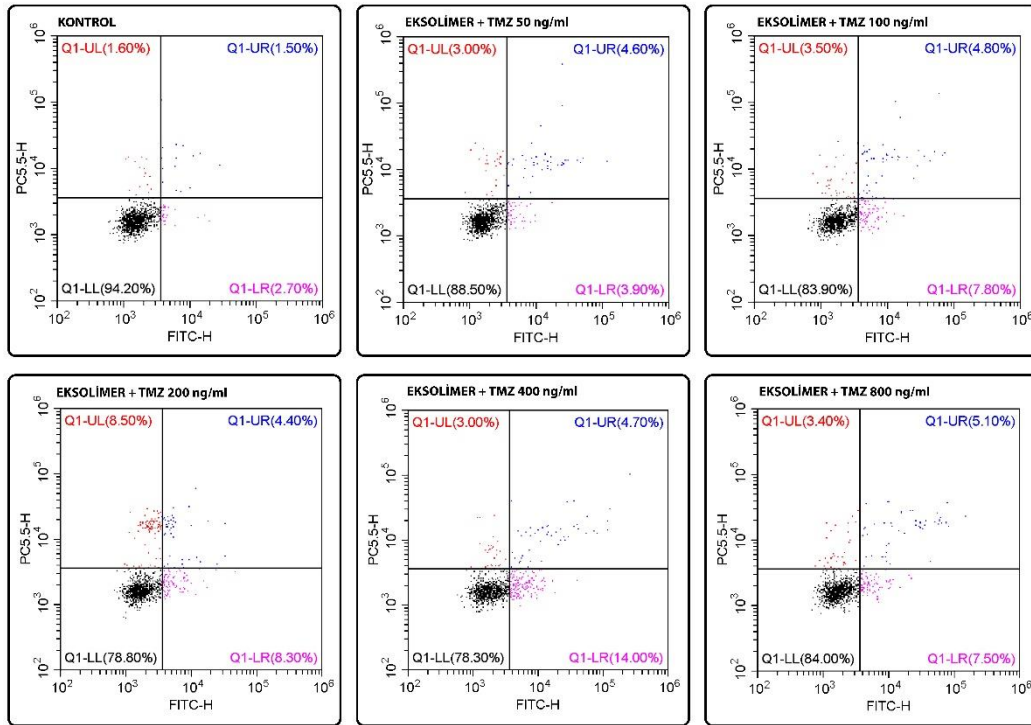


Şekil 4.55. 72 saat sonrası Nöron hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

Nöron hücrelerinde Eksolimer+TMZ grubunda doza bağlı olarak canlılık oranı her ne kadar düşse de istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmedi. Kontrol grubunda hücre canlılığı oranı $95,00 \pm 0,12$ olarak tespit edilmişken, Eksolimer+TMZ 800 grubunda bu değer 24 saat sonunda $81,70 \pm 0,63$ ve 72 saat sonunda $84,00$ olarak bulunmuştur. Erken apoptoz seviyesi $10,20 \pm 0,15$ ve $7,50 \pm 0,42$ olurken, geç apoptotik hücre seviyesi $4,80 \pm 0,23$ ve $5,10 \pm 0,42$ olmuştur. Eksolimer+TMZ 800 ng/ml grubunda nekrotik hücre yüzdesi ise $3,30 \pm 0,21$ ve $3,40 \pm 0,08$ olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.56. 24 saat sonrası Nöron hücre hattına ait farklı dozlardaki Eksolimer+TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

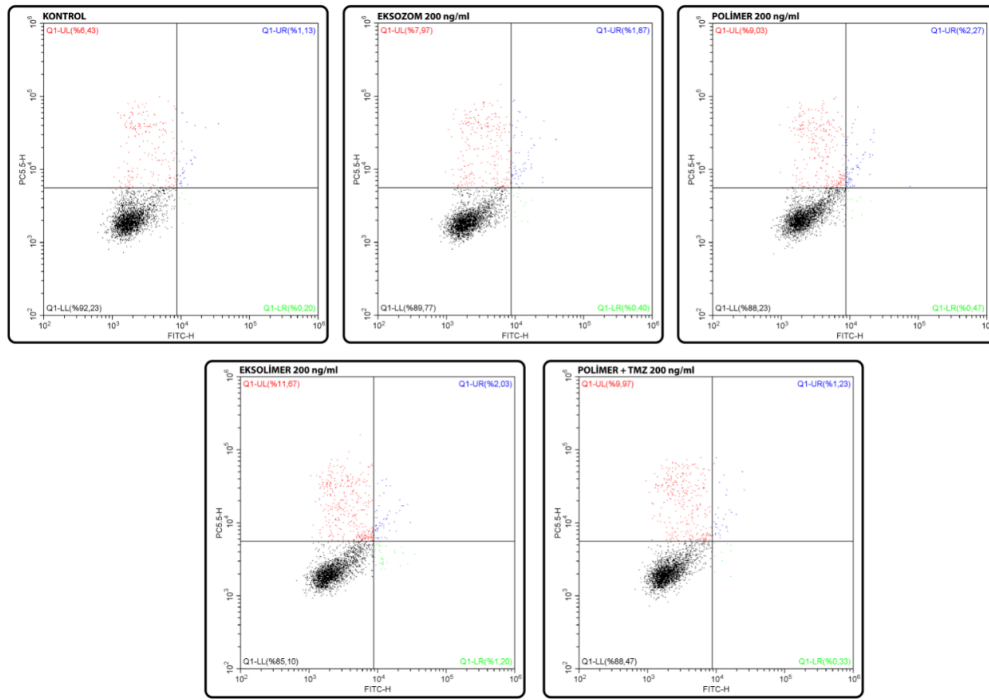


Şekil 4.57. 72 saat sonrası Nöron hücre hattına ait farklı dozlardaki Eksolimer+TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

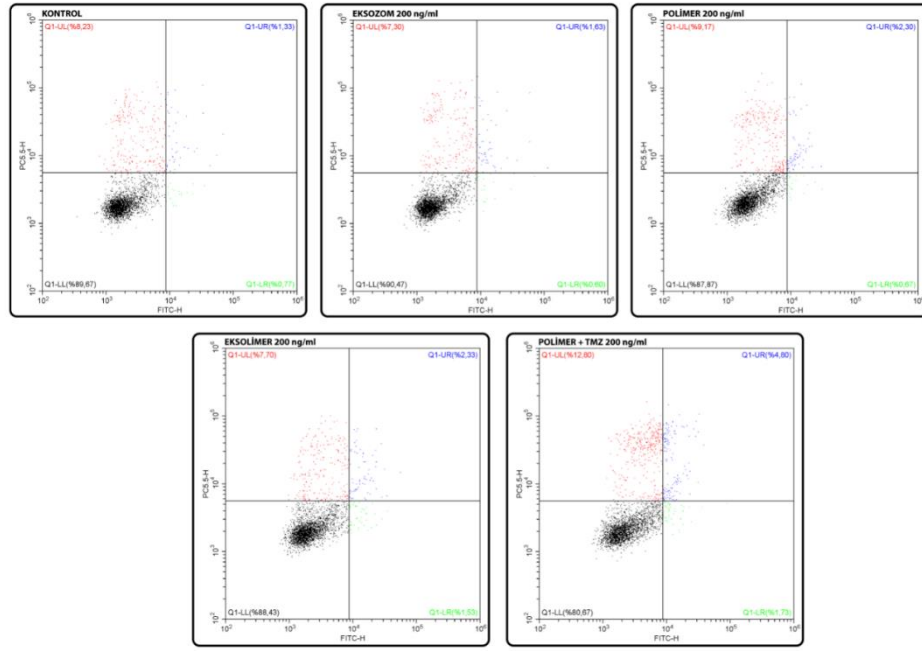
4.3.7.2. T98-G Hücrelerine Ait Flow Sitometri Sonuçları

T98-G hücre hattında hem kontrol grupları hem de TMZ ve Eksolimer+TMZ grubuna ait 24 ve 72 saat sonunda hücre ölümünün hangi şekilde olduğuna dair etkileri, anneksin FITC flow sitometri analizi ile ortaya koyulmuştur.

24 saat sonunda T98-G hücre hattına ait flow sitometri bulguları grafiği Şekil 4.58-63'te verildi. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun hücre canlılığı oranı $92,23 \pm 0,52$ olarak tespit edildi. Kontrol grubundan erken apoptoz seviyesi $0,20 \pm 0,015$ olurken, geç apoptotik hücre seviyesi $1,13 \pm 0,23$ olmuştur. Kontrol grubunda nekrotik hücre yüzdesi ise $6,43 \pm 0,14$ olarak kaydedildi. 72 saat sonunda ise bu değerler sırasıyla $89,67 \pm 0,12$, $0,77 \pm 0,21$, $1,13 \pm 0,003$ ve $7,97 \pm 0,41$ olarak gözlemlendi. Pozitif gruplarda (Eksozom, Polimer, Eksolimer ve Polimer+TMZ) ise kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

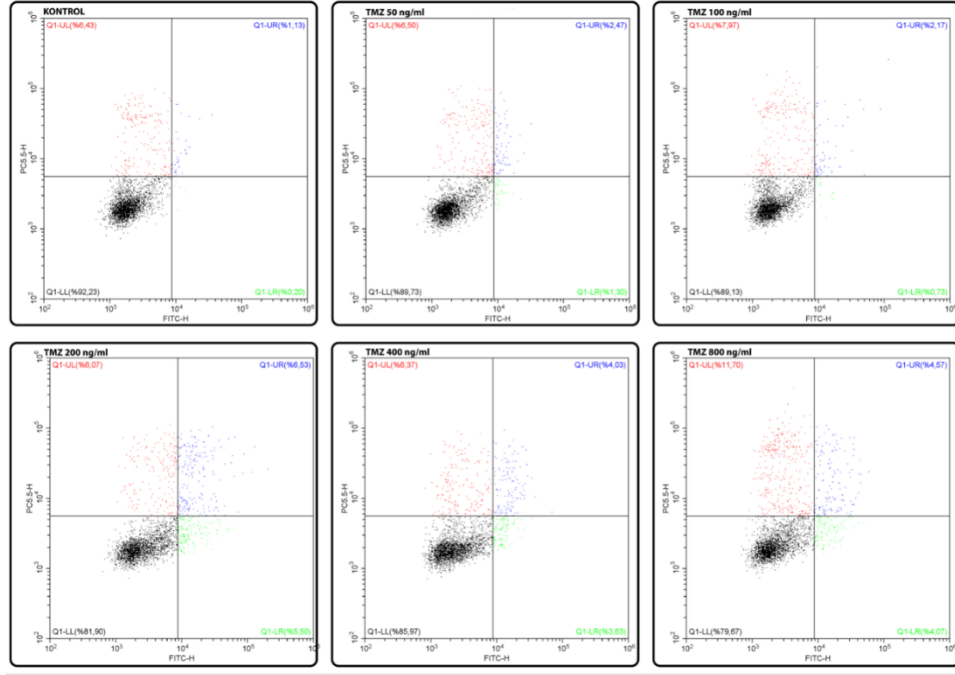


Şekil 4.58. 24 saat sonrası T98-G hücre hattına ait kontrol gruplarının flow sitometri analizi. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

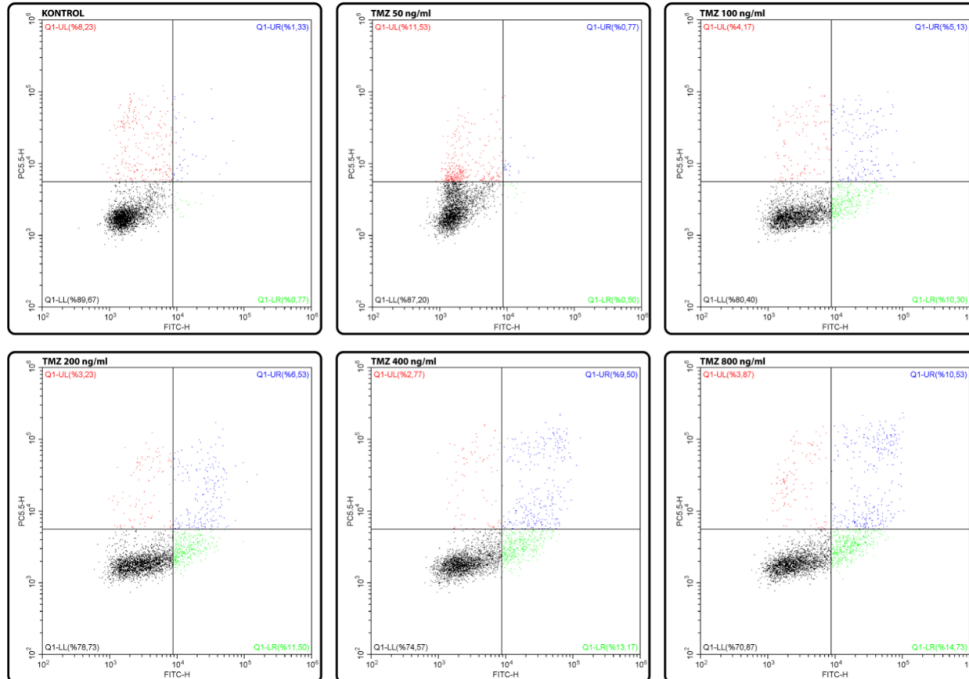


Şekil 4.59. 72 saat sonrası T98-G hücre hattına ait kontrol gruplarının flow sitometri analizi. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

TMZ grubunda düşük dozlarda anlamlı sonuç bulunmadı (Şekil.4.60-4,61). Yalnızca yüksek (400 ve 800 ng/ml) konsantrasyonlarında anlamlı sonuçlar elde edildi. Bu bağlamda 24 saat uygulama sonunda TMZ 400 ng/ml’de hücre canlılığı $85,97 \pm 0,95$ seviyesinde belirlendi, 72 saat sonunda ise $74,57 \pm 0,37$ olarak bulundu. Canlılık oranı en fazla TMZ 800 ng/ml grubunda düştü ve canlılık oranı 24 ve 72 saate göre sırasıyla $79,67 \pm 0,23$ ve $74,57 \pm 1,11$ olarak tespit edildi. Elde edilen veriler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p \leq 0,05$). Buna ek olarak 24 ve 72 saat sırasıyla TMZ 800 ng/ml erken apoptoz seviyesi $4,07 \pm 0,16$ ve $14,73 \pm 0,45$ olurken, geç apoptotik hücre seviyesi $4,57 \pm 0,013$ ve $10,53 \pm 0,21$ olarak bulundu. TMZ 800 ng/ml grubunda nekrotik hücre yüzdesi ise $11,70 \pm 0,43$ ve $3,87$ olarak kaydedildi.



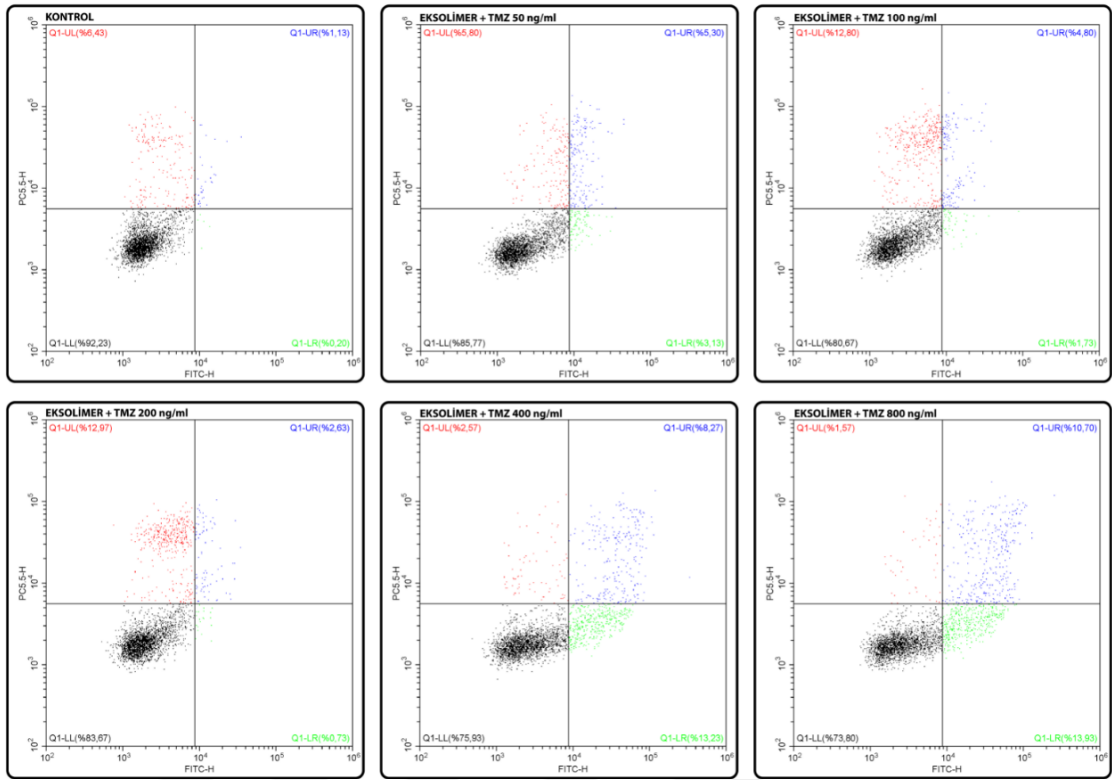
Şekil 4.60. 24 saat sonrası T98-G hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.



Şekil 4.61. 72 saat sonrası T98-G hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

Eksolimer+TMZ 50 ng/ml uygulama dozunda 24 ve 72 saatlerde hücre canlılığı sırasıyla %85,77±0,31 ve 84,77±0,95 seviyesinde belirlendi. Hücre canlılık seviyesi 100 ng/ml dozunda %80,67±0,98 ve 70,30±0,37 olurken, 200 ng/ml dozunda ise %83,67±0,81 ve 69,87±0,64 oldu. Yüksek dozlarda canlılık oldukça düşmüştür. Buna kapsamda 400 ng/ml dozunda hücre canlılık seviyesi 24 saatte %75,93±0,08 iken bu değer 72 saat sonunda 55,50±0,23 olarak tespit edildi. En yüksek konsantrasyon olan 800 ng/ml dozunda bu rakam %73,80±0,42 ve 53,53±1,11 olmuştur. Eksozom ile enkapsüle olmuş TMZ ilacımız kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan çok anlamlı ($p \leq 0,01$) olarak tespit edildi.

Eksolimer+TMZ 50 ng/ml uygulama dozunda erken apoptotik hücre oranı 24 ve 72 saatlerde sırasıyla %3,13±0,12 ve 3,70±0,76 seviyesinde belirlendi. Erken apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 100 ng/ml dozunda %1,73±0,82 ve %18,87 ±0,73 200 ng/ml dozunda ise %0,73±0,42 ve %14,0±0,17 olmuştur. 400 µg/ml dozunda erken apoptotik hücre seviyesi %13,23±0,28 ve %33,03±0,26 olarak tespit edilirken, en yüksek konsantrasyonda (800 ng/ml) dozunda bu rakam %13,93±0,53 35,13±0,18 oldu.

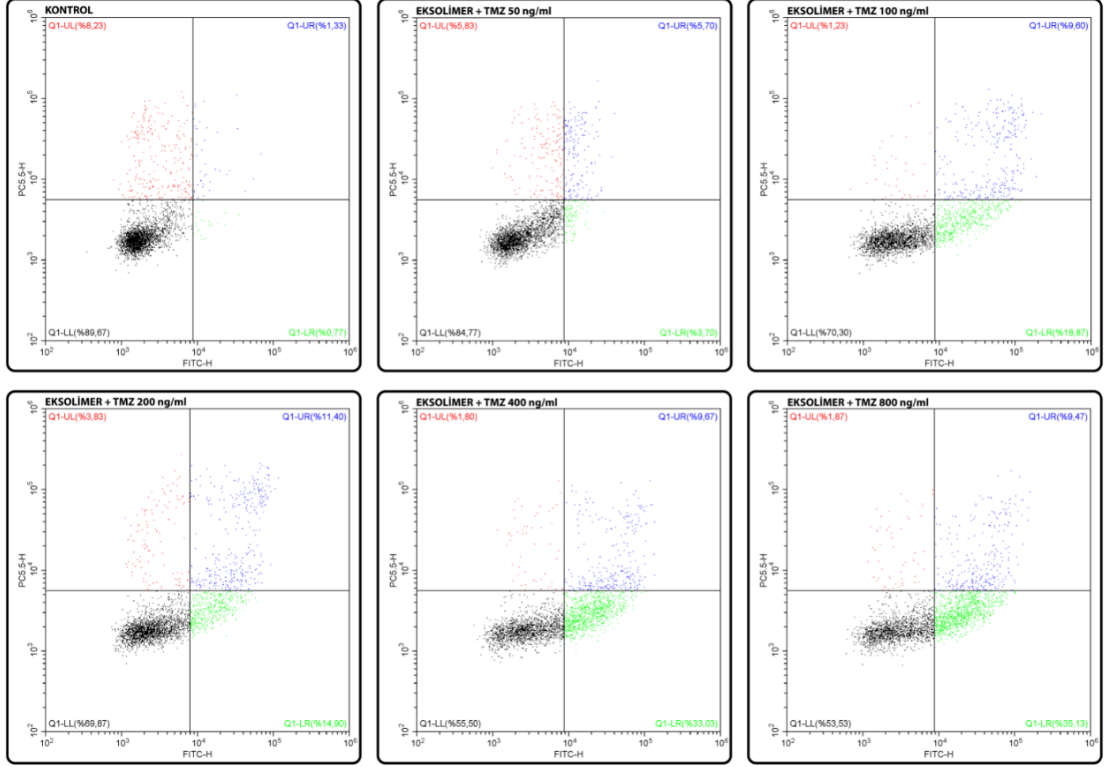


Şekil 4.62. 24 saat sonrası T98-G hücre hattına ait farklı dozlardaki Eksolimer+ TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

Eksolimer+TMZ 50 ng/ml uygulama dozunda geç apoptotik hücre oranı 24 ve 72 saatlerde $5,30 \pm 0,55$ ve $5,70 \pm 0,21$ seviyesinde belirlendi. Geç apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 100 nµg/ml dozunda $4,80 \pm 0,45$ ve $9,60 \pm 0,34$ olurken, 200 ng/ml dozunda ise $2,63 \pm 0,2$ ve $11,40 \pm 0,08$ oldu. Eksolimer+TMZ 400 ng/ml dozunda geç apoptotik hücre seviyesi $8,27 \pm 0,35$ ve $9,67 \pm 0,004$ olarak tespit edildi, 800 ng/ml dozunda bu rakam $10,70 \pm 0,37$ ve $9,47 \pm 0,31$ oldu. Bahsedilen geç apoptotik hücre oranı verilen uygulamaların tamamı kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan çok anlamlı ($p \leq 0,01$) olarak tespit edildi.

Eksolimer+TMZ 50 ng/ml uygulama dozunda nekrotik hücre oranı $5,80 \pm 0,51$ ve $5,83 \pm 1,26$ seviyesinde belirlendi. Nekroza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 100 ng/ml dozunda $12,80 \pm 0,08$ ve $1,23 \pm 0,91$ olurken, 200 ng/ml dozunda ise $12,97 \pm 0,66$ ve $3,83 \pm 0,12$ olmuştur. 400 ng/ml dozunda nekrotik hücre seviyesi $2,57 \pm 0,61$ ve

1,80±0,51 olarak tespit edilmişti. 800 ng/ml dozunda ise %1,57±0,32 ve %1,87±0,32 olduğu tespit edildi. Nekrotik hücre oranı bakımından elde edilen veriler kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar elde edilmediği görüldü.



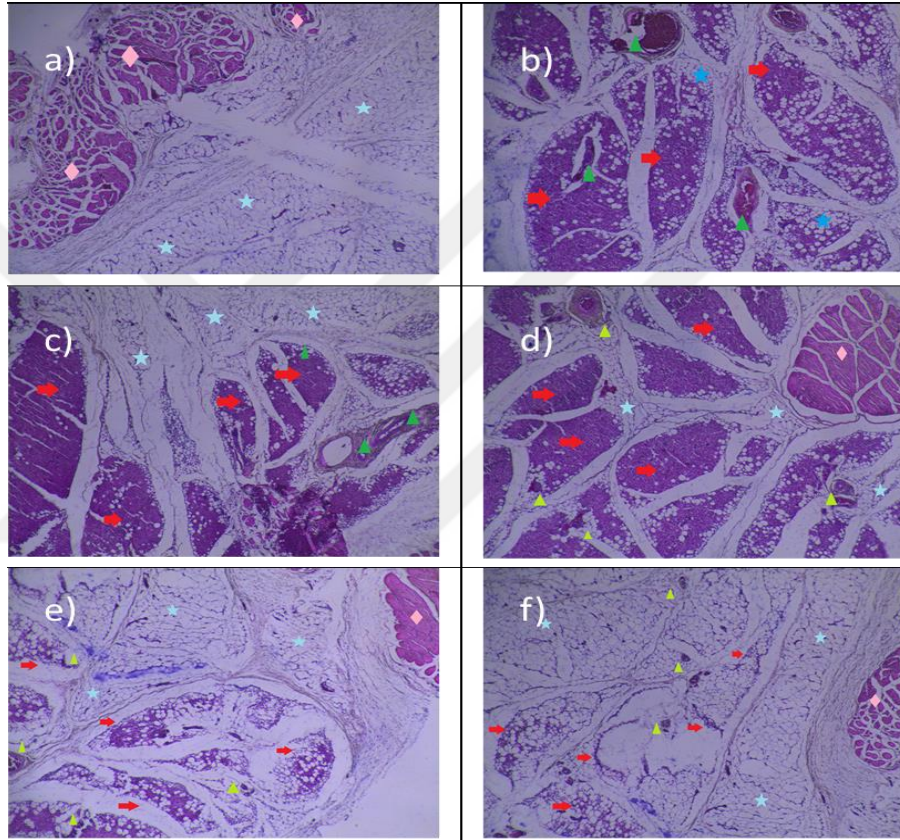
Şekil 4.63. 72 saat sonrası T98-G hücre hattına ait farklı dozlardaki TMZ gruplarının flow sitometri analizi sonuçları. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

4.4. *İn vivo* Çalışmalar

4.4.1. *İn vivo* Kanser Modelinin Histopatolojik İncelenmesi

In vivo rat glioblastoma kanser modeli oluşturulduktan sonra bir ay kanser hücresinin enjekte edilen bölgede büyütülmesi beklendi. Bir ay sonunda tedavi grupları oluşturulmuş (Kontrol, Kontrol, Polimer Kontrol, Eksolimer Kontrol, TMZ 200 µgr/kg ve TMZ + Eksolimer 200 µgr/kg olmak üzere) ve 15 gün boyunca ilaç uygulaması yapılmıştır. Tedavilerin sonucu Şekil 4.52’de gösterilmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında kontrol grubunda (sadece PBS verilen) herhangi bir kanser kitlesi görülmezken şam kontro gruplarında kanser yayılımı yağlı doku içerisinde net bir şekilde

gözükmemektedir. Polimer ve eksolimer uygulanan gruplarda kanser kitlesi üzerinde herhangi bir etki bulunmamıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. TMZ 200 $\mu\text{gr/kg}$ grubunda kanser kitlesinde azalma meydana gelmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$) fakat buna rağmen TMZ+ Eksolimer 200 $\mu\text{gr/kg}$ grubunda kanser kitlesi daha etkili şekilde küçülmüştür. Elde edilen sonuçlar çok anlamlı olarak bulunmuştur ($P<0,01$).



Şekil 4.64. *In vivo* rat glioblastoma modeline karşı kullanılan tedavilerin sonucu. a) Kontrol, b) Kanser Kontrol, c) Polimer Kontrol, d) Eksolimer Kontrol, e) TMZ 200 $\mu\text{gr/kg}$ ve F) TMZ + Eksolimer 200 $\mu\text{gr/kg}$. Kırmızı ok; kanser, yeşil üçgen; damar yapısı, mavi yıldız; yağ dokusu, pembe dörtgen; kas dokusu

5. TARTIŞMA

GBM kanserinden salınan eksozomlar, kansere karşı oluşan immun cevabın baskılanması, kanser yayılımı ve metastaz gibi birçok önemli görevde rol almaktadır. Bununla birlikte eksozomların hedefe yönelik kanser tedavilerinde önemli rol oynadığını gösteren çalışmaların sayısı hızla artmaktadır.^{99, 114, 115} Bu sebeple yeni çalışmalarda bu veziküllerin taşıyıcı olarak kullanımı önem kazanmıştır. Fakat eksozomların taşıma kapasitesinin düşük olması ve taşıdığı çeşitli bioaktif maddelerin eliminasyon zorluğu bu veziküllerin etkili şekilde kullanımını kısıtlamaktadır. Çalışmamızda bu vezikülleri yeni nanoteknolojik yöntemlerle birleştirerek eksolimer adı verdiğimiz yeni taşıyıcı molekülleri ürettik. Bu taşıyıcı nanokargoların anti kanser etkinliğini araştırmak amacıyla farklı aşamalarda elde edilen parçacıkların karakterizasyonunu yaptıktan sonra antikanser etkinlik bakımından değerlendirmek üzere *in vitro* ve *in vivo* olarak deneyler tasarladık. Çalışmamızın hedefi üretilen eksolimerlerin truva atı gibi kanser hücrelerini hedeflemektir. Böylece GBM klasik tedavisinde yaygın olarak kullanılan TMZ ilacının daha etkin bir şekilde kanser hücrelerine taşınmasını sağlayarak etki gücünü artırmayı planlamaktayız. Bu amaçla, deney sonunda sitotoksik analiz, oksidan ve antioksidan analiz, genetik ve histopatolojik deneyler ile enkapsüle olan ilacımızın etkinlik bakımından inceledik.

Eksozom taşıyıcı olarak kullanımı farklı çalışmalarda gösterilmiştir özellikle miRNA taşıyıcısı olarak kullanımıdır. Jianxing Yin ve ark.¹¹⁶ 2019 yılında yaptıkları çalışmada temozolomide karşı ilaç direncini azaltmak için eksozomları kullanmışlardır. Bu çalışmada TMZ'e dirençli glioblastoma hattından elde ettikleri eksozomlara yüklenerek kanser hücreleri transfekte edilmiştir. Elde ettikleri bulgular transfeksiyon sonucunda mir1238 miktarı hedef hücrelerde artarak TMZ ilacına karşı hassas duruma getirilmiştir. Elde edilen verilere sayesinde Eksozom taşıma sistemi efektif şekilde kanser

mikro çevresine ve kanser hücresine daha rahat nüfuz ettiği ispatlamıştır. ¹¹⁶ Bizim yaptığımız çalışmada farklı eksozomların saf hali yerine polimer ve eksozom karışımı kullanılmıştır. Bu sayede eksozomların içeriğinin boşaltılması sağlanarak taşıma kapasitesi artırılmıştır. Ayrıca elde edilen saf eksozom miktarının az olması elde edilen materyalin sınırlı olmasına neden olacaktı bundan dolayı polimer ile yeni oluşturulan enkapsülasyon ile daha fazla miktarda taşıyıcı maddesi elde edilesi sağlandı. Deneyimizde MTT sonuç grafiklerine bakıldığında saf TMZ etkisi Eksolimer-TMZ'e göre daha zayıf kalmaktadır. Bunun nedeni eksolimer ile taşınan TMZ'nin daha etkili şekilde hücreye taşınmasıdır. Buna ek olarak nöron kültüründe elde edilen sonuçlarda TMZ'nin oluşturduğu toksisitenin giderilmesi ile nöronların kemoterapotik ajanlara karşı korunması sağlanmıştır. İlacımızın kanser hedefli olması ve daha asidik pH'da salımının artış göstermesi, nöronların korunmasındaki temel mekanizma olduğunu düşünmekteyiz. PLGA pH'ya hasas bir polimer yapısında değildir ve pH değişiminden etkilenmeksizin ilaç salınımını gerçekleştirmektedir fakat eksolimer pH değişimine hasas olarak 5 ve 6 pH'da hızlı ve yüksek oranda salınımı gerçekleşmiştir. Bu sayede kanser sitoplasmasında gelişen asiditik ortam salım sürecinin başlamasına neden olmaktadır. ¹¹⁷ Nöron sitoplasmasının pH değeri 7 ye yakın olduğundan dolayı salım daha geç başlamakta ve daha yavaş bir şekilde uzun süren bir salım profili göstermektedir. ¹¹⁸ Yavaş salınan ilacın nöronlar tarafından tolere edilmesi daha kolay olacağından toksisite belirtileri daha uzun zamanda ortaya çıkacaktır ve bu işlem daha spesifik bir sistemin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. 1950'lerde Thomlinson ve Gray tarafından yapılan histolojik çalışmalar, insan tümörlerinin kan damarlarının etrafında büyüdüğünü ve kandan yaklaşık 200 µm'lik bir mesafenin ötesinde en dıştaki hücrelerin nekroz olduğu ortaya koymuştur. ^{119, 120}

Munoz JL ve ark. ¹²¹ 2014 yılında yaptıkları çalışmada TMZ'in yüksek dozlarının kanser hücrelerinde LDH seviyesinin artışına ve GR değerlerinin düşmesine sebep olarak

hücreyi ölüme sürüklediğini göstermişlerdir. Fakat yapılan araştırmalar TMZ'e karşı gelişen direncin, hücre ölüm oranının ve LDH seviyelerinin düşmesine neden olduğunu da göstermişlerdir. Çalışmamızda TMZ grubunda LDH aktivitesi en fazla TMZ 400-800 ng/ml grupları arasında görülmüştür. 24 saat sonucu $58,9 \pm 1,37$ ve $68,8 \pm 1,68$ iken 72 saat sonucu $75,5 \pm 6,02$ ve $85,3 \pm 6,88$ olarak bulunmuştur. En yüksek dozda LDH aktivitesi neredeyse 6 kat artış göstermiştir. Fakat bariz şekilde eksolimer gruplarımızda dirençle karşılaşmaması sitotoksiteyi ve hücrel stresi artırdığı tespit edilmiştir.

Glioblastoma tedavisinde antikanser ilaçlarının kanser hücresinde verdiği hasara bağlı oluşturdukları oksidatif stres birçok çalışmada gösterilmiştir. Emsen B ve ark.¹²² 2018 yılında yaptıkları çalışmada antikanser ilacının toplam oksidant ve antioksidant oranlarının ölüm oranıyla korele olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca Tuzgen S ve ark.¹²³ 2007 yılında glioblastoma hastalarında yaptıkları çalışmada toplam antioksidant seviyelerini araştırmışlardır. İki çalışmada da elde edilen veriler kanser hücresine karşı uygulanan tedavinin etkinliğine bağlı olarak oksidant seviyenin arttığı ve antioksidant kapasitenin düştüğünü rapor etmişlerdir.¹²³ Bizim çalışmamızda da benzer sonuç elde edilmiştir. Fakat bu çalışmada farklı olarak saf ilaç kullanımı eksolimer+TMZ ile karşılaştırılmış olup eşdeğer doza nazaran Eksolimer+TMZ gruplarında oksidan seviyesinin daha da arttığı, antioksidan seviyesinin ise azaldığı bulunmuştur.

L1CAM olarak da bilinen L1, L1CAM geni tarafından kodlanan L1 protein ailesinin bir transmembran protein üyesidir. Bu protein, hücre göçü, yapışma, nörit büyümesi, miyelinasyon ve nöronal farklılaşmada güçlü bir etkisi olan bir nöronal hücre yapışma molekülüdür. Ayrıca işlevi nedeniyle tedaviye dirençli kanserlerde anahtar rol oynar. L1 proteini, sinir sisteminin her yerinde nöronların yüzeyinde bulunur. Hücre zarı boyunca, proteinin bir ucu sinir hücresinin içinde, diğer ucu nöronun dış yüzeyinde kalacak şekilde yerleştirilir. Bu pozisyon, proteinin nöron boyunca yayılan kimyasal

sinyalleri aktive etmesine izin verir.⁵⁹ Janka Held-Feindt ve ark.⁵⁹ 2012 yılında yaptıkları çalışmada bu genin GBM farklı hatlarında 4 kata kadar ekspresyon seviyesinde artış olduğunu görülmüştür. Bizim çalışmada GBM hattımızda artış görülmektedir fakat ekspresyon kat sayımız Janka'nın çalışmasıyla farklı olmaktadır. En yüksek seviye Eksozom kontrol grubunda gözüksede tedavi gruplarında bu gen açıkça baskılandığı görülmektedir. Ayrıca nöron hücrelerinde uygulanan tedavi ekspresyon seviyesini kontrol grubuna yaklaştırmaktadır.

Apoptoza karşı gelişen direnç kanser hücrelerinin en önemli ayırt edici özelliklerinden biridir. Apoptoza uğramayan bu hücreler metastaz yeteneği kazanmakta hem de tedaviye karşı direnç gelişimi göstermektedirler. Kaspaz-8, apoptozun başlatılması ve yürütülmesi için gerekli olan kanionik bir sistein proteazıdır; ölüm reseptörünün neden olduğu programlanmış hücre ölümünün önemli bir aktörüdür ve aktivasyonu bu yolun işlevselliği için kesinlikle gereklidir. Ölüm reseptörünün neden olduğu apoptozdaki merkezi rolü ile tutarlı olarak, tarihsel olarak bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilir. Bu, apoptotik sinyalin yürütülmesi için gerekli olan Kaspaz-8 ekspresyonunun veya enzimatik aktivitesinin kanserde sıklıkla bozulduğu gözlemiyle uyumludur. Aslında Kaspaz-8, nöroblastom ve medulloblastom gibi çeşitli tümörlerde genetik veya epigenetik olarak susturulur. Kaspaz-8 ekspresyonu çalışmamızda değerlendirildiğinde tedavi dozu ve etkinliği artmasıyla beraber artış göstermektedir. Kaspaz 8 apoptoz başlamasında rol alan önemli bir gendir. Eksolimer+TMZ kombinasyonu GBM hattında önemli derecede artışa neden olarak hücrel ölümün başlatılmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

SSS'yi etkileyen iskemik hasarlar, bozulmuş duyuusal motor fonksiyonun yanı sıra bozulmuş bilişsel yeteneklerle sonuçlanır. Bu eksiklikler genellikle iskemik hasar bölgesindeki nöronların kaybına bağlanır. Daha önceki birkaç çalışma, apoptoz yoluyla

nöron kaybının bu bağlamda önemli olabileceğini düşündürmektedir. Hücresel yapıdaki bu belirgin değişiklikler, apoptozu hücre ölümünün alternatif bir şekli olan nekrozdan ayırır. İki hücre ölümü süreci, apoptoz ve nekroz, farklı DNA bozunma modelleri ile daha da ayırt edilir; apoptozun morfolojik değişikliklerinin, nükleozomlar arasındaki bağlayıcı bölgelerde nükleer DNA'nın çift sarmallı bölünmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Genetik ve biyokimyasal çalışmalar, hücre içi proteazların bir ailesinin, hücresel yapının bu koordineli parçalanmasına katıldığını göstermiştir.¹²⁴ Çalışmamızda antikanser ilaç olan TMZ doz artışıyla beraber yan etki olarak nöronlarda apoptozun başlanmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Fakat eksolimer+TMZ kombinasyonu kaspaz 8 gen ekspresyonunu anlamlı derece değiştirmedeği gözükmemektedir. Xuan Pu ve ark.¹²⁵ 2017 yılında apoptoz dergisinde yaptıkları çalışmada kaspaz 8 ve 3'un kanser sağ kalım üzerinde etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada kaspaz 3 ve 8 birbirinden bağımsız olsalarda kaspaz 8'in bu sürecin başlanmasında ki önemi yanı sıra artışı kontrol grubunda prognozun kötü olduğunu göstermektedir. Bizim geliştirdiğimiz yeni kapsülasyon formu ile TMZ ilacının özellikle nöron hücreleri üzerinde kaspaz 8 ekspresyon düzeyini düzenleyerek bu hücrelerin ölümleri engellenmiştir. Ayrıca T98-G hücrelerinin apoptoza gitmesine neden olmuştur.

O⁶-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT), insanlarda ve birçok prokaryotik organizmada bulunan bir DNA onarım proteinidir. Araştırmalar, gliomalı hastalarda alkilleyici ajanlarla yapılan antineoplastik ilaç tedavilerinin ilaç direncine yol açabileceğini ve MGMT'nin ana neden olduğunu ve bu nedenle hastalar için ideal bir tedavi olmadığını göstermiştir. Bazı raporlar, pozitif MGMT ekspresyonunun etkisinin, gliomalı hasta için kemoterapi sırasındaki negatif ekspresyondan daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, MGMT aktivitesi daha yüksektir ve alkilleyici ajan sınıfının antineoplastik ilaçlarına karşı ilaç direnci daha fazladır. MGMT ekspresyonu daha

düşükse, antineoplastik ilaçların alkilleyici sınıfı daha duyarlıdır ve daha iyi bir etkinliğe sahiptir. MGMT gen ekspresyonu alkilleyici ilaç anti kanser ilaçların direncine sebep olsada çalışmamızda üretilen eksolimerler bu direncin azalmasında önemli rol oynamaktadırlar. Elde ettiğimiz LDH, GR, MTT TAS ve TOS verilerinde bu olay açık bir şekilde beyan edilmiştir. Qiang Li ve ark.¹²⁶ 2017 yılında glioma hastalarında yaptıkları çalışmada MGMT geninin evreleri arttığında MGMT gen ekspresyonu anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat uygun tedavi süreci bu gen ekspresyon seviyesi düşüş gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda nöron kültüründe MGMT geni üzerinde anlamlı bir artış gözlemlenmedi. Fakat GBM kanserinde Eksozom, MGMT geninin artışına neden olurken saf TMZ ve Eksolimer+TMZ gruplarında doza bağlı olarak MGMT gen ekspresyonunda düşüş görülmüştür. Bu düşüş oranı Eksolimer+TMZ 400 ve 800 ng/ml gruplarında daha belirgindir.

MHC sınıf I molekülleri, birçok somatik hücrede beta 2-mikroglobulin (beta 2-M) ile birlikte eksprese edilir. Bununla birlikte, bu proteinler normalde merkezi sinir sistemi hücrelerinde bulunmazlar. İnsan nöroblastomlarından türetilen hücreler, nöral hücrelerde MHC sınıf I ve beta 2-M gen ekspresyonunun azlığının moleküler temelini araştırılması ve bu genlerin iki sitokin, IFN-gamma ve TNF- tarafından uyarılması için bir model olarak kullanıldı. Gliomların sınırlı tedavi stratejisi nedeniyle, tanı ve tedavinin anahtarı yeni moleküler biyobelirteçler bulmaktır. Burada, β 2-mikroglobulinin (B2M) gliomalarda immünoterapi veya tanısal biyobelirteç için umut verici bir aday olarak hizmet etme potansiyelini araştırdık. Yüksek B2M ifadesi, daha kötü prognozla koreledir. Yüksek B2M ekspresyonuna sahip gliomaların somatik mutasyonları, delesyonu ve EGFR amplifikasyonu ile ilişkilidir. Bu arada, B2M, bağışıklık kontrol noktası molekülleri ve inflamatuvar aktivitelerle ilişkilendirildi.¹²⁷ B2M'nin immünoterapi için potansiyel bir aday olduğunu doğruladı. B2M'nin tümör ilerlemesinde, hasta

prognozunda ve gliomaların immünoterapisinde kritik bir rol oynadığını çalışmalarca doğrulanmıştır. ¹²⁸ Bu çalışma ede edilen verilerimizle uyumluluk göstermektedir.

Tümör baskılayıcı ve transkripsiyon faktörü p53, hasarlı hücre apoptozu, genomik stabilitenin korunması, anjiyogenezin inhibisyonu ve hücre metabolizmasının ve tümör mikroçevresinin düzenlenmesi dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel tepkileri düzenleyerek tümörün önlenmesinde kritik roller oynar. TP53, kanserde en yaygın olarak bulunan düzensiz genlerden biridir. p53-ARF-MDM2 yolu, glioblastoma (GBM) hastalarının %84'ünde ve GBM hücre hatlarının %94'ünde düzensizdir. Düzensiz p53 yolağı bileşenleri, GBM hücre istilas, göçü, çoğalması, apoptozdan kaçınmada gibi birçok önemli faktöre neden olur. Örneğin, 2011'de yapılan bir araştırma, TP53 prolin mutasyonunun erkeklerde pankreas kanseri riski üzerinde derin bir etkisi olduğunu buldu. Arap kadınları üzerinde yapılan bir araştırma, TP53 kodon 72'deki prolin homozigotluğunun meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili olduğunu buldu. Bir çalışma, TP53 kodon 72 polimorfizmleri, MDM2 SNP309 ve A2164G'nin toplu olarak orofaringeal olmayan kanser duyarlılığı ile ilişkili olabileceğini ve MDM2 SNP309'un TP53 kodon 72 ile kombinasyon halinde kadınlarda orofaringeal olmayan kanserin gelişimini hızlandırabileceğini öne sürdü. 2011 yılında yapılan bir çalışma, TP53 kodon 72 polimorfizminin artmış akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Glioblastoma (GBM), önemli sayıda tümör dışı infiltrate hücrenin bulunabildiği merkezi sinir sisteminin ölümcül bir tümörüdür. Bu tümör hücrelerine komşu olan astrositler, belirli bir reaktif fenotipe sahiptir ve anormal hücre çoğalmasını ve istilasını indükleyerek GBM malignitesini artırabilir. Tümör baskılayıcı p53, komşu hücreleri etkileyen salgılanan proteinlerin ekspresyonunu modüle ederek potansiyel bir hücre dışı otonom fonksiyona sahiptir. GBM hücrelerinin, sırayla tümör dayanıklılığını şiddetlendiren p53 ekspresyonunun bozulmasına dayanan işlevsiz bir mikro ortam yarattığını

göstermektedir. GBM hücrelerinin astrositlerde p53 ekspresyonunu azalttığını, bunun da ECM kompozisyonunu modüle ettiğini ve tümör malignitesini desteklediğini gösterilmiştir. Son olarak, GBM hücreleri ve astrositler arasındaki etkileşimde p53'ün önemli bir rolüne işaret ediyor; bu, GBM'yi tedavi etmek için yeni yaklaşımlar tasarlama potansiyeline sahip bir keşiftir. p53 tümör baskılayıcı gen, genotoksik strese yanıt olarak büyümenin durdurulmasını veya hücre ölümünü teşvik eden genlerin ekspresyonunu aktive eden diziye özgü bir transkripsiyon faktörüdür. İskemi ve epilepsi gibi akut yaralanma modellerinde ve kronik nörodejeneratif hastalıkları olan hastalardan elde edilen beyin dokusu örneklerinde p53 ekspresyonunun hasarlı nöronlarda arttığının bulunmasıyla, p53 ile ilişkili nöronal canlılık modülasyonu için olası bir rol önerilmiştir. Ayrıca, p53'ün yokluğunun nöronları çok çeşitli akut toksik hakaretlerden koruduğu gösterilmiştir. p53'ün neden olduğu hücre ölümüyle ilişkili sinyal iletim yolları çözülüyor ve müdahalenin nöronal canlılığın korunmasında ve sitopatik hareketlerin ardından fonksiyonun geri kazanılmasında verimli olabileceğini düşündürmektedir.^{129, 130}

Kromozom 10'da (PTEN) bulunan fosfataz ve tensin homologu, orijinal olarak bir dizi farklı hücrede çoğalmayı, göçü, hücre büyümesini ve apoptozu engelleyebilen bir tümör baskılayıcı olarak karakterize edildi. Daha sonra, bir tümör baskılayıcı rolüne ek olarak, PTEN'in beyin gelişiminin farklı aşamalarında ve yetişkinlikte merkezi sinir sisteminde (CNS) birçok rolü olduğu ortaya çıktı. PTEN, nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir. Son çalışmalar, PTEN'in de-regülasyonunun, nörogenezi kontrol etme rolüne atfedilir. Bu da sinir sistemindeki önemli nöronal fonksiyonları etkilediğini göstermektedir. (nörit büyümesi, sinaptogenez ve sinaptik plastisite). İnsan germline PTEN mutasyonları veya farelerde PTEN'in koşullu silinmesi, makrosefali, ataksi, nöbetler, zeka geriliği ve otizm gibi nörolojik bozukluklarla ilişkili olası nedenlere ilişkin içgörüler sağlamıştır. Ayrıca, PTEN aktivitesinin inhibisyonu, dejeneratif koşullarda

veya sinir sisteminin yaralanmasını takiben etkilenen nöronların rejeneratif kapasitelerini arttırmak için şu anda ikna edici bir hedef olarak görülmektedir.¹³¹

Son zamanlarda kanser tedavisinde hedefe yönelik çalışmalar oldukça yaygınlaşmıştır. Eksozomlar taşıdıkları biyobelirteçler sayesinde hücrel sinyal iletiminde önemli role sahiplerdir. Bu özellikleri ile kanser dahil birçok hastalığın tedavisinde yeni bir umut olarak görülmektedir. Çalışmamızda eksozomun bu özelliğinden yararlanarak kanser hedefli yeni formülasyon oluşturduk. Yaptığımız analizler sonucunda, eksozom aracılı yeni taşıyıcı sisteminin sağlıklı nöron hücreler üzerinde nörotoksik etki göstermediği T98-G hücrelerinde ise apoptoza sürükleyerek hücrel ölüme neden olduğunu tespit ettik. Diğer analizlerimiz de bu sonuçlarımızı kanıtlar niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında kapsamında gerçekleştirilen karakterizasyon yöntemleri ile eksozomun doğru bir biçimde elde edildiği, literatür örneklerine benzer nitelikte sentezlendiği, enkapsülasyon neticesinde elde edilen yapıların da hedeflenen ürünler olduğu tespit edilmiştir.
- MTT sonuçlarına en etkin grup Eksolimer+TMZ grubu olduğu geliştirdiğimiz ilaç taşıyıcı sistemin kansere hedefli olduğu ve nöronlar üzerinde toksik etkisinin indirgendiği gösterilmiştir. Ayrıca LDH ve GR ile MTT testimizin doğruluğu kanıtlanmıştır.
- Eksolimerin nöron hücrelerinde TMZ'ye bağlı antioksidan aktivitesinde düşüşü engellediği belirlenmiştir.
- Oksidan etkinlik bazında, nöron hücrelerinde Eksozom 200 ng/ml T98-G hücrelerinde ise Eksolimer+TMZ grubunda kontrole kıyasla yüksek olduğu saptanmıştır.
- İn vivo hayvan modelinde de Eksolimer+TMZ 200 µg/ml grubunun kanser kitlesini oldukça azalttığı gözlemlenmiştir.
- Uyguladığımız bu yeni ilaç formülasyonunun farmakokinetik ve farmakodinamik etkinliği henüz bilinmemektedir. Bu nedenle gelecek çalışmalarda bu çalışmalara yer verilerek ilacın etki gücü ortaya konulmalıdır. Ayrıca farklı kanser türlerinde de eksozom aracılı taşıyıcı sistem geliştirilmesi ile o hastalıkların tedavisini hızlandırılacağı düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23: 1985-1996.
2. Blissitt PA. Clinical practice guideline series update: care of the adult patient with a brain tumor. *J Neurosci Nurs*, 2014, 46: 367-368.
3. Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*, 2016, 134: 381-397.
4. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200: 373-383.
5. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 619-624.
6. Chen Y, Xie Y, Xu L, Zhan S, Xiao Y, Gao Y, Wu B, Ge W. Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics. *Int J Cancer*, 2017, 140: 900-913.
7. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*, 2011, 2: 180.
8. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 654-659.
9. Sato-Kuwabara Y, Melo SA, Soares FA, Calin GA. The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review). *Int J Oncol*, 2015, 46: 17-27.

10. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2008, 110: 13-21.
11. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 2012, 18: 883-891.
12. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release*, 2015, 219: 278-294.
13. Vella LJ. The emerging role of exosomes in epithelial-mesenchymal-transition in cancer. *Front Oncol*, 2014, 4: 361.
14. Sousa D, Lima RT, Vasconcelos MH. Intercellular Transfer of Cancer Drug Resistance Traits by Extracellular Vesicles. *Trends Mol Med*, 2015, 21: 595-608.
15. Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics*, 2016, 6: 1306-1323.
16. Haque S, Whittaker MR, McIntosh MP, Pouton CW, Kaminskas LM. Disposition and safety of inhaled biodegradable nanomedicines: Opportunities and challenges. *Nanomedicine*, 2016, 12: 1703-1724.
17. Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, Chen H, Yuan H, Sun D. Engineering exosomes as refined biological nanoplateforms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38: 754-763.
18. Charles R. Noback NLS, Robert J. Demarest, David A. Ruggiero. *The Human Nervous System Structure and Function* Baski. New York, 2005.

19. Herculano-Houzel S, Catania K, Manger PR, Kaas JH. Mammalian Brains Are Made of These: A Dataset of the Numbers and Densities of Neuronal and Nonneuronal Cells in the Brain of Glires, Primates, Scandentia, Eulipotyphlans, Afrotherians and Artiodactyls, and Their Relationship with Body Mass. *Brain Behav Evol*, 2015, 86: 145-163.
20. Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 2014, 62: 1377-1391.
21. Bardehle S, Kruger M, Buggenthin F, Schwausch J, Ninkovic J, Clevers H, Snippert HJ, Theis FJ, Meyer-Luehmann M, Bechmann I, Dimou L, Gotz M. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 580-586.
22. Strzelecki D, Tabaszewska A, Barszcz Z, Jozefowicz O, Kropiwnicki P, Rabe-Jablonska J. A 10-week memantine treatment in bipolar depression: a case report. Focus on depressive symptomatology, cognitive parameters and quality of life. *Psychiatry Investig*, 2013, 10: 421-424.
23. Mathews DC, Henter ID, Zarate CA. Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs*, 2012, 72: 1313-1333.
24. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Stewart JW, Nierenberg AA, Thase ME, Ritz L, Biggs MM, Warden D, Luther JF, Shores-Wilson K, Niederehe G, Fava M. Bupropion-SR, sertraline, or venlafaxine-XR after failure of SSRIs for depression. *N Engl J Med*, 2006, 354: 1231-1242.
25. Purves D AG, Fitzpatrick D, Hall Wc, Lamantia A-S, Mcnamara Jo, Williams Sm. *Neuroscience*. 3. Baskt. Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2004.

26. Carter SF, Herholz K, Rosa-Neto P, Pellerin L, Nordberg A, Zimmer ER. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med*, 2019, 25: 77-95.
27. Verkhratsky A, Butt A. *Glial Neurobiology*. 1. Baskı. England, John Wiley & Sons Ltd. , 2007.
28. Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*, 2006, 29: 547-553.
29. Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, 2010, 468: 244-252.
30. Butt AM, Papanikolaou M, Rivera A. Physiology of Oligodendroglia. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1175: 117-128.
31. Kyrousi C, Lygerou Z, Taraviras S. How a radial glial cell decides to become a multiciliated ependymal cell. *Glia*, 2017, 65: 1032-1042.
32. Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7: a020487.
33. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 2011, 91: 461-553.
34. Cooper GM, Hausman, Robert E. *The cell : a molecular approach*. 3rd Baskı. Washington, D.C. : Sunderland, Mass. : ASM Press, 2004.
35. Klug WS CM. *Genetik*. Baskı. Palme, 2002.
36. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*, 2000, 21: 167-223.
37. Hanahan D, Weinberg RAJc. Hallmarks of cancer: the next generation. 2011, 144: 646-674.
38. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for

- 36 cancers in 185 countries. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68: 394-424.
39. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanseri Dairesi Başkanlığı, Kanseri Nedir? <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2016-yili-turkiye-kanser-i-istatistikleri.html>. 28 Haziran 2021.
40. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70: 7-30.
41. Cancer.Net Abt. Cancer.Net Editorial Board, Brain Tumor: Statistics <https://www.cancer.net/cancer-types/brain-tumor/statistics>.
42. Levin B BP. 2008. *Dünya Kanseri Raporu, Uluslararası Kanseri Araştırma Kurumu (IARC)*.
43. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127: 2893-2917.
44. Boss BJ, & Wilkerson, R. R. . *Concepts of neurologic dysfunction. Understanding pathophysiology* , 5th ed Baskı. 2006: 491-546.
45. Baksi Şimşek A. MD Anderson Beyin Tümörü Semptom Envanteri'nin geçerlilik ve güvenilirliği. DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
46. Geneva AJ, Muirhead CA, Kingan SB, Garrigan DJPo. A new method to scan genomes for introgression in a secondary contact model. 2015, 10: e0118621.
47. Malak AT, Dicle A. Assessing the efficacy of a peer education model in teaching breast self-examination to university students. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2007, 8: 481-484.
48. Segal D, Karajannis MA. Pediatric Brain Tumors: An Update. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2016, 46: 242-250.

49. American Brain Tumor Association. *Brain Tumor Primer. A Comprehensive Introduction to Brain Tumors*. 9. Baskl. Chicago, 2015: 7- 86.
50. Yoshida K. [History and perspectives of brain tumor surgery]. *Nihon Rinsho*, 2016, 74 Suppl 7: 25-30.
51. Castillo M. History and evolution of brain tumor imaging: insights through radiology. *Radiology*, 2014, 273: S111-125.
52. Ali MY, Oliva CR, Noman ASM, Allen BG, Goswami PC, Zakharia Y, Monga V, Spitz DR, Buatti JM, Griguer CE. Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. *Cancers (Basel)*, 2020, 12.
53. Ostrom QT, Gittleman H, de Blank PM, Finlay JL, Gurney JG, McKean-Cowdin R, Stearns DS, Wolff JE, Liu M, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. American Brain Tumor Association Adolescent and Young Adult Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, 2016, 18 Suppl 1: i1-i50.
54. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*, 2007, 25: 867-890, vii.
55. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 2006, 9: 157-173.
56. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*, 1999, 1: 44-51.
57. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol*, 2006, 1: 97-117.

58. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, 2000, 343: 1350-1354.
59. Held-Feindt J, Schmelz S, Hattermann K, Mentlein R, Mehdorn HM, Sebens S. The neural adhesion molecule L1CAM confers chemoresistance in human glioblastomas. *Neurochem Int*, 2012, 61: 1183-1191.
60. Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, Wang YP, Preston-Martin S. A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. *Cancer*, 2005, 104: 2798-2806.
61. Yabroff KR, Harlan L, Zeruto C, Abrams J, Mann B. Patterns of care and survival for patients with glioblastoma multiforme diagnosed during 2006. *Neuro Oncol*, 2012, 14: 351-359.
62. Babu R, Kranz PG, Agarwal V, McLendon RE, Thomas S, Friedman AH, Bigner DD, Adamson C. Malignant brainstem gliomas in adults: clinicopathological characteristics and prognostic factors. *J Neurooncol*, 2014, 119: 177-185.
63. Butowski NA, Sneed PK, Chang SM. Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 1273-1280.
64. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther*, 2015, 152: 63-82.
65. Moody CL, Wheelhouse RT. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014, 7: 797-838.
66. Brown GD, Luthra SK, Brock CS, Stevens MF, Price PM, Brady F. Antitumor imidazotetrazines. 40. Radiosyntheses of [4-¹¹C-carbonyl]- and [3-N-¹¹C-methyl]-8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one

- (temozolomide) for positron emission tomography (PET) studies. *J Med Chem*, 2002, 45: 5448-5457.
67. Chinot OL, Honore S, Dufour H, Barrie M, Figarella-Branger D, Muracciole X, Braguer D, Martin PM, Grisoli F. Safety and efficacy of temozolomide in patients with recurrent anaplastic oligodendrogliomas after standard radiotherapy and chemotherapy. *J Clin Oncol*, 2001, 19: 2449-2455.
68. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005, 352: 997-1003.
69. Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, Isaacson S, Rotman M, Asbell SO, Nelson JS, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1993, 26: 239-244.
70. Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Williams VL, Curry WT, Rodkey EA, Barker FG, 2nd, Sloan AE. Racial/ethnic differences in survival among elderly patients with a primary glioblastoma. *J Neurooncol*, 2007, 85: 171-180.
71. Hong H, Zhang Y, Sun J, Cai W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano Today*, 2009, 4: 399-413.
72. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, 2008, 3: 133-149.
73. Schiavina R, Brunocilla E, Borghesi M, Vagnoni V, Castellucci P, Nanni C, Ceci F, Gacci M, Martorana G, Fanti S. Diagnostic imaging work-up for disease relapse after radical treatment for prostate cancer: how to differentiate local from systemic

- disease? The urologist point of view. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*, 2013, 32: 310-313.
74. Markram H, Gerstner W, Sjostrom PJ. A history of spike-timing-dependent plasticity. *Front Synaptic Neurosci*, 2011, 3: 4.
75. Mendez P, Bacci A. Assortment of GABAergic plasticity in the cortical interneuron melting pot. *Neural Plast*, 2011, 2011: 976856.
76. Rocher C, Spedding M, Munoz C, Jay TM. Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cereb Cortex*, 2004, 14: 224-229.
77. Lucassen PJ, Fuchs E, Czeh B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry*, 2004, 55: 789-796.
78. Slaterry DA, Hudson AL, Nutt DJ. Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. *Fundam Clin Pharmacol*, 2004, 18: 1-21.
79. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. İçinde: Kaalp o (editör). Pelikan Yayıncılık, 2009.
80. Uzbay T. Anksiyete ve Depresyonun Nörobiyolojisi. *Klinik Psikiyatri*, 2004, 4: 3-11.
81. Braestrup C, Nielsen M. Anxiety. *Lancet*, 1982, 2: 1030-1034.
82. Brick J EC. Drugs, the brain, and behavior, The Pharmacology of Abuse and Dependence. *The Haworth Medical*, 1998: 119-131.
83. Emrich HM, von Zerssen D, Kissling W, Moller HJ, Windorfer A. Effect of sodium valproate on mania. The GABA-hypothesis of affective disorders. *Arch Psychiatr Nervenkr*, 1980, 229: 1-16.

84. Shiah IS, Yatham LN. GABA function in mood disorders: an update and critical review. *Life Sci*, 1998, 63: 1289-1303.
85. Lloyd KG, Zivkovic B, Scatton B, Morselli PL, Bartholini G. The gabaergic hypothesis of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1989, 13: 341-351.
86. Petty F. GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *J Affect Disord*, 1995, 34: 275-281.
87. Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology*, 1998, 18: 135-174.
88. Reisine T. Adaptive changes in catecholamine receptors in the central nervous system. *Neuroscience*, 1981, 6: 1471-1502.
89. Redmond DE, Jr., Huang YH. Current concepts. II. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci*, 1979, 25: 2149-2162.
90. Ninan PT. The functional anatomy, neurochemistry, and pharmacology of anxiety. *J Clin Psychiatry*, 1999, 60 Suppl 22: 12-17.
91. Dubovsky SL, Thomas M. Beyond specificity: effects of serotonin and serotonergic treatments on psychobiological dysfunction. *J Psychosom Res*, 1995, 39: 429-444.
92. Papp M, Moryl E. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol*, 1994, 263: 1-7.
93. Campbell S, Macqueen G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci*, 2004, 29: 417-426.
94. Lusén PT BJ, Selis SR, Gwirtsman HE, Shelton RC, Bird RP, Nash JL. *duygudurum bozuklukları*. Baskı. Güneş kitabevi, 2003: 290-327.

95. Golinkoff M, Sweeney JA. Cognitive impairments in depression. *J Affect Disord*, 1989, 17: 105-112.
96. Drevets WC. Functional neuroimaging studies of depression: the anatomy of melancholia. *Annu Rev Med*, 1998, 49: 341-361.
97. Tkach M, Thery C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 2016, 164: 1226-1232.
98. EL Andaloussi S, Maeger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, 12: 348-358.
99. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367.
100. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Thery C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 2011, 12: 1659-1668.
101. He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics*, 2018, 8: 237-255.
102. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther*, 2018, 188: 1-11.
103. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, Liebler DC, Ping J, Liu Q, Evans R, Fissell WH, Patton JG, Rome LH, Burnette DT, Coffey RJ. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 2019, 177: 428-445 e418.
104. Siemann DW, Horsman MR. Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy. *Pharmacol Ther*, 2015, 153: 107-124.
105. Kuczynski EA, Vermeulen PB, Pezzella F, Kerbel RS, Reynolds AR. Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16: 469-493.

106. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 1470-1476.
107. Filipazzi P, Burdek M, Villa A, Rivoltini L, Huber V. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22: 342-349.
108. Weiner-Gorzel K, Dempsey E, Milewska M, McGoldrick A, Toh V, Walsh A, Lindsay S, Gubbins L, Cannon A, Sharpe D, O'Sullivan J, Murphy M, Madden SF, Kell M, McCann A, Furlong F. Overexpression of the microRNA miR-433 promotes resistance to paclitaxel through the induction of cellular senescence in ovarian cancer cells. *Cancer Med*, 2015, 4: 745-758.
109. Xu CG, Yang MF, Ren YQ, Wu CH, Wang LQ. Exosomes mediated transfer of lncRNA UCA1 results in increased tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20: 4362-4368.
110. Fan Y, Shen B, Tan M, Mu X, Qin Y, Zhang F, Liu Y. Long non-coding RNA UCA1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling. *FEBS J*, 2014, 281: 1750-1758.
111. Amarouch MY, El Hilaly J, Mazouzi D. AFM and FluidFM Technologies: Recent Applications in Molecular and Cellular Biology. *Scanning*, 2018, 2018: 7801274.
112. Nalci OB, Nadaroglu H, Genc S, Hacimuftuoglu A, Alayli A. The effects of MgS nanoparticles-Cisplatin-bio-conjugate on SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Mol Biol Rep*, 2020, 47: 9715-9723.
113. Huang J, Ding ZP, Luo QQ, Xu WR. Cancer cell-derived exosomes promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis of both normal lung fibroblasts and non-

- small cell lung cancer cell through delivering alpha-smooth muscle actin. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11: 1711-+.
114. Saadatpour L, Fadaee E, Fadaei S, Nassiri Mansour R, Mohammadi M, Mousavi SM, Goodarzi M, Verdi J, Mirzaei H. Glioblastoma: exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23: 415-418.
 115. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, Pogossova-Agadjanyan EL, Morrissey C, Stirewalt DL, Hladik F, Yu EY, Higano CS, Tewari M. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 14888-14893.
 116. Yin J, Zeng A, Zhang Z, Shi Z, Yan W, You Y. Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. *EBioMedicine*, 2019, 42: 238-251.
 117. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL, Hulikova A. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369: 20130099.
 118. Liu J, Huang Y, Kumar A, Tan A, Jin S, Mozhi A, Liang XJ. pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol Adv*, 2014, 32: 693-710.
 119. Flinck M, Kramer SH, Pedersen SF. Roles of pH in control of cell proliferation. *Acta Physiol (Oxf)*, 2018, 223: e13068.
 120. Harguindey S, Stanciu D, Devesa J, Alfarouk K, Cardone RA, Polo Orozco JD, Devesa P, Rauch C, Orive G, Anitua E, Roger S, Reshkin SJ. Cellular acidification as a new approach to cancer treatment and to the understanding and therapeutics of neurodegenerative diseases. *Semin Cancer Biol*, 2017, 43: 157-179.

121. Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P. Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1145.
122. Emsen B, Kaya A, Aslan A. Cytotoxic, Genotoxic and Oxidative Effects of *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. on Human Peripheral Lymphocytes. *Cumhuriyet Science Journal*, 2018, 39: 169-180.
123. Tuzgen S, Hanimoglu H, Tanriverdi T, Kacira T, Sanus GZ, Atukeren P, Dashti R, Gumustas K, Canbaz B, Kaynar MY. Relationship between DNA damage and total antioxidant capacity in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2007, 19: 177-181.
124. Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci*, 1999, 19: 5932-5941.
125. Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, Martin SG. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis*, 2017, 22: 357-368.
126. Li Q, Guo J, Wang W, Wang D. Relationship between MGMT gene expression and treatment effectiveness and prognosis in glioma. *Oncol Lett*, 2017, 14: 229-233.
127. Zhang H, Cui B, Zhou Y, Wang X, Wu W, Wang Z, Dai Z, Cheng Q, Yang K. B2M overexpression correlates with malignancy and immune signatures in human gliomas. *Sci Rep*, 2021, 11: 5045.
128. Drew PD, Lonergan M, Goldstein ME, Lampson LA, Ozato K, McFarlin DE. Regulation of MHC class I and beta 2-microglobulin gene expression in human

- neuronal cells. Factor binding to conserved cis-acting regulatory sequences correlates with expression of the genes. *J Immunol*, 1993, 150: 3300-3310.
129. Banasiak KJ, Haddad GG. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res*, 1998, 797: 295-304.
130. Morrison RS, Kinoshita Y. The role of p53 in neuronal cell death. *Cell Death Differ*, 2000, 7: 868-879.
131. Benitez JA, Ma J, D'Antonio M, Boyer A, Camargo MF, Zanca C, Kelly S, Khodadadi-Jamayran A, Jameson NM, Andersen M, Miletic H, Saberi S, Frazer KA, Cavenee WK, Furnari FB. PTEN regulates glioblastoma oncogenesis through chromatin-associated complexes of DAXX and histone H3.3. *Nat Commun*, 2017, 8: 15223.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Doğum tarihi: Doğum Yeri: Medeni Hali: Uyruğu: Adres: Tel: Faks: E-mail:
Eğitim
Lise: Lisans: Yüksek lisans: Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Almanca: - Rusça: -
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
-
İlgi Alanları ve Hobiler
Doğa ve kültürel geziler Resim Yapmak

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Zeynep ÇAKIR danışmanlığında sunulan “Ekzosom Tabanlı İlaç Taşıma Sisteminin Glioblastoma Tedavisinde Kullanım Potansiyelinin *in vitro* ve *in vivo* Deneysel Modellerde Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	2	15
Genel Bilgiler	9	35
Materyal ve Metod	17	35
Bulgular	9	15
Tartışma	0	20

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 28/07/ 2021

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU

TOPLANTI TARİHİ : 27.06.2019

TOPLANTI SAYISI : 7

KARAR N0 119: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Acil Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneyisel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "İlaç Taşıma Sistemi Olarak Ekzosom Kullanımının İlaçların Kanser Hücrelerine Hedeflendirilmesi, İn-vitro ve İn Vivo Yeni Tedavi Yöntemlerinin Araştırılması" isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 26.06.2019 tarih ve 42190979-000-E.1900187944 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; (Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi gereğince, Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU, görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı). karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/birim=veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vettak@atauni.edu.tr



EK-4. TEZ ADI/ KONUSU DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

TEZ ADI/KONUSU DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Sıdika GENÇ
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığına

Danışmanlığımı yürüttüğüm ve yukarıda bilgileri yazılı olan bilim dalımız öğrencisinin Tez adı/İçeriği aşağıda belirtilen şekilde değiştirilmiştir. Bilgilerinize arz ederim. 14.07.2021

Değişiklik Türü	Tez Adı Değişikliği ☒	Tez İçeriği Değişikliği ¹ ☐
Tezin Eski Adı	İlaç Taşıma Sistemi Olarak Ekzosom Kullanımının İlaçların Kanser Hücrelerine Hedeflendirilmesi, <i>in Vitro</i> ve <i>in Vivo</i> Yeni Tedavi yöntemlerinin Araştırılması	
Tezin Yeni Adı	Ekzosom Tabanlı İlaç Taşıma Sisteminin Glioblastoma Tedavisinde Kullanım Potansiyelinin <i>in Vitro</i> Ve <i>in Vivo</i> Deneysel Modellerde Araştırılması	
Tezin İngilizce Adı	Investigation of the Exosome-Based Drug Delivery System Potential in the Treatment of Glioblastoma <i>in Vitro</i> and <i>in Vivo</i> Experimental Models	
Değişikliğin Gerekçesi	Tez içeriğini daha iyi yansıtacağı düşünüldüğünden isim değişikliği önerilmiştir.	

Tez İzleme Komitesi Üyeleri

İmza 

¹ Lütfen yeni tez önerisini ekleyiniz. Tez konusu değişen doktora öğrencileri yeni tez konusu kabul edildikten sonra en az 3 kere Tez İzleme Komitesi Ara Raporu sunmak zorundadır.