



T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

BİYOMÜHENDİSLİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**GLİOBLASTOMA'DA EKSOZOMA YÜKLÜ SN-38 ve ETOPOZİD İLAÇLARININ
TEDAVİ EDİCİ ETKİLERİNİN EKSOZOM KAYNAKLI miRNA'lar ÜZERİNDEKİ
İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESMANUR NİĞDE

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. RAFİG GURBANOV

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. ALİ TAGHİZADEHGHJALEHJOUGHİ

BİLECİK, 2026

10824700

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**GLİOBLASTOMA'DA EKSOZOMA YÜKLÜ SN-38 ve ETOPOZİD İLAÇLARININ
TEDAVİ EDİCİ ETKİLERİNİN EKSOZOM KAYNAKLI miRNA'lar ÜZERİNDEKİ
İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESMANUR NİĞDE

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. RAFİG GURBANOV

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ALİ TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ

BİLECİK, 2026

10824700

BEYAN

Glioblastoma’da Eksozoma Yüklü SN-38 ve Etoposid İlaçlarının Tedavi Edici Etkilerinin Eksozom Kaynaklı miRNA’lar Üzerindeki İfadesinin Araştırılması başlıklı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazım aşamasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehberine uygun olarak tez/dönem projemi hazırladığımı, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel etik kurallarına uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, çalışmamın herhangi bir kısmının başka bir tez/dönem projesi olarak sunulmadığını, aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Esmanur Niğde

../../2026

İmza:

	YAPAY ZEKÂ KULLANIMINA İLİŞKİN ÖĞRENCİ BEYAN FORMU	BŞEÜ-KAYSİS	DFR-516
		İlk Yayın	30.04.2026/16
		Revizyon Tarihi	00
		Revizyon No.su	00
		Toplam Sayfa	1

Bölüm I. Yapay Zekâ Kullanım Durumu
☒ Bu tezin/projenin yazım süreçlerinde yapay zekâ tabanlı araçlardan faýdalandım .
☐ Bu tezin/projenin yazım süreçlerinde yapay zekâ tabanlı herhangi bir araçtan faýdalanmadım .

Bölüm II. Yapay Zekâ Kullanım Detayları
<i>*Bu bölüm yalnızca yapay zekâ kullanımı beyan edilmiş ise doldurulacaktır. Aksi durumda boş bırakılmalıdır.</i>
Tezinizde/projenizde kullandığınız <u>yapay zekâ araçlarını</u> ve <u>sürümünü</u> listeleyiniz:
ChatGPT- GPT-5.5
Yapay zekâ araçlarını tezin/projenin aşağıdaki aşamalarında ilgili amaçlar için kullandım. (Birden fazla seçenek işaretlenebilir):
☐ Cümle oluşturma ☐ Literatür tarama ☐ Çeviri ☒ Düzenleme/dil kontrolü ☐ Veri işleme ve analizi ☐ Veri görselleştirme ☒ Görüntü üretme ☐ Kaynakça düzenleme ☐ Diğer (Belirtiniz):.....
Bu çalışmada yapay zekâ kullanımı Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber'e ve akademik dürüstlük ilkelerine uygun şekilde gerçekleştirilmiş olup yapay zekâ araçlarından alınan destek, etik kurallar ve kaynak gösterme esaslarına uygun biçimde belirtilmiştir. Yapay zekâ kullanımı, çalışmanın özgünlüğüne, bilimsel etik kurallarına ve ilgili mevzuata aykırı olmayacak biçimde gerçekleştirilmiştir. Usulsüz yapay zekâ kullanımı (örneğin: kaynak göstermeksizin metin üretimi, otomatik içerik üretiminin özgün eser gibi sunulması, yanıltıcı kaynak gösterimi vb.) tarafımdan kesinlikle yapılmamıştır. Yapay zekâ araçlarının sağladığı bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi, yanlış veya eksik bilgi bulunması halinde tüm sorumluluğun tarafıma ait olduğunu; ayrıca çalışmamla ilgili bu beyana aykırı bir durumun herhangi bir zamanda tespit edilmesi durumunda ortaya çıkabilecek akademik ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi beyan ederim.

Esmanur Niğde

../../2026

İmza:

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, akademik gelişimime katkı sağlayan, eleştirileri ve önerileriyle çalışmamın şekillenmesine yardımcı olan değerli danışmanım Doç. Dr. Rafig GURBANOV'a ve kıymetli eş danışmanım Doç. Dr. Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ'ye en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Kendilerinden edindiğim bilimsel bakış açısının ve araştırma disiplininin bundan sonraki akademik hayatımda da bana ışık tutacağına inanıyorum.

Deneyisel çalışmalarım ve laboratuvar süreçlerim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle cömertçe paylaşan, karşılaştığım her güçlükte sabırla yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Sıdika GENÇ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar ortamında bana kazandırdıkları uygulamalı bilgi birikimi ve gösterdikleri özverili yaklaşım, bu çalışmanın sağlıklı bir şekilde yürütülmesinde çok değerli bir yer tutmuştur.

Bu çalışma, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından ÖNAP-2025-712 numaralı proje ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı BAP birimine teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, inancımı kaybettiğim anlarda bana inanmaya devam eden ve attığım her adımda arkamda duran kıymetli babam Muhammet NİĞDE'ye, canım annem Nazlı NİĞDE'ye, sevgili kardeşlerim Şeybenur NİĞDE, Hacer Merve NİĞDE ve Ömer Asaf NİĞDE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca hayatıma dokunan, kimi zaman tek bir cümlesiyle, kimi zaman ise yalnızca sessizce yanımda oluşuyla bana güç veren kıymetli arkadaşım Kübra KARABULUT'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Uzun ve zorlu yolların yalnızca sahip olunan bilgi ve azimle değil, bu yolda insanın yanında yürüyen kıymetli insanların varlığıyla da aşılabildiğini bana gösterdiğin için sana minnettarım.

Son olarak, bu süreçte gösterdiğim sabır, kararlılık ve çaba için kendime de teşekkür etmek istiyorum. Çünkü bazı yollar, dışarıdan yalnızca akademik bir süreç gibi görünse de aslında insanın kendisiyle mücadele ettiği ve her şeye rağmen ilerlemeyi öğrendiği uzun bir yolculuktur. Bu tez, yalnızca bilimsel verilerin ve elde edilen sonuçların değil, aynı zamanda uykusuz gecelerin, tekrar tekrar denenilen deneylerin, belirsizliklerin, tüm bunlara rağmen devam etme iradesinin bir sonucudur.

ÖZET

Glioblastoma (GBM), yüksek proliferatif kapasitesi, invaziv karakteri ve yapısal heterojenitesiyle santral sinir sisteminin en agresif malign tümörüdür. Cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapiden oluşan standart tedaviye rağmen, yüksek nüks oranları ve düşük sağkalım süreleri mevcut yaklaşımların sınırlı etkinliğini ortaya koymaktadır. Bu sınırlılığın temelinde, kan-beyin bariyerinin (KBB) ilaç geçirgenliğini kısıtlaması ve tümör hücrelerinde gelişen direnç mekanizmaları yer almaktadır. Dolayısıyla etkili sitotoksik ajanların KBB'yi aşabilecek taşıyıcı sistemlerle hedefe ulaştırılması kritik bir gereksinimdir. Topoizomerez I inhibitörü SN-38 ve Topoizomerez II inhibitörü etopozid, güçlü antikanser etkiye sahip olmakla birlikte klinik uygulanabilirlikleri uygun taşıyıcı sistemlere bağlıdır. Eksozomlar, yüksek biyouyumlulukları, immün sistemden kaçabilme kapasiteleri ve KBB'yi doğal yollarla geçebilme özellikleriyle umut vadeden nano taşıyıcılar olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca köken aldıkları hücelere özgü mikroRNA içerikleriyle tümör mikroçevresinin aktif düzenleyicisi olarak işlev görürler; eksozomal miRNA'lar hücre döngüsü, apoptoz, inflamasyon ve ilaç direncindeki rolleri nedeniyle önemli biyobelirteç adaylarıdır. Bu tez kapsamında, T-98 ve U373 GBM hücre hatlarından izole edilen eksozomlara SN-38 ve Etopozid yüklenmiş; elde edilen yapıların miRNA profili (miR-142-3p, miR-150-5p, miR-21), hücre canlılığı (MTT, LDH), oksidatif hasar (MDA, KAT), inflamatuvar yanıt (IL-1 β , IL-6, IL-10) ve apoptotik belirteç ekspresyonu (p53, p21, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Kaspaz-3/9) değerlendirilmiştir. Tüm tedavi gruplarında apoptotik etkinlik kontrole göre artmış; en belirgin artış Exo+SN-38+Etopozit (25 μ g/mL) grubunda gözlenmiştir. Aynı grupta pro-apoptotik miRNA düzeyleri en yüksek, onkojenik miR-21 düzeyi ise en düşük düzeyde saptanmıştır. Sonuç olarak, bu kombine yükleme stratejisi GBM hücrelerinde canlılığı azaltmış, oksidatif hasarı ve apoptozu artırmış, onkojenik eksozomal miRNA etkisini baskılamıştır. Bulgular, benzer mekanizmalı ajanların otolog eksozomlara yüklenmesinin GBM tedavisinde umut vadeden bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Eksozom, Etopozid, GBM, SN-38, T-98, U373

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is one of the most aggressive malignant tumors of the central nervous system, characterized by a high proliferative capacity, invasive behavior, and structural heterogeneity. Despite the standard treatment consisting of surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy, high recurrence rates and poor survival outcomes demonstrate the limited efficacy of current therapeutic approaches. The blood–brain barrier (BBB), which restricts drug permeability, and the resistance mechanisms that develop in tumor cells are among the primary factors underlying this limitation. Therefore, the targeted delivery of effective cytotoxic agents using carrier systems capable of crossing the BBB represents a critical therapeutic requirement. Although the Topoisomerase I inhibitor SN-38 and the Topoisomerase II inhibitor Etoposide possess potent anticancer activity, their clinical applicability is closely associated with the development of appropriate drug delivery systems. Exosomes have emerged as promising nanocarriers due to their high biocompatibility, ability to evade immune system recognition, and potential to cross the BBB naturally. In addition, through their cell-of-origin-specific microRNA cargo, exosomes function as active regulators of the tumor microenvironment. Exosomal miRNAs are considered important biomarker candidates due to their roles in fundamental biological processes, including cell cycle regulation, apoptosis, inflammation, and drug resistance. In this thesis, SN-38 and Etoposide were loaded into exosomes isolated from T-98 and U373 GBM cell lines. The effects of the resulting structures were evaluated in terms of miRNA profiles (miR-142-3p, miR-150-5p, and miR-21), cell viability (MTT and LDH), oxidative damage (MDA and CAT), inflammatory response (IL-1 β , IL-6, and IL-10), and the expression of apoptotic markers (p53, p21, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, caspase-3, and caspase-9). Apoptotic activity increased in all treatment groups compared with the control group, with the most pronounced increase observed in the Exo + SN-38 + Etoposide (25 μ g/mL) group. Within the same group, pro-apoptotic miRNA levels were highest, whereas the level of the oncogenic miRNA miR-21 was lowest. In conclusion, this combined loading strategy reduced cell viability, increased oxidative damage and apoptosis, and suppressed the oncogenic effects associated with exosomal miRNAs in GBM cells.

Keywords: Exosome, Etoposide, GBM, SN-38, T-98, U373

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Glioblastoma	2
2.1.1. GBM'nin klinik özellikleri ve moleküler mekanizmaları	3
2.2. GBM'nin Mikroçevresi	4
2.2.1. GMÇ'nin şekillenmesinde rol oynayan mekanizmalar	5
2.3. Eksozomlar	7
2.3.1. GBM kaynaklı eksozomların biyogenezi, mikroçevre ortamına salınması ve hedef hücreyle etkileşimi	8
2.3.2. Eksozom kaynaklı miRNA'lar: Tümör baskılayıcı ve onkomiRNA'lar	11
2.4. Tümör Baskılayıcı miRNA'lar ve Tedaviye Duyarlılık	14
2.4.1. miR-142-3p	14
2.4.2. miR-150-5p	16
2.5. OnkomiRNA ve Tümör Progresyonu ile İlişkisi.....	18
2.5.1. miR-21.....	18
2.6. SN-38 ve Etopozid'in Antikanser Mekanizmaları.....	20
2.6.1. DNA topoizomerazlar: Yapı ve fonksiyon.....	21

2.6.2. SN-38: Etkin metabolit olarak moleküler mekanizmalar	22
2.6.3. Etopozid: topoizomeraz II inhibisyonu	24
2.7. SN-38 ve Etopozid'in Kombine Uygulamaları.....	25
3. MATERYAL ve METOT	29
3.1. Hücre Kültürü	30
3.2. Eksozom İzolasyonu	30
3.3. Eksozom Karakterizasyonu.....	30
3.3.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	31
3.3.2. Zeta potansiyeli	31
3.3.3. Western blot	31
3.4. SN-38 ve Etopozid Antikanser İlaçlarının GBM Kaynaklı Eksozomlara (T-98 ve U373) Kapsüle Edilmesi	32
3.5. İn Vitro Uygulama.....	32
3.5.1. Deney gruplarının oluşturulması	32
3.6. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) Analizi..	33
3.7. İmmünofloresan Boyama Analizi	34
3.8. Real-Time PCR Analizi.....	34
3.8.1. Genetik materyalin elde edilişi	34
3.8.2. Eksozomal miRNA izolasyonu.....	35
3.8.3. Toplam RNA (hücre kaynaklı) izolasyonu	35
3.8.4. Eksozom ve hücre kaynaklı RNA'lardan cDNA sentezi	36
3.8.5. Gen ekspresyonu	36
3.9. ELISA Analizleri	37
3.10 İstatistiksel Analiz.....	38
4. SONUÇLAR	39
4.1. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu	39
4.2. SN-38 ve Etopozid Antikanser İlaçlarının GBM Kaynaklı Eksozomlara Kapsüle	

Edilmesi Sonucu Karakterizasyon Analizi.....	41
4.3. MTT Analizi.....	42
4.4. İmmüno Floresan Boyama.....	45
4.5. RT-qPCR Analizleri.....	48
4.5.1. Eksozomal miR-142-3p gen seviyelerinin sonuçları	49
4.5.2. Eksozomal miR-150-5p gen seviyelerinin sonuçları	50
4.5.3. Eksozomal miR-21 gen seviyelerinin sonuçları.....	51
4.5.4. Hücresel BAX gen seviyesinin analiz sonuçları	52
4.5.5. Hücresel Bcl-2 ve Bcl-xL gen seviyelerinin analiz sonuçları	54
4.5.6. Hücresel kaspaz-3 gen seviyesinin analiz sonuçları.....	56
4.5.7. Hücresel p53 ve p21 gen seviyelerinin analiz sonuçları	57
4.6. ELISA Analiz Sonuçları.....	59
4.6.1. LDH protein seviyesinin sonuçları.....	59
4.6.2. Katalaz ve MDA protein seviyelerinin sonuçları.....	61
4.6.3. IL-1 β , IL-6 ve IL-10 protein seviyelerinin sonuçları	63
4.6.4. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 protein seviyelerinin sonuçları.....	67
5. TARTIŞMA	70
5.1. T-98 ve U373 GBM Hücre Hatları.....	72
5.2. GBM Kaynaklı Eksozomların Karakterizasyonu	72
5.3. Sitotoksikite Analizlerinin (MTT ve LDH) Değerlendirilmesi	74
5.4. Oksidatif Stres Belirteçlerinin (KAT ve MDA) Değerlendirilmesi.....	75
5.5. İnflamasyon Belirteçlerinin (IL-1 β , IL-6 ve IL-10) Değerlendirilmesi	76
5.6. Apoptotik Belirteçlerin (p53, p21, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9) Değerlendirilmesi	77
5.7. Annexin V/FITC-DAPI İmmüno Floresan Boyama Değerlendirmesi	81
5.8. GBM Kaynaklı Eksozomal miRNA Seviyelerinin (miR-142-3p, miR-150-5p ve miR-21) Değerlendirilmesi.....	82

6. SONUÇ	84
KAYNAKÇA	86

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. MiRNA'lar ve hastalıklar üzerine etkileri.....	20
Tablo 2. Deney grupları	33
Tablo 3. Gen primer dizilim listesi	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. GBM hücrelerinin tümör mikroçevresi ile oluşturduğu etkileşim.....	5
Şekil 2. Eksozomların yapısı ve biyogenezi	10
Şekil 3. DNA Topoizomeraz I ve II'nin fonksiyonlarına ait görseldir.....	22
Şekil 4. İrinotekan'ın karaciğerde SN-38'e dönüşüm mekanizmasıdır.	23
Şekil 5. Tez çalışmasına ait grafiksel özet.....	29
Şekil 6. T-98 ve U373 eksozomlarının SEM görüntüsüdür	39
Şekil 7. T-98 ve U373 GBM hücrelerinden izole edilen eksozomların zeta potansiyel sonuçlarıdır.....	40
Şekil 8. T-98 ve U373 GBM hücrelerinden izole edilen eksozomların Western blot sonuçlarıdır.	41
Şekil 9. İlaçların yüklenmesinden sonra T-98 ve U373 GBM eksozomlarının morfolojik özelliklerini ve boyutlarını belirlemek için elde edilen SEM görüntüsüdür	41
Şekil 10. GBM hücrelerinden izole edilen eksozomlara SN-38 ve Etopozid kombine antikanser ilaç yüklemesi sonrası oluşan zeta potansiyel sonuçlarıdır	42
Şekil 11. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkileri.....	44
Şekil 12. T-98 (A) ve U373 (B) hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının 72 saatlik uygulama sonrasında Annexin V-FITC/PI ve DAPI boyamaları ile apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi	48
Şekil 13. Eksozoma yüklü SN-38 ve Etopozid tedavilerinin GBM hücrelerinde eksozomal miR-142-3p ekspresyon düzeyine etkisi	49
Şekil 14. Eksozoma yüklü SN-38 ve Etopozid tedavilerinin GBM hücrelerinde eksozomal miR-150-5p ekspresyon düzeyine etkisi	50
Şekil 15. Eksozoma yüklü SN-38 ve Etopozid tedavilerinin GBM hücrelerinde eksozomal miR-21 ekspresyon düzeyine etkisi.....	51
Şekil 16. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde BAX gen düzeyleri üzerine etkisi.	53
Şekil 17. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde Bcl-2 gen düzeyleri üzerine etkisi	54
Şekil 18. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde Bcl-xL gen düzeyleri üzerine etkisi.....	55
Şekil 19. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde Kaspaz-3 gen düzeyleri üzerine etkisi.....	56
Şekil 20. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde p53 gen düzeyleri üzerine etkisi	57
Şekil 21. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde p21 gen düzeyleri üzerine etkisi.....	58

Şekil 22. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının LDHA üzerine etkileri ...	60
Şekil 23. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının KAT üzerine etkileri.	61
Şekil 24. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının MDA üzerine etkileri	62
Şekil 25. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının IL-1 β üzerine etkileri	64
Şekil 26. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının IL-6 üzerine etkileri	65
Şekil 27. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının IL-10 üzerine etkileri	66
Şekil 28. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının Kaspaz-3 üzerine etkileri	67
Şekil 29. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkileri	68

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Ang-2: Anjiyopoietin-2

BCA: Bicinchoninic acid

KAT: Katalaz

cDNA: Komplementer DNA

CDKN2A: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ECL: Geliştirilmiş kemilüminesans

ECM: Ekstraselüler Matriks

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EV: Ekstraselüler Vezikül

FBS: Fetal bovin serum

GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz

GBM: Glioblastoma

GMÇ: Glioblastoma Mikroçevresi

HDM: Hücre Dışı Matriks

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

HIF-1 α : Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 Alfa

IL: İnterlökin

KBB: Kan-Beyin Bariyeri

LDH: Laktat dehidrogenaz

MDA: Malondialdehit

MDA-MB-231: Üçlü negatif insan meme kanseri hücre hattı

MDM2: Mouse Double Minute 2

MiRNA: mikroRNA

mRNA: Mesajcı RNA

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

OS: Genel sağkalım

PBS: Fosfat tamponlu salin

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PD-L1: Programmed Death Ligand-1

PI3K: Fosfatidilinozitol 3-kinaz

RT-qPCR: Gerçek zamanlı kantitatif ters transkripsiyon PCR

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

SSS: Santral Sinir Sistemi

TİF: Tümör İlişkili Fibroblast

TİM: Tümör İlişkili Makrofaj

TMÇ: Tümör Mikroçevresi

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Glioblastoma (GBM), santral sinir sisteminde proliferasyon kapasitesinin yüksek olması, invazyon yeteneğinde artış ve yapısal heterojenitesi ile tanımlanan en malign kanser türlerinden biridir (Delgado-Martin & Medina, 2020). Günümüzde GBM tedavisinde güvenilirlik açısından sıklıkla tercih edilen cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları terapötik yöntemler olarak kullanılır. Ancak tedavi sırasında ya da tedavi sonrasında hastaların büyük bir kısmında kısa süre içinde tümör tekrarı gözlenmekte ve sağkalım oranları düşmektedir (Anjum et al., 2017). GBM tedavisinin en önemli zorluklarından biri kullanılan antikanserlerin KBB'yi geçememesidir (Da Ros et al., 2018). Bu durum, mevcut tedavi yaklaşımlarının GBM tedavisinin yeterince hedeflenemediğini ve yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. KBB'nin yanı sıra, tümör hücrelerinde aktive olarak hücrenin ölümünü engelleyen DNA onarım mekanizmaları, anti-apoptotik sinyal yolları ve çoklu ilaç direnç proteinleri kemoterapiye karşı direnç gelişimini oluşturmaktadır. GBM tedavileri için kullanılan kemoterapötiklerin etki mekanizmaları DNA alkilasyonu, PD-L aktivatörleri, topoizomerazlar, platin tabanlı toksik ajanlar, anjiyogenezde etkili olan ve apoptozu tetikleyen ajanlar olarak sınıflandırılmıştır. Söz konusu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada kanser hücresi proliferasyonunun engellenmesi, nöronal hasarın azaltılması, hasta sağkalımının ve yaşam kalitesinin artırılması ile tümör regresyonunun sağlanması hedeflenerek Topoizomeraz-I inhibitörü SN-38 ve Topoizomeraz-II inhibitörü etopozid monoterapi ve kombinasyon şeklinde değerlendirilmiştir (Birandra K Sinha, 1995). Fakat bu iki antikanser bileşiğin yüksek sitotoksik potansiyeline karşın, sistemik kullanımda ortaya çıkan düşük hedeflenme kapasitesi ve sistemik toksisite, GBM tedavisindeki klinik başarıyı kısıtlamaktadır. Dolayısıyla, tez çalışmasının diğer bir hedefi SN-38 ve Etopozid'in terapötik etkinliğinin artırılması ve advers etkilerinin en aza indirilmesi oluşturmaktadır.

GBM, kanserlere ulaşabilmek için ilk savunma sistemi olarak beyin bariyerini oluşturur. Beyin bariyerini geçtikten sonra tümörün mikroçevresi yer almaktadır. Mikroçevrede kanser hücreleri ile yanlarındaki stromal hücreler, immün hücreler, endotel hücreleri, perisitler, astrositler, mikrogliya, ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri ve çözünür mediyatörler yer almaktadır. Bu mikroçevre, tümör gelişimi ve progresyonunda aktif rol oynayan biyolojik bir ekosistem olarak kabul edilmektedir. Bu ekosistemde yer alan aktif bileşenlerin iletişim araçları sitokinler, büyüme faktörleri ve EV'lerdir. Özellikle son yıllarda, hücreler tarafından salgılanan ve biyolojik olarak aktif proteinler, lipidler, DNA, mRNA ve mikroRNA (miRNA) gibi çeşitli molekülleri taşıyan eksozomların tümör mikroçevresinin düzenlenmesinde kritik bir rol

oynadığı gösterilmiştir (Hessvik & Llorente, 2018). Eksozomların içeriğinde, köken aldıkları hücreye ait DNA, RNA ve protein gibi biyolojik molekülleri taşıyabilmesi sebebiyle günümüz çalışmalarında yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemler için umut vadeden hedef haline gelmiştir (Wang et al., 2021). Eksozomlar, hücresel membran yapıları ile yüksek biyouyumluluk sergileyerek immün sistemden kaçabilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca, nano boyutta olmaları nedeniyle biyolojik bariyeri olan KBB'yi aşabilme yetenekleri onları özellikle santral sinir sistemi hastalıklarında etkili taşıyıcılar haline getirmektedir. Eksozomların bu özelliğinden hareketle, çalışmada yer alan SN-38 ve Etopozid'in daha önce değinilen olumsuzluklarını ortadan kaldırmak amacıyla söz konusu nanoveziküllere yükleme yapılmıştır (Davis, 2016).

SN-38 ve etopozid yüklü eksozomların antikanser etkilerinin monitörize edilmesi için miRNA profilinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Kanserli hücrelerden salınan eksozomların biyolojik etkilerinin önemli bir kısmı, taşıdıkları miRNA'lar aracılığıyla gerçekleşmektedir. miRNA'lar, hedef mRNA'ların translasyonunu değiştirerek gen ekspresyonunu düzenleyen küçük kodlamayan RNA molekülleri olup hücre döngüsü, apoptoz, DNA hasar yanıtı ve ilaç direnci gibi süreçlerde kritik rol oynamaktadır (Aili et al., 2021). Bu miRNA'ların tümör mikroçevresinin yeniden şekillenmesinde ve tedaviye verilen yanıtın belirlenmesinde rol oynadıkları tespit edilmiştir. Kemoterapötik ajanlarla yüklenmiş eksozomların miRNA ekspresyon profilleri üzerindeki etkilerinin sistematik olarak incelendiği çalışmalar sınırlı kalmaktadır (Campos et al., 2021). Bu tez çalışmasında, antikanser ilaçların doğrudan sitotoksik etkilerinin yanı sıra tümör mikroçevresinin yeniden şekillendirilmesinin kanserin sınırlandırılmasında önemli bir rol oynayabileceği öngörülmüştür. Bu doğrultuda, eksozom yüklü SN-38 ve Etopozid'in etkilerini değerlendirmek amacıyla miR-142-3p, miR-150-5p ve miR-21 düzeyleri ile oksidatif stres, inflamasyon, p53, p21 ve apoptoz biyobelirteçleri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Glioblastoma

GBM, santral sinir sistemi (SSS) tümörleri arasında en agresif malign tümörlerden biridir. GBM, malign primer beyin ve diğer SSS tümörlerinin yaklaşık yarısını oluşturur (Ostrom et al., 2016; Wirsching & Weller, 2016). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 10.000'den fazla yeni GBM olgusu tanı almaktadır. GBM her yaş grubunda görülebilir. Ancak ortalama tanı yaşı 64 olup, erkeklerde kadınlara göre 1,5 kat daha fazla gözlenmektedir (Ostrom et al., 2016; Tamimi & Juweid, 2017). İnsidans oranının son 20 yılda radyolojik tanı

yöntemlerinin gelişmesiyle beraber arttığı tespit edilmiştir. GBM tanısı alan hastalarda medyan genel sağkalım yaklaşık 15 aydır (Grochans et al., 2022; Louis et al., 2021).

2.1.1. GBM'nin klinik özellikleri ve moleküler mekanizmaları

GBM'de semptomlar genellikle tümörün yerleşimine bağlı olarak değişir. Hastalarda en sık baş ağrısı, focal nörolojik defisit ve baş dönmesi görülür. Bunların yanında bulantı, kusma ve nöbetler de diğer sık görülen semptomlar arasındadır (McKinnon et al., 2021). Epileptik nöbetler, özellikle kortikal tutulumun olduğu durumlarda hastalığın ilk klinik bulgusu olarak ortaya çıkabilmektedir. Özellikle 64 yaş ve üzerindeki hastalarda davranışsal değişiklikler genç hastalara göre daha sık görülmektedir (Chakrabarti et al., 2005; Clarke, 2005; Tan et al., 2020).

GBM, yalnızca makroskopik olarak görülebilen ve sınırları net bir kanser tipi değildir. Tümör sağlıklı beyin dokusuna mikroskobik düzeyde infiltre olma eğilimi göstermektedir. Bu infiltratif özellik, tümörün anatomik sınırlarının net olarak belirlenmesini güçleştirmekte ve cerrahi rezeksiyonun çoğu durumda tam olarak gerçekleştirilememesine neden olmaktadır (Adamson et al., 2009; Tan et al., 2020). Cerrahi sınırlar içerisinde kalmış gibi görünen rezeksiyonlara rağmen, beyin parankimi içerisinde kalan invaziv tümör hücreleri, tedavi sonrası gelişen lokal nükslerin başlıca kaynağını oluşturmaktadır (Hanif et al., 2017). Ayrıca GBM'nin hücresel ve moleküler düzeyde belirgin heterojenite sergilediği bilinmektedir. Aynı tümör dokusu içerisinde farklı genetik ve fenotipik özelliklere sahip hücre popülasyonlarının bulunması, tedaviye verilen yanıtın yetersiz olmasına ve dirençli klonların gelişmesine neden olmaktadır (Neftel et al., 2019; Vanderbeek et al., 2018).

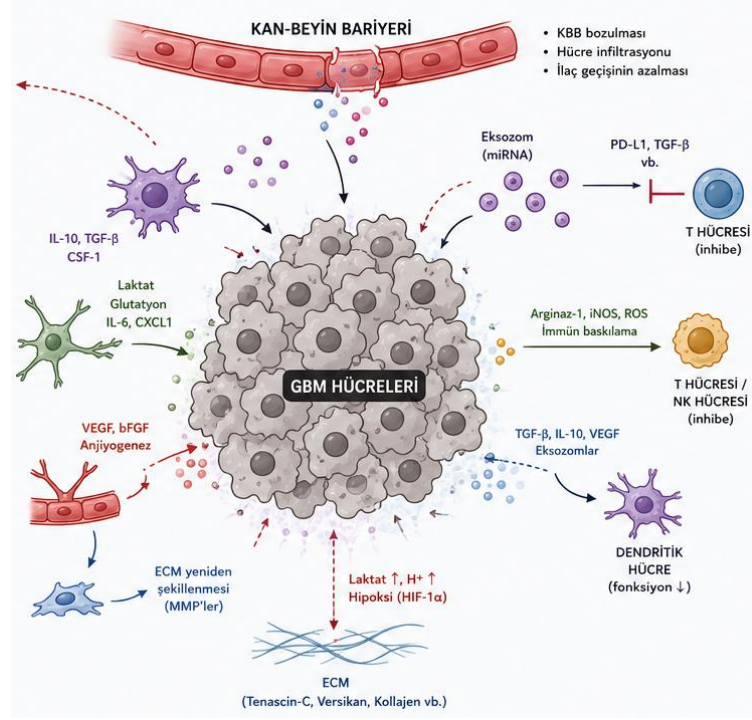
GBM'nin moleküler mekanizmaları incelendiğinde, agresif biyolojik davranışının çok sayıda genetik ve epigenetik değişikliklerle ilişkili olduğu görülmektedir. Güncel WHO sınıflandırmasında glioblastoma, IDH-yabanıl tip, CNS WHO derece 4 olarak tanımlanmaktadır; daha önce sekonder GBM olarak adlandırılan IDH-mutant tümörler ise astrositom, IDH-mutant, CNS WHO derece 4 kapsamında sınıflandırılmaktadır (Kleihues & Ohgaki, 1999). Primer ve sekonder formlar bazı moleküler farklılıklar gösterse de aynı yollar üzerinden etkilendiklerinden ve mevcut standart tedaviye benzer şekilde yanıt verdiklerinden, nihai sonuç hemen hemen aynıdır. Primer GBM yaygın form olarak (yaklaşık %95) yaşlı hastalarda daha sık görülmektedir (Ohgaki & Kleihues, 2013). Sekonder GBM'nin ise zaman içinde daha düşük dereceli bir gliomanın moleküler ilerlemesi ve malignite derecesinin artmasının bir sonucu olduğu öne sürülmüştür (Louis, 2006; Louis et al., 2016; Molinaro et al., 2020). Bu tümörlerde MDM2 amplifikasyonu, PTEN mutasyonları ve CDKN2A homozigot delesyonu gibi moleküler değişiklikler bildirilmiştir. MDM2, p53 proteinini negatif yönde

düzenleyen bir proteini kodlar (Kanzawa et al., 2003; Koul, 2008). Tümör hücrelerinde görülen bu anormalliklerin öncelikle iki ana hücresel sistemin büyüme faktörü aracılı sinyal yolları ve hücre döngüsünün anormal düzenlenmesine yol açarak hücre proliferasyonu, apoptoz inhibisyonu, invazyon ve anjiyogenezde kritik rol oynadıkları yaygın olarak gösterilmiştir (Quail & Joyce, 2017).

GBM biyolojisinde tümör mikroçevresi de önemli rol oynamaktadır. Tümör mikroçevresi bileşenleri ve intratümöral hipoksi (düşük oksijen seviyesi) GBM progresyonunda önemli rol oynamaktadır (Sharma et al., 2023). Mikroçevrede hipoksi ile indüklenen faktör 1 alfa (HIF-1 α), anjiyogenez, glikolitik metabolizma ve invazyonla ilişkili genlerin ekspresyonunu artırmaktadır. Bu durum, tümörün hem büyümesini desteklemekte hem de radyoterapi ve kemoterapiye karşı direnç gelişimini kolaylaştırmaktadır (Oliver et al., 2009). GBM mikroçevresi, tümörle ilişkili makrofajlar, mikrogial hücreler, anormal vasküler yapılar ve ekstraselüler matriks bileşenlerinden oluşan dinamik bir yapı sergilemektedir. Bu mikroçevresel bileşenler, tümör hücrelerinin invazyonunu kolaylaştırmakta ve immün kaçış mekanizmalarını desteklemektedir (Quail & Joyce, 2017). Dolayısıyla GBM, yalnızca genetik alterasyonlarla değil, aynı zamanda mikroçevre ile kurulan karmaşık etkileşimler aracılığıyla da progresyon göstermektedir.

2.2. GBM'nin Mikroçevresi

GBM mikroçevresi (GMÇ), stromal hücreler, immün hücreler, endotel hücreleri, perisitler, astrositler, mikrogia, hücre dışı matriks (HDM) bileşenleri ve çözünür mediyatörler arasındaki dinamik etkileşimlerle şekillenen karmaşık bir sistemdir. Bu mikroçevre, tümör gelişimi ve progresyonunda aktif rol oynayan biyolojik bir ekosistem olarak kabul edilmektedir. GBM hücreleri, doku homeostazını tümör destekleyici bir fenotipe dönüştürmek amacıyla çevresindeki stromal hücrelerle simbiyotik bir ilişki kurar. GBM mikroçevresindeki çift yönlü iletişim; aralık bağlantıları (gap junctions), tünelleyen nanotüpler, ekstraselüler veziküller, sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve metabolitler aracılığıyla sağlanmaktadır. (Broekman et al., 2018).



Şekil 1. GBM hücrelerinin tümör mikroçevresi ile oluşturduğu etkileşim.

2.2.1. GMÇ'nin şekillenmesinde rol oynayan mekanizmalar

GMÇ, bağ dokusu, immün sistem ve vasküler yapılardan HDM'ye kadar birçok hücre ve hücre dışı unsurun dinamik etkileşiminden meydana gelir. Bu karmaşık mikroekosistem, tümör hücreleriyle çift yönlü iletişim kurarak tümörün invazivliğini, direnç mekanizmalarını ve yeniden oluşma kapasitesini doğrudan etkiler (Read et al., 2024; Tataranu et al., 2024). Bu kompleks yapılardan bir tanesi olan bağ dokusu bileşenleri arasında, özellikle tümörle ilişkili fibroblastlar (TİF) dikkat çekmektedir. GBM her ne kadar beyin parankiminden kaynaklansa da, TİF-benzeri hücreler bu tümörlerde de saptanmış ve stromal yapılaşma, HDM sentezi ve tümör hücrelerine büyüme faktörü salımı gibi işlevlerle tümöral progresyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Bu hücreler, özellikle TGF- β , PDGF ve IL-6 gibi faktörler aracılığıyla tümör hücrelerinin göç ve invazyon yeteneğini stimüle eder (Faisal et al., 2022). HDM, GMÇ'nin temel bileşenlerinden biridir ve glioma hücreleri için hem fiziksel bir zemin hem de biyokimyasal sinyal kaynağı olarak işlev görür. GBM'de HDM bileşimi, normal beyinden önemli ölçüde farklıdır. Özellikle tenaskin-C, fibronektin, brevikan ve versikan gibi HDM proteinlerinin artmış ekspresyonunun hücre adezyonunun azalmasına, motilitenin artmasına ve kemoterapiye dirençli fenotip gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Erices et al., 2023).

İmmün hücreler, GBM mikroçevresinin en dinamik ve tartışmalı unsurlarından biridir. Tümör, immün sistemi baskılayan bir ortam yaratarak immün kaçış mekanizmalarını aktif hale getirir. GBM mikroçevresinde mikroglialar, tümörle ilişkili makrofajlar (TİM) ve sınırlı sayıda

T hücresi bulunur. TİM'ler çoğunlukla M2-polarize fenotipte olup, immün supresif sitokinlerin (örneğin: IL-10, TGF- β) üretimini artırır ve T-hücre aktivasyonunu inhibe eder. Bu da hem tümör büyümesini destekler hem de immünoterapiye daha zayıf bir yanıt verilmesiyle sonuçlanır (Chen & Hambardzumyan, 2018). GMÇ'deki bu hücrel ve yapısal bileşenler, sadece pasif destek sunmakla kalmaz; aynı zamanda GBM'nin fenotipini şekillendiren aktif katılımcılardır. İmmün baskılanma, stromal aktivasyon ve HDM'nin yeniden yapılanması gibi süreçler, tümörün evrimsel olarak avantajlı alt klonlarının seçilimini kolaylaştırır (Friebel et al., 2020; Marino et al., 2023). Bu nedenle GMÇ, hem hedeflenmesi gereken bir terapötik odak hem de tümör biyolojisini anlamada kritik bir parametredir.

GBM mikroçevresinin en önemli immün kaçış mekanizmalarından biri immün kontrol noktası moleküllerinin aşırı ekspresyonudur. Bu mekanizmalar fizyolojik koşullarda aşırı immün yanıtı önleyerek immün homeostazın korunmasında görev alırken, GBM hücreleri bu düzenleyici yolları kendi lehine kullanarak antitümör immün yanıtı baskılamaktadır (Lim et al., 2018). Özellikle programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1), glioblastoma hücreleri, glioma kök hücreleri, TİM, mikroglialar ve bazı endotel hücreleri tarafından yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Klinik çalışmalar, yüksek PD-L1 ekspresyonunun artmış tümör derecesi, daha kötü prognoz ve kısa genel sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermektedir. GBM'de PD-L1 ekspresyonu tümör mikroçevresindeki çeşitli sinyal yollarından etkilenmektedir. Özellikle hipoksik bölgelerde stabilize olan HIF-1 α , PD-L1 gen promotörüne bağlanarak transkripsiyonunu doğrudan artırmaktadır (Feldman, 2024). Bunun yanı sıra IFN- γ , IL-6/JAK/STAT3, PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK ve NF- κ B sinyal yollarının aktivasyonu da PD-L1 ekspresyonunun artmasına katkı sağlamaktadır. STAT3, hem PD-L1 ekspresyonunu artırmakta hem de immün baskılayıcı sitokinlerin sentezini uyararak tümör mikroçevresinde güçlü bir immünoşüpresif ağ oluşturmaktadır (Garcia-Diaz et al., 2017). Böylece hipoksi ve inflamasyonun birlikte etkisiyle gelişen pozitif geri besleme döngüsü, PD-L1 düzeylerinin sürekli yüksek kalmasını sağlamaktadır (Berghoff et al., 2015).

GBM mikroçevresinin temel bileşenlerinden bir diğeri vasküler yapıdır. GBM, solid tümörler arasında en yüksek anjiyojenik kapasiteye sahip malignitelerden biri olup, hızlı tümör büyümesine bağlı gelişen hipoksi yeni damar oluşumunu sürekli olarak tetiklemektedir (Jain et al., 2007). Hipoksik bölgelerde stabilize olan HIF-1 α , başta vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) olmak üzere anjiyopöietin-2 (Ang-2), stromal kaynaklı faktör-1 (SDF-1/CXCL12) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi proanjiyojenik moleküllerin ekspresyonunu artırmaktadır (Feldman, 2024). VEGF'nin VEGFR-2 reseptörüne bağlanması, PI3K/Akt,

MAPK/ERK ve PLC γ sinyal yollarını aktive ederek yeni kapiller tomurcuklanmasını uyarırken, damar geçirgenliğini de önemli ölçüde artırmaktadır. Bunun sonucunda gelişen tümör damarları düzensiz dallanma, kalınlaşmış bazal membran, yetersiz perisit desteği ve yapısal olgunlaşma kusurları göstermekte ve kan-beyin bariyerinin bozulmasına neden olmaktadır (Koch & Claesson-Welsh, 2012). Bu anormal vasküler mimari, tümör dokusunda düzensiz kan akımı oluşturarak kronik hipoksinin devam etmesine neden olur ve HIF-1 α –VEGF eksenini besleyen pozitif geri bildirim döngüsünü sürdürür. Ayrıca bozulmuş kan-beyin bariyeri, plazma proteinlerinin yayılmasına ve interstisyel sıvı basıncının artmasına yol açarak terapötik ajanların tümör dokusu içerisine homojen dağılmasını sınırlar ve tedavi etkinliğini azaltır (Bayona et al., 2026). Vasküler endotelial hücreler yalnızca damar oluşumunda görev almakla kalmayıp, salgıladıkları IL-6, CXCL8, TGF- β ve çeşitli büyüme faktörleri aracılığıyla glioblastoma hücreleri, glioma kök hücreleri ve TİM’ler ile karşılıklı etkileşim kurmaktadır. Bu sinyalleşme ağı, tümör hücrelerinde proliferasyon, invazyon, kök hücre fenotipinin korunması ve immün baskılanmanın sürdürülmesini desteklemektedir (Faisal et al., 2022).

Son yıllarda elde edilen bulgular, GBM mikroçevresinde gerçekleşen immün baskılanma, stromal yeniden yapılanma, anjiyogenez, invazyon ve tedavi direnci gibi birçok biyolojik sürecin yalnızca hücreler tarafından salgılanan çözünür sitokin ve büyüme faktörleri ile değil, aynı zamanda hücre dışı veziküller ve özellikle eksozomlar aracılığıyla da düzenlendiğini ortaya koymuştur (Indira Chandran et al., 2024). Kanser kaynaklı eksozomlar; miRNA, mRNA, lncRNA, DNA parçacıkları, proteinler, lipidler, enzimler ve çeşitli biyoaktif molekülleri taşıyarak tümör hücreleri ile mikroglialar, tümör ilişkili makrofajlar, astrositler, endotelial hücreler, perisitler ve diğer stromal hücreler (mikroçevreyi oluşturan tüm hücre elemanları) arasında çift yönlü bir iletişim ağı kurarak, GMC’nin bağ dokusu, immün ve vasküler bileşenlerini etkilemektedir (Erices et al., 2023).

2.3. Eksozomlar

Eksozomlar, ilk olarak 1980’li yılların başında olgunlaşmakta olan retikülositlerden salınan küçük veziküller olarak tanımlanmış ve bu yapılar başlangıçta hücrel artıkların uzaklaştırılmasına hizmet eden pasif “atık taşıyıcıları” olarak değerlendirilmiştir (Zhang et al., 2020). Nitekim Rose Johnstone ve çalışma arkadaşları, 1987 yılında multiveziküler cisimciklerin plazma membranı ile füzyonu sonucu bu veziküllerin hücre dışına salındığını göstererek eksozom kavramını literatüre kazandırmıştır (Johnstone, 2005). 2000’li yıllarla birlikte eksozomların yalnızca protein değil, aynı zamanda mRNA ve özellikle miRNA gibi fonksiyonel nükleik asitleri taşıyabildiğinin gösterilmesi, bu veziküllere ilişkin paradigmayı

köklü biçimde değiştirmiştir. Günümüzde eksozomların yalnızca hücrel atıkların uzaklaştırılmasında değil, hücreler arası moleküler bilgi aktarımında ve hedef hücre fenotipinin düzenlenmesinde de rol oynadığı gösterilmiştir (Yu et al., 2016). Kanser hücrelerinden salınan eksozomların tümör mikroçevresinin yeniden düzenlenmesi, ilaç direnci, immün baskılanma ve anjiyogenez gibi süreçlerde aktif rol oynadıkları gösterilmiştir. Ayrıca eksozomlar düşük immünojenisite, biyolojik bariyerleri aşabilme yeteneği ve hedef hücrelere özgül moleküler yük taşıyabilme kapasiteleriyle tanımlanmaktadır (Fang et al., 2022).

2.3.1. GBM kaynaklı eksozomların biyogenezi, mikroçevre ortamına salınması ve hedef hücreyle etkileşimi

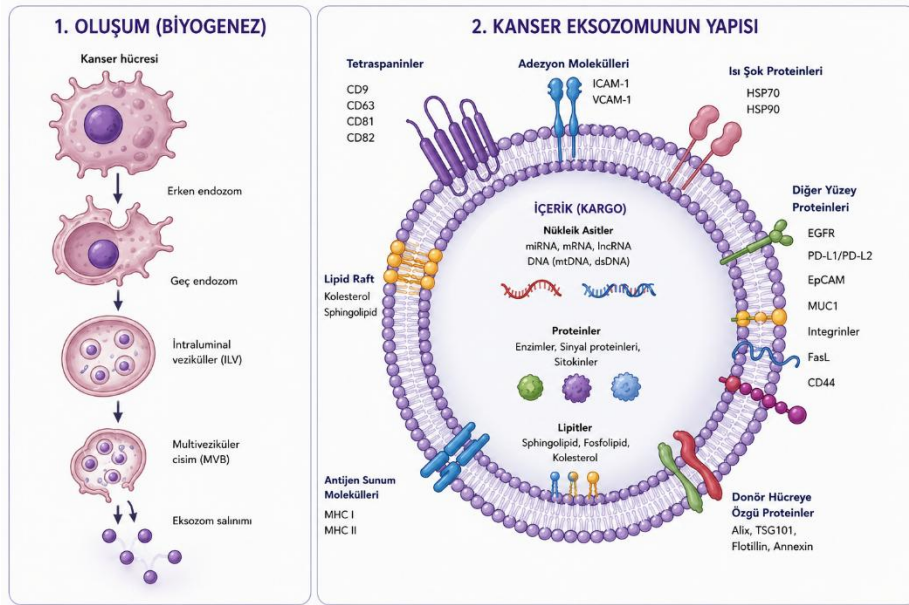
Yapısal olarak eksozomlar, fosfolipit çift tabakalı bir membranla çevrili olup çapları genellikle 30–150 nm arasındadır. Membran yapıları, tetraspaninler (CD9, CD63, CD81), integrinler ve adezyon molekülleri gibi yüzey proteinleri içerirken, iç kısımlarında sitozolik proteinler, enzimler, mRNA, miRNA, DNA fragmentleri ve çeşitli metabolitler bulunmaktadır (Raghu Kalluri & Valerie S LeBleu, 2020; Krylova & Feng, 2023; Schorey & Bhatnagar, 2008).

Eksozomlar, endozomal sistem kökenli olup biyogenezi hücre içi membran dinamikleri ile yakından ilişkili, çok basamaklı ve yüksek düzeyde düzenlenmiş bir süreç sonucunda oluşmaktadır (Han et al., 2022). Bu süreç, erken endozomların olgunlaşarak geç endozomlara ve ardından multiveziküler cisimciklere (MVB) dönüşmesiyle başlar. MVB oluşumu sırasında endozomal membranın içe doğru kıvrılması ile intraluminal veziküller (ILV) meydana gelir; bu ILV'ler daha sonra MVB'nin plazma membranı ile füzyonu sonucunda hücre dışına salınarak eksozomları oluşturur (Şekil 2) (Stoorvogel et al., 2002; Zhang et al., 2019).

Eksozomlar çok sayıda hücre tipi tarafından salgılanabilmekle beraber tümör hücrelerinden köken alanlar biyolojik özellikleri bakımından normal hücre eksozomlarından belirgin şekilde farklılık göstermektedir (R. Kalluri & V. S. LeBleu, 2020). Özellikle GBM hücrelerinden salınan eksozomlar, tümör büyümesi, invazyon, anjiyogenez, immün baskılanma ve tedavi direnci gibi birçok patolojik süreci düzenleyen biyolojik taşıyıcılar olarak kabul edilmektedir (Indira Chandran et al., 2024). GBM eksozomları, biyolojik membran yapıları sayesinde içeriklerini enzimatik degradasyondan koruyarak hedef hücrelere iletebilmektedirler. Membran yapıları başlıca kolesterol, sfingomiyelin, seramid, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin ve glikosfingolipitlerden oluşmaktadır (Record et al., 2011). Bu lipid bileşimi eksozomların yüksek stabilite kazanmasını sağlarken, dolaşımda uzun süre kalmalarına ve kan-beyin bariyerini geçebilmelerine katkıda bulunmaktadır. GBM eksozomlarının membranında ayrıca karakteristik yüzey proteinleri bulunmaktadır (Ramos-

Zaldivar et al., 2022). Yaygın kullanılan ekstraselüler vezikül belirteçleri arasında CD9, CD63, CD81, TSG101 ve ALIX yer almaktadır. Ayrıca GBM kaynaklı ekstraselüler veziküllerde bulunabilen EGFR, EGFRvIII, PD-L1 ve bazı integrinler gibi moleküller vezikül yüzeyinde taşınabilmektedir. Bu proteinler, tümör mikroçevresinin yeniden şekillenmesinde ve tümör hücrelerinin çevre dokularla etkileşiminde önemli roller üstlenmektedir (Osti et al., 2019; Ricklefs et al., 2018).

GBM hücrelerinden salgılanan eksozomlar: haberci RNA (mRNA), miRNA, uzun kodlamayan RNA (lncRNA), dairesel RNA (circRNA), ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) parçaları, çift iplikli genomik DNA (dsDNA), mitokondriyal DNA (mtDNA), proteinler, enzimler, transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, lipidler ve çeşitli metabolitleri taşıyabilmektedir (Şekil 2) (Thery et al., 2018). Bu biyomoleküller hedef hücrelere aktarıldığında gen ekspresyonunu, sinyal iletim mekanizmalarını ve hücrel metabolizmayı yeniden programlayarak tümör progresyonunu destekleyen birçok biyolojik süreci düzenlemektedir. GBM eksozomlarının RNA yükü içerisinde en yoğun araştırılan moleküller miRNA'lardır (Aili et al., 2021). GBM eksozomlarında taşınan miRNA'lar yalnızca tümör hücreleri arasındaki iletişimi sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda mikrogliya, astrositler, endotelial hücreler, perisitler ve immün hücreler gibi tümör mikroçevresindeki birçok hücre tipinin gen ekspresyonunu ve hücrel sinyal yollarını düzenleyerek bu hücrelerin işlevlerini değiştirebilmektedir (Aili et al., 2021; Marangon & Lecca, 2023). Bu nedenle eksozomal miRNA'lar glioblastomanın agresif biyolojisinin oluşmasında temel düzenleyiciler arasında kabul edilmektedir.



Şekil 2. Eksozomların yapısı ve biyogenezi. **1.** Eksozom biyogenezinin şematik anlatımıdır. **2.** Kanser eksozomlarının yapısını oluşturan moleküllerin şematik görüntüsüdür.

GBM kaynaklı eksozomların üretiminin en iyi bilinen mekanizması, “Endosomal Sorting Complex Required for Transport” (ESCRT) sistemidir. ESCRT makinesi, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III olmak üzere dört ana protein kompleksinden ve yardımcı proteinlerden (örneğin VPS4, ALIX) oluşmaktadır (Colombo et al., 2013; Kim et al., 2022). Bu kompleksler ardışık şekilde çalışarak hem kargo seçimini hem de membran şekillenmesini düzenler (Kenific et al., 2021). ESCRT sistemiyle oluşan eksozomlar, multiveziküler cisimciklerin plazma membranıyla birleşmesi sonucunda hücre dışına salınmaktadır. Eksozomların kargo seçimi ve hedef hücrelerle etkileşimi düzenlenmiş biyolojik süreçlerden etkilenebilmektedir.

Geleneksel olarak hücreler arası iletişim, komşu hücreler arasında doğrudan temas mekanizmaları ve uzak hücreler arasında ise çözünür sinyal molekülleri aracılığıyla sağlanmaktadır (Maia et al., 2018). Hücre-hücre teması, aralık bağlantıları ve hücre yüzeyindeki protein-protein etkileşimlerini içerirken, uzun mesafeli iletişim hormonlar, sitokinler ve çeşitli kimyasal medyatörler yoluyla gerçekleşmektedir. Ayrıca nükleotidler, lipitler ve kısa peptitler gibi elektriksel ve kimyasal sinyaller de bu iletişim ağının önemli bileşenleri arasında yer almaktadır (Bang & Thum, 2012). Bununla birlikte, son yıllarda eksozomların hücreye özgü protein, lipit ve nükleik asit içeriği taşıyarak yeni ve özgün bir hücreler arası iletişim mekanizması oluşturduğu kabul edilmektedir. Bu yaklaşım, kaynak hücrelerden salınan eksozomların hedef hücrelerle etkileşime girerek onların davranışlarını ve fenotipik özelliklerini değiştirebildiğini ortaya koyan bulgulara dayanmaktadır (Camussi et al., 2010).

Eksozom aracılı iletişimin etkinliği, taşınan biyolojik yükün hedef hücelere başarılı bir şekilde aktarılmasına bağlıdır. Bu aktarım, reseptör-ligand etkileşimleri, eksozom membranının hedef hücre membranı ile doğrudan füzyonu veya endositoz yoluyla hücre içine alınma mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. Hücre içine alındıktan sonra eksozomlar endozomal sistemle etkileşime girerek içeriklerini sitoplazmaya bırakabilir ve bu sayede yatay genetik bilgi transferi sağlanır (Xie et al., 2022). Eksozomların taşıdığı biyoaktif moleküller, hedef hüceleri çeşitli yollarla etkileyebilmektedir: yüzey ligandları aracılığıyla doğrudan hücrel sinyalleme başlatma, aktive reseptörlerin alıcı hücelere transferi ve protein, lipid ile RNA taşınması yoluyla hücrel ve epigenetik yeniden programlama bu mekanizmalar arasında yer almaktadır (Hosseini et al., 2016). Bu çok yönlü etkileşimler, eksozomların hem yakın hem de uzak hücelere özgül ve etkili bir iletişim kurabilmesine olanak tanımaktadır (Gross, 2021).

2.3.2. Eksozom kaynaklı miRNA'lar: Tümör baskılayıcı ve onkomiRNA'lar

Kanser kaynaklı eksozomlar; VEGF, EGF, FGF, insülin benzeri büyüme hormonu, sitokinler, DNA fragmentleri, mRNA'lar ve miRNA'lar gibi farklı biyolojik maddelerin iletildiği rapor edilse de, tümör gelişimi ve progresyonu aşamalarında hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı roller miRNA'lar aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Whiteside, 2016a, 2016b). Tümör kaynaklı eksozomal miRNA'ların anjiyogenezi teşvik ettiği, epitel-mezenkimal geçişi (EMG) indüklediği ve metastatik potansiyeli artırdığı gösterilmiştir (Kim et al., 2020; Qin et al., 2016). Bu miRNA'lar, hedef hücelerde tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inhibe ederek proliferasyon, invazyon ve hücre sağkalımını destekleyen sinyal yollarını aktive edebilmektedir (Zhang et al., 2015).

Eksozomal miRNA'ların dikkat çekici işlevlerinden biri, bazı kanserlerde premetastatik niş oluşumuna katkıda bulunmalarıdır. Tümör hücelerinden salınan eksozomlar, uzak organlara taşınarak bu dokularda uygun bir mikroçevre oluşturmakta ve metastaz için zemin hazırlamaktadır (Milane et al., 2015). Ayrıca GBM mikroçevresindeki hipoksinin, eksozomal miRNA içeriğini değiştirerek tümör agresifliğini ve adaptif yanıtları artırabildiği bildirilmiştir (Kahlert & Kalluri, 2013; Paskeh et al., 2022).

GBM'de eksozom kaynaklı miRNA'ların fonksiyonları tümör baskılayıcı miRNA'lar ve onkomiRNA'lar olmak üzere iki ana grupta değerlendirilmektedir (Aili et al., 2021). Tümör baskılayıcı miRNA'lar, hücre proliferasyonunu baskılayan, apoptozu indükleyen ve invazyonu azaltan moleküller olarak görev yaparken, bu etkilerin tersine tümör büyümesini, anjiyogenezi, immün kaçışı ve tedavi direncini destekleyen miRNA'lar onkomiRNA'lar olarak tanımlanır (Saito & Jones, 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalar, GBM hücelerinin yalnızca onkojenik

miRNA'ları eksozomlar aracılığıyla çevre hücrelere aktarmadığını, aynı zamanda kendi büyümelerini sınırlandırabilecek tümör baskılayıcı miRNA'ları da hücre dışına uzaklaştırarak tümör gelişimi için avantaj sağladığını ortaya koymuştur (Ghaemmaghami et al., 2020; Peng et al., 2022; Qi et al., 2022). Bu durum, eksozomların GBM biyolojisinde çift yönlü düzenleyici bir rol üstlendiğini göstermektedir.

Tümör baskılayıcı miRNA'lara ilişkin en dikkat çekici örneklerden biri miR-3591-3p'dir. Yapılan sekanslama analizlerinde miR-3591-3p'nin gliom dokularında normal beyin dokusuna göre düşük düzeyde eksprese edildiği, buna karşın beyin omurilik sıvısı (BOS) kaynaklı eksozomlarda belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Fonksiyonel analizler, bu miRNA'nın MAPK sinyal yolunu baskılayarak hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğunu ve apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, gliom hücrelerinin miR-3591-3p'yi seçici olarak eksozomlar aracılığıyla hücre dışına salgıladığı, böylece hücre içindeki tümör baskılayıcı etkiden kurtulduğu bildirilmiştir (Li et al., 2022). Benzer şekilde miR-34a, glioblastomada en iyi karakterize edilmiş tümör baskılayıcı miRNA'lardan biridir. GBM dokularında ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı gösterilen miR-34a'nın PDGFRA, c-MET, Notch1/2 ve CDK6 gibi proliferasyonla ilişkili genleri baskılayarak hücre döngüsünü durdurduğu, apoptozu artırdığı ve glioma kök hücrelerinin kendini yenilemesini azalttığı bildirilmiştir (Guessous et al., 2010). Bir diğer önemli tümör baskılayıcı miRNA olan miR-128, GBM'de düşük düzeyde eksprese edilmekte olup özellikle BMI1, E2F3 ve PDGFRA gibi onkogenik hedefleri baskılayarak hücre proliferasyonunu azaltmakta ve glioma kök hücrelerinin yenilenmesini engellemektedir (Cui et al., 2010). Benzer şekilde miR-181d, MGMT ekspresyonunu baskılayarak TMZ duyarlılığını artırmakta, düşük ekspresyonu ise tedavi direnci ile ilişkilendirilmektedir (W. Zhang et al., 2012). Bunun yanında miR-142-3p'nin HMGB1 ve TGF- β ilişkili sinyal mekanizmalarını düzenleyerek proliferasyonu azaltmasının yanı sıra makrofajların M2 fenotipine geçişini baskıladığı ve antitümör immün yanıtı güçlendirdiği gösterilmiştir (Wei et al., 2025). Ayrıca miR-150-5p'nin VEGFA, MMP14 ve proliferasyonla ilişkili çeşitli hedef genleri inhibe ederek hücre çoğalmasını, invazyonu ve anjiyogenezi baskıladığı bildirilmiştir (Lin et al., 2026).

Tümör baskılayıcı miRNA'ların aksine, onkomiRNA'lar glioblastoma gelişimini destekleyen ve eksozomlar aracılığıyla tümör mikroçevresini yeniden programlayan moleküllerdir. Bu miRNA'lar tümör hücreleri tarafından yüksek miktarda sentezlenmekte ve eksozomlarla çevredeki tümör hücrelerine, endotelial hücrelere, mikrogliyalara ve makrofajlara taşınarak proliferasyon, invazyon, anjiyogenez, immün baskılanma ve tedavi direncini

artırmaktadır. Bu nedenle eksozomal onkomiRNA'lar hücre içi sinyal mekanizmalarının yanı sıra hücreler arası iletişimi de düzenleyen temel moleküler araçlar olarak kabul edilmektedir (Aili et al., 2021).

GBM'de en iyi tanımlanmış onkomiRNA miR-21'dir. MiR-21'in hem tümör dokusunda hem de serum ve BOS kaynaklı eksozomlarda belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Eksozomal miR-21'in PTEN, PDCD4, RECK ve TIMP3 gibi tümör baskılayıcı genleri inhibe ederek PI3K/Akt ve MAPK sinyal yollarını aktive ettiği, bunun sonucunda proliferasyon, invazyon ve anjiyogenezin arttığı bildirilmiştir (Masoudi et al., 2018). Hipoksik glioblastoma hücrelerinden salınan eksozomal miR-21'in ayrıca miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerde immün baskılanmayı güçlendirdiği ve glioma ilişkili mikroglia/makrofajlardan salınan miR-21'in STAT3 aktivasyonu yoluyla temozolomid direncini artırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle miR-21, günümüzde GBM'nin en önemli tanısal ve prognostik eksozomal biyobelirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, miR-10b, glioblastomda yüksek ekspresyon gösteren ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen önemli bir onkomiRNA'dır (Akers et al., 2013; Chan et al., 2005). miR-10b'nin HOXD10 ve diğer tümör baskılayıcı hedefleri inhibe ederek hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu artırdığı bildirilmiştir (Sun et al., 2011). Benzer şekilde miR-221/222 ailesi, p53 ve PTEN gibi hücre döngüsü düzenleyicilerini baskılayarak proliferasyonu hızlandırmakta ve apoptozu azaltmaktadır (C. Zhang et al., 2012). Özellikle eksozomal miR-221'in alıcı hücrelerde tümör progresyonunu ve TMZ direncini desteklediği gösterilmiştir (Quintavalle et al., 2012). İmmün düzenlenme açısından öne çıkan bir diğer onkomiRNA miR-155'tir. GBM mikroçevresinde yüksek düzeyde bulunan bu miRNA'nın makrofajlarda ve mikroglialarda pro-tümöral sinyal mekanizmalarını aktive ederek immün baskılayıcı fenotipi desteklediği bildirilmiştir (Qiu et al., 2013). Ayrıca miR-9, eksozomal taşıyım yoluyla TMZ direncinin gelişmesine katkıda bulunmakta ve glioma kök hücre özelliklerinin korunmasını desteklemektedir (Munoz et al., 2014).

GBM hücreleri bir yandan tümör baskılayıcı miRNA'ları hücre dışına uzaklaştırarak kendi proliferatif avantajlarını artırırken, diğer yandan onkomiRNA'ları tümör mikroçevresine aktararak immün baskılanma, anjiyogenez, invazyon ve tedavi direncini desteklemektedir (Erices et al., 2023).

Literatürde GBM'de eksozomal miRNA'ların biyolojik rolleri üzerine çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, bu çalışmaların büyük çoğunluğu tek bir miRNA'nın fonksiyonunun incelenmesine veya yalnızca eksozomal ya da yalnızca hücre içi ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesine odaklanmıştır (Marangon & Lecca, 2023). Özellikle miR-

21'in onkomiRNA olarak ve miR-142-3p ile miR-150-5p'nin tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak GBM patogeneziindeki rolleri farklı çalışmalarda ortaya konulmuş olsa da bu miRNA'ların eksozomal ekspresyon profilleri ile hücre içi düzeylerinin aynı deneysel modelde birlikte değerlendirilerek karşılaştırıldığı çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışmasında, glioblastoma hücrelerinde onkomiRNA olarak miR-21, tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak ise miR-142-3p ve miR-150-5p seçilmiştir. Bu miRNA'ların hem hücre içi gen ekspresyon düzeyleri hem de eksozomlar aracılığıyla taşınan ekspresyon profilleri birlikte değerlendirilmiştir. Böylece yalnızca miRNA ekspresyon değişikliklerinin belirlenmesi değil, aynı zamanda tedaviye bağlı olarak hücre ile eksozom arasındaki miRNA dağılımının nasıl değiştiğinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2.4. Tümör Baskılayıcı miRNA'lar ve Tedaviye Duyarlılık

Tez çalışmasında, tümör baskılayıcı faktörler arasında etkili olduğu değerlendirilen miR-142-3p ve miR-150-5p çalışmaya dahil edilmiştir.

2.4.1. miR-142-3p

miR-142-3p, insan kromozomu 17q22 bölgesinde bulunan MIR142 geninden transkribe edilen ve olgunlaşma sürecinin ardından oluşan fonksiyonel bir mikroRNA'dır (Wu et al., 2011). Hematopoietik hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilen bu miRNA, hücre proliferasyonu, farklılaşması, immün yanıt, apoptoz ve hücrelerel göç gibi birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bununla birlikte, miR-142-3p'nin kanser biyolojisindeki fonksiyonu tümör tipine bağlı olarak değişebilmekte ve hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik özellikler gösterebilmektedir (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

Birçok katı tümörde miR-142-3p'nin tümör baskılayıcı etkileri bildirilmiştir (Deng et al., 2015; Hua et al., 2018; Wu et al., 2011).

Benzer şekilde, servikal kanserde yapılan araştırmalar da miR-142-3p'nin tümör baskılayıcı etkilerini desteklemektedir. Deng ve arkadaşları, servikal kanser dokularında miR-142-3p düzeylerinin normal servikal epitellere göre anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir. Çalışmada miR-142-3p'nin doğrudan FZD7 (Frizzled Class Receptor 7) genini hedeflediği belirlenmiştir. FZD7, Wnt (Wingless/Integrated) sinyal yolunun temel reseptörlerinden biri olup özellikle kanonik Wnt/ β -katenin yolunun aktivasyonunda görev almaktadır. Wnt/ β -katenin yolunun aşırı aktivasyonu; hücre proliferasyonu, farklılaşma, invazyon ve kanser kök hücre özelliklerinin kazanılmasıyla ilişkilendirilmektedir. Deng ve arkadaşları, miR-142-3p'nin FZD7 ekspresyonunu baskılaması sonucunda β -katenin nükleer translokasyonunun azaldığını ve proliferasyonla ilişkili hedef genlerin ekspresyonunun

düştüğünü göstermiştir. Bunun sonucunda servikal kanser hücrelerinde proliferasyon, koloni oluşumu, migrasyon ve invazyon belirgin şekilde baskılanmıştır. Bu bulgular, miR-142-3p'nin Wnt/ β -katenin sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığını ortaya koymaktadır (Deng et al., 2015).

Fakat yukarıda bulunan kanıtlara rağmen miR-142-3p'nin biyolojik fonksiyonlarının tüm kanser tiplerinde aynı olmadığı yönünde bilgiler literatürde yer almaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) yapılan çalışmalar, miR-142-3p'nin bazı hücrel bağlamlarda onkojenik özellik gösterebildiğini ortaya koymuştur. Lei ve arkadaşları, NSCLC dokularında miR-142-3p ekspresyonunun arttığını ve bu miRNA'nın doğrudan Transforming Growth Factor Beta Receptor 1 (TGFB1) genini hedeflediğini göstermiştir. TGFB1, TGF- β sinyal yolunun temel reseptörlerinden biri olup erken evre tümörlerde hücre döngüsünü durdurarak proliferasyonu baskılayan ve apoptozu destekleyen önemli bir tümör baskılayıcı mekanizmanın parçasıdır. miR-142-3p aracılığıyla TGFB1 ekspresyonunun azalması sonucunda, TGF- β aracılı büyüme inhibisyonu ortadan kalkmış ve tümör hücre proliferasyonu artmıştır. Bu çalışma, miR-142-3p'nin fonksiyonlarının yalnızca kendi ekspresyon düzeyine değil, aynı zamanda hedef aldığı genlerin hücrel bağlamına da bağlı olduğunu göstermektedir (Lei et al., 2014). Bu durum, miRNA'ların biyolojik etkilerinin hücrel bağlama ve hedef gen repertuarına bağlı olarak değişebildiğini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, miR-142-3p'nin GBM patogeneğinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın MIR142 promotör bölgesindeki metilasyonu artırarak miR-142-3p ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir. Buna karşılık miR-142-3p de IL-6 ekspresyonunu inhibe etmekte ve böylece iki molekül arasında negatif geri besleme döngüsüne dayanan bir düzenleyici mekanizma oluşmaktadır (Chiou et al., 2013).

Yeni çalışmalar, miRNA'ların kanser hücrelerindeki değişimlerin yanı sıra farklı ilaç direnci mekanizmalarında da rol oynadığını göstermektedir. Örneğin, GBM tedavisinde kullanılan temel kemoterapötik ajanlardan biri olan TMZ direncinin gelişiminde miRNA aracılı moleküler mekanizmaların rol oynadığı gösterilmiştir. miR-195, miR-10a ve miR-445-3p gibi miRNA'ların TMZ direncinin gelişiminde rol oynadığı bildirilirken, miR-142-3p'nin de inflamasyon ve hücre sağkalım yolları üzerindeki düzenleyici etkileri nedeniyle bu süreçte potansiyel bir rol oynayabileceği öne sürülmektedir (Lee et al., 2018). Özellikle IL-6 sinyalizasyonunun GBM kök hücre özellikleri, tümör agresifliği ve tedavi direnci ile ilişkili

olduğu göz önüne alındığında, miR-142-3p'nin bu yolak üzerindeki baskılayıcı etkisi terapötik açıdan dikkat çekmektedir.

Sonuç olarak miR-142-3p, kanser türüne bağlı olarak farklı fonksiyonlar gösterebilen çok yönlü bir miRNA olup, özellikle GBM'de inflamasyonla ilişkili sinyal yolaklarının düzenlenmesi, tümör progresyonunun kontrolü ve tedavi direncinin modülasyonu açısından önemli bir moleküler düzenleyici olarak değerlendirilmektedir (Xu et al., 2014). Bu nedenle, miR-142-3p'nin ilişkili sinyal ağlarını daha ayrıntılı olarak aydınlatmak ve GBM için yeni yaklaşımlar geliştirmek, tez çalışmasının temel amaçlarından birini oluşturmaktadır.

2.4.2. miR-150-5p

miR-150-5p, insan genomunda kromozom 19q13 bölgesinde bulunan MIR150 geninden transkribe edilen ve olgunlaşma süreci sonucunda oluşan fonksiyonel bir miRNA'dır (Punga et al., 2014). Fizyolojik koşullarda hematopoietik hücre gelişimi, immün yanıt, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli görevler üstlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, miR-150-5p'nin hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, metastaz, epitel-mezenkimal geçiş ve kanser kök hücre özelliklerinin düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmektedir (Dai et al., 2019; Niemira et al., 2023).

Papiller tiroid kanseri üzerine yapılan çalışmalarda, miR-150-5p ekspresyonunun tümör dokularında normal tiroid dokusuna göre anlamlı derecede daha düşük olduğu gösterilmiştir. Chen ve arkadaşları, miR-150-5p'nin yeniden eksprese edilmesinin tiroid kanseri hücrelerinde proliferasyonu önemli ölçüde azalttığını, hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurduğunu ve apoptozu artırdığını bildirmiştir. Ayrıca miR-150-5p'nin aşırı ekspresyonunun hücre migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığı, bunun sonucunda tümör hücrelerinin metastatik potansiyelinin azaldığı gösterilmiştir. Çalışmada, bu etkinin hücre proliferasyonu ve sağkalımını düzenleyen çeşitli onkojenik sinyal yolaklarının baskılanmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yapılan araştırmalar da miR-150-5p'nin tümör baskılayıcı rolünü desteklemektedir. Lu ve arkadaşları, NSCLC dokularında miR-150-5p düzeylerinin belirgin şekilde azaldığını göstermiştir. Araştırmacılar, miR-150-5p'nin yeniden eksprese edilmesiyle tümör hücre proliferasyonunun yavaşladığını, koloni oluşturma kapasitesinin azaldığını, hücre migrasyonunun ve invazyonunun baskılandığını bildirmişlerdir. Ayrıca miR-150-5p'nin apoptozu artırarak tümör hücrelerinin canlılığını azalttığı ve bu nedenle akciğer kanserinde önemli bir tümör baskılayıcı miRNA olarak değerlendirilebileceği ifade edilmiştir (Chen et al., 2018; Lu et al., 2017).

Hematolojik malignitelere karşı yapılan çalışmalar, miR-150-5p'nin özellikle hematopoietik kök hücrelerin farklılaşması ve lösemi kök hücre biyolojisinin düzenlenmesinde kritik rol oynadığını göstermektedir. Jiang ve arkadaşları, akut miyeloid lösemi kök hücrelerinde miR-150-5p ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığını bildirmiştir. Çalışmada miR-150-5p'nin yeniden eksprese edilmesiyle lösemi kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitesinin azaldığı, hücre proliferasyonunun baskılandığı ve lösemik hücrelerin farklılaşmaya yönlendirildiği gösterilmiştir. Ayrıca deneysel hayvan modellerinde miR-150-5p ekspresyonunun artırılmasının tümör oluşumunu ve lösemik hücre yükünü önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Jiang et al., 2012).

GBM'nin kötü prognozunda glioma kök hücrelerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, miR-150-5p ekspresyonunun glioma dokularında ve hücre hatlarında azaldığını ve bu miRNA'nın gliom hücrelerinde tümör baskılayıcı özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. miR-150-5p'nin aşırı ekspresyonunun gliom hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığı, buna karşılık düşük ekspresyonunun tümör progresyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Sakr et al., 2016).

MiR-150-5p'nin GBM'deki etkilerinin önemli bir kısmının Wnt/ β -katenin sinyal yolu üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Wnt/ β -katenin yolu, hücre proliferasyonu, farklılaşması, anjiyogenez, invazyon ve kanser kök hücre özelliklerinin sürdürülmesinde kritik rol oynayan temel sinyal mekanizmalarından biridir. Bu yolaktaki anormal aktivasyonun glioma gelişimi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Biyoinformatik analizler ve fonksiyonel çalışmalar, miR-150-5p'nin β -katenin proteinini kodlayan CTNNB1 geninin 3'-UTR bölgesine bağlanabildiğini ve böylece Wnt/ β -katenin sinyal aktivitesini baskılayabildiğini ortaya koymuştur. CTNNB1'in baskılanması sonucunda glioma hücrelerinin proliferasyon kapasitesi azalmakta, apoptoz artmakta ve tümör kök hücre özellikleri zayıflamaktadır. Ayrıca miR-150-5p'nin glioma kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitesini azaltarak tümör oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Tian et al., 2020). Glioma kök hücrelerinin tedavi direnci ve tümör nüksündeki merkezi rolü göz önüne alındığında, miR-150-5p'nin bu hücre popülasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi terapötik açıdan büyük önem taşımaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla gerçekleşen bu etki, miR-150-5p'nin GBM tedavisinde potansiyel bir moleküler hedef olarak değerlendirilmesine yol açmıştır.

Sonuç olarak miR-150-5p, hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve kanser kök hücre özelliklerini düzenleyen önemli bir miRNA olup, özellikle GBM'de tümör baskılayıcı fonksiyon göstermektedir. CTNNB1/Wnt/ β -katenin eksenini hedefleyerek glioma kök

hücrelerinin özelliklerini baskılaması, bu miRNA'yı hem prognostik bir biyobelirteç hem de gelecekte geliştirilebilecek hedefe yönelik tedavi stratejileri açısından umut verici bir molekül haline getirmektedir (Kalaimani et al., 2022).

2.5. OnkomiRNA ve Tümör Progresyonu ile İlişkisi

2.5.1. miR-21

miR-21, kanser hücrelerinde yaygın olarak yüksek oranda eksprese edilen miRNA'lardan biri olup, birçok katı tümörde ve hematolojik malignitede onkomiRNA olarak tanımlanmaktadır (Krichevsky & Gabriely, 2009). İlk kez çeşitli tümör dokularında yüksek düzeyde eksprese edildiğinin gösterilmesinden bu yana, miR-21'in hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon, metastaz, anjiyogenez, immün kaçış ve tedavi direnci gibi kanser gelişiminin hemen her aşamasında görev aldığı ortaya konmuştur (Pan et al., 2010). Özellikle GBM (Gabriely et al., 2008), meme (Yan et al., 2008), akciğer (Zhang et al., 2010), kolorektal (Wu et al., 2017), pankreas (Dillhoff et al., 2008), prostat (Li et al., 2009) ve hepatoselüler karsinom (Liu et al., 2010) gibi agresif tümörlerde miR-21 ekspresyonunun normal dokulara göre belirgin şekilde arttığı bildirilmektedir.

miR-21'in onkojenik etkilerinin büyük ölçüde tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılamasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. miR-21'in doğrulanmış hedefleri arasında PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog), Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4), Tropomyosin 1 (TPM1), Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein with Kazal Motifs (RECK), Sprouty RTK Signaling Antagonist 2 (SPRY2) ve B-cell Translocation Gene 2 (BTG2) gibi birçok tümör baskılayıcı gen bulunmaktadır. Bu genlerin baskılanması sonucunda PI3K/Akt, MAPK/ERK, TGF- β ve NF- κ B sinyal yolları aktive olmakta; hücre proliferasyonu artarken apoptoz baskılanmakta, migrasyon ve invazyon kapasitesi ise belirgin şekilde yükselmektedir (Krichevsky & Gabriely, 2009).

GBM'de miR-21, en yüksek düzeyde eksprese edilen miRNA'lardan biri olup tümör agresifliği ile doğrudan ilişkilidir. Yapılan çalışmada, GBM dokularında ve glioma hücre hatlarında miR-21 ekspresyonunun normal beyin dokusuna göre anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (Pfeffer et al., 2015; Wu et al., 2013). miR-21'in aşırı ekspresyonu, PTEN ve PDCD4 gibi tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasına bağlı olarak PI3K/Akt sinyal yolunun aktivasyonunu artırmakta, hücre proliferasyonunu hızlandırmakta ve apoptozu inhibe etmektedir. Ayrıca kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesinin azalmasına neden olarak programlanmış hücre ölümünü baskıladığı, bunun sonucunda GBM hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye karşı daha dirençli hale geldiği bildirilmiştir (Papagiannakopoulos et al., 2008).

Ayrıca RECK ve TPM1 genlerinin miR-21 tarafından baskılanması sonucunda MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Metalloproteinase). Bunun yanında miR-21'in epitel-mezenkimal geçiş benzeri moleküler değişiklikleri desteklediği ve tümör kök hücre özelliklerinin korunmasına katkı sağladığı bildirilmektedir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, miR-21'in yalnızca hücre içinde değil, aynı zamanda eksozomlar aracılığıyla tümör mikroçevresinin yeniden şekillendirilmesinde de önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (Iser et al., 2017).

GBM kaynaklı eksozomal miR-21'in en önemli fonksiyonlarından biri tümör mikroçevresinde immün baskılanmanın oluşmasına katkı sağlamasıdır. Eksozomlar aracılığıyla makrofajlara ve mikrogliya taşınan miR-21'in bu hücrelerde M2 benzeri immünsüpresif fenotipi desteklediği ve IL-10, TGF- β ile VEGF gibi immün baskılayıcı ve proanjiyogenik faktörlerin üretimini artırdığı gösterilmiştir. Buna karşılık, antitümör immün yanıtı destekleyen sitokinlerin ekspresyonu azalmaktadır. Böylece GBM hücreleri, eksozomal miR-21 aracılığıyla tümör lehine immün tolerans oluşturarak büyümelerini desteklemektedir (Musatova & Rubtsov, 2023).

Eksozomal miR-21 aynı zamanda anjiyogenezin düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadır. GBM hücrelerinden salınan eksozomların endotelial hücreler tarafından alınması sonucunda PI3K/Akt ve ERK sinyal yollarının aktive olduğu, VEGF ekspresyonunun arttığı ve yeni damar oluşumunun hızlandığı bildirilmiştir. Artan vaskülarizasyon, tümörün oksijen ve besin ihtiyacını karşılayarak hızlı büyümesine katkıda bulunmaktadır (Lucero et al., 2020).

Bunun yanında eksozomal miR-21'in tedavi direncinin gelişiminde de önemli görevleri bulunmaktadır. TMZ tedavisine dirençli GBM hücrelerinden salgılanan eksozomların yüksek miktarda miR-21 içerdiği ve bu eksozomların TMZ'ye duyarlı hücrelere aktarılması sonucunda alıcı hücrelerde de ilaç direnci geliştiği gösterilmiştir. Bu etkinin PTEN/PI3K/Akt ve antiapoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Munoz et al., 2014; Shi et al., 2010). Böylece eksozomlar, direnç fenotipinin tümör hücreleri arasında yayılmasını sağlayan önemli biyolojik taşıyıcılar olarak görev yapmaktadır.

Son yıllarda geliştirilen deneysel tedavi yaklaşımlarında da miR-21'in hedeflenmesi dikkat çekmektedir. Anti-miR-21 oligonükleotidleri, kilitli nükleik asit (KNA) inhibitörleri ve eksozom temelli RNA taşıma sistemleri kullanılarak miR-21 ekspresyonunun baskılanmasının, GBM hücrelerinde proliferasyonu azalttığı, apoptozu artırdığı ve TMZ'ye duyarlılığı yeniden kazandırdığı gösterilmiştir (Singh et al., 2021). Ayrıca terapötik eksozomlar aracılığıyla anti-

miR-21 moleküllerinin doğrudan tümör hücrelerine taşınmasının, kan-beyin bariyerini aşabilmesi nedeniyle gelecekte umut verici bir tedavi stratejisi olabileceği düşünülmektedir (Corsten et al., 2007).

Tablo 1. MiRNA'lar ve hastalıklar üzerine etkileri

miRNA	Hastalık/Kanser Türü	Biyolojik Etki	Temel Hedef/Yolak
miR-142-3p	Hepatoselüler karsinom	RAC1	Göç ve invazyonu inhibe eder
miR-142-3p	Servikal kanser	FZD7 / Wnt- β -katenin	Proliferasyon ve invazyonu baskılar
miR-142-3p	NSCLC	TGF β R1	Onkojenik etki gösterebilir
miR-142-3p	GBM	IL-6	İnflamasyon ve tümör progresyonunu baskılar
miR-150-5p	Papiller tiroid kanseri	MUC4 ve ilişkili yollar	Proliferasyonu baskılar
miR-150-5p	Lösemi	Kök hücre ilişkili genler	Lösemi kök hücrelerini baskılar
miR-150-5p	GBM	CTNNB1 (β -katenin)	Wnt/ β -katenin sinyalini baskılar
miR-150-5p	GBM hücrelerinde	CTNNB1/Wnt	Kendini yenileme kapasitesini azaltır
miR-21	Meme kanseri	PTEN, TPM1	Hücre büyümesini ve metastazı destekler
miR-21	NSCLC	PTEN, RECK	Epitel-mezenkimal geçiş, invazyon ve metastazı artırır
miR-21	GBM	PTEN / PI3K-AKT	Hücre proliferasyonunu, invazyonu ve tedavi direncini artırır; apoptozu baskılar
miR-21	Kolorektal kanser	PDCD4, PTEN	Proliferasyon, invazyon ve metastazı artırır

2.6. SN-38 ve Etopozid'in Antikanser Mekanizmaları

Kanser hücreleri kontrolsüz proliferasyon ve invazyon gibi özelliklerle tanımlanmaktadır. SN-38 ve Etopozid antikanser ajanları, hücresel proliferasyonun kontrolsüz artışını engelleyerek hücreyi apoptoza sürüklemek üzere tasarlanan önemli moleküllerdir (Kashifa Fathima et al., 2022). Topoizomerez I ve II, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu sırasında DNA topolojisinin düzenlenmesinde görev alan enzimlerdir. Bu nedenden dolayı SN-

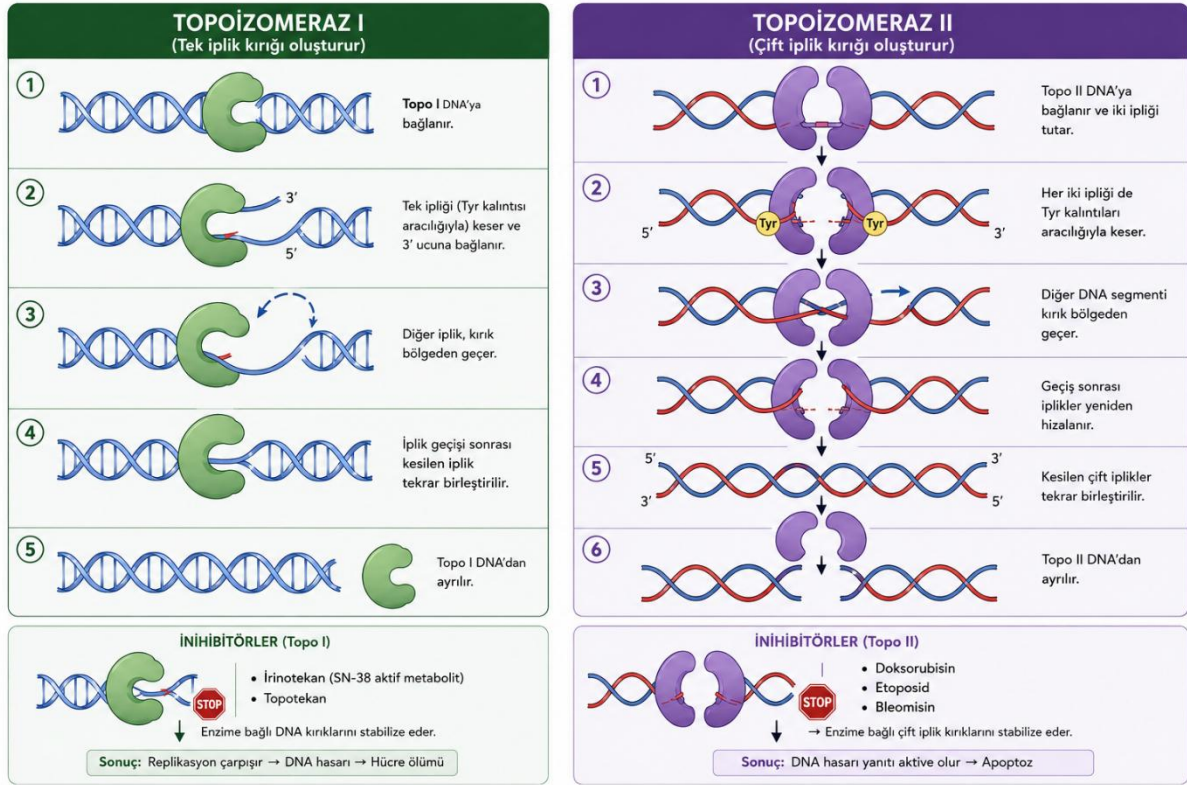
38 ve Etopozid DNA topoizomerazlarını hedefleyerek DNA hasarına ve hücre ölümüne yol açabilen antikanser ajanlardır (Birandra K Sinha, 1995). Ayrıca SN-38 ve Etopozid farklı enzimler üzerinde etkili olduklarından dolayı kombine tedaviler kanser çoğalmasını ve büyümesini daha güçlü bir şekilde baskılamaktadır.

2.6.1. DNA topoizomerazlar: Yapı ve fonksiyon

DNA replikasyonunda çift sarmal yapının çözülmesi ve replikasyon sonrası yeniden sarmal hâline gelmesi gerekmektedir. Bu işlevin sağlanması için gerekli olan enzimler DNA topoizomeraz I ve II'dir. Topoizomeraz I, tek iplik kırılma ve yeniden bağlanma süreçlerini başlatarak DNA sarmal yapılarını transkripsiyon için hazır hale getirmektedir. Enzim, DNA zincirinde geçici bir kesik oluşturarak zincirlerin üst üste sarılmalarını azaltır ve daha sonra kesilen ipliği yeniden birleştirir. Bu mekanizma DNA replikasyonu ilerledikçe sarmal sebebiyle oluşacak stresin giderilmesinde kritik rol oynamaktadır (Pourquier & Pommier, 2001).

Topoizomeraz II, çift iplik kırılma ve yeniden bağlanma mekanizmasıyla ATP bağımlı olarak çalışmaktadır. DNA çift sarmalını geçici olarak iki parçaya bölerek, diğer bir DNA segmentini bu kesikten geçirir ve ardından yeniden sarmal oluşturur. Bu enzim kromozom ayrılması, replikasyonun sonlandırılması ve DNA sarmal yapısının düzenlenmesi gibi süreçlerde zorunludur (Osheroff et al., 1991).

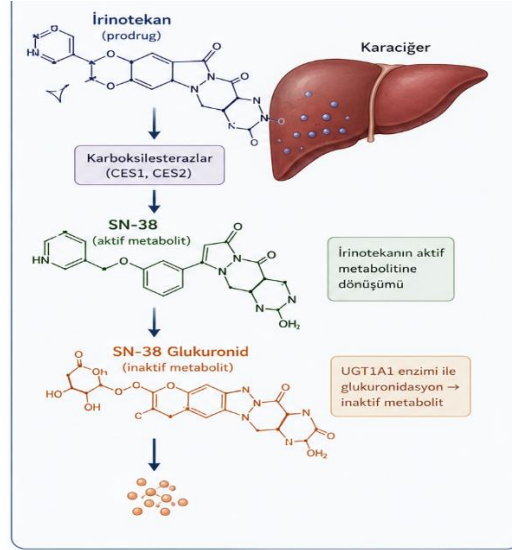
Topoizomeraz I ve II enzimleri birbirlerinin alternatifi değil, fonksiyonel olarak tamamlayıcılardır ve özellikle S ve G2/M fazlarında koordineli şekilde çalışmaktadırlar. Topoizomeraz I replikasyon düğümünün ilerlemesini kolaylaştırırken, topoizomeraz II replikasyon sonrası kardeş kromatitlerin ayrılmasında kritik rol oynamaktadır (Şekil 3). Hücreler, bir topoizomerazın baskılanması durumunda diğerinin ekspresyonunu artırarak topolojik stresi telafi edebilir. Bu fonksiyonel ilişki, topoizomeraz hedefli kemoterapilere karşı gelişen direnç mekanizmalarının temelini oluşturur. Kanser hücrelerinde artmış proliferasyon ve replikasyon stresi, topoizomerazlara olan bağımlılığı artırarak bu enzimleri etkili antikanser hedefleri haline getirmektedir (Pommier, 2012). Bu bilgiler doğrultusunda, GBM'de tedavi direnci ve tümör hücrelerinin kaçış mekanizmalarının aşılması amacıyla SN-38 ve etopozidin kombinasyon halinde kullanımının antikanser etkinliği artırabilecek potansiyel bir tedavi yaklaşımı olduğu öngörülmekte ve bu kombinasyonun terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.



Şekil 3. DNA Topoizomerez I ve II'nin fonksiyonlarına ait görseldir. Topoizomerez I inhibitörü olan SN-38 ve Topoizomerez II inhibitörü olan Etopozid antikanser ilaçlarının çalışma prensibini göstermektedir.

2.6.2. SN-38: etkin metabolit olarak moleküler mekanizmalar

Hücre proliferasyonu sırasında DNA replikasyonunun sağlıklı bir şekilde ilerleyebilmesi için topoizomerez I enzimi önemli bir rol oynar. Topoizomerez I'in inhibisyonu proliferasyonu baskılar ve DNA hasarına bağlı hücre ölümünü artırır (Pommier, 2006); bunun sonucunda bazı tümörlerde invazyonun ve metastatik potansiyelin azaldığı farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Gokduman, 2016; Thomas & Pommier, 2019). Topoizomerez I baskılayıcı ajanlar arasında SN-38'in etkisi rapor edilmiştir (Fukuda et al., 1996; Tanizawa et al., 1994). SN-38, irinotekan maddesinin aktif metaboliti olarak 1994 yılında tanımlanmıştır (Fernandez et al., 2025; Poujol et al., 2007). Irinotekan, başta metastatik kolorektal kanser olmak üzere çeşitli solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Irinotekan vücuda alındıktan sonra karaciğerde karboksilesterazlar tarafından 100-1000 kat daha güçlü metaboliti olan SN-38'e dönüşerek güçlü antikanser etki oluşturmaktadır (Şekil 4) (Ramesh et al., 2010). Yukarıda da bahsettiğim gibi, SN-38 topoizomerez I enzimine geçici kovalent bağlarla bağlanarak bölünmenin ilk evresi olan DNA replikasyon aşamasını güçlü bir şekilde baskılamaktadır (Kawato et al., 1991).



Şekil 4. Irinotekan'ın karaciğerde SN-38'e dönüşüm mekanizması. Irinotekan, karaciğerde başta karboksilesteraz-2 (CES-2) olmak üzere karboksilesteraz enzimleri tarafından hidrolize edilerek aktif metaboliti SN-38'e dönüştürülür. Oluşan SN-38 daha sonra UGT1A1 (uridin difosfat glukuronozil transferaz 1A1) enzimi aracılığıyla glukuronidasyona uğrayarak inaktif SN-38 glukuronid (SN-38G) metabolitine dönüştürülür. Bu metabolik dönüşüm, SN-38'in biyoyararlanımını, terapötik etkinliğini ve toksisite profilini belirleyen temel süreçlerden biridir.

Yakın zamanda gerçekleştirilen bir prelinik çalışmada, glioblastomada metabolik ve epigenetik direnç mekanizmalarını hedeflemek amacıyla SN-38 ile hücre döngüsü kontrol noktası kinazı (CHK1) inhibitörü olan rabusertibin kombinasyon tedavisi değerlendirilmiştir. Çalışmada, SN-38'in topoizomerez I-DNA kompleksini stabilize ederek DNA replikasyonu sırasında oluşan tek zincir kırıklarının çift zincir DNA hasarına dönüşmesine neden olduğu ve böylece DNA hasar yanıtını aktive ettiği gösterilmiştir. Buna karşılık, tümör hücrelerinin CHK1 aracılığıyla hücre döngüsünü durdurarak DNA onarım mekanizmalarını aktive ettiği ve bu durumun SN-38'e karşı direnç gelişimine katkı sağladığı belirtilmiştir. Araştırmacılar bu direnç mekanizmasını ortadan kaldırmak amacıyla SN-38'i CHK1 inhibitörü rabusertib ile kombine etmişlerdir. Rabusertib uygulaması sonucunda CHK1 aktivasyonunun baskılandığı, DNA hasar kontrol noktalarının devre dışı kaldığı ve hasarlı DNA'ya sahip glioblastoma hücrelerinin hücre döngüsüne devam ederek apoptoza yönlendirildiği gösterilmiştir (Chiou et al., 2025).

Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada ise glioblastoma tedavisinde SN-38'in terapötik etkinliğini artırmak amacıyla transferrin reseptörünü (TfR) hedefleyen bir peptit aracılığıyla SN-38 ve PARP inhibitörü rucaparibin birlikte taşındığı yeni bir konjugat geliştirilmiştir. Çalışmada, glioblastoma hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen transferrin reseptörü hedef alınarak konjugatın tümör hücrelerine reseptör aracılı endositoz yoluyla seçici olarak taşınması amaçlanmıştır. Hücre içine alındıktan sonra konjugattan serbestleşen SN-38'in topoizomerez I-DNA kompleksini stabilize ederek DNA replikasyonu sırasında oluşan tek zincir kırıklarının çift zincir DNA hasarına dönüşmesine neden olduğu

gösterilmiştir. Eşzamanlı olarak salınan rukaparib ise PARP enzimini inhibe ederek DNA tek zincir kırıklarının onarımını engellemiş ve SN-38 tarafından oluşturulan DNA hasarının daha da artmasına katkı sağlamıştır (Bataille Backer & Adesina, 2025).

Bu çalışma kapsamında, SN-38 aracılı topoizomeraz I inhibisyonunu takiben tamir mekanizmalarını baskılamak adına ikinci önemli enzim olan topoizomeraz II etopozid ile hedeflenmiş ve bir kombinasyon tedavisi kurgulanmıştır. Ayrıca, aktif hedeflendirme yoluyla sağlıklı hücrelere zarar vermeden/kanser hücresinde kontrolsüz stres tetiklemeden hücre replikasyonunun durdurulması ve apoptozun indüklenmesi hedeflenmektedir.

2.6.3. Etopozid: Topoizomeraz II İnhibisyonu

Etopozid, Amerikan mayapple bitkisinde (*Podophyllum peltatum*) doğal bir polifenol olan lignandan üretilen podofilotoksinden türetilmiş yarı sentetik bir antikanser ajandır. İlk kez 1966 yılında sentezlenmiş ve kapsamlı prelinik ve klinik değerlendirmelerin ardından 1983 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından kanser tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (Sinkule, 1984). 1980’li yıllardan itibaren yürütülen çok sayıda çalışma, etopozidin temel etki mekanizmasının DNA topoizomeraz II enziminin inhibisyonu olduğunu ortaya koymuştur (Siddiqui et al., 2015). Etopozid, topoizomeraz II–DNA kompleksini stabilize ederek kalıcı DNA çift iplik kırıklarının oluşumuna neden olur ve buna bağlı olarak hücresel metabolizmanın farklı yönlerini etkileyen kapsamlı bir DNA hasar yanıtını tetikler. GBM’de etopozid tedavisi klinik olarak günümüzde kullanılmaktadır. Radyoterapi tedavisinin yanında ek olarak kullanılır. Etopozid nispeten iyi tolere edilen bir kemoterapötik ajandır. Ancak GBM tedavisinde sağ kalım süresindeki etkinliği oldukça düşüktür. Bu da alternatif tedavi yöntemlerinin gelişmesine yol açmaktadır. Bu nedenlerden dolayı antikanser tedavi rejimlerinde genellikle karboplatin veya bleomisin gibi diğer sitotoksiklerle kombine edilmiştir (Jang et al., 2025).

CD133 pozitif U251 glioblastoma kök benzeri hücrelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, Etopozid’in apoptotik yollar ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili gen ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Topoizomeraz II inhibitörü olan Etopozid’in, DNA çift zincir kırıklarını artırarak DNA hasar yanıtını aktive ettiği ve bunun sonucunda intrinsik apoptotik yolların uyarıldığı gösterilmiştir. Tedavi sonrasında antiapoptotik özellik gösteren BCL-2 ve BCL-XL genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenirken, apoptotik hücre ölümünün arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, çoklu ilaç direncinden sorumlu ATP-bağımlı taşıyıcı proteinleri kodlayan ABCG2 (BCRP) ve ABCB1 gibi direnç genlerinin ekspresyonunda değişiklikler meydana geldiği ve etopozidin glioblastoma kök hücrelerinin kemoterapiye verdiği yanıtı bu

mekanizmalar üzerinden etkileyebileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar, Etopozidin yalnızca DNA hasarı oluşturarak sitotoksik etki göstermediğini, aynı zamanda apoptozu düzenleyen ve ilaç direnci gelişiminde rol oynayan moleküler yolları da modüle ettiğini ortaya koymuştur (Jin et al., 2010).

Franceschi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen Faz II klinik çalışmada ise, cerrahi rezeksiyon ve radyoterapi sonrasında tekrarlayan yüksek dereceli glioma hastalarında karboplatin ve etopozid kombinasyonunun etkinliği ve güvenilirliği değerlendirilmiştir. Çalışmaya 25 glioblastoma ve 5 anaplastik astrositom olmak üzere toplam 30 hasta dahil edilmiştir; hastalara dört haftada bir üç gün süreyle intravenöz karboplatin ve etopozid uygulanmıştır. Etopozid'in topoizomera II enzimini inhibe ederek DNA çift zincir kırıkları oluşturması, karboplatinin ise DNA zincirleri arasında çapraz bağlar meydana getirerek DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu baskılaması nedeniyle iki ajanın sinerjistik antitümör etki oluşturabileceği öngörülmüştür. Tedavi sonucunda hastaların %20'sinde tam yanıt, %10'unda parsiyel yanıt ve %40'ında stabil hastalık elde edilmiş, toplam hastalık kontrol oranı %70 olarak bildirilmiştir (Franceschi et al., 2004).

Çalışmada ilk kez elde edilen veriler doğrultusunda, kan-beyin bariyerini geçebilen biyoteknolojik antikanser ajanlara ilişkin literatürdeki ve klinikteki eksikliğin tamamlanması hedeflenmektedir. Bunun yanı sıra, mikroçevreye salınan onkogenik ve tümör baskılayıcı miRNA profillerinin analiziyle antikanser yanıtın ve kanser hücreleriyle mücadelenin izlenebilirliği ile etkinliği bu çalışma dâhilinde ortaya konacaktır.

2.7. SN-38 ve Etopozid'in Kombine Uygulamaları

GBM, CNS WHO derece 4 olarak sınıflandırılan agresif bir tümördür ve hastaların sağkalım süresi kısadır. Bundan dolayı uygulanan tedaviler, kombinasyonlar veya adjuvan tedavi seçenekleriyle birleştirilerek uygulanmaktadır. SN-38, güçlü topoizomera I inhibitörü olması nedeniyle tek başına belirgin antikanser aktivite göstermekle birlikte, kombine kemoterapi yaklaşımlarında çok daha etkili bir terapötik profile sahiptir (Price et al., 2024; Roger Stupp et al., 2005). Kombine tedavilerde SN-38'in temel avantajı, DNA replikasyonu sırasında oluşturduğu yüksek düzeyde replikasyon stresi ve tek iplik DNA kırıklarının diğer sitotoksik ajanlar tarafından oluşturulan hasarlarla sinerjik biçimde birikmesidir (Voigt et al., 1998). Özellikle DNA tamir mekanizmalarını hedefleyen veya DNA sentezini baskılayan ajanlarla birlikte kullanıldığında, SN-38'in neden olduğu topoizomera I–DNA kompleksinin stabilizasyonu, onarımı neredeyse imkânsız olan çift iplik kırıklarına dönüşerek hücrel ölüm sinyallerini kuvvetlendirir (Pommier, 2006).

Etopozid, topoizomeraz II inhibitörü olarak DNA çift iplik kırıkları oluşturma kapasitesi sayesinde kombine kemoterapi protokollerinin temel bileşenlerinden biri haline gelmiştir. Etopozid'in kombine tedavilerdeki etkinliği, özellikle topoizomeraz II'nin replikasyon ve kromozom ayrılması üzerindeki rolüne dayanmaktadır. Etopozid, topoizomeraz I inhibitörleriyle birleştirildiğinde hücresel DNA tamir kapasitesini aşan bir stres yaratır ve apoptotik yanıtı güçlendirir (Montecucco & Biamonti, 2007). Son çalışmalar, etopozidin diğer antikanser ajanlarla kombinasyonunun bazı modellerde etkinliği artırabildiğini göstermiştir. Literatürde irinotekanın aktif metaboliti SN-38'in etkisinden yararlanan irinotekan temelli rejimlerin sisplatin (Negoro et al., 2003), karboplatin (Schmitt et al., 2006) veya bleomisin (Wang et al., 2024) gibi antikanser ajanlarla birlikte farklı malignitelerde değerlendirildiği bildirilmiştir.

Levitt ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, tekrarlayan over kanserinde topotekan ve etopozid kombinasyonunun klinik etkinliğinin yanı sıra, her iki ilacın farklı uygulama sıralarının antitümör etkileri in vitro olarak da araştırılmıştır. Çalışmada A2780, SKOV-3 ve OVCAR-3 over kanseri hücre hatları kullanılmış; apoptoz, hücre döngüsü dağılımı, sitotoksik etki ve topoizomeraz II α ekspresyonu değerlendirilmiştir. Apoptotik hücre oranı propidyum iyodür (PI) ile boyanmış hücrelerde akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiş, hücre döngüsü değişiklikleri ise DNA içeriği analizleriyle belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, topotekan ve Etopozid'in eşzamanlı uygulanmasının sınırlı apoptotik etki oluşturduğunu, buna karşın ilaçların ardışık uygulanmasının antitümör etkinliği belirgin şekilde artırdığını göstermiştir. En yüksek apoptotik aktivite, hücrelerin önce topotekan ile üç gün süreyle tedavi edilmesi, ardından 24 saat ilaçsız bekletilmesi ve sonrasında üç gün etopozid uygulanması ile elde edilmiştir. Bu tedavi protokolünde tüm hücre hatlarında sub-G0/G1 fazındaki apoptotik hücre popülasyonunda belirgin artış gözlenmiş ve hücre canlılığında en fazla azalma bu grupta saptanmıştır. Araştırmacılar, kombinasyon tedavisindeki üstün etkinliğin topoizomeraz II α ekspresyonundaki değişiklikten ziyade, hücre döngüsü kinetiği ve ilaçların uygulanma zamanlamasına bağlı olarak gelişen sinerjistik DNA hasarı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Levitt et al., 2005).

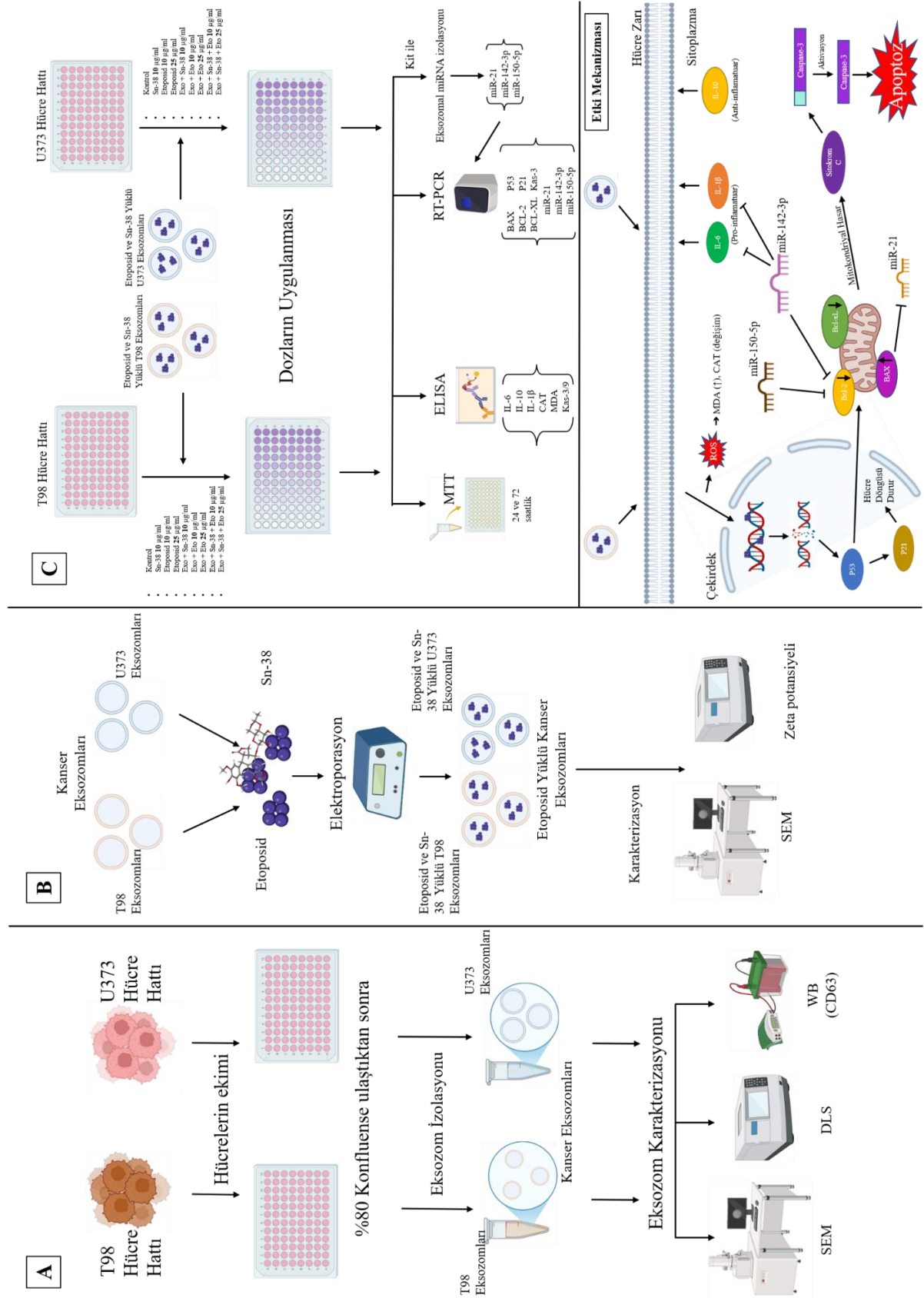
Oizumi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada da topoizomeraz I inhibitörü SN-38 ile topoizomeraz II inhibitörü Etopozid'in insan akciğer kanseri hücrelerinde oluşturduğu apoptotik yanıt ve bu yanıtın Bel-2 ailesi proteinleri, kemoterapi duyarlılığı ve p53 durumu ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada iki küçük hücreli akciğer kanseri ve dört küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Araştırmada hücre canlılığı

mikrokültür tetrazolyum testi ile değerlendirilirken, apoptotik hücre oranı, Bcl-2 ve Bax protein ekspresyonları akış sitometrisi ile analiz edilmiş, ayrıca hücre hatlarının p53 mutasyon durumu ile ilaç duyarlılığı arasındaki ilişki incelenmiştir. Elde edilen bulgular, hem SN-38 hem de Etopozid uygulamasını takiben apoptotik hücre oranının zamana bağlı olarak anlamlı düzeyde arttığını göstermiştir. Apoptozun indüklenmesine eşlik eden en önemli moleküler değişiklik, antiapoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunda belirgin azalma olmasıdır. Buna karşın, proapoptotik Bax protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamış, apoptotik yanıtın esas olarak Bcl-2'nin baskılanmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerine göre hem SN-38'e hem de etopozide daha yüksek duyarlılık gösterdiği, buna paralel olarak bu hücrelerde apoptotik hücre oranının daha fazla arttığı ve Bcl-2 ekspresyonundaki azalmanın daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, hücre hatlarının p53 mutasyon durumu ile apoptotik yanıt veya kemoterapi duyarlılığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu bulgular, SN-38 ve Etopozid'in apoptotik hücre ölümünü artırırken antiapoptotik Bcl-2 düzeylerini baskıladığını göstermesi bakımından, glioblastoma hücrelerinde elde edilen BAX/BCL-2 dengesi, kaspaz aktivasyonu ve antiproliferatif etkinlik bulgularının değerlendirilmesi açısından önemli bir literatür desteği sağlamaktadır (Oizumi et al., 2002).

Tabata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, topoizomera I inhibitörü SN-38 ile topoizomera II inhibitörü etopozid (VP-16)'in insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC-3 ve NSCLC-5) hücrelerindeki apoptotik etkileri ve bu süreçte NF- κ B sinyal yolu ile 26S proteazomun rolü araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, hem SN-38 hem de etopozid tedavisinin DNA hasarını takiben NF- κ B aktivasyonunu artırdığını ve bu aktivasyonun apoptotik hücre ölümünden önce gerçekleştiğini göstermiştir. Araştırmacılar, proteazom inhibitörü MG-132 ile I κ B α 'nın yıkımını engelleyerek NF- κ B aktivasyonunu belirgin şekilde baskılamış ve buna bağlı olarak apoptozun da azaldığını göstermiştir. Moleküler analizlerde her iki ilacın da mitokondriden sitokrom c salınımını artırdığı, bunun sonucunda prokaspaz-9'un aktive olduğu, ardından efektör kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktive olarak PARP parçalanmasını indüklediği gösterilmiştir. Bu değişikliklerin hem kontrol hücrelerinde hem de NF- κ B aktivitesi baskılanmış hücrelerde benzer şekilde gerçekleşmesi, apoptotik mekanizmanın büyük ölçüde mitokondri aracılı intrinsik yol üzerinden ilerlediğini göstermiştir. Hücre döngüsü analizlerinde ise SN-38 ve etopozid uygulamasının hücrelerin önemli bir kısmını S/G2+M fazında durdurduğu, ancak ilaç uygulamasından sonra MG-132 verilmesinin bu hücre döngüsü arrestini azalttığı ve buna karşılık apoptotik hücre oranını belirgin şekilde artırdığı saptanmıştır (Tabata et al., 2001).

Bu tez çalışması kapsamında, dirençli T-98 ve dirençsiz U373 GBM hücre hatları kullanılarak, eksozomlara yüklenmiş SN-38 ve etopozid antikanser ilaçlarının kombine etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada, bu ajanların hücre canlılığı, oluşan oksidatif stres, apoptoz ve hücrel yanıt üzerindeki etkilerinin yanı sıra, onkomiR olan miR-21 ile tümör baskılayıcı miR'lerden ise miR-142-3p ve miR-150-5p ekspresyon profillerindeki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmaktadır. Böylece, eksozomlar 'Truva atı' gibi kullanılarak antikanser ilaçların kanserli hücrelerden gizlenerek taşınmasını sağlayacaktır. Bu yöntem sayesinde kanser hücrelerinin antikanser ilaçlara karşı geliştirilebilecek direnç mekanizmalarından kaçarak toksisite oluşturmaları sağlanacaktır. Çalışmadan elde edilen verilerin eksozom temelli ilaç taşıma yaklaşımlarına ilişkin literatüre katkı sağlaması beklenmektedir. Ayrıca antikanser yanıtın mikroçevreye salınan onkogenik ve tümör baskılayıcı miRNA profilinin değerlendirilmesi, kanser hücreleriyle mücadelenin izlenebilir ve etkinliğinin değerlendirilebilir olması tezimle birlikte gerçekleştirilecektir.

3. MATERYAL ve METOT



Şekil 5. Tez çalışmasına ait grafiksel özet.

3.1. Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında GBM hücre hatlarından T-98 ve U373 kullanılmıştır. Hücrelerin temini Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan (Bilecik, Türkiye) sağlanmıştır. Azot tankında kriyotüpler içerisinde stoklanmış hücreler hızlıca çözündürülmüş ve 15 ml'lik falkonlara alınarak üzerlerine 2'şer ml hücre medyumuna eklenmiştir. Falkonlar hiç bekletilmeden 5 dakika süreyle 1500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırılarak hücreler medyumla süspanse edilmiştir. Hücre medyumuna içeriği: %83 Dulbecco modifiye besiyeri ortamı (DMEM), %15 fetal bovin serum (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin, streptomisin ve amfoterisin B) oluşmaktadır. Süspanse edilen hücreler, 25 cm²'lik flasklara (Corning, ABD) ekilerek inkübasyon için etüve bırakılmıştır (PHCBI, MCO-170AC-PE, %5 CO₂; 37°C). Hücreler yeterli yoğunluğa ulaşana kadar her gün kontrol edilmiştir. 3 günde bir medyumların tazelemesi yapılmıştır. Flaskın %85'i hücrelerle kaplanınca, hücreler Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisiyle (%0,25 tripsin-%0,02 EDTA) kaldırılarak, 75 cm²'lik flasklara (Corning, ABD) aktarılmıştır. Yeni flasklar tekrar inkübasyona alınarak (%5 CO₂; 37 °C) hücre çoğaltma işlemi tekrarlanmıştır. Flasklardaki hücreler ELISA testleri için 96 kuyucuklu plaklara, Western Blot ve PCR analizleri için uygun flasklara aktarılmıştır (Genc et al., 2025).

3.2. Eksozom İzolasyonu

Eksozom (Exo) elde edilen T-98 ve U373 hücreleri 150 cm²'lik flaskta %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra, flask Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) ile üç kere yıkanarak ortamdan FBS kalıntısı uzaklaştırılmıştır ve 0,2 uM nanopore filtresiyle filtrelenmiştir. Hücreler 48 saat boyunca FBS olmayan medyumda bekletilmiştir. 48.saatın sonunda flask içerisinde bulunan sıvı alınarak 10 dakika boyunca 300 g'de santrifüj edilmiştir. Filtrelenen süpernatantlar, Exospin (Thermo Sci, Kat. No. 4478359) ticari eksozom izolasyon kitinde belirtilen adımlara tabi tutulmuştur. Kısaca, kit içerisine eklenen tampon süpernatantlara eklenerek gece boyunca 4 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 g'de 1 saat santrifüj edilerek süpernatantlar izolasyon kolonlarından geçirilmiştir (Marqués-García & Isidoro-García, 2016). Prosedürün sonunda pelet alınarak deney boyunca kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Eksozom Karakterizasyonu

Her gruptaki izole edilmiş eksozomların karakterizasyonu, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'ndan (BARUM) hizmet alınarak SEM ve zeta potansiyeli analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sonuçlar Western Blot (CD63) analizi ile doğrulanmıştır (Genc et al., 2025; Midekessa et al., 2020; Sokolova et al., 2011).

3.3.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Eksozomların taramalı elektron mikroskobu ile karakterizasyonu için, öncelikle izole edilen eksozom süspansiyonu uygun taşıyıcı yüzeye damlatılarak yaklaşık 10–20 dakika yüzeye adsorbe olması sağlanmıştır. Ardından numuneler %2–4 glutaraldehit ile oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika fikse edilmiştir ve PBS ile birkaç kez yıkanmıştır. Fiksasyonu takiben numune, artan konsantrasyonlarda etanol serisinden (%30, %50, %70, %90 ve %100) geçirilerek her basamakta yaklaşık 10 dakika bekletilmek suretiyle dehidre edilmiştir. Dehidrasyon sonrası numuneler kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Kuruyan örnekler iletkenlik kazandırmak amacıyla ince bir altın/paladyum tabakası ile kaplanmıştır. Son aşamada numuneler ZEISS/Supra 40 VP SEM cihazında düşük hızlandırma voltajı altında (genellikle 1–5 kV) incelenerek eksozomların morfolojik özellikleri ve yaklaşık boyut dağılımları değerlendirilmiştir (Sokolova et al., 2011).

3.3.2. ZETA potansiyeli

Eksozomların yüzey yükü ve koloidal stabilitesinin belirlenmesi amacıyla zeta potansiyeli analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, izole edilen eksozomlar öncelikle uygun bir tampon çözeltide (saf su) seyreltilerek ölçüm için uygun konsantrasyona getirilmiştir. Numunede agregasyonu önlemek amacıyla hafif bir vorteks uygulanmıştır. Hazırlanan örnekler, partikül yüzey yükünü ölçmeye yönelik Dinamik Işık Saçılımı prensibine dayalı MALVERN/NANO-ZS zeta potansiyel ölçüm cihazına (Malvern, Worcestershire, İngiltere) özel kapiler hücrelere dikkatlice aktarılmıştır. Ölçümler genellikle 25 °C’de gerçekleştirilmiştir ve her numune için en az üç tekrar alınarak ortalama değer hesaplanmıştır. Elde edilen zeta potansiyeli değerleri, eksozomların yüzey yükünü (genellikle negatif) ve süspansiyon stabilitesini değerlendirmek için kullanılmıştır; yüksek mutlak zeta potansiyeli daha stabil sistemlere işaret etmektedir (Midekessa et al., 2020). Bu analiz, eksozomların biyofiziksel özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir parametre olarak raporlanmıştır.

3.3.3. Western blot

T-98 ve U373 GBM hücrelerinden elde edilen eksozomlardaki toplam protein içeriğini belirlemek için BCA Protein Tayin Kiti (Thermo Fisher Scientific, Kat. # 23225) kullanılarak spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Eşit miktarda protein (kuyu başına 50 µg) SDS-PAGE jellerine uygulanmıştır ve Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell elektroforez cihazı kullanılarak ayrıştırılmıştır. Elektroforezden sonra proteinler yarı kuru transfer cihazı (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) aracılığıyla nitroselüloz membranlara (NC) aktarılmıştır. Transfer için aşağıdaki sırayla bir sandviç düzeneği oluşturulmuştur: sünger, filtre kâğıdı, jel, nitroselüloz

membran, filtre kâğıdı ve sünger (katottan anoda). Aktarım sonrasında, membranlar bloke edilmiştir ve daha sonra TBS-T'de (0,1% Tween 20 içeren Tris tamponlu salin) %5 (a/h) yağsız sütte seyreltilmiş birincil antikorlarla 4 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Kullanılan ana antikor CD-63 (1:1000) idi. Primer için uygun ikincil antikorlar %5 süt tozunda seyreltilmiştir (Fare Karşıtı İkincil Antikor: 1/5000) ve membranlar bu antikorlarla 1 saat işleme tabi tutulmuştur. Membranlar kemilüminesan konjugat (ECL) ile muamele edilmiştir. Bant görüntüleri SYNGENE G: Box Chemi XRQ görüntüleme cihazı aracılığıyla elde edilmiştir. Elde edilen görüntülerdeki bant yoğunlukları ImageJ2 kullanılarak ölçülmüştür ve analiz üç kez tekrarlanmıştır (Çınar et al., 2026).

3.4. SN-38 ve Etopozid Antikanser İlaçlarının GBM Kaynaklı (T-98 ve U373) Eksozomlara Kapsüle Edilmesi

Exo + SN-38 (10 µg/mL), Exo + Etopozid (10, 25 µg/mL), Exo, SN-38 ve Etopozid kombine tedavi grupları (Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL) birer elektroporasyon küvetinde PBS ile 500 µL'lik nihai hacme kadar karıştırılmıştır. Karışım 500 V'de 1 ms süreyle tek deşarjla elektroporasyona tabi tutulmuştur. Süspansiyon, elektroporasyondan sonra 15 dakika boyunca 4°C'de inkübe edilerek, ilaç difüzyonunu ve gözenek kapanmasını desteklemek için 37°C'de 1 saat inkübasyona devam edilmiştir. Son olarak, karışım ekstra eksozomal yapılara sabitlenen Etopozid ve SN-38'in arındırılması için 100 kDa ultrafiltrasyon tüplerinde iki kez (4000 g, 30 dakika) santrifüjlenmiştir (Zeng et al., 2023).

3.5. İn vitro Uygulama

MTT, immünofloresan boyama, RT-qPCR ve ELISA testleri için tüm hücreler uygun hücre büyüme kaplarına alınarak çoğalmaları sağlandı.

3.5.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

MTT testi için 96 kuyucuklu plateler kullanıldı (n=8). SN-38, etopozid monoterapileri ve kompleks tedavi gruplarının hepsi her iki hücre hattında da (T-98 ve U373) MTT testine tabi tutulmuştur. MTT testleri deney uygulandıktan sonra 24. ve 72.saatlerde gerçekleştirilmiştir. MTT sonuçlarına göre Western Blot, RT-qPCR ve ELISA testlerinde kullanılacak gruplar belirlenmiştir;

- Kontrol,
- SN-38 10 µg/mL,
- Etopozid 10 µg/mL,
- Etopozid 25 µg/mL,

- Exo + SN-38 10 µg/mL,
- Exo + Etopozid 10 µg/mL,
- Exo + Etopozid 25 µg/mL,
- Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL
- Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL

ELISA testleri için 96 kuyucuklu platelerde bulunan hücre süspansiyonları tedaviden sonraki 72. saatte toplanarak Eppendorf tüplerinde -80 °C’de saklanmıştır (n=3). Western Blot analizi için grup sayısı kadar 75 cm²’lik flasklara hücreler ekilmiştir ve %85 hücre yoğunluğuna ulaşana kadar hücrelere tedavi uygulanmıştır. 72.saatte flasklardaki hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılarak 5 dakika boyunca 1500 rpm’de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak pelet protein izolasyonu için işlemlere tabi tutulmuştur.

MTT analizi dışında gerçekleştirilen tüm analizlerde, 72 saatlik tedavi sonrasında elde edilen örnekler kullanılmıştır. Bu süre, eksozomların hücreler tarafından internalize edilmesi, eksozom içerisindeki SN-38 ve etopozid ilaçlarının salınması ve ilaçların hücresel düzeyde biyolojik etkilerini tam olarak gösterebilmesi göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

Tablo 2. Deney grupları

T-98 GBM Hücre Hattı	U373 GBM Hücre Hattı
Kontrol,	Kontrol,
SN-38 10 µg/mL,	SN-38 10 µg/mL,
Etopozid 10 µg/mL,	Etopozid 10 µg/mL,
Etopozid 25 µg/mL,	Etopozid 25 µg/mL,
Exo + SN-38 1 µg/mL,	Exo + SN-38 1 µg/mL,
Exo + Etopozid 10 µg/mL,	Exo + Etopozid 10 µg/mL,
Exo + Etopozid 25 µg/mL,	Exo + Etopozid 25 µg/mL,
Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL	Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL
Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL	Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL

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

Çalışmanın hücre canlılığını test etmek için, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür içeren MTT maddesi ile (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA)

değerlendirme yapılmıştır. MTT testi ile sitotoksiteyi belirlemek için 1 ml PBS içinde 5 mg MTT tozu olacak şekilde karışım hazırlanarak 0,20 µm'lik steril filtreden (Corning, Wiesbaden, Almanya) geçirilmiş ve dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra +4 °C'de kullanılacağı zamana kadar bekletilmiştir. Tedavi uygulandıktan sonra 96 kuyucuklu hücre platelerinde hücrelerin ortam sıvıları çekildikten sonra, daha önceden hazırlanmış olan MTT solüsyonu her kuyucuğa uygulanarak 4 saat 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 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. Bu işlemin ardından absorbans (optik yoğunluk) spektrofometrede (µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek) 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür (n=8) (Şensoy Gün et al., 2025).

3.7. İmmünofloresan Boyama Analizi

Apoptoz analizi, ApoDETECT Annexin V-FITC Kiti (Thermo Sci. Kat. No: 331200) kullanılarak Annexin V-FITC/PI boyama yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Her örnek için 1×10^5 – 1×10^6 hücre kullanılmıştır ve hücreler $400 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti soğuk PBS (pH 7,0) ile yıkanmıştır ve dikkatlice yeniden süspanse edilmiştir. Hücreler tekrar $400 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bağlanma tamponu, deiyonize su ile seyreltilerek 1X konsantrasyonda (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) hazırlanmıştır. Hücre peleti 190 µL 1X bağlanma tamponu içerisinde yeniden süspanse edilmiştir ve üzerine 10 µL Annexin V-FITC eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler bağlanma tamponu ile yıkanmıştır ve $400 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 190 µL 1X bağlanma tamponu içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Daha sonra, 20 µg/mL konsantrasyondaki stok propidyum iyodür (PI) çözeltisinden 10 µL eklenerek hücreler boyanmıştır. Boyanan hücrelerin görüntüleri 20× büyütme altında çalışan bir immünofloresan mikroskobu kullanılarak elde edildi (ZEISS Primovert, Carl Zeiss, Almanya). Analizler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirildi (Genc et al., 2025).

3.8. RT-qPCR Analizi

3.8.1. Genetik materyal elde edilişi

Toplanan hücre vasatından eksozomal miRNA izolasyonu, RNA izolasyonu, eksozomal cDNA sentezi ve hücresel cDNA sentezi işlem aşamaları sırasıyla uygulanmıştır (Lv et al., 2013).

3.8.2. Eksozomal miRNA izolasyonu

Hücre kültürü süpernatantları $300 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilerek hücresel artıklarından arındırılmıştır. Ardından süpernatant $2000 \times g$ 'de 20 dakika santrifüj edilerek apoptotik cisimcikler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak süpernatanta üretici protokolüne uygun hacimde Total Exosome Isolation Reagent eklenmiştir ve karışım homojenize edilerek $4^{\circ}C$ 'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler $10.000 \times g$ 'de 60 dakika santrifüj edilerek eksozom peletleri elde edilmiştir. Peletler PBS ile yeniden süspanse edilerek sonraki analizler için hazırlanmıştır. Eksozomal miRNA izolasyonu, üretici firmanın (Thermo Fisher Scientific) talimatlarına uygun olarak sağlanan ticari kitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, elde edilen eksozom peletleri uygun lizis tamponu ile parçalanarak RNA izolasyonuna hazır hale getirilmiştir. Lizis sonrası örnekler fenol/kloroform içeren ayırma solüsyonu eklenmiştir ve vorteks ile homojenizasyon sağlanmıştır. Faz ayrımı için örnekler $12.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki sulu faz dikkatlice alınarak yeni tüplere aktarılmıştır ve RNA'nın çöktürülmesi amacıyla %100 etanol eklenmiştir. Elde edilen karışım, silika membran bazlı spin kolonlara aktarılmıştır ve üretici protokolüne uygun şekilde yıkama tamponları ile yıkanmıştır. Son aşamada RNA RNaz içermeyen su ile elüe edilmiştir. İzole edilen toplam RNA içerisinde özellikle küçük RNA fraksiyonları (miRNA) korunacak şekilde işlem gerçekleştirilmiştir (Manna et al., 2018).

3.8.3. Toplam RNA (hücre kaynaklı) izolasyonu

Hücrelerden elde edilen toplam RNA izolasyonu, Qiagen RNA izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Almanya; Kat. # 74104) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pelet halinde tüpün dibine çöken hücrelere 1 mL Qiazole solüsyonu ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra her bir Eppendorf'a 200 µl kloroform ilave edilmiştir. Tüpler 15 saniye boyunca çalkalanmıştır ve 2-3 dakika boyunca tekrar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletilen örnekler 12.000 'de 15 dakika boyunca $+4^{\circ}C$ 'de santrifüj edilmiştir. En üst kısımda duran renksiz sıvı başka bir tüpe aktarılmıştır. Aktarılan tüplerin içine 1:1 oranında etanol ilave edilerek 5 saniye boyunca düşük ayar da vortekslenmiştir. Örneklerden 700 µL alınarak RNeasy kolonlarına konulmuştur ve kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 15 saniye $8.000 g$ 'de iki kez santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası örneklerin üzerine 700 µl RW1 solüsyonu eklenmiştir. Kolonunun kapağı kapatılmıştır ve 15 saniye $8.000 g$ 'de tekrar santrifüjlenmiştir. 500 µl RPE kolonlara eklenerek 15 saniye boyunca $8.000 g$ 'de santrifüj edilmiştir. İkinci kez 500 µl RPE kolonlara eklenerek 2 dakika $8.000 g$ 'de santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra RNeasy

kolonuna yeni bir 1,5 ml'lik tüp yerleştirilerek 30-50 µl RNase içermeyen su eklenmiştir. Son santrifüj işlemi 8.000 g'de 1 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Tüplerde kalan RNA'lar cDNA sentezi için işleme alınmıştır (Gecili et al., 2026).

3.8.4. Eksozom ve hücre kaynaklı RNA'lardan cDNA sentezi

Eksozomal cDNA sentezi için Qiagen miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin miktarları ve saflıkları NanoDrop spektrofotometresi ile değerlendirildikten sonra, her reaksiyon için toplam 10 µL hacminde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 2 µL 5× miRCURY RT Reaction Buffer, 1 µL Enzyme Mix, uygun miktarda RNA örneği ve RNaz içermeyen su ilave edilerek toplam hacim 10 µL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışımlar hafifçe vortekslelendikten ve kısa süre santrifüj edildikten sonra termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. Ters transkripsiyon reaksiyonu 42°C'de 60 dakika gerçekleştirildikten sonra enzim inaktivasyonu amacıyla 95°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir ve ardından örnekler 4°C'de bekletilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri analiz edilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir ve hedef miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen RT-qPCR analizlerinde şablon olarak kullanılmıştır (Genc et al., 2025).

Hücre kaynaklı toplam RNA'ların cDNA sentezi, kullanılan kit prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (ECO-TECH Biotechnology, 2X SYBR Green qPCR Master Mix). Her grup için bir cDNA tüpü etiketlenmiştir ve her 0,2 ml'lik tüpün içerisine 2 µl genomik DNA wipeout buffer 7x solüsyonu, 3 µl örnek RNA ve 9 µl nükleaz içermeyen su eklenerek total hacim 14 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler 2 dakika boyunca 42 °C'de tutularak tekrar buza konulmuştur. Sonra, 1 µl reverse transkripsiyon master mix, 4 µl Quantscript RT buffer 5x, 1 µl RT primer mix ve bir önceki aşamada hazırlanan 14 µl'lik örnek eklenerek son hacim 20 µl olarak hazırlanmıştır. Örnekler termal döngü (Thermo Fisher Scientific, SimpliAmp Thermal Cycler) cihazına yerleştirilmiştir. 15 dakika 42 °C'de ve 3 dakika 95 °C'de ısı ile cDNA oluşumu gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda örnekler cihazdan alınarak RT-qPCR işlemi için kullanılmıştır (Gecili et al., 2026).

3.8.5. Gen ekspresyonu

Eksozomlardan elde edilen cDNA örneklerinde RNU, miR-21, miR-150-5p ve miR-142-3p ekspresyon düzeyleri (Tablo 3), FAM floresan boyası ile işaretlenmiş TaqMan™ MicroRNA Assay kullanılarak RT-qPCR yöntemi ile belirlendi. Amplifikasyon reaksiyonları, her örnek için üç teknik tekrar halinde toplam 20 µL reaksiyon hacminde hazırlandı. Her reaksiyon karışımı: 10 µL TaqMan™ Universal PCR Master Mix (2×), 1 µL FAM işaretli

TaqMan™ miRNA Assay (20×), 2 µL cDNA ve 7 µL nükleaz içermeyen sudan oluşturuldu. RT-qPCR analizleri gerçek zamanlı PCR cihazında, 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu sonrasında 40 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye denatürasyon ve 60°C'de 60 saniye birleşme/uzama koşullarında gerçekleştirildi. Floresan sinyalleri her döngünün uzama basamağında FAM kanalından kaydedildi. Elde edilen Ct değerleri referans gen olarak kullanılan U6 snRNA ile normalize edilerek ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ yöntemleri kullanıldı ve relatif miRNA ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı (Schmittgen et al., 2008).

Hücre kaynaklı elde edilen cDNA örneklerindeki BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Kaspaz-3, p53, p21 ve GAPDH gen ekspresyon seviyeleri (Tablo 3'te), ClearPeak 2x SYBR Master Mix kullanılarak LightCycler® 96 ile RT-qPCR ile analiz edildi. Hücreler 3 tekrar halinde incelendi. Tüm gen bölgelerinin tavlama sıcaklığı 60 °C idi. Gen ekspresyon seviyeleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) olarak belirlendi (Genc et al., 2025).

Tablo 3. Gen primer dizilim listesi

Gen	Forward	Reverse
RNU	5'CTCGCTTCGGCAGCAC3'	5'AACGCTTCACGAATTTGCGT3'
mir-21	5'GCCGCTAGCTTATCAGACTGATGT3'	5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'
miR-150-5p	5'GTCCCCCAGGCCTGTACC3'	5'CTCCCCATGGCCCTGTCT 3'
miR-142-3p	5'GGGGGTGTAGTGTTCCTA3'	5'CAGTGCCTGTCGTGGA 3'
GAPDH	5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'	5' GAAGATGGTGATGGGATTTC 3'
Kaspaz-3	5'AGCGAATCAATGGACTCTGGA 3'	5' TTCCCTGAGGTTTGCTGCAT 3'
p21	5' GACCTGTCACCTGTCTTTGTAC 3'	5' CTCTCATTCAACCGCCTAG 3'
p53	5' CCACCATGAGCGCTGCTCA 3'	5' GCAGGGGAGGGAGAGATG 3'
BAX	5' TTCATCCAGGATCGAGCAGG 3'	5' GGAAAAAGACCTCTCGGGGG 3'
Bcl-2	5' CCTGTGGATGACTGAGTACC 3'	5' GAGACAGCCAGGAGAAATCA 3'
Bcl-xL	5' GCAGGTATTGGTGAGTCGGATCGC 3'	5' CACAAAAGTATCCCAGCCGCCG 3'

3.9. ELISA Analizleri

Tedavi sonrası toplanan hücre kültür süspansiyonlarından, laktat dehidrojenaz (LDH), malondialdehit (MDA), katalaz (CAT), kaspaz-3 (Cas-3), kaspaz-9 (Cas-9) ve interleukin (IL-1β, IL-10, IL-6) seviyelerinin belirlenmesi için ELISA kitleri kullanıldı. Örnekler n = 3 olacak şekilde kit içerisinden çıkan plakelere eklendi. 1 saat boyunca 36 °C'de inkübe edildi. Daha sonra kit prosedürüne uygun şekilde deney gerçekleştirildi. LDH (Feiyue Bio, FY-EH1908),

MDA (Sunred, DZE201121372), KAT (BT Lab, SH0023), Kaspaz-3 (Sunred, DZE201120970), Kaspaz-9 (Sunred, DZE201120969) IL-1 β (Feiyue Bio, FY-EH1444), IL-10 (Feiyue Bio, FY-EH31875), IL-6 (Feiyue Bio, FY-EH31865). Her numunenin optik yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. Kit içerisinde bulunan standart çözeltiler üretici protokolüne uygun olarak 1:2 oranında seri dilüsyon şeklinde hazırlanarak numunelerle aynı koşullarda analiz edildi. Elde edilen standart absorbans değeri kullanarak standart eğri oluşturuldu ve numunelere ait konsantrasyonlar bu standart eğri esas alınarak hesaplandı (Genç et al., 2024).

3.10. İstatistiksel Analiz

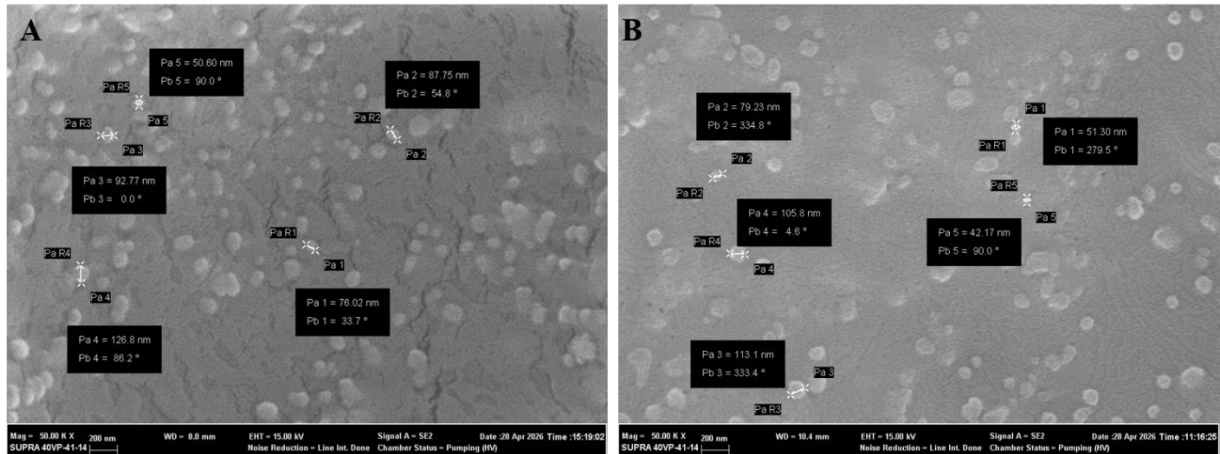
İstatistiksel analizler, deneysel gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi amacıyla IBM Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics) Version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Birden fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (One-Way Analysis of Variance; One-Way ANOVA) uygulanmıştır. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (Mean $\pm$ Standard Deviation; Ortalama $\pm$ SD) olarak ifade edilmiştir. Grafiklerin hazırlanması ve verilerin görsel sunumu için GraphPad Prism Version 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR

4.6. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Elde edilen T-98 ve U373 GBM kaynaklı eksozomlar SEM, zeta potansiyeli ve Western Blot yöntemleri ile karakterize edildi.

Eksozomların morfolojik özelliklerini ve boyutlarını belirlemek için SEM analizi yapıldı. Stub üzerinde bulunan eksozom örneği 100.000 kat büyütmede bir ZEISS Supra 40 VP Taramalı Elektron Mikroskobu (Oberkochen, Almanya) kullanılarak incelendi ve temsili mikrograflar Şekil 6'da sunuldu. SEM görüntülerinde, eksozomların, düzgün dağılım ve minimum agregasyon ile küresel veya yarı küresel bir morfoloji sergilediği gözlemlenmiştir. Bu görüntü elde edilen eksozomların başarılı bir şekilde dağılımını ve kararlılığını göstermektedir. T-98 eksozomlarının boyutu, literatürle uyumlu olarak 50.60 nm ile 126.8 nm arasında tespit edildi. U373 eksozomlarının boyutu literatürle uyumlu olarak 42.17 nm ile 113.1 nm arasında tespit edildi (Yeni et al., 2023).

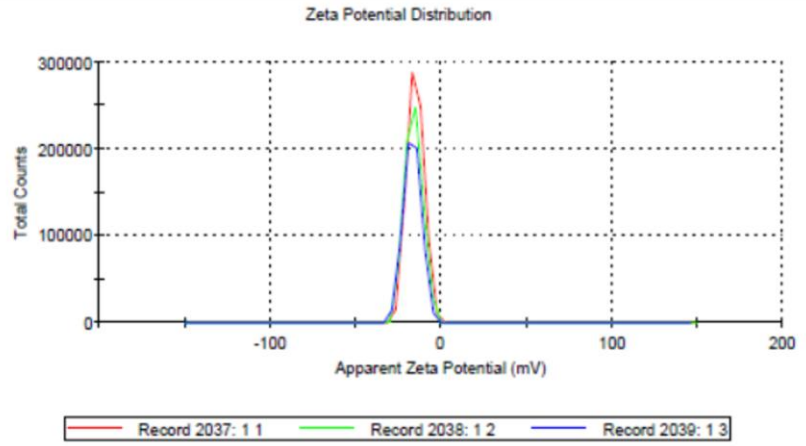


Şekil 6. T-98 ve U373 eksozomlarının SEM görüntüsüdür. **A.** T-98 GBM hücre hattından izole edilen eksozomların SEM görüntüsü. Eksozomların küresel morfolojiye sahip olduğu ve yaklaşık 50–126 nm çap aralığında dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Görüntü üzerinde temsili partiküllerin çapları sırasıyla 76.02 nm, 87.75 nm, 92.77 nm, 126.8 nm ve 50.6 nm olarak ölçülmüştür. **B.** U373 GBM hücre hattından izole edilen eksozomların SEM görüntüsü. Eksozomların küresel morfolojiye sahip olduğu ve yaklaşık 42–113 nm çap aralığında dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Görüntü üzerinde temsili partiküllerin çapları sırasıyla 51.30 nm, 79.23 nm, 113.1 nm, 105.8 nm ve 42.17 nm olarak ölçülmüştür (Görüntüler 50.000× büyütmede elde edilmiştir. Ölçek çubuğu 200 nm'dir).

Eksozomlara ait zeta potansiyeli, MALVERN Nano-ZS Zetasizer (Malvern, İngiltere) kullanılarak değerlendirildi ve bulgular Şekil 7'de gösterildi. Eksozomlar ortalama $\pm 5,01$ mV sapma ile sırasıyla (A: T-98) -16,7 mV'lik ve (B: U373) -16,6 mV'lik ortalama zeta potansiyeli ve bu değerde belirgin bir tepe noktası gösterdi. Bu durum tutarlı bir yüzey yük dağılımını işaret etmektedir. Yüksek negatif zeta potansiyeli, eksozomlar arasında önemli elektrostatik itme sergilediğini, agregasyonu engellediğini ve sulu süspansiyonda koloidal stabilite sağladığını göstermektedir. ± 30 mV'yi aşan zeta potansiyeli değerleri, kararlı bir sistemin göstergesidir. Bu nedenle, tespit edilen -16,7 mV ve -16,6 mV kararlı ve iyi dağılmış eksozomlar elde edildiğini göstermektedir.

A

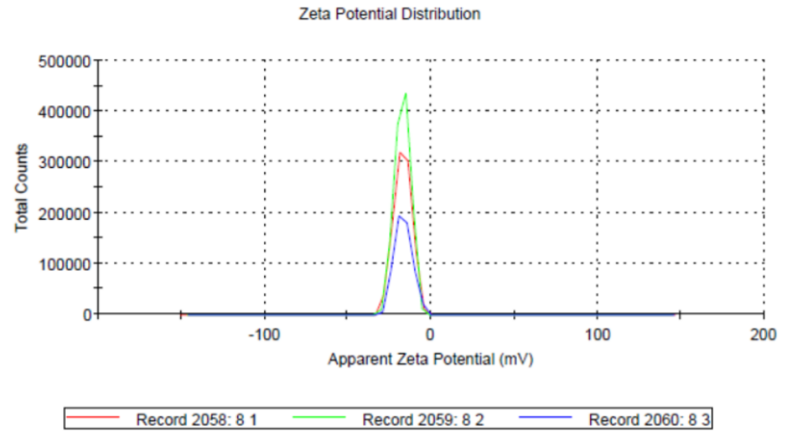
Parametre	Değer
Zeta Potansiyeli	-16,7
Standart Sapma	5,06
Kondüktivite (mS/cm)	0,106
Sonuç	İyi



Pik	Ortalama (mV)	Alan (%)	Standart Sapma (mV)
1	-16,7	%100	5,06
2	0,00	0	0
3	0,00	0	0

B

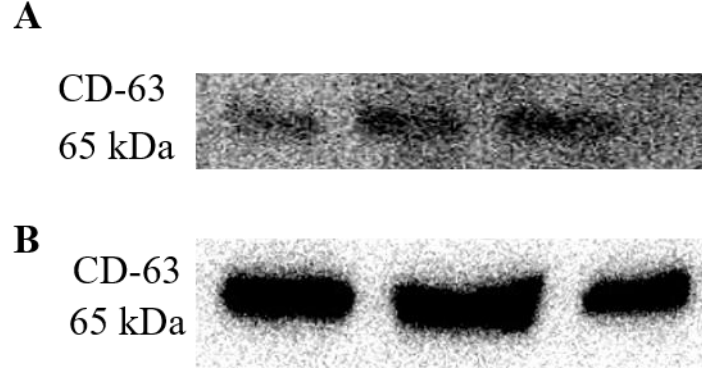
Parametre	Değer
Zeta Potansiyeli	-16,6
Standart Sapma	5,18
Kondüktivite (mS/cm)	0,00762
Sonuç	İyi



Pik	Ortalama (mV)	Alan (%)	Standart Sapma (mV)
1	-16,6	%100	5,18
2	0,00	0	0
3	0,00	0	0

Şekil 7. T-98 ve U373 GBM hücrelerinden izole edilen eksozomların zeta potansiyel sonuçlarıdır. A: T-98 GBM eksozomlarının zeta potansiyel sonucunu göstermektedir. B: U373 GBM eksozomlarının zeta potansiyel sonucunu göstermektedir. Eksozomların ortalama yüzey yükü $-16,6 \pm 5,01$ mV olarak belirlenmiştir.

CD63 protein seviyelerinin Western blot sonuçları Şekil 8'de gösterilmiştir. Eksozomların yüzey belirteçlerinden CD63'ün Western blot ile tespit edilmesi, eksozomal yapının bozulmadığı ve proteinlerin stabil kaldığını göstermektedir.

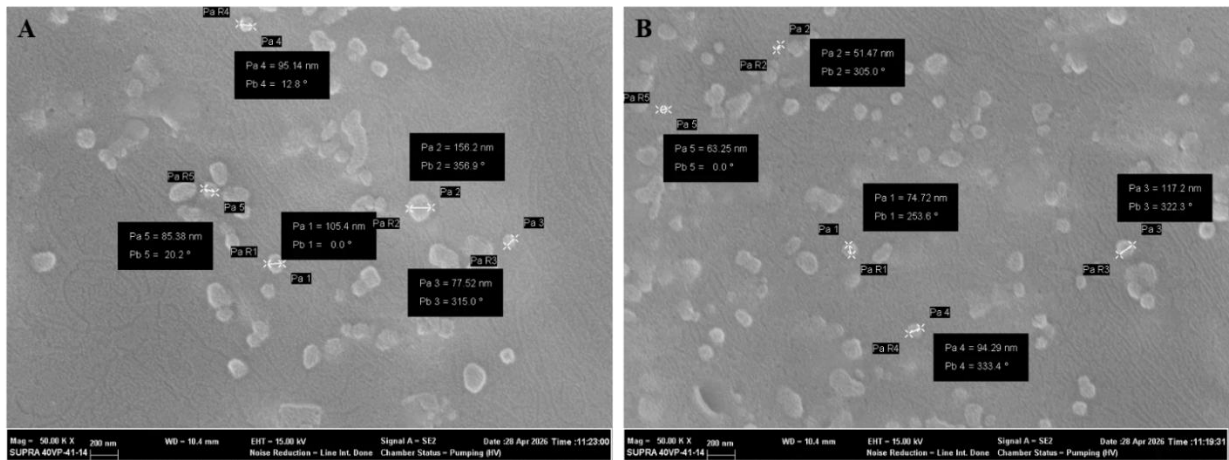


Şekil 8. T-98 ve U373 GBM hücrelerinden izole edilen eksozomların Western blot sonuçlarıdır. (A: T-98, B: U373) Görüntüde CD63 protein seviyeleri bulunmaktadır.

4.7. SN-38 ve Etoposid Antikanser İlaçlarının GBM Kaynaklı Eksozomlara Kapsüle Edilmesi Sonucu Karakterizasyon Analizi

Oluşturulan Exo + SN-38 + Etoposid komplekslerinin karakterizasyonu SEM ve zeta potansiyeli testleri ile gerçekleştirildi.

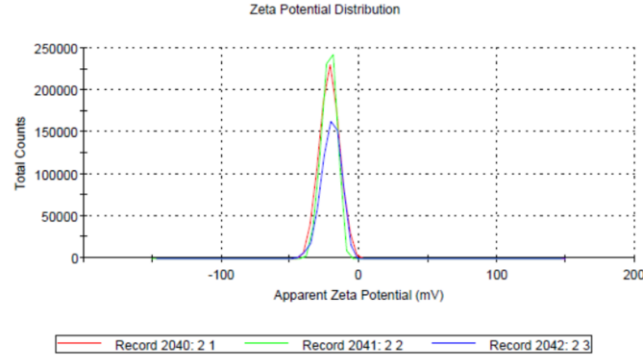
Yükleme sonrası eksozomların morfolojik özelliklerini ve boyutlarını belirlemek için SEM analizi yapıldı. Stub üzerinde bulunan eksozom örneği 100.000 kat büyütmede bir ZEISS Supra 40 VP Taramalı Elektron Mikroskobu (Oberkochen, Almanya) kullanılarak incelendi ve temsili mikrograflar Şekil 9'da verilmiştir. SEM görüntülerinde, yükleme sonrası eksozomların, düzgün dağılım ve minimum agregasyon ile küresel veya yarı küresel bir morfoloji sergilediği gözlemlenmiştir. Bu görüntü elde edilen eksozomların başarılı bir şekilde dağıldığını ve elektroporasyon işlemi esnasında hasar almadığını göstermektedir. Eksozomların boyutlarında meydana gelen değişimlerin sebebi olarak SN-38 ve Etoposid ilaçlarının eksozomların içerisine girerek boyutlarında değişime neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 9. İlaçların yüklenmesinden sonra T-98 ve U373 GBM eksozomlarının morfolojik özelliklerini ve boyutlarını belirlemek için elde edilen SEM görüntüsüdür. **A:** T-98 GBM kaynaklı eksozomların ilaç yükleme sonrasındaki görüntüsüdür. **B:** U373 GBM kaynaklı eksozomların ilaç yükleme sonrasındaki görüntüsüdür. Eksozomların boyutları 51,47 nm ile 156,2 nm arasında değişmektedir. Görüntüler 50.000× büyütmede elde edilmiştir. Ölçek çubuğu 200 nm'dir.

T-98 GBM kaynaklı eksozomların kararlılığını test etmek için zeta potansiyeli testi gerçekleştirildi. Exo + SN-38 + Etopozid'e ait sonuçlar Şekil 10'da gösterildi. Exo + SN-38 + Etopozid ortalama $\pm 7,01$ mV sapma ile $-20,2$ mV'lik bir ortalama zeta potansiyeli ve bu değerde belirgin bir tepe noktası gösterdi. Bu durum tutarlı bir yüzey yük dağılımını işaret etmektedir. Yüksek negatif zeta potansiyeli, eksozomlar arasında önemli elektrostatik itme sergilediğini, agregasyonu engellediğini ve sulu süspansiyonda koloidal stabilite sağladığını göstermektedir.

Parametre	Değer
Zeta Potansiyeli	-20,2
Standart Sapma	7,01
Kondüktivite (mS/cm)	0,0188
Sonuç	İyi



Pik	Ortalama (mV)	Alan (%)	Standart Sapma (mV)
1	-20,2	%100	7,01
2	0,00	0	0
3	0,00	0	0

Şekil 10. GBM hücrelerinden izole edilen eksozomlara SN-38 ve Etoposid kombine antikanser ilaç yüklemesi sonrası oluşan zeta potansiyel sonuçlarıdır. Eksozomların ortalama yüzey yükü $-20,2 \pm 5,01$ mV olarak belirlenmiştir.

4.8. MTT Analizi

MTT testi, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesine bağlı olarak tetrazolyum tuzunun formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanan güvenilir ve yaygın olarak kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir.

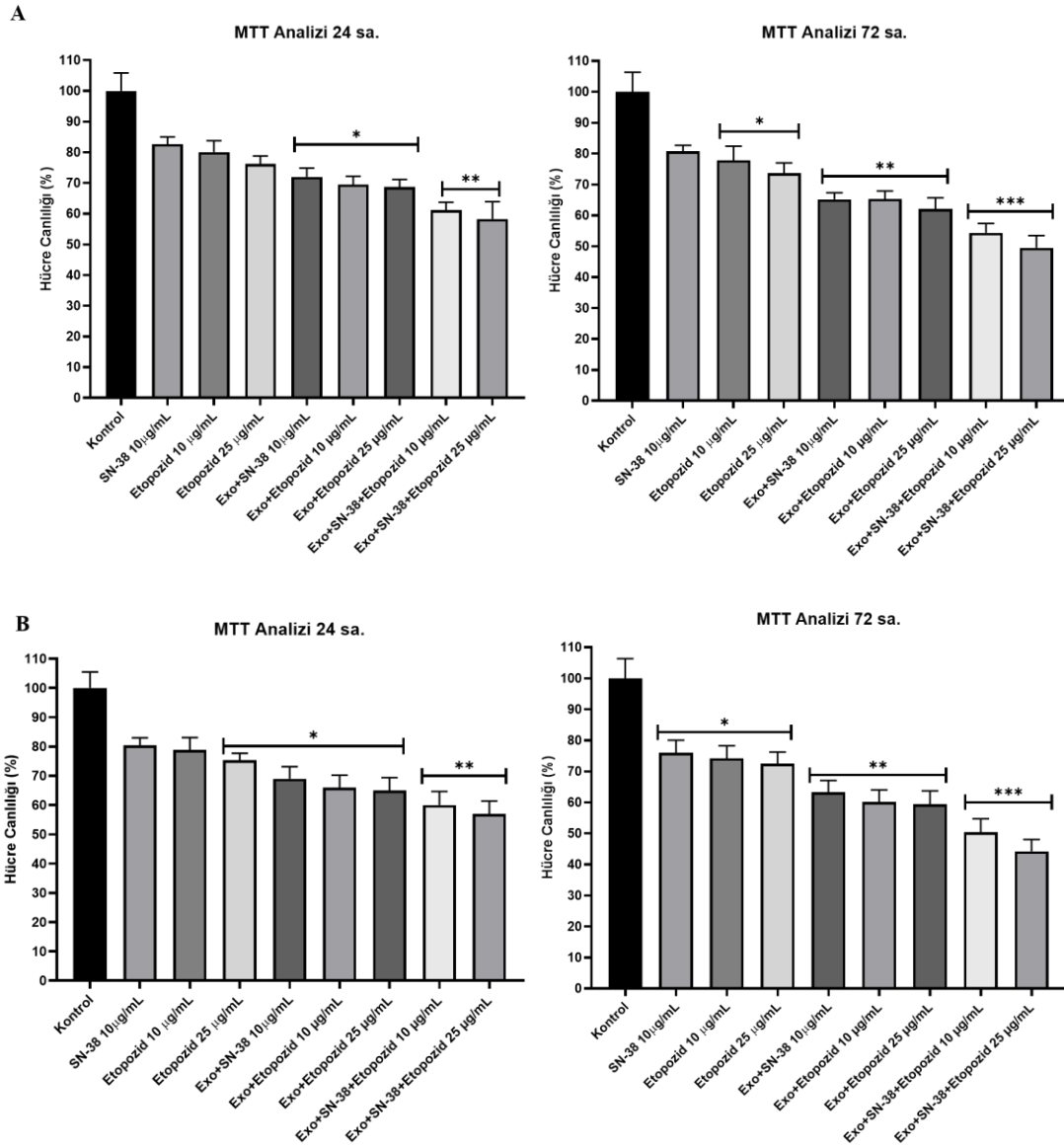
T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38, Etopozid monoterapisi ve Exo + SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının 24. ve 72. saatlerdeki canlılıkları MTT yöntemi ile değerlendirildi. Tüm analizlerde kontrol grubu 100 olarak kabul edildi.

Şekil 11-A'ya göre dirençli T-98 GBM hücre hattının 24. saat ve 72. saat sonundaki MTT analizi sonuçlarına göre, SN-38 ve Etopozid monoterapi grupları kontrol grubuna göre değerlendirildi. 24 saatin sonunda SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi ($p > 0.05$). 72 saatin sonunda ise, Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları kontrole göre (~ 20) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p < 0.05$). Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları ise kontrol grubu ve monoterapi grupları ile kıyaslandı. 24 saatin sonunda Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, hem kontrol grubuna (~ 30) hem de monoterapi gruplarına oranla (~ 12) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi.

($p<0.05$). 72 saatin sonunda ise, Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, hem kontrol grubuna ($\sim\%40$) hem de monoterapi gruplarına oranla ($\sim\%18$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.01$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, 24 saat ve 72 saat sonunda hem kontrol grubuna hem de Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarına kıyaslandı. 24 saat sonuçlarına göre, T-98 hücrelerinde Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ kombine tedavi grupları hem kontrol grubuna ($\sim\%37$) hem de Exo kombine gruplarına oranla ($\sim\%11$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.01$). 72 saat sonuçlarında Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, hem kontrol grubuna ($\sim\%50$) hem de Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarına ($\sim\%13$) oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.001$).

Şekil 11-B'ye göre dirençsiz U373 GBM hücre hattının 24 saat ve 72 saat sonundaki MTT analizi sonuçlarına göre, SN-38 ve Etopozid monoterapi grupları kontrol grubuna göre değerlendirildi. 24 saatin sonunda SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Etopozid 10 $\mu\text{g/mL}$ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grubu kontrol grubuna göre ($\sim\%20$) istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir ($p<0.05$). 72 saatin sonunda SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Etopozid 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları kontrol grubuna kıyasla ($\sim\%23$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları ise kontrol grubu ve monoterapi grupları ile kıyaslandı. 24 saatin sonunda Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, hem kontrol grubuna ($\sim\%30$) hem de monoterapi gruplarına oranla ($\sim\%10$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.05$). 72 saatin sonunda Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, hem kontrol grubuna ($\sim\%35$) hem de monoterapi gruplarına oranla ($\sim\%16$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.01$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, 24 saat ve 72 saat sonunda hem kontrol grubuna hem de Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarına kıyaslandı. 24 saat sonuçlarına göre, U373 hücrelerinde Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ kombine tedavi grupları hem kontrol grubuna ($\sim\%42$) hem de Exo kombine gruplarına oranla ($\sim\%9$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.01$). 72 saat sonuçlarında Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, hem kontrol grubuna ($\sim\%51$) hem de Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarına ($\sim\%18$) oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.001$).

Bu bulgular, hem T-98 hem de U373 GBM hücrelerinde Exo aracılı ilaç uygulamasının tekli tedavilere kıyasla hücre canlılığını daha belirgin biçimde azalttığını ve SN-38 ile Etopozid'in Exo aracılı kombine kullanımının, özellikle 72 saatlik uygulama sonunda, hücre canlılığını en yüksek düzeyde baskılayan tedavi yaklaşımı olduğunu göstermektedir.



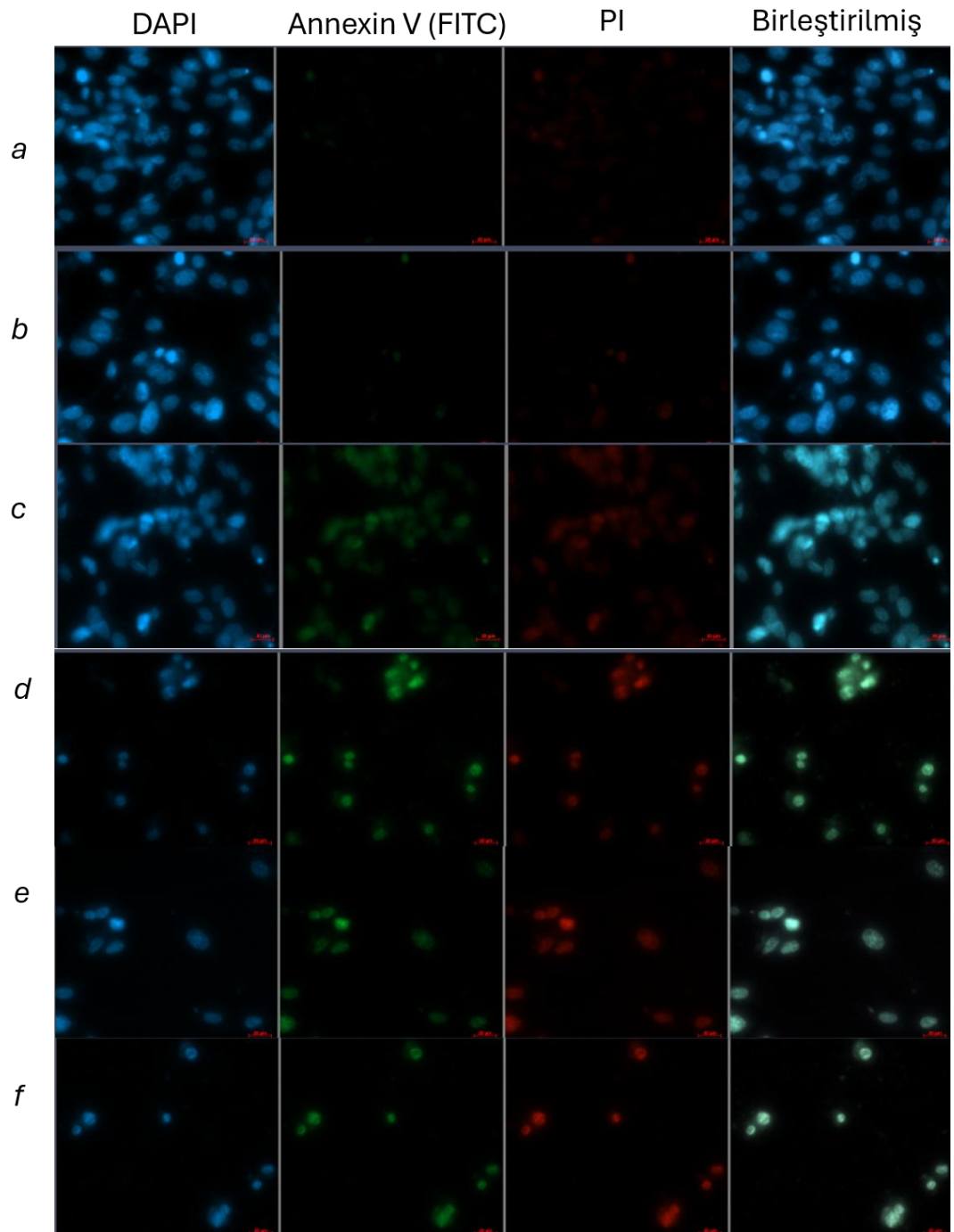
Şekil 11. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 24 ve 72 saatlik tedavi sonrasında MTT yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları, kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrolle göre en etkili azalma Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.

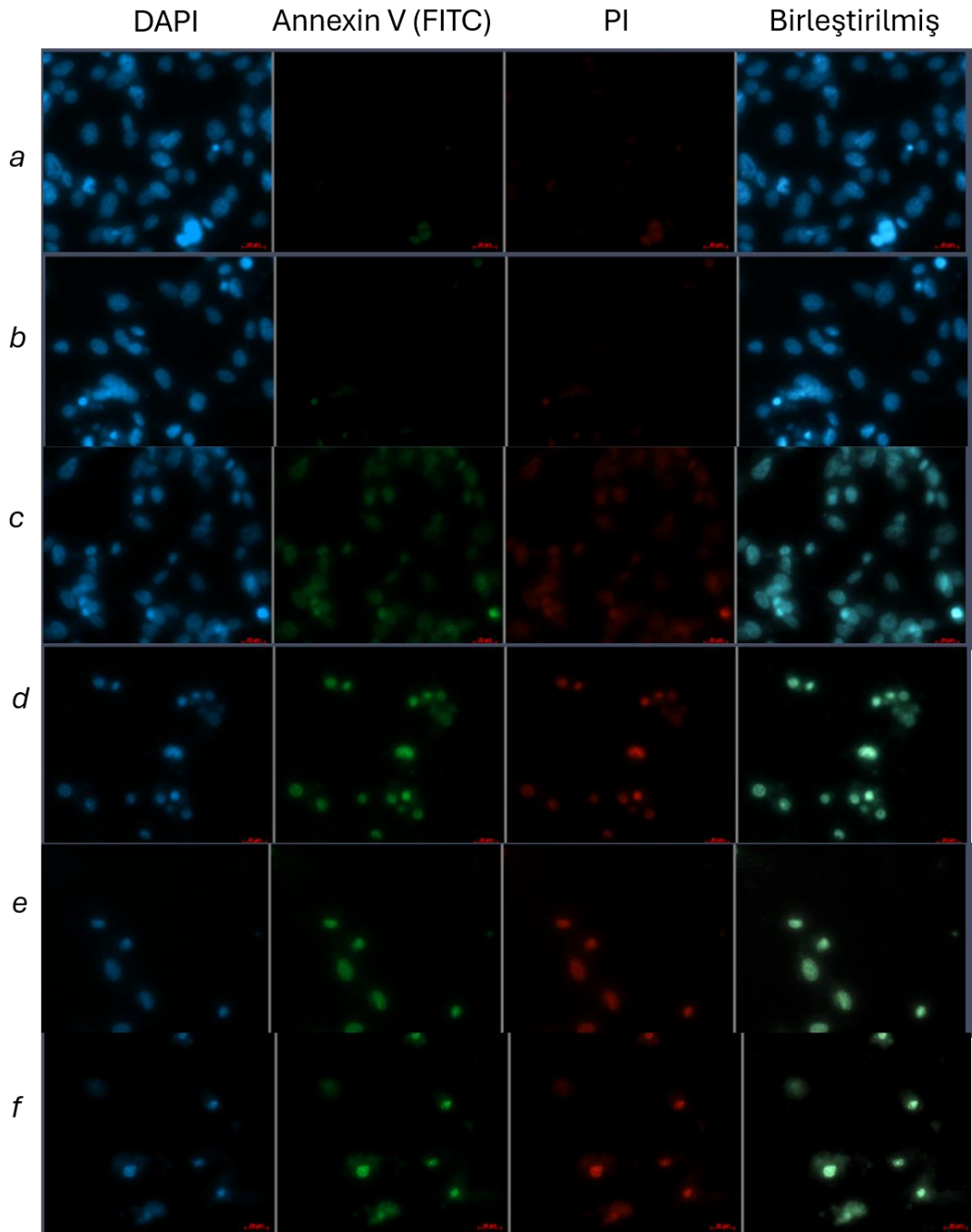
4.9. İmmüno Floresan Boyama Analizleri

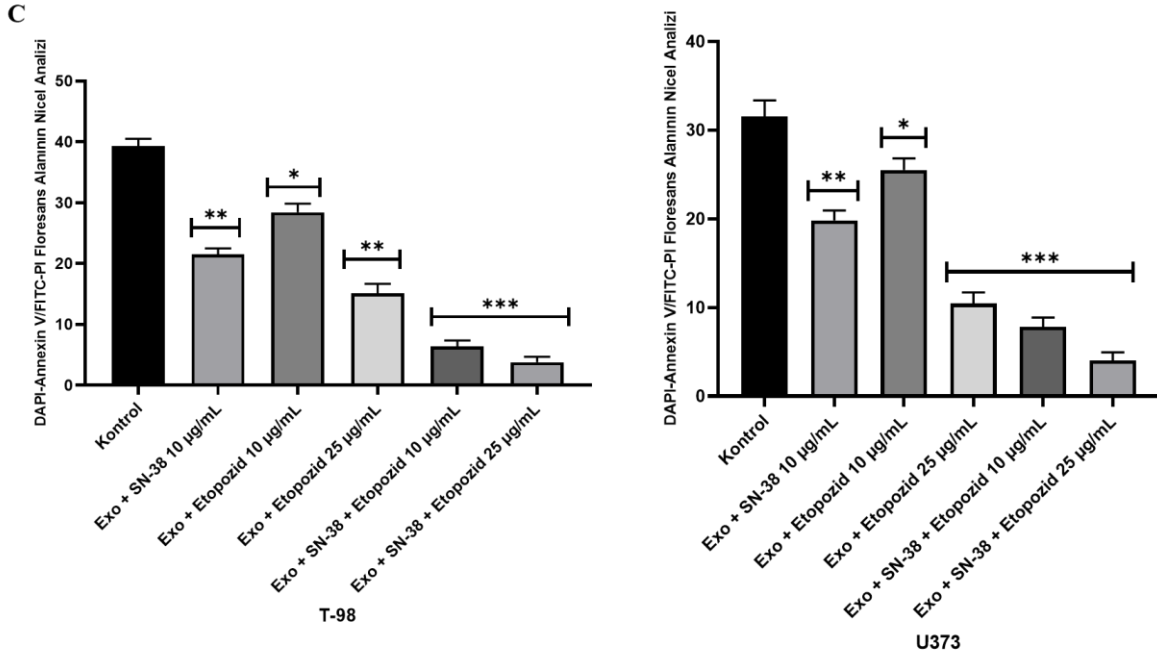
Apoptoz sırasında plazma membranındaki asimetrisinin bozulması, normalde plazma membranının sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin (PS) iç yaprakta dış yüzeye translokasyonuna neden olur. Annexin V hücre yüzeyinde açığa çıkan PS'ye yüksek afinite gösterir ve bu nedenle apoptotik hücrelerin tespitinde kullanılabilir. Apoptozun ileri evrelerinde

ve nekroz sırasında plazma membran bütünlüğünün bozulması, propidyum iyodürün (PI) hücre içine girmesine ve nükleer DNA'ya bağlanmasına olanak sağlar. Buna ek olarak, çekirdeklerin ve nükleer morfolojinin görüntülenmesi amacıyla kullanılan DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), hücre çekirdeğinde bulunan DNA'nın özellikle A-T açısından zengin bölgelerine bağlanarak mavi floresans oluşturur. Bu özellik sayesinde DAPI boyaması, hücre çekirdeğinin görselleştirilmesine ve apoptoz sırasında meydana gelen nükleer yoğunlaşma, nükleer parçalanma ve çekirdek morfolojisindeki değişikliklerin değerlendirilmesine olanak sağlar. Bu nedenle, Annexin V-FITC ve PI ile çift boyama; canlı hücrelerin (Annexin V-FITC-/PI-), erken apoptotik hücrelerin (Annexin V-FITC+/PI-), geç apoptotik hücrelerin (Annexin V-FITC+/PI+) ve nekrotik hücrelerin (Annexin V-FITC-/PI+) ayırt edilmesi amacıyla kullanılmıştır. DAPI boyaması ise hücre çekirdeklerinin ve apoptotik süreç sırasında meydana gelen nükleer morfolojik değişikliklerin destekleyici olarak değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Floresan mikroskopisi altında, Annexin V-FITC pozitif hücreler yeşil, PI pozitif hücreler ise kırmızı floresans göstermiştir. Bununla birlikte, hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi ve nükleer morfolojinin değerlendirilmesi amacıyla DAPI boyaması kullanılmış ve çekirdekler mavi floresans ile görüntülenmiştir. T-98 (A) ve U373 (B) hücrelerinin SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarıyla 72 saatlik muamelesi sonrasında elde edilen sonuçlar Şekil 12A ve B'de gösterilmiştir. Tedavi gruplarında, geç apoptoz ve nekrozla ilişkili belirgin morfolojik değişikliklerin yanı sıra, DAPI boyaması ile apoptotik hücre ölümünün karakteristik özellikleri olan nükleer yoğunlaşma, nükleer parçalanma ve çekirdek morfolojisinde bozulmalar gözlenmiştir. Bu bulgular, apoptozla ilişkili BAX ve BCL-2 proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde gözlenen değişikliklerle uyumludur. Sonuç olarak, elde edilen veriler eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının T-98 ve U373 GBM hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü artırdığını göstermektedir.

A

B



Şekil 12. T-98 (A) ve U373 (B) hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının 72 saatlik uygulama sonrasında Annexin V-FITC/PI ve DAPI boyamaları ile apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi. Annexin V-FITC pozitif hücreler yeşil, PI pozitif hücreler kırmızı ve DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri mavi floresans göstermektedir. Tedavi gruplarında Annexin V-FITC ve PI pozitifliğindeki artış, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün arttığını gösterirken, DAPI boyaması ile apoptotik hücrelerde nükleer yoğunlaşma ve morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. (a: Kontrol, b: Exo + SN-38 10 µg/mL, c: Exo + Etopozid 10 µg/mL, d: Exo + Etopozid 25 µg/mL, e: Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL, f: Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL).

4.10. RT-qPCR Analizleri

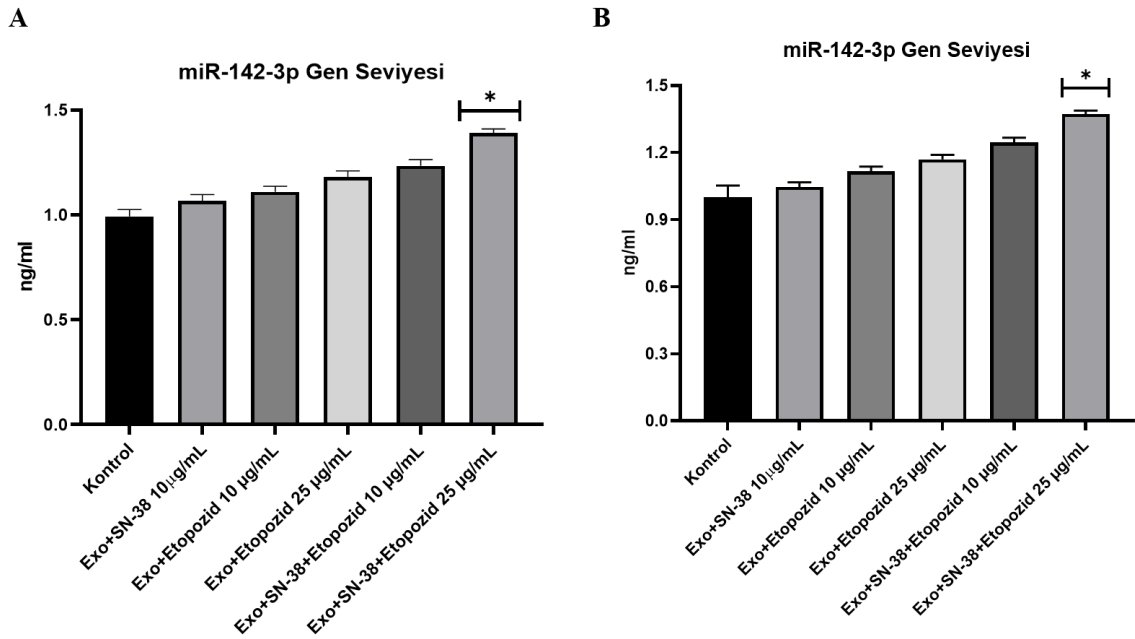
T-98 ve U373 GBM hücrelerinde 72 saatin sonunda hücre süspansiyonları ve hücreler toplanarak eksozomal miRNA ve total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tümör baskılayıcı ve onkomiR olarak miR-142-3p, miR-150-5p ve miR-21 gen seviyeleri, ayrıca apoptotik yolda görev alan bazı önemli genlerin (BAX, Bcl-2, Bcl-xL, p53, p21 ve Kaspaz-3) ekspresyon seviyeleri RT-qPCR ile tespit edilmiştir.

4.10.1. Eksozomal miR-142-3p gen seviyelerinin sonuçları

Tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-142-3p'nin GBM hücrelerinde proliferasyon ve tümör progresyonuyla ilişkili moleküler yolların düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu doğrultuda, uygulanan tedavilerin miR-142-3p ekspresyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla (A) T-98 ve (B) U373 GBM hücrelerine Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL, Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavileri uygulanmıştır.

Şekil 13-A'da T-98 GBM hücrelerinin eksozomal miR-142-3p sonuçları verilmiştir. Şekil 13-B'de U373 GBM hücrelerinin eksozomal miR-142-3p sonuçları verilmiştir. Sonuçlarda kontrol grubu 1 olarak kabul edilmiş ve tedavi grupları bu orana göre kıyaslanmıştır. Her iki hücre hattında da Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi

grupları, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermemiştir ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları hem kontrol grubuna hem de Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarına kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 $\mu\text{g/mL}$ doz grubu kontrole göre ve tedavi gruplarına kıyasla her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grubu T-98 ve U373 hücrelerinde kontrole göre yaklaşık sırasıyla %40 ve %37 artış göstermiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarına göre ise bu artış yaklaşık olarak sırasıyla %18 ve %17 olarak tespit edilmiştir.



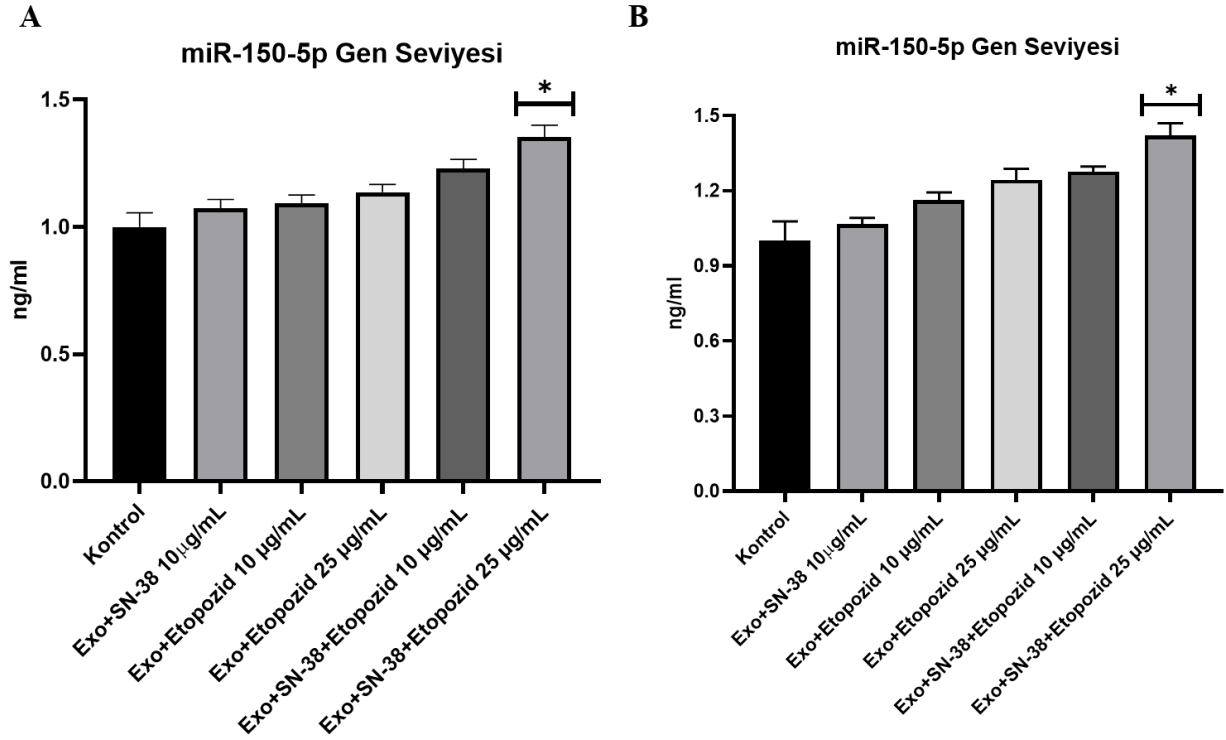
Şekil 13. Eksozoma yüklü SN-38 ve Etopozid tedavilerinin GBM hücrelerinde eksozomal miR-142-3p ekspresyon düzeyine etkisi. (A) T-98 ve (B) U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ ile Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarının eksozomal miR-142-3p ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 + Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grubunda miR-142-3p ekspresyonu, kontrol grubuna göre T-98 ve U373 hücrelerinde sırasıyla yaklaşık %40 ve %37 oranında artış göstermiştir. Aynı tedavi grubunda, Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ gruplarına kıyasla miR-142-3p ekspresyonunda sırasıyla yaklaşık %18 ve %17 oranında artış gözlenmiştir. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

4.10.2. Eksozomal miR-150-5p gen seviyelerinin sonuçları

Tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-150-5p'nin, GBM gelişimi ve progresyonunda rol oynayan hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir miRNA olduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda, eksozom aracılı SN-38 ve Etoposid tedavilerinin eksozomal miR-150-5p ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 13'te sunulmuştur.

Şekil 14-A'da T-98 GBM hücrelerinin eksozomal miR-150-5p sonuçları verilmiştir. Şekil 14-B'de U373 GBM hücrelerinin eksozomal miR-150-5p sonuçları verilmiştir. Sonuçlarda kontrol grubu 1 olarak kabul edilmiş ve tedavi grupları bu orana göre kıyaslanmıştır. Her iki hücre hattında da Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermemiştir ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid

10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubuna hem de Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarına kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL doz grubu kontrole göre ve tedavi gruplarına kıyasla her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubu T-98 ve U373 hücrelerinde kontrole göre yaklaşık sırasıyla %35 ve %42 artış göstermiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarına göre ise bu artış yaklaşık sırasıyla %19,5 ve %14,52 olarak tespit edilmiştir.

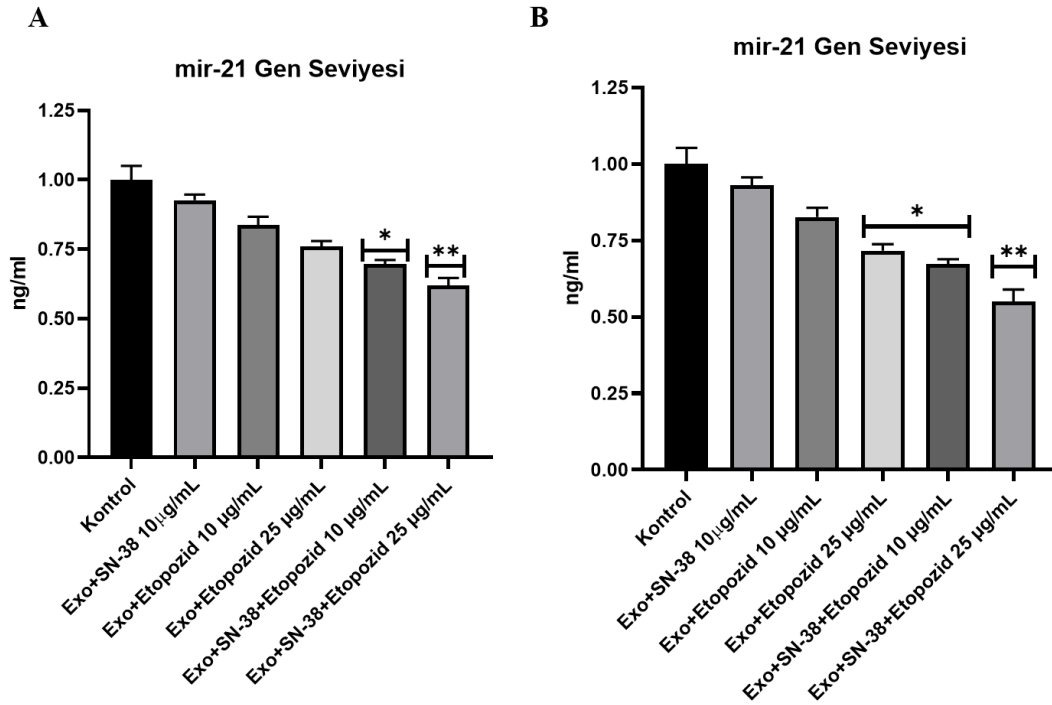


Şekil 14. Eksozoma yüklü SN-38 ve Etoposid tedavilerinin GBM hücrelerinde eksozomal miR-150-5p ekspresyon düzeyine etkisi. (A) T-98 ve (B) U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL ile Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarının eksozomal miR-150-5p ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda miR-150-5p ekspresyonu, kontrol grubuna göre T-98 ve U373 hücrelerinde sırasıyla yaklaşık %35 ve %42 oranında artış göstermiştir. Aynı tedavi grubunda, Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL gruplarına kıyasla miR-150-5p ekspresyonunda sırasıyla yaklaşık %19,5 ve %14,52 oranında artış gözlenmiştir. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

4.10.3. Eksozomal miR-21 gen seviyelerinin sonuçları

OnkomiRNA olarak tanımlanan miR-21'in GBM gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynadığı; hücre proliferasyonunu, apoptozdan kaçışı ve tümör hücrelerinin invaziv özelliklerini destekleyen çeşitli moleküler yolların düzenlenmesine katkı sağladığı bilinmektedir. Tedavi sonrasında miR-21 ekspresyonunda gözlenen azalma, onkomiRNA aracılı tümör ilerletici mekanizmaların baskılanması ve tedaviye bağlı tümör baskılayıcı yanıtın desteklenmesi açısından değerlendirilebilir. Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında eksozom aracılı SN-38 ve Etoposid tedavilerinin eksozomal miR-21 ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Şekil 15-A'da T-98 GBM hücrelerinin eksozomal miR-21 sonuçları verilmiştir. Şekil 15-B'de U373 GBM hücrelerinin eksozomal miR-21 sonuçları verilmiştir. Sonuçlarda kontrol grubu 1 olarak kabul edilmiş ve tedavi grupları bu orana göre kıyaslanmıştır. Her iki hücre hattında da Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 µg/mL tedavi grupları, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermemiştir ($p>0.05$). U373 hücre hattındaki Exo + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubu kontrole göre yaklaşık %29 azalma göstermiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubuna hem de Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarına kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL doz grubu kontrole göre kıyasla her iki hücre hattında da istatistiksel olarak sırasıyla %31 ve %33 azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubu T-98 ve U373 hücrelerinde kontrole göre yaklaşık sırasıyla %38 ve %45 azalma göstermiştir ($p<0.01$). Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarına göre ise bu azalma yaklaşık sırasıyla %10 ve %17,91 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 15. Eksozoma yüklü SN-38 ve Etopozid tedavilerinin GBM hücrelerinde eksozomal miR-21 ekspresyon düzeyine etkisi. (A) T-98 ve (B) U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL ile Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarının eksozomal miR-21 ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda miR-21 ekspresyonu, kontrol grubuna göre T-98 ve U373 hücrelerinde sırasıyla yaklaşık %38 ve %45 oranında azalma göstermiştir. Aynı tedavi grubunda, Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL gruplarına kıyasla miR-21 ekspresyonunda sırasıyla yaklaşık %10 ve %17,91 oranında azalma gözlemlenmiştir. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

4.10.4. Hücresel BAX gen seviyesinin analiz sonuçları

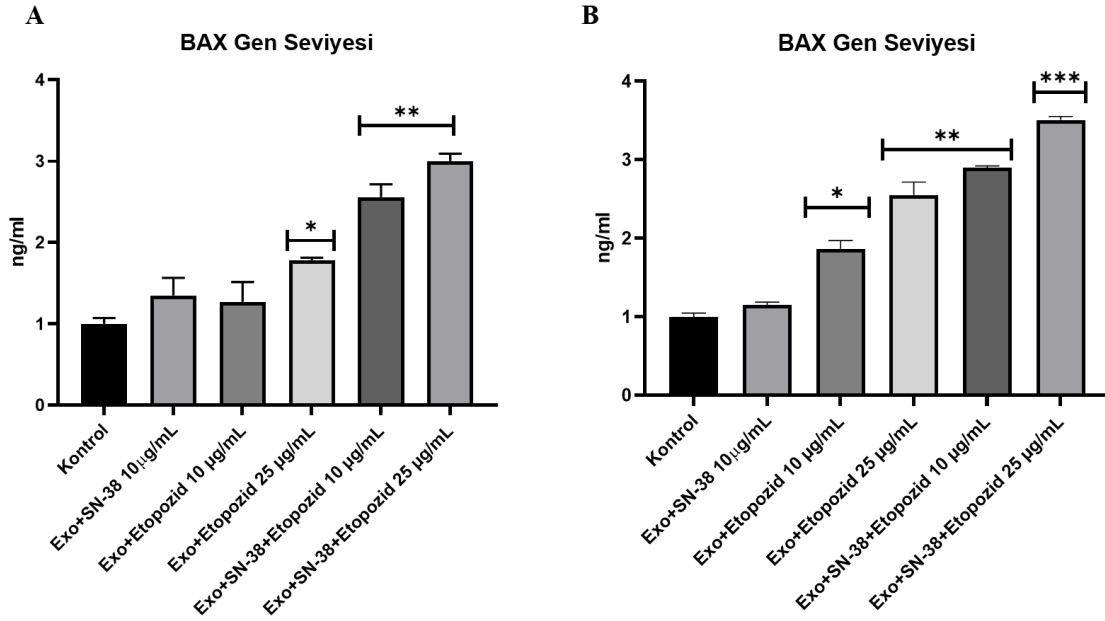
Bax, Bcl-2 ve Bcl-xL, hücrenin mitokondri zarında lokalize olup hücrenin yaşayıp yaşamayacağına karar veren Bcl-2 protein ailesinin üyelerindendir. Bu proteinler kendi aralarında pro-apoptotik ve anti-apoptotik olarak iki gruba ayrılır. Aralarındaki denge, hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirlemede önemli bir belirteçtir.

BAX, pro-apoptotik bir protein olarak hücrede ölüm sinyallerinin oluşmasıyla birlikte mitokondrinin dış membranında birikir ve burada por oluşumunu indükler. Bu porların oluşması, mitokondriden sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasına neden olur. Sitokrom c'nin salınımı, kaspaz-3 aktivasyonunu tetikleyerek apoptotik hücre ölümünün geri dönüşsüz aşamasını başlatır ve hücrenin apoptoza yönelmesine neden olur.

72 saatlik tedavi süresi sonrasında elde edilen BAX seviyeleri Şekil 16'da verilmiştir. Sonuçlarda kontrol grubu 1 olarak kabul edilmiş ve tedavi grupları bu orana göre kıyaslanmıştır.

Şekil 16-A'ya göre T-98 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 µg/mL tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak Exo + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık %75 artış gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %156 ve %203 artarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %43,8 ve %70,2 oranında artış gözlemlenmiştir.

Şekil 16-B'ye göre U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL tedavi grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarında kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %86 ($p<0.05$) ve %153 ($p<0.01$) oranında artış gözlemlenmiştir. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %190 ($p<0.01$) ve %250 ($p<0.001$) artarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %55 ve %88,2 şeklinde artış gözlemlenmiştir.



Şekil 16. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde BAX gen düzeyleri üzerine etkisi. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarında BAX ekspresyonu hem kontrol grubuna göre hem de diğer tedavi gruplarına kıyasla iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak değerlendirilmiştir.

4.10.5. Hücresel Bcl-2 ve Bcl-xL gen seviyelerinin analiz sonuçları

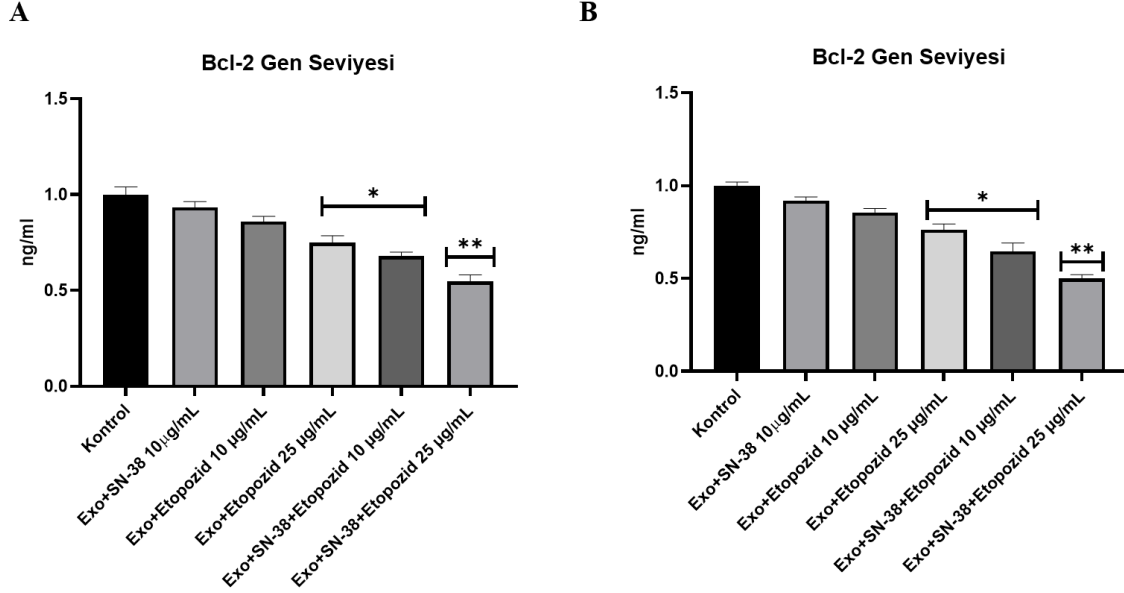
Bcl-2 ve Bcl-xL, hücrede anti-apoptotik etki gösteren ve BAX aktivitesini dengeleyen önemli proteinlerdir. Bu proteinler, BAX'a bağlanarak onun aktivasyonunu ve mitokondri dış membranında por oluşumunu inhibe eder. Böylece mitokondriden sitokrom c salınımı engellenir. Sitokrom c salınımının baskılanması, kaspaz aktivasyonunun önlenmesine ve sonuç olarak apoptotik hücre ölümünün baskılanmasına yol açar.

Bcl-2 ve Bcl-xL gen düzeyleri Şekil 17 ve 18'de verilmiştir. Bcl-2 gen seviyeleri 72 saatlik tedavi sonrasında T-98 ve U373 GBM hücrelerinde anlamlı bir azalma göstermiştir.

Şekil 17-A'ya göre T-98 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 µg/mL tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak Exo + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık %25 azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL sırasıyla %32 ($p<0.05$) ve %46 ($p<0.01$) azalarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %20,9 ve %37,2 şeklinde azalma gözlemlenmiştir.

Şekil 17-B'ye göre U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 µg/mL tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık %24

azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ sırasıyla %36 ($p<0.05$) ve %50 ($p<0.01$) azalarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %24,7 ve %41,2 oranında azalma gözlemlenmiştir.



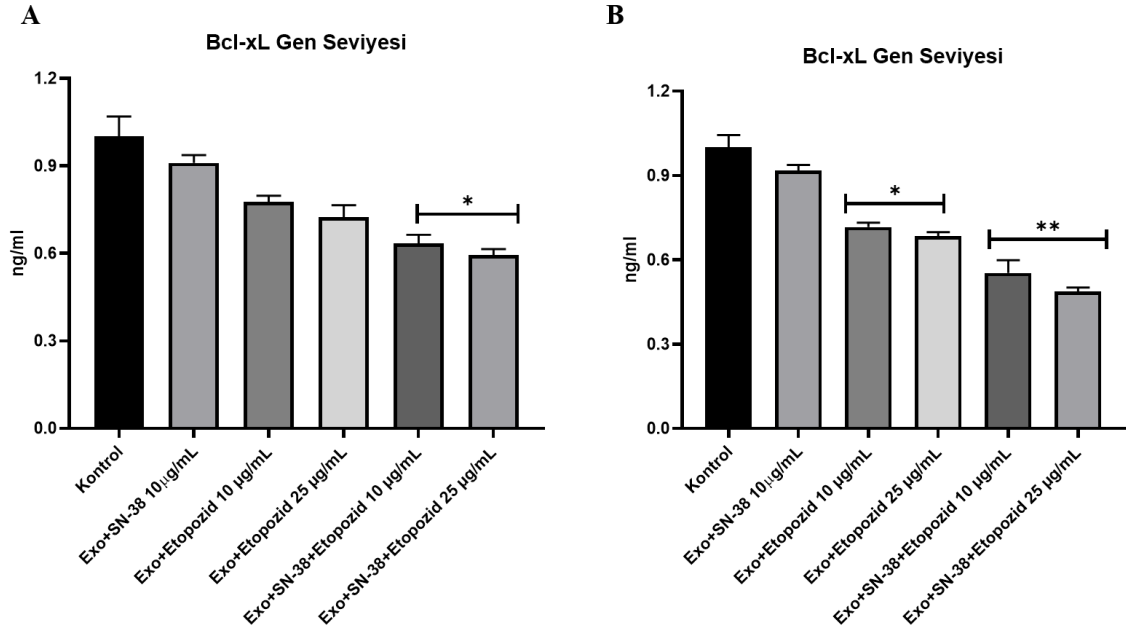
Şekil 17. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde Bcl-2 gen düzeyleri üzerine etkisi. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarında Bcl-2 ekspresyonu hem kontrol grubuna göre hem de diğer tedavi gruplarına kıyasla iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak değerlendirilmiştir.

Bcl-xL gen seviyeleri 72 saatlik tedavi sonrasında T-98 ve U373 GBM hücrelerinde anlamlı bir azalma göstermiştir.

Şekil 18-A'ya göre T-98 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ sırasıyla %37 ve %41 azalarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %18,2 ve %23,4 oranında azalma gözlemlenmiştir.

Şekil 18-B'ye göre U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarında kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %29 ve %32 azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ sırasıyla %45

ve %52 oranında azalarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %20,2 ve %32,4 oranında azalma gözlemlenmiştir.



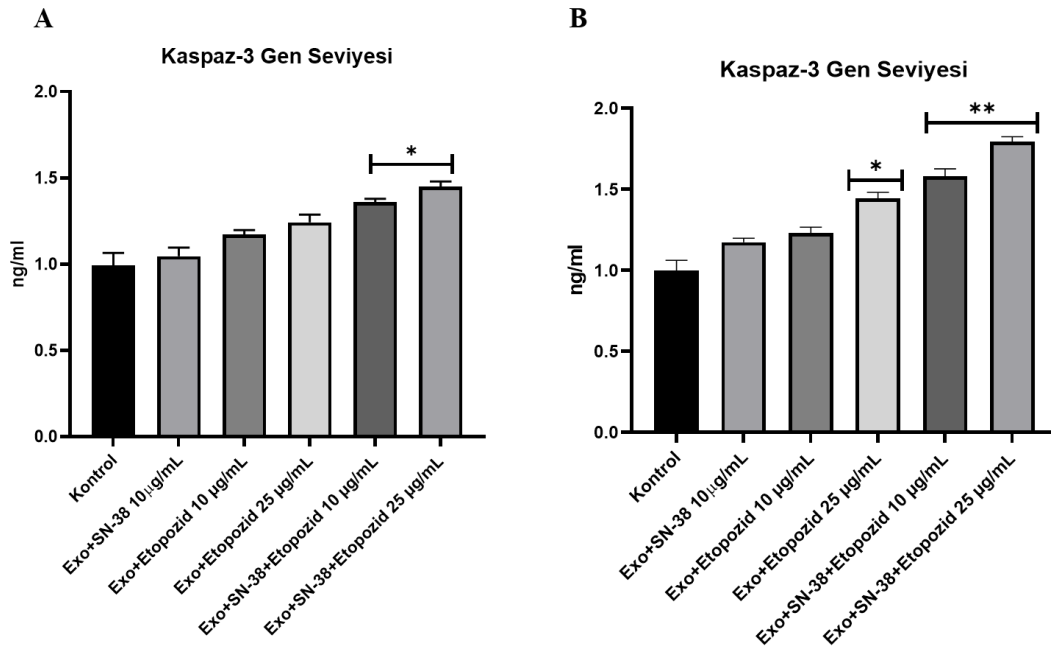
Şekil 18. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde Bcl-xL gen düzeyleri üzerine etkisi. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarında Bcl-xL ekspresyonu hem kontrol grubuna göre hem de diğer tedavi gruplarına kıyasla iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak değerlendirilmiştir.

4.10.6. Hücresel kaspaz-3 gen seviyesinin analiz sonuçları

Kaspaz-3, apoptotik sürecin ilerleyen aşamalarında hücresel bileşenlerin parçalanmasından sorumlu olan temel efektör kaspazlardan biridir. Mitokondriden sitokrom c salınımının ardından apoptosom kompleksi oluşur ve bu kompleks kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Aktif olan kaspaz-9, inaktif prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 formuna dönüştürür. Aktif kaspaz-3, hücresel proteinlerin parçalanmasını ve apoptotik hücre ölümünün ilerlemesini sağlayarak apoptozun önemli biyokimyasal göstergelerinden biri olarak kabul edilir. Bu nedenle kaspaz-3 düzeylerindeki artış, apoptotik sürecin aktivasyonunun ve hücresel parçalanmanın önemli bir göstergesidir.

72 saatlik deney sonunda analiz edilen Kaspaz-3 gen düzeyleri Şekil 19'da verilmiştir. Şekil 19-A'ya göre T-98 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL sırasıyla %36 ve %45 artarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %16,2 ve %23,9 oranında artış gözlemlenmiştir.

Şekil 19-B'ye göre U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 µg/mL tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık %44 artış gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL sırasıyla %58 ve %75 oranında artarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %9,7 ve %23,6 oranında artış gözlemlenmiştir.



Şekil 19. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde Kaspaz-3 gen düzeyleri üzerine etkisi. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarında Kaspaz-3 ekspresyonu hem kontrol grubuna göre hem de diğer tedavi gruplarına kıyasla iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak değerlendirilmiştir.

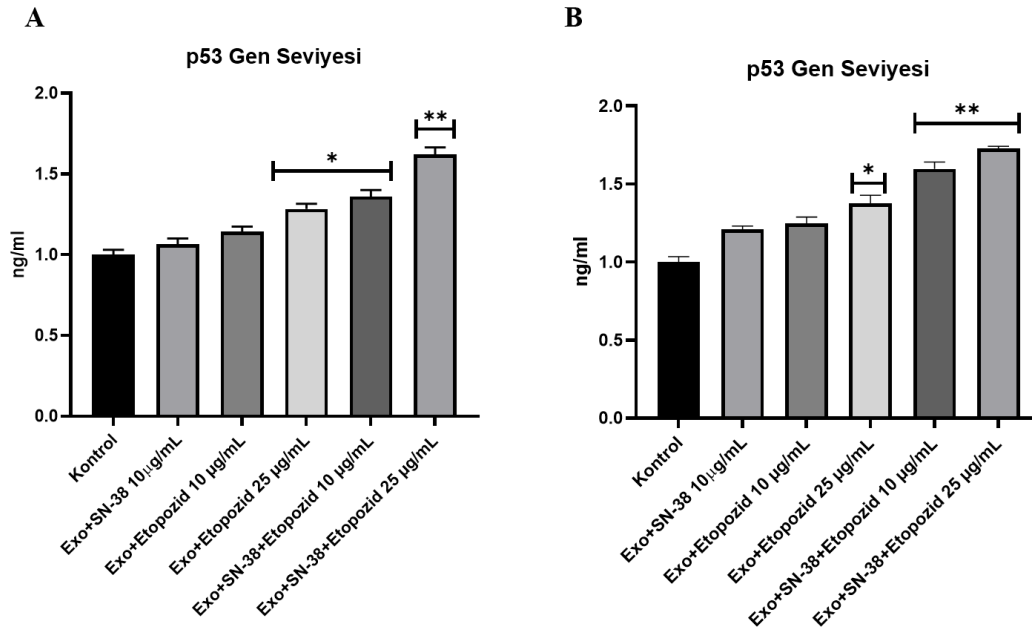
4.10.7. Hücresel p53 ve p21 gen seviyelerinin analiz sonuçları

p53 ve p21, hücre döngüsünün kontrolü ve DNA hasarına karşı gelişen hücresel yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynayan moleküler belirteçlerdir. DNA hasarı veya hücresel stres koşullarında p53 proteini aktive olarak p21 geninin transkripsiyonunu uyarır. p21 proteini ise siklin bağımlı kinazları (CDK) inhibe ederek hücre döngüsünün, özellikle G1/S geçişinin durdurulmasını sağlar. Bu nedenle p53 ve p21 ekspresyonundaki değişimler, hücre döngüsünün durması ve apoptotik yanıtın değerlendirilmesinde önemli moleküler göstergeler olarak kabul edilmektedir.

72 saatlik deney süresi sonunda analiz edilen p53 ve p21 gen düzeyleri Şekil 20 ve 21’de verilmiştir.

Şekil 20-A'ya göre T-98 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 µg/mL tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak Exo + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubu kontrole göre yaklaşık %28 artarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL sırasıyla %36 ($p<0.05$) ve %62 ($p<0.01$) artarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %6,3 ve %26,6 oranında artış gözlemlenmiştir.

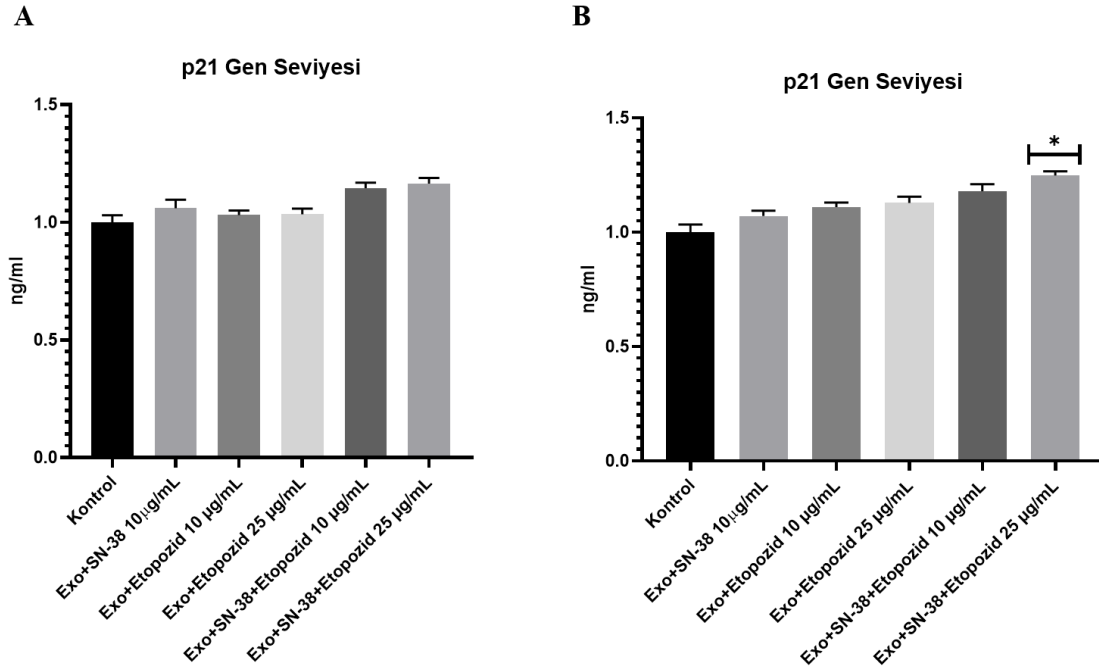
Şekil 20-B'ye göre U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 µg/mL tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık %37 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL sırasıyla %59 ve %72 oranında artarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). Tedavi gruplarına kıyasla ise sırasıyla %16,1 ve %25,5 oranında artış gözlemlenmiştir.



Şekil 20. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde p53 gen düzeyleri üzerine etkisi. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarında p53 ekspresyonu hem kontrol grubuna göre hem de diğer tedavi gruplarına kıyasla iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 21-A'ya göre T-98 GBM hücrelerinde tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Şekil 21-B'ye göre U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL tedavi grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu ile hem de Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL %25 oranında artarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tedavi gruplarına kıyasla ise %10,7 oranında artış gözlemlenmiştir.



Şekil 21. Exo + SN-38 ve Exo + Etopozid tedavilerinin T-98 (A) ve U373 (B) GBM hücrelerinde p21 gen düzeyleri üzerine etkisi. T-98 GBM hücrelerinde tedavi grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir. U373 GBM hücrelerinde Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda p21 ekspresyonu hem kontrol grubuna göre hem de diğer tedavi gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak değerlendirilmiştir.

4.11. ELISA Analiz Sonuçları

72 saatlik tedavi sonrası hücre süspansiyonları toplandı ve LDH, MDA, KAT, IL-1 β , IL-6, IL-10, kaspaz-3 ve kaspaz-9 metabolitlerinin ölçümü için ELISA kitleri kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

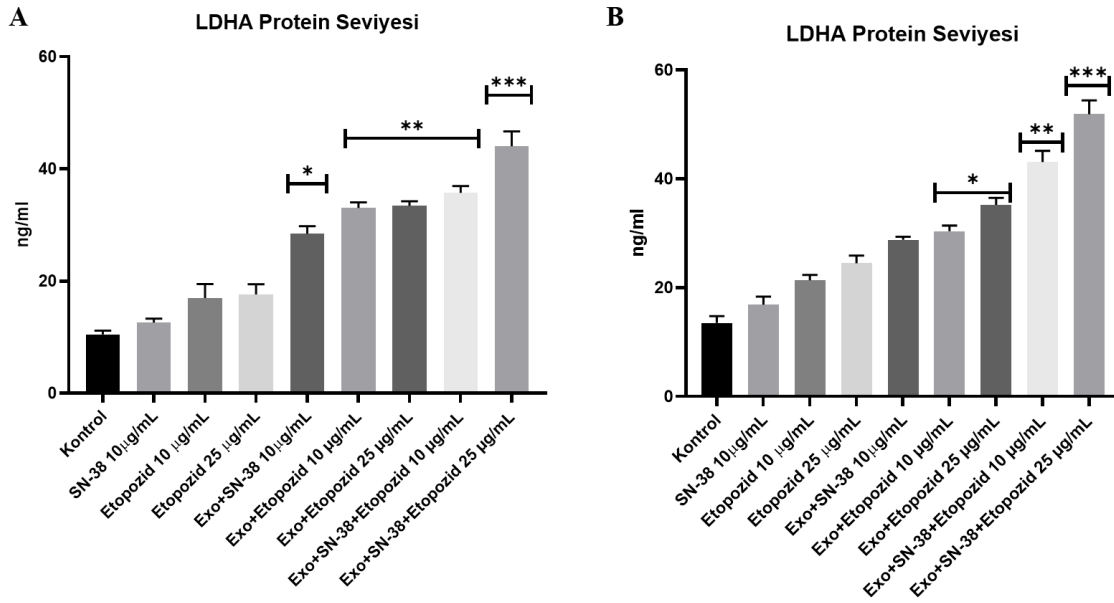
4.11.1. LDH protein seviyesinin sonuçları

LDH, hücrelerde glikoz metabolizması ve enerji üretiminde rol oynayan önemli bir enzimdir. Hücre membran bütünlüğünün bozulması sonucunda sitoplazmik LDH'nin hücre dışına salınması, hücre hasarının ve hücre ölümünün bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, hücre kültürü süpernatantındaki yüksek LDH düzeyleri, hücre membran bütünlüğünün bozulduğunu ve hücre canlılığının azaldığını göstermektedir.

72 saatlik deney sonunda analiz edilen LDH seviyeleri Şekil 22’de verilmiştir (A: T-98 ve B: U373).

Şekil 22-A’ya göre, SN-38 10 µg/mL, Etopozid 10 ve 25 µg/mL monoterapileri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu hem de monoterapi grupları ile kıyaslanmıştır. Exo + Sn 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kontrole göre sırasıyla yaklaşık olarak %180 ($p<0.05$), %230 ve %231 ($p<0.01$) oranında artmıştır. Monoterapi gruplarına göre ise sırayla yaklaşık olarak %75, %100 ve %106 oranında artmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık olarak %250 ($p<0.01$) ve %340 ($p<0.001$) oranında artış gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık olarak %6,06 ve %33,33 oranında artmıştır.

Şekil 22-B’ye göre, SN-38 10 µg/mL, Etopozid 10 ve 25 µg/mL monoterapileri ve Exo + SN-38 10 µg/mL tedavi grubu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu hem de monoterapi grupları ile kıyaslanmıştır. Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kontrole göre sırasıyla yaklaşık olarak %130,8 ve %169,25 oranında artmıştır ($p<0.05$). Monoterapi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık olarak %42,86 ve %66,67 oranında artış gözlemlenmiştir. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık olarak %230 ($p<0.01$) ve %292,31 ($p<0.001$) oranında artmıştır. Tedavi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık olarak %22,86 ve %45,71 oranında artmıştır.



Şekil 22. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının LDHA üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında ELISA yöntemi ile LDHA değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları, kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrole göre en etkili artış Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.

4.11.2. Katalaz ve MDA protein seviyeleri sonuçları

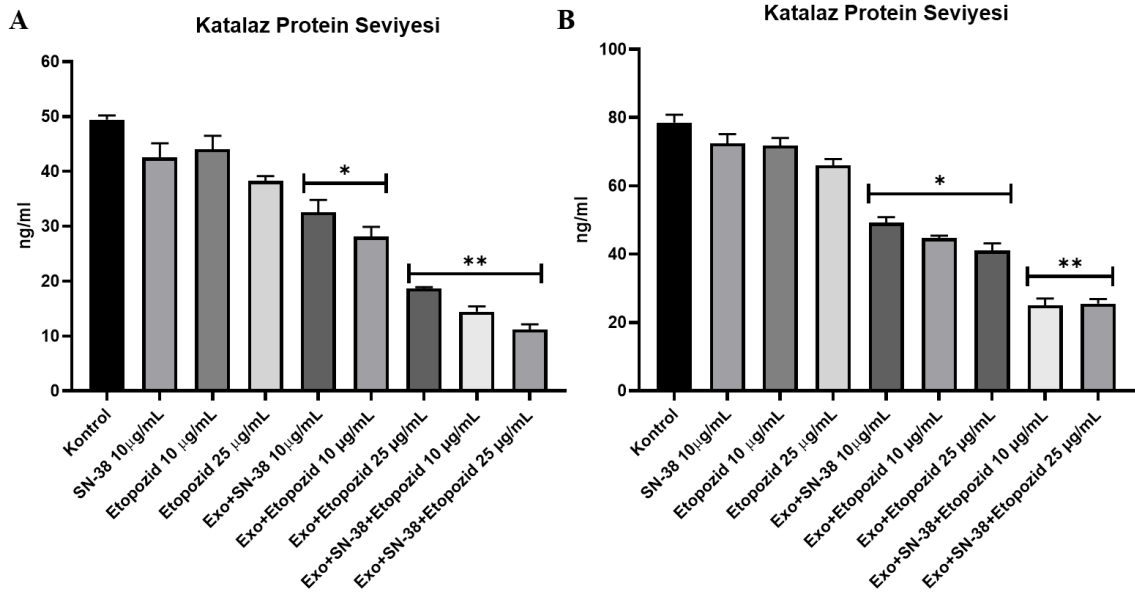
Tedavi sonrası oksidatif hasar düzeyindeki değişimleri değerlendirmek amacıyla KAT ve MDA düzeyleri analiz edilmiştir. MDA, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan ve hücresel oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olarak kabul edilen toksik bir son üründür. KAT serbest radikalleri ve özellikle hidrojen peroksiti detoksifiye ederek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan önemli bir antioksidan enzimdir. MDA düzeylerindeki artış ise hücrelerde lipid peroksidasyonunun ve buna bağlı oksidatif hasarın arttığını göstermektedir. Bununla birlikte, şiddetli veya kronik oksidatif stres koşullarında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması sonucunda KAT aktivitesinde azalma görülebilmektedir. Bu nedenle, yüksek KAT aktivitesi genel olarak güçlü bir antioksidan savunma kapasitesini yansıtırken, KAT düzeylerindeki azalma oksidatif stresin artışına işaret etmektedir.

72 saatlik deneyin sonunda analiz edilen KAT ve MDA seviyeleri Şekil 23 ve 24'te verilmiştir (A: T-98 ve B: U373).

Şekil 23-A'ya göre, SN-38 10 µg/mL, Etopozid 10 ve 25 µg/mL monoterapileri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu hem de monoterapi grupları ile kıyaslanmıştır. Exo + Sn 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kontrole göre sırasıyla yaklaşık olarak %36 ($p<0.05$), %44 ($p<0.05$) ve %64 ($p<0.01$) oranında azalma

gözlemlenmiştir. Monoterapi gruplarına göre ise sırayla yaklaşık olarak %23,81, %33,33 ve %57,14 oranında azalmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık %70 ve %78 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0.01$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %56,25 ve %65,63 oranında azalmıştır.

Şekil 23-B'ye göre, SN-38 10 µg/mL, Etopozid 10 ve 25 µg/mL monoterapileri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu hem de monoterapi grupları ile kıyaslanmıştır. Exo + Sn 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kontrole göre sırasıyla yaklaşık olarak %37,18 %43,59 ve %47,44 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Monoterapi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık %30, %37,14 ve %41,43 oranında azalmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık %67,88 ve %67,22 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0.01$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %38,90 ve %37,63 oranında azalmıştır.

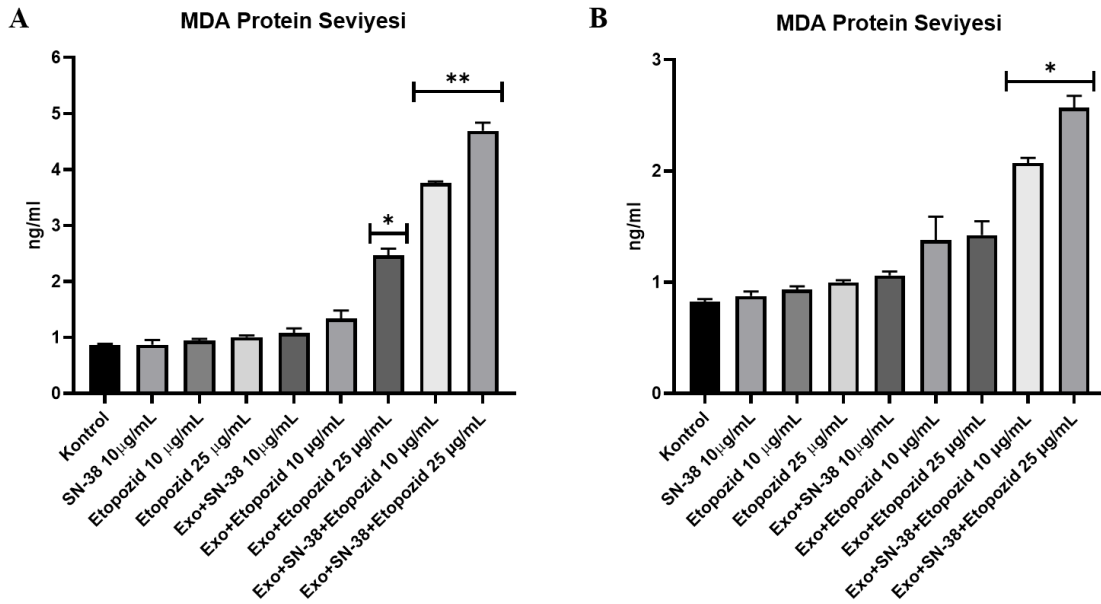


Şekil 23. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının KAT üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında ELISA yöntemi ile KAT değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları, kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrole göre en etkili azalma Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

Şekil 24-A'ya göre, SN-38 10 µg/mL, Etopozid 10 ve 25 µg/mL monoterapileri ve Exo + SN 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 µg/mL kombine tedavi grupları kontrole göre istatistiksel

olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grubu hem kontrol grubu hem de monoterapi grupları ile kıyaslanmıştır. Exo + Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ kontrol grubuna göre yaklaşık %186 oranında arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Monoterapi gruplarına göre ise yaklaşık %84,96 oranında artmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık %336,05 ve %446,51 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0,01$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %50 ve %88 oranında artmıştır.

Şekil 24-B'ye göre, SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ monoterapileri ve Exo + SN 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ kombine tedavi grupları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık %143,90 ve %213,41 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0,01$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %40,85 ve %80,99 oranında artmıştır.



Şekil 24. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının MDA üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında ELISA yöntemi ile MDA değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrole göre en etkili artış Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

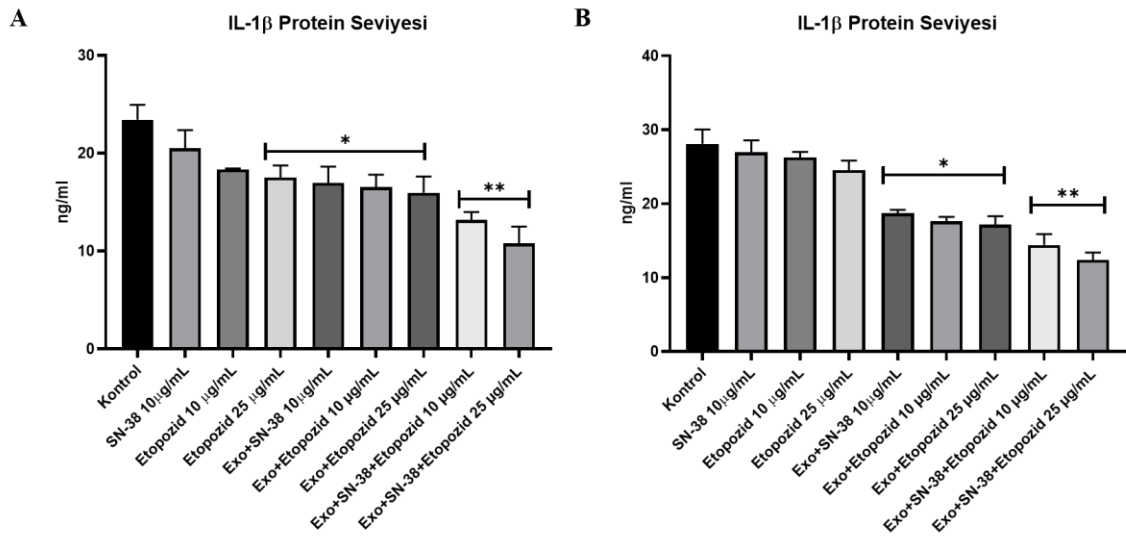
4.11.3. IL-1 β , IL-6 ve IL-10 protein seviyelerinin sonuçları

IL-1 β , IL-6 ve IL-10, başta bağışıklık sistemi hücreleri olmak üzere çeşitli hücreler tarafından üretilen ve hücreler arası iletişimi sağlayan önemli sitokinlerdir. Bu moleküller bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde, hücre içi ve hücreler arası homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Sitokinler, fonksiyonlarına bağlı olarak proinflamatuvar veya antiinflamatuvar etkiler gösterebilmektedir.

IL-1 β , inflamatuvar yanıtın başlatılmasında rol oynayan en önemli proinflamatuvar sitokinlerden biridir. İnflamasyonun başlatılmasında rol oynayan önemli faktörlerden biri, hücre ortamda yabancı olarak algılanan maddelerin varlığıdır. Bu tür uyaranların makrofajlar tarafından tanınması, IL-1 β üretimini ve salınımını tetiklemekte; IL-1 β ise diğer bağışıklık hücrelerine sinyal göndererek yabancı etkenlerin ortadan kaldırılmasına yönelik inflamatuvar yanıtı başlatmaktadır. IL-6 ise hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar özellik gösterebilen pleiotropik bir sitokindir. Bununla birlikte, özellikle inflamatuvar süreçlerde IL-1 β ile benzer şekilde hareket ederek inflamasyonun sürdürülmesine ve artmasına katkıda bulunabilmektedir. Buna karşılık IL-10, önemli bir antiinflamatuvar sitokin olarak proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılamakta ve aşırı bağışıklık yanıtını sınırlandırmaktadır. Bu özellik sayesinde inflamatuvar yanıtın kontrol altına alınmasına, doku hasarının azaltılmasına ve iyileşme ile doku onarımı süreçlerinin desteklenmesine katkı sağlamaktadır.

Şekil 25-A'ya göre, SN-38 10 μ g/mL ve Etopozid 10 μ g/mL monoterapileri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak Etopozid 25 μ g/mL monoterapi grubunda kontrole göre yaklaşık %26,09 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 10 μ g/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 μ g/mL tedavi grupları hem kontrol grubu hem de monoterapi grupları ile kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 10 μ g/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 μ g/mL tedavi gruplarında kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %26,52, %28,26 ve %30,87 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Monoterapi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık %15,50, %17,50 ve %20,50 oranında azalmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 μ g/mL kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 μ g/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 μ g/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 μ g/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 μ g/mL tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık %43,48 ve %56,52 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0.01$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %13,33 ve %33,33 oranında azalmıştır.

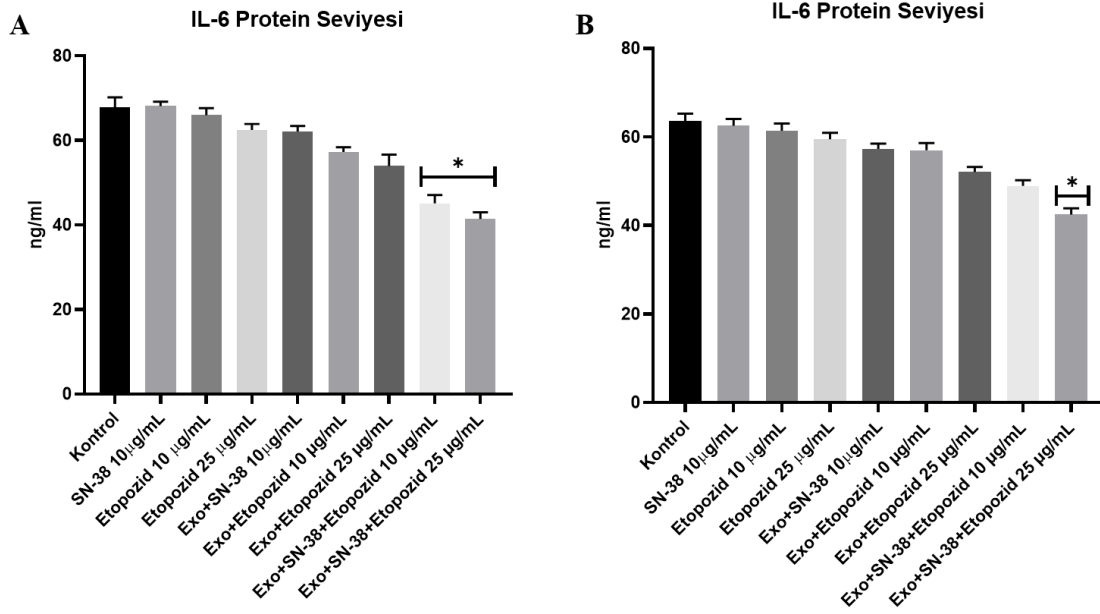
Şekil 25-B'ye göre, SN-38 10 µg/mL ve Etopozid 10 ve 25 µg/mL monoterapileri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları hem kontrol grubu hem de monoterapi grupları ile kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarının kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %35,71, %37,29 ve %38,75 oranında azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Monoterapi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık %25, %26,83 ve %28,54 oranında azalmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık %50 ve %57,14 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0,01$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %17,65 ve %29,41 oranında azalmıştır.



Şekil 25. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının IL-1β üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında ELISA yöntemi ile IL-1β değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları, kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrole göre en etkili azalma Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

Şekil 26-A'ya göre, SN-38 10 µg/mL ve Etopozid 10 ve 25 µg/mL monoterapileri, Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi grupları kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi gruplarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık %32,84 ve %38,81 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %15,09 ve %22,64 oranında azalmıştır.

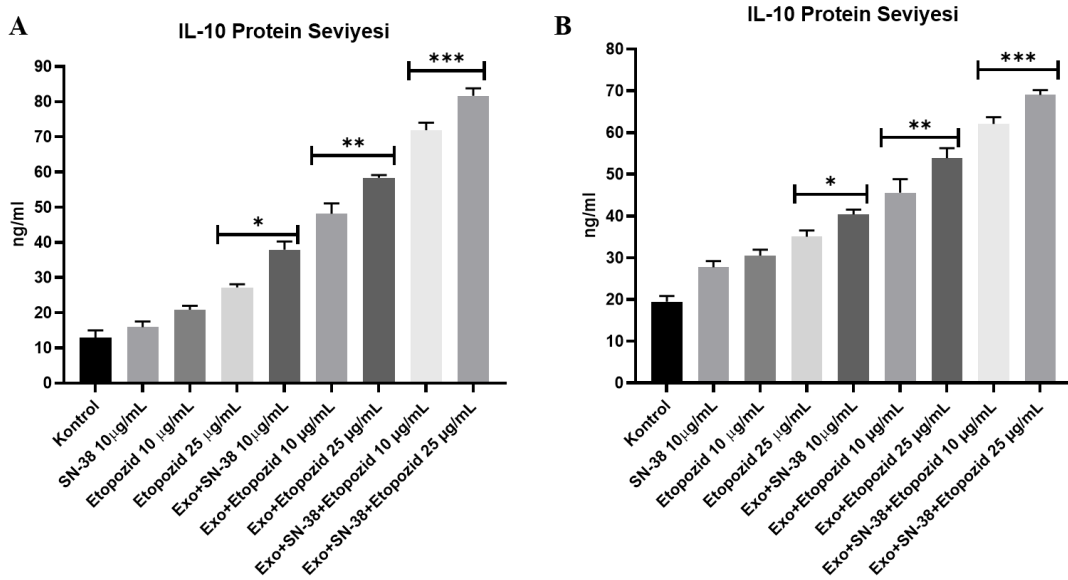
Şekil 26-B'ye göre, SN-38 10 µg/mL ve Etopozid 10 ve 25 µg/mL monoterapileri, Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları ve Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL kombine tedavi grubu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL kombine tedavi grubu kontrol grubuna ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grubunda kontrole göre yaklaşık %33,33 oranında azalma gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Tedavi gruplarına göre yaklaşık %19,23 oranında azalmıştır.



Şekil 26. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının IL-6 üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında ELISA yöntemi ile IL-6 değerlendirilmiştir. Kontrole göre istatistiksel olarak en etkili azalma Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

Şekil 27-A'ya göre, SN-38 10 µg/mL ve Etopozid 10 µg/mL monoterapi grupları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak Etopozid 25 µg/mL monoterapi grubunda kontrole göre yaklaşık %125 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları kontrol grubu ve monoterapi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrole göre sırasıyla yaklaşık %208,33 ($p<0.05$), %300 ve %383,33 ($p<0.01$) oranında artış gözlemlenmiştir. Monoterapi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık %37,04, %77,78 ve %114,81 oranında artmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grupları kontrole ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrole göre sırasıyla yaklaşık %491,67 ve %575 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0.001$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %22,41 ve %39,66 oranında artmıştır.

Şekil 27-B'ye göre, SN-38 10 µg/mL ve Etopozid 10 µg/mL monoterapi grupları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak Etopozid 25 µg/mL monoterapi grubunda kontrole göre yaklaşık %84,21 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları kontrol grubu ve monoterapi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrole göre sırasıyla yaklaşık %110,53 ($p<0.05$), %136,84 ve %178,95 ($p<0.01$) oranında artış gözlemlenmiştir. Monoterapi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık %14,29, %28,57 ve %51,43 oranında artmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grupları kontrole ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrole göre sırasıyla yaklaşık %226,32 ve %263,16 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0.001$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %16,98 ve %30,19 oranında artmıştır.



Şekil 27. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının IL-10 üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında ELISA yöntemi ile IL-10 değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları, kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrole göre en etkili artış Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

4.11.4. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 protein seviyelerinin sonuçları

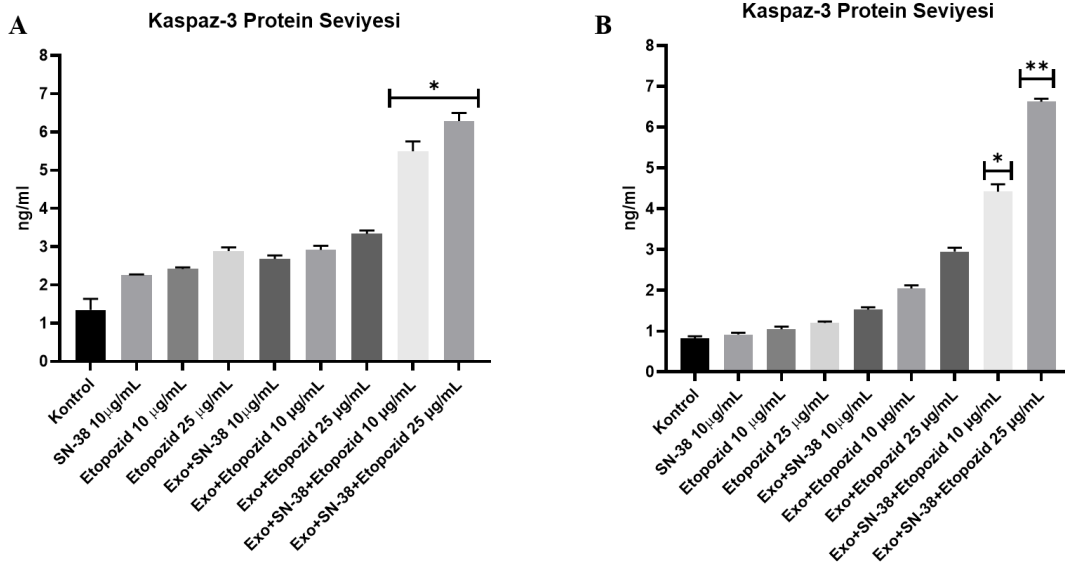
Kaspaz-3 ve kaspaz-9, apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan proteolitik enzimlerdir. Yüksek düzeyde oksidatif stres ve/veya onarılamayan DNA hasarı sonucunda mitokondriden sitokrom c salınmaktadır. Salınan sitokrom c, Apaf-1 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturmakta ve bu kompleks kaspaz-9'un aktivasyonunu tetiklemektedir. Aktif olan kaspaz-9, yürütücü kaspazlardan biri olan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptotik süreci başlatmaktadır. Kaspaz-3 aktivasyonu ile hücresel proteinlerin ve DNA'nın parçalanması, hücresel yapıların bozulması ve nihayetinde hücre membran bütünlüğünün kaybı

gerçekleşmektedir. Bu süreçlerin sonucunda programlanmış hücre ölümü olan apoptoz meydana gelmektedir.

72 saatlik deney süresi sonunda analiz edilen Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 seviyeleri Şekil 28 ve 29'da verilmiştir.

Şekil 28-A'ya göre, SN-38 10 µg/mL ve Etopozid 10 µg/mL monoterapi grupları ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grupları, kontrol grubu ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrole göre sırasıyla yaklaşık %315,38 ve %376,92 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %63,64 ve %87,88 oranında artmıştır.

Şekil 28-B'ye göre, SN-38 10 µg/mL ve Etopozid 10 µg/mL monoterapi grupları ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + SN-38 + Etopozid 10 µg/mL ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL tedavi grupları, kontrol grubu ve Exo + SN-38 10 µg/mL, Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrole göre sırasıyla yaklaşık %342 ($p<0.05$) ve %562 ($p<0.01$) oranında artış gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %50,34 ve %125,17 oranında artmıştır.

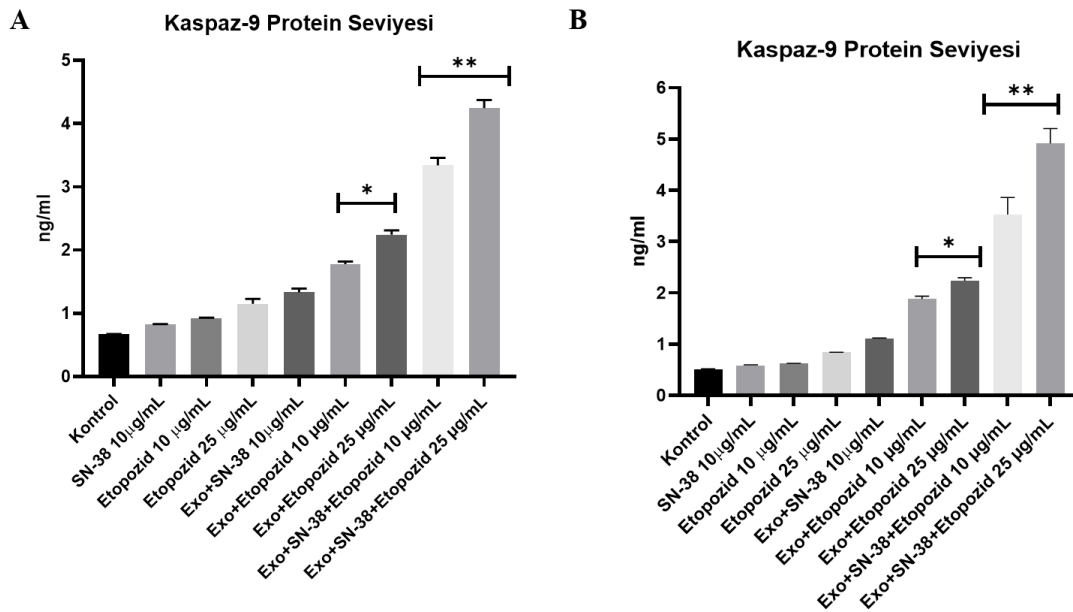


Şekil 28. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etopozid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etopozid ve SN-38 + Etopozid kombinasyonlarının Kaspaz-3 üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında ELISA yöntemi ile Kaspaz-3 değerlendirilmiştir. Kontrole göre istatistiksel olarak en etkili artış Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 µg/mL kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

Şekil 29-A'ya göre, SN-38 10 µg/mL ve Etopozid 10 µg/mL monoterapi grupları ve Exo + SN-38 10 µg/mL tedavi grubu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır

($p>0.05$). Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları kontrol grubu ve monoterapi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %165,67 ve %228,36 oranında artmıştır ($p<0.05$). Monoterapi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık %54,78 ve %91,30 oranında artmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, kontrol grubu ve Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %398,51 ve %589,55 oranında artış gözlemlenmiştir ($p<0,01$). Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %87,64 ve %138,20 oranında artmıştır.

Şekil 29-B'ye göre, SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Etopozid 10 $\mu\text{g/mL}$ monoterapi grupları ve Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grubu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları kontrol grubu ve monoterapi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık %252,83 ve %320,75 oranında artmıştır ($p<0.05$). Monoterapi gruplarına göre ise sırasıyla yaklaşık %70 ve %102,2 oranında artmıştır. Exo + SN-38 + Etopozid 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, kontrol grubu ve Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$, Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi gruplarıyla kıyaslanmıştır. Kontrole göre sırasıyla yaklaşık %604 ve %882 oranında artış gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarına göre sırasıyla yaklaşık %57,85 ve %120,18 oranında artmıştır.



Şekil 29. T-98 ve U373 GBM hücrelerinde SN-38 ve Etoposid monoterapileri ile eksozom aracılı SN-38, Etoposid ve SN-38 + Etoposid kombinasyonlarının Kaspaz-9 üzerine etkileri. (A) T-98 ve (B) U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında ELISA yöntemi ile Kaspaz-9 değerlendirilmiştir. Exo + SN-38 10 $\mu\text{g/mL}$ ve Exo + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ tedavi grupları, kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrole göre istatistiksel olarak etkili artış Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ kombine tedavi gruplarında gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

5. TARTIŞMA

GBM, erişkinlerde görülen en agresif primer santral sinir sistemi tümörlerinden biridir. Günümüzde standart tedavi yaklaşımı, cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ve TMZ kemoterapisini içermektedir (R. Stupp et al., 2005). Ancak bu tedavi yaklaşımına rağmen hastalıkta yeniden tekrarlama oranı oldukça yüksektir. Ayrıca, KBB'nin etkin ilaç geçişini sınırlandırması ve GBM'nin heterojen yapısı tedavi başarısını kısıtlayarak sağkalımı azaltmaktadır (Rabah et al., 2023). Bu nedenle son yıllarda GBM tedavisinde daha etkili ve hedeflendirilmiş yeni antikanser ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır (Bae et al., 2024). SN-38, irinotekanın aktif metaboliti olan güçlü bir antikanser ajandır. DNA replikasyonu sırasında DNA sarmalının açılmasını sağlayan topoizomera I enzimini inhibe ederek sitotoksik etkisini göstermektedir. Bununla birlikte, SN-38'in tek başına klinik kullanımı henüz söz konusu değildir; günümüzde daha çok deneysel araştırmalarda değerlendirilmektedir (Yang et al., 2023). Etopozid ise topoizomera II inhibitörü olarak etki gösteren ve başta akciğer kanseri olmak üzere çeşitli hematolojik maligniteler ile germ hücreli tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan önemli bir sitotoksik ajandır (B. K. Sinha, 1995). Bu nedenle çalışmada, topoizomera enzimleri üzerindeki sinerjik etki göstereceği düşünülerek SN-38 ve Etopozid'in kombinasyonu kullanılmıştır.

Eksozomlar, düşük immünojenite ve toksisite sergilemeleri, biyolojik uyumlulukları, proteinler, lipitler, DNA, küçük müdahale edici ribonükleik asit (siRNA), mRNA, miRNA ve çeşitli sinyal molekülleri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olarak aktif yükler içermeleri ve kaynak hücreye özgü yüzey bileşenlerini kısmen koruyabilmeleri nedeniyle antikanser ilaçların taşınmasında umut vadeden doğal nanotaşıyıcılarıdır (Gutierrez-Millan et al., 2021). Özellikle tümör hücresi kaynaklı eksozomların homotipik hücresel etkileşimlerinden yararlanılması, terapötik yüklerin köken aldıkları tümör hücrelerine taşınmasını kolaylaştırabilecek bir sistem olarak değerlendirilmektedir (Qiao et al., 2020).

Bu doğrultuda tez çalışmamda, T-98 ve U373 glioblastoma hücrelerinden izole edilen otolog eksozomlara SN-38 ve Etopozid'in tekli ve kombine olarak yüklenmesinin antikanser etkinliği, apoptotik belirteçler, inflamatuvar yanıt, oksidatif stres göstergeleri ve eksozomal miRNA ekspresyonları üzerinden kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmadan elde edilen bulgular, eksozom aracılı SN-38 ve Etopozid uygulamalarının T-98 ve U373 glioblastoma hücrelerinde hücre canlılığı ve hücresel homeostaz üzerinde belirgin değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Özellikle MTT sonuçlarında gözlenen hücre canlılığındaki azalma ve LDH düzeylerindeki değişimler, eksozom aracılı ilaç

uygulamalarının GBM hücrelerinde belirgin bir sitotoksik yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, tedavi gruplarında MDA düzeylerinde gözlenen artış ve KAT aktivitesindeki azalma, uygulamaların hücrel antioksidan savunma kapasitesini etkileyerek oksidatif stres oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Özellikle eksozomla SN-38 ve Etopozid'in birlikte uygulandığı gruplarda oksidatif stres göstergelerinde gözlenen daha belirgin değişimler, iki topoizomera inhibitörünün birlikte kullanımının hücrel stres yanıtını güçlendirebileceğini düşündürmektedir. Buna paralel olarak, kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerinde gözlenen değişimler, eksozom aracılı SN-38 ve Etopozid uygulamalarının mitokondriyal hasar ile ilişkili intrinsik apoptotik yolları etkileyebileceğini düşündürmektedir. BAX, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi apoptotik ve hücrel yaşam sinyalleşmesinde rol alan belirteçlerde meydana gelen değişiklikler de bu apoptotik yanıtın değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Çalışmanın bir diğer önemli bulgusu, eksozom kaynaklı miRNA ekspresyonlarında tedaviye bağlı değişikliklerin ortaya konulmuş olmasıdır. miR-21, miR-142-3p ve miR-150-5p ekspresyonlarında gözlenen değişimler, SN-38 ve Etoposid uygulamalarının yalnızca hücrel canlılık, oksidatif stres ve apoptotik yanıt üzerinde değil, aynı zamanda hücreler arası moleküler iletişimde rol oynayan eksozomal miRNA profili üzerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle miR-21'in PTEN, PDCD4, RECK ve TIMP3 gibi hücre proliferasyonu, apoptoz ve invazyonla ilişkili hedeflerle; miR-142-3p'nin RAC1, FZD7/Wnt- β -katenin ve TGF- β sinyal yollarıyla; miR-150-5p'nin ise CTNNB1/ β -katenin aracılı süreçlerle ilişkilendirilmiş olması, bu miRNA'lardaki tedaviye bağlı değişimlerin GBM hücrelerinin proliferatif, apoptotik ve invaziv özelliklerinin düzenlenmesi açısından biyolojik önem taşıyabileceğini düşündürmektedir. Eksozomal miRNA'ların tedavi sonrasında değişim göstermesi, bu moleküllerin yalnızca tedavi yanıtının bir göstergesi değil, aynı zamanda tedaviye bağlı hücrel yeniden programlanmanın potansiyel araçlarından biri olabileceğini de düşündürmektedir.

Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, eksozom aracılı SN-38 ve Etopozid uygulamalarının GBM hücrelerinde yalnızca doğrudan sitotoksik etki oluşturmakla kalmayıp, oksidatif stres, mitokondriyal homeostaz, mitofaji, apoptotik hücre ölümü ve eksozomal miRNA düzenlenmesi ile ilişkili çoklu hücrel mekanizmaları etkileyebileceği düşünülmektedir. Özellikle SN-38 ve Etopozid'in sırasıyla topoizomera I ve topoizomera II'yi hedeflemesi sonucunda oluşan DNA hasarının, oksidatif stres ve mitokondriyal işlev bozukluğu ile apoptotik yanıtı güçlendirebileceği öne sürülebilir. Eksozomların bu ajanların

hücre içine taşınmasını kolaylaştırması ise söz konusu etkilerin daha belirgin hale gelmesine katkıda bulunmuştur. Sonuç olarak, elde edilen veriler eksozom temelli SN-38 ve Etopozid uygulamalarının GBM hücrelerinde sitotoksiteyi artırırken oksidatif stres ve mitokondriyal yanıtları etkileyebildiğini, intrinsik apoptotik mekanizmaları uyarabildiğini ve buna eşlik eden eksozomal miRNA profilinde değişikliklere yol açabildiğini göstermektedir. Bu çoklu biyolojik yanıt, eksozom aracılı SN-38 ve etopozid uygulamalarının GBM tedavisinde araştırılmaya değer potansiyel bir yaklaşım olduğunu desteklemektedir.

5.6. T-98 ve U373 GBM Hücre Hatları

Bu çalışmada GBM modeli olarak T-98 ve U373 hücre hatlarının tercih edilmesinin temel nedeni, her iki hattın da literatürde uzun yıllardır yaygın şekilde kullanılan, iyi karakterize edilmiş ve birbirini tamamlayan moleküler özelliklere sahip insan kaynaklı GBM hücre hatları olmasıdır. T-98 hücre hattı, 61 yaşında nüks glioblastomalı bir erkek hastadan elde edilmiş olup hızlı proliferasyon, DNA hasarı yapan ajanlara karşı direnç ve mezenkimal benzeri fenotip ile karakterize edilmektedir (Arthurs et al., 2020).

U373 hücre hattı ise T-98'e kıyasla farklı bir moleküler profil sunması nedeniyle çalışmaya dahil edilmiştir. U373 hattı hem p53 hem de PTEN genlerinde mutasyon taşıyan ve kolajen matriksler üzerinden en yüksek invazyon oranlarını gösteren glioma hatlarından biri olarak tanımlanmıştır (Mummel et al., 2014). Sonuç olarak, T-98 ve U373 hücre hatlarının bir arada kullanılması, GBM'nin klinik olarak bilinen genetik ve fenotipik heterojenitesini in vitro ortamda kısmen yansıtmaya imkânı sunmaktadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında T-98 ve U373 GBM hücre hatları tercih edilmiştir.

5.7. GBM Kaynaklı Eksozomların Karakterizasyonu

Literatür incelendiğinde, eksozomların kanser kaynaklı veya sağlıklı hücrelerden izolasyonu yapılmaktadır. Eksozom izolasyonları üç farklı yöntemle yapılırsa da kit tabanlı kimyasal izolasyon verim açısından diğerlerine göre daha üstün olmaktadır. Ayrıca elde edilen eksozomların karakterizasyonu NTA, zeta potansiyeli, Western blot, SEM ve TEM, MS/MS ve QTOF ile de gerçekleştirilmektedir. Bu amaç doğrultusunda tez çalışması kapsamında öncelikle her iki hücre hattından eksozomlar izole edilmiş ve elde edilen eksozomların karakterizasyonu SEM, zeta potansiyeli analizi ve Western blot yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kanser hücrelerinden elde edilen eksozomlar, SEM ile yapılan karakterizasyonda şekil ve boyut açısından incelenmektedir. Masoumeh E.D. ve arkadaşları, 2023 yılında yaptıkları GBM çalışmasında kanser kaynaklı eksozomların 98,25–105,9 nm olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir (Eliyasi Dashtaki et al., 2023). Benzer şekilde, Ramazan R. ve arkadaşlarının

kanser kaynaklı eksozom çalışmasında izole edilen eksozomların çapının 95 nm olduğunu rapor etmişlerdir (Rezaei et al., 2021). Genc ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada T-98 ve U373 hücrelerinden eksozomlar izole edilmiş ve karakterizasyonları SEM ile doğrulanmıştır. Çalışmalarında eksozom boyutlarını 70-227 nm arasında tespit etmişlerdir. Bulgular çalışmada elde edilen eksozom görüntülerini desteklemektedir (Genc et al., 2023). Çalışma verilerimiz T-98 ve U373 hücrelerinin eksozom boyutlarının 89,7 nm (50,60-126,8 nm aralığında) ve 77,63 nm (42,17-113,1 nm aralığında) olduğunu göstermektedir.

Zeta potansiyeli analizinde ise T-98 ve U373 kaynaklı eksozomların sırasıyla ortalama -16,7 mV ve -16,6 mV yüzey yüküne sahip olduğu belirlenmiştir. Her iki örnekte de tek ve belirgin bir pik elde edilmesi, eksozom popülasyonunun homojen bir yüzey yükü dağılımı sergilediğini göstermektedir. Ayrıca eksozomal yüzey belirteçlerinden CD63 proteininin Western blot yöntemi ile doğrulanması, izole edilen eksozomların protein yapılarını koruduğunu göstermektedir. Midekessa ve arkadaşlarının eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu hakkında yaptıkları bir araştırmada zeta potansiyeli testlerinin ± 30 mV aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmanın devamında Western blot analizi gerçekleştirilmiş ve CD63, CD81, CD9, HSP70 proteinlerinin varlığı doğrulanmıştır. (Midekessa et al., 2020). Soodeh S. ve arkadaşlarının U87 kaynaklı eksozomların zeta potansiyelini değerlendirdiklerinde -22,16 ve -18,27 mV olarak göstermişlerdir (Salarpour et al., 2019). Belirtilen bulgular çalışmamızdaki zeta potansiyeli için elde ettiğimiz verilerle korelasyon göstermektedir.

Karakterizasyonu tamamlanan eksozomlara elektroporasyon yöntemi kullanılarak SN-38 ve Etopozid yüklenmiştir (Liang et al., 2020). İlaç yükleme işleminin eksozomal yapıyı etkileyip etkilemediğini değerlendirmek amacıyla SEM ve zeta potansiyeli analizleri tekrar edilmiştir. SEM görüntülerinde, ilaç yüklemesi sonrasında da eksozomların küresel/yarı küresel morfolojisini koruduğu, düzgün dağılım gösterdiği ve belirgin agregasyon oluşmadığı gözlenmiştir. Salarpour ve arkadaşları U87 hücrelerine paklitaksel (PTX) yüklenmiş eksozomların SEM görüntülerini ve zeta potansiyel testlerini elde etmişlerdir. Yükleme öncesi ve sonrası boyut değişiminde anlamlı bir fark olmadığı ve yüklemenin başarılı olduğu doğrulanmıştır. Bu bulgular verilerimizle kıyaslandığında doğrudan uyumaktadır (Liang et al., 2020; Salarpour et al., 2019).

Eksozomların kaynaklandıkları hücrenin membran yapısını koruyarak hedef hücrelerle yüksek biyouyumlulukta etkileşime girebilmeleri, onları ilaç taşıma sistemleri açısından önemli adaylar hâline getirmektedir. Özellikle tümör kaynaklı eksozomların köken aldıkları tümör

hücrelerine yönelik doğal hedeflenme eğilimi göstermesi nedeniyle antikanser ajanların seçici olarak tümör dokusuna taşınmasında önemli avantajlar sağlayabileceği bildirilmektedir (Stoorvogel et al., 2002). Bu doğrultuda çalışmamda, tümör kaynaklı otolog eksozomların SN-38 ve Etopozid için biyolojik bir taşıyıcı olarak kullanılmasıyla, "Truva atı" etkinliği sağlanmıştır. Böylece SN-38 ve Etopozid'in terapötik etkinliklerinin artırılabilirliği düşünülmektedir. Literatür incelendiğinde, bu yaklaşıma benzer çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Feldman ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada HT1080 ve HeLa hücrelerinde elde edilen eksozomlara doksil kemoterapötik ajan yüklenerek terapötik etkinliği değerlendirilmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre, HT1080 ve HeLa hücrelerine karşı doksil yüklü eksozomların terapötik etkinliğinin doksil monoterapisine oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Feldman et al., 2018).

5.8. Sitotoksikite Analizlerinin (MTT ve LDH) Değerlendirilmesi

Tedavi uygulandıktan 24 ve 72 saat sonra canlılık analizi için MTT testi yapıldı (Ghasemi et al., 2021). Dirençli T-98 GBM hücrelerinde gerçekleştirilen MTT analizinde, en belirgin sitotoksik etkinin Exo + SN-38 + Etopozid kombinasyonunda gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Sitotoksik etkinin zamanla arttığı ve 72. saatte hücre canlılığındaki azalmanın yaklaşık %50'ye ulaşarak istatistiksel olarak en yüksek anlamlılığı gösterdiği belirlenmiştir. Salarpour ve arkadaşları tarafından U87 ve T-98 hücreleri üzerinde PTX yüklü U87 eksozomların terapötik etkinliği değerlendirilmiş ve elde ettikleri sonuçlara göre PTX yüklü eksozomların 24. ve 48. saatlerde PTX monoterapisine oranla daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Salarpour et al., 2019). Ayrıca Hashemi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada doğal öldürücü hücrelerden (NKC) elde edilen eksozomlara doksorubisin yüklenmiş ve meme kanseri hücre hatlarında etkinliği değerlendirilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda eksozomlara yüklü doksorubisinin, doksorubisin monoterapisine oranla canlılık oranlarında daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Hashemi et al., 2024).

MTT sonuçlarının doğruluğunu tasdiklemek amacıyla sitotoksikite analizlerinden elde edilen sonuçlar, LDH testi ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. LDH, hücrelerde glikoz metabolizması ve enerji üretiminde rol oynayan önemli bir enzimdir. Hücre membran bütünlüğünün bozulması sonucunda sitoplazmik LDH'nin hücre dışına salınması, hücre hasarın ve hücre ölümünün bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, hücre kültürü süpernatantındaki yüksek LDH düzeyleri, hücre membran bütünlüğünün bozulduğunu ve hücre canlılığının azaldığını göstermektedir (Jurisic et al., 2015; Magesh et al., 2006).

T-98 ve U373 hücrelerinde 72. saat sonunda gerçekleştirilen LDH analizinde, en yüksek sitotoksik etkinin Exo + SN-38 + Etopozid kombinasyonlarında gözlemlendiği belirlenmiştir. Kombine tedavi grupları hem kontrol grubuna hem de eksozom aracılı monoterapi gruplarına kıyasla LDH salınımını anlamlı düzeyde artırmıştır. Özellikle Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubunda LDH seviyesinin kontrole göre yaklaşık %340 ve %292,31 oranında artış göstererek en yüksek değere ulaştığı belirlenirken, eksozom aracılı monoterapilere göre bu oran yaklaşık %33 ve %45,71 olarak tespit edilmiştir. Genç ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada TMZ ilacı T-98 hücrelerinden elde edilen ve daha sonra polimerle genişletilen eksolimerlere yüklenmiş ve T-98 hücrelerine uygulanmıştır. Sitotoksik analizleri için MTT ve LDH testleri uygulanmış, MTT seviyelerinin TMZ yüklü ekzolimerlerde serbest TMZ oranına göre azaldığı tespit edilmiştir. LDH seviyelerinin ise monoterapiye oranla geliştirilen tedavilerde artış gösterdiği belirlenmiştir (Genç et al., 2021). Yongxin Z. ve arkadaşlarının akciğer, HeLa, MCF-7, PC3 kanserlerinde yaptıkları çalışmada sisplatin ve 5-FU uyguladıklarında antikanser etkinliğine bağlı olarak 3-8 gün arasında yüksek antikanser etki tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca, bu etkinliğe bağlı olarak LDH seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek oranda arttığı rapor edilen veriler arasındadır (Zhang et al., 2017).

5.9. Oksidatif Stres Belirteçlerinin (KAT ve MDA) Değerlendirilmesi

Reaktif oksijen türleri (ROS), kronik inflamasyon ve DNA hasarı, birbirini tetikleyerek hücre yenilenme kapasitesini baskılayan ve apoptotik/nekrotik ölüme yol açan temel etmenlerdir. Kanser hücrelerinde tedavi kaynaklı ROS birikiminin antioksidan savunma sistemi tarafından dengelenememesi sonucu apoptotik süreçler tetiklenir. Eğer oluşan hücre hasarı onarılamazsa, hücre ölümü gerçekleşir (Waris & Ahsan, 2006).

Tedavi sonrası oksidatif hasar düzeyindeki değişimleri değerlendirmek amacıyla KAT ve MDA düzeyleri analiz edilmiştir. MDA, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan ve hücre oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olarak kabul edilen toksik bir son üründür. KAT serbest radikalleri uzaklaştırarak hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan önemli bir antioksidan enzimdir. MDA düzeylerindeki artış ise hücrelerde lipid peroksidasyonunun ve buna bağlı oksidatif hasarın arttığını göstermektedir (Ayala et al., 2014). Bununla birlikte, şiddetli veya kronik oksidatif stres koşullarında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması sonucunda KAT aktivitesinde azalma görülebilmektedir. Bu nedenle, yüksek KAT aktivitesi genel olarak güçlü bir antioksidan savunma kapasitesini yansıtırken, KAT düzeylerindeki azalma oksidatif stresin artışına işaret etmektedir (Ighodaro & Akinloye, 2018).

T-98 ve U373 hücrelerinde 72 saatlik tedavi sonrasında analiz edilen KAT seviyelerine göre, Exo + SN-38 10 µg/mL ve Exo + Etopozid 10 ve 25 µg/mL tedavi grupları, kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Exo + Sn + Etopozid 10 ve 25 µg/mL gruplarında eksozom aracılı monoterapilere göre her iki hücre hattında da sırasıyla %65,63 ve %37,63 azalma meydana gelmiştir. KAT seviyelerini destekleyen MDA bulgularında ise T-98 hücrelerine uygulanan Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubu eksozom aracılı monoterapilere oranla %88 artış gösterirken, bu değişim U373 hücrelerinde %80,99'dur. Yu ve arkadaşlarının HFL-1 hücrelerinden elde edilmiş erastin yüklü FA işaretli eksozomların MDA-MB-231 hücrelerindeki etkinliği değerlendirildi. Hücrelerde MDA seviyelerinin antikanser tedaviyle birlikte aşırı arttığı, KAT gibi önemli bir antioksidan olan glutatyon seviyelerinin ise azaldığı tespit edilmiştir (Yu et al., 2019). Najm A.M. ve arkadaşlarının meme kanseri üzerinde oksidatif stres belirteçlerinin rolünü araştırdıkları bir çalışmada ise kontrol grubuna göre MDA düzeyinin arttığını, KAT düzeylerinin ise anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir (Najm et al., 2019).

5.10. İnflamasyon Belirteçlerinin (IL-1β, IL-6 ve IL-10) Değerlendirilmesi

Antikanser tedavilere bağlı gelişen hücresel stres ve hasar, inflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonuna neden olarak çeşitli sitokinlerin salınımını düzenlemektedir. Bu sitokinler arasında IL-1β, IL-6 ve IL-10 tümör mikroçevresinin şekillenmesinde ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde kritik rol oynayan temel bileşenlerdir. Sitokinler, fonksiyonlarına bağlı olarak proinflamatuvar veya antiinflamatuvar etkiler gösterebilmektedir (Kany et al., 2019).

IL-1β, inflamatuvar yanıtın başlatılmasında rol oynayan en önemli proinflamatuvar sitokinlerden biridir. Uyaranların makrofajlar tarafından tanınması, IL-1β üretimini ve salınımını tetikler. Üretilen IL-1β diğer bağışıklık hücrelerine sinyal göndererek yabancı etkenlerin ortadan kaldırılmasına yönelik inflamatuvar yanıtı başlatmaktadır. IL-6 ise hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar özellik göstererek çift yönlü hareket eden bir sitokindir. Buna karşılık, IL-10 önemli bir antiinflamatuvar sitokin olarak proinflamatuvar sitokinlerin üretimini ve aşırı bağışıklık yanıtını baskılamaktadır. Bu özellik sayesinde inflamatuvar yanıtın kontrol altına alınmasına, doku hasarının azaltılmasına ve iyileşme ile doku onarımı süreçlerinin desteklenmesine katkı sağlamaktadır (Kany et al., 2019).

T-98 hücrelerinde IL-1β analizinde Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubunda IL-1β seviyesi kontrole göre yaklaşık %57,14 azalırken, eksozom aracılı monoterapilere göre ise %29,41 azalma göstermiştir. U373 hücrelerinde IL-1β seviyesi, Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubunda kontrole göre %57,14 oranında azalma gösterirken, tedavi grubunda %29,41

azalma gözlemlenmiştir. Elsea R.C. ve arkadaşlarının akciğer kanserinin Etopozid, doksurubisin ve 5-FU antikanser ilaçları ile tedavi edilmesi üzerine yaptığı çalışmada IL-1 β seviyesinde artış tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Elsea et al., 2008).

IL-6 seviyeleri incelendiğinde, Exo + SN-38 + Etopozid 25 μ g/ml grubunda, eksozom aracılı monoterapilere oranla değişim T-98 hücreleri için %22,64 oranında saptanırken, bu oran U373 hücreleri için %19,23 oranına düşmüştür. Pu S.Y. ve arkadaşlarının prostat kanseri hücrelerinde ilaç direnci ve apoptoz üzerindeki etkilerini inceledikleri bir çalışmada IL-6 seviyesindeki anlamlı azalmanın prostat kanseri üzerinde etkili bir sinyal yolağı olabileceğini öne sürmüşlerdir (Pu et al., 2004). Exo + SN-38 + Etopozid 25 μ g/ml grubunun inflamatuvar etkinliğini IL-10 seviyelerinin aşırı yükselmesi ise tedaviyle birlikte artan ROS aktivitesine karşı güçlü antiinflamatuvar etkinlik sağladığı düşünülmektedir (Luan et al., 2017). IL-10 seviyeleri her iki hücre hattında benzerdir. T-98 hücrelerinde kontrole göre Exo + SN-38 + Etopozid 10 μ g/ml ve Exo + SN-38 + Etopozid 25 μ g/ml gruplarında sırasıyla %22,41 ve %39,66 artış meydana gelirken, U373 hücrelerinde ise sırasıyla %16,98 ve %30,19 oranında artış tespit edilmiştir. Shirzad ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, menstrüel kök hücrelerden elde ettikleri eksozomlara doksurubisin yüklenmiş ve yüklü eksozomların meme kanseri hücrelerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmada IL-1 β ve IL-10 seviyeleri incelenmiş, ilaç yüklü eksozomların IL-1 β seviyelerini baskıladığı, IL-10 seviyelerini ise yükselttiği tespit edilmiştir. Bu durum doksurubisin kaynaklı inflamasyonun hafifletilmesinde eksozomların rolünü ortaya koymaktadır. Eksozomların düşük immünojene bilgisi ve literatür araştırmaları sonucunda, çalışmamızda elde edilen veriler doğrulanmıştır (Shirzad et al., 2024). IL-10 seviyelerindeki yüksek artış miktarları, tedavi sonrasında antiinflamatuvar yanıtın desteklendiğini göstermektedir. Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, kullanılan eksozom temelli tedavi yaklaşımının GBM için immün sistemden kaçış açısından önemli bir potansiyele sahip olabileceği öngörülmektedir (Stevens Barrón et al., 2023).

5.11. Apoptotik Belirteçlerin (p53, p21, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9) Değerlendirilmesi

Yapılan RT-qPCR ve ELISA analizleri sonrasında p53, p21, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyeleri tespit edilmiştir.

T-98 hücrelerinde p53 seviyelerinin en yüksek olduğu grup Exo + SN-38 + Etopozid 25 μ g/mL olarak belirlenmiştir. Bu grup kontrole %62 oranında artış gösterirken, eksozom aracılı monoterapilere göre yaklaşık %26,6 artış göstermiştir. U373 hücrelerinde ise kontrole göre en fazla artış yine Exo + SN-38 + Etopozid 25 μ g/mL grubunda meydana gelirken, eksozom aracılı

monoterapilere göre %25,5 artış tespit edilmiştir. P21 seviyelerinde kontrole göre artış tespit edilmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunmazken U373 hücrelerinde Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubunda artış kontrole göre anlamlıdır.

Sato ve arkadaşları, farklı p53 statüsüne sahip üç GBM hücre hattını (yabani tip p53 taşıyan A172, mutant p53 taşıyan T-98G ve p53 statüsü farklı YKG-1) etopozid ile muamele ederek, DNA hasarının duyarlı bir belirteci olan γ H2AX fosforilasyonunu hücre döngüsü fazı ve apoptoz indüksiyonuyla ilişkilendirmiştir. Bu çalışmada, Etoposid uygulaması sonrasında her üç hücre hattında da hücre döngüsünün tüm fazlarında γ H2AX artışı gözlenmesine rağmen, hücre hatları arasında tedaviye karşı belirgin farklılıklar ortaya çıkmıştır (Sato et al., 2009). Çalışmamızda kullanılan T-98 hücre hattının da mutant p53 statüsüne sahip olması, Sato ve arkadaşlarının T-98G hücrelerinde gözlemlediği p53 gen yanıtını destekler niteliktedir. Eksozom aracılı SN-38 ve Etopozid kombinasyonu (25 µg/mL) sonrasında T-98 hücrelerinde p53 seviyesinin kontrole göre artması, hücrelerde belirgin bir DNA hasarı sinyalinin tetiklendiğini göstermektedir. Çalışmadaki bulgular hücre hattına özgü bir moleküler temele dayandığını göstermektedir.

Bu noktada, p21 artışının anlamlılığa ulaşmamasının hücresel döngüyü nasıl etkilediği sorusu önem kazanmaktadır. P21, hücre döngüsünü durdurarak hücreye DNA onarımı için zaman tanıyan bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olmasının yanı sıra, kaspaz aktivasyonunu baskılayan anti-apoptotik bir işleve de sahiptir. Dolayısıyla p21'in beklenen düzeyde artmaması, DNA hasarının doğrudan apoptotik sinyal yollarını (BAX, PUMA, kaspaz kaskadı gibi) tetiklediğini düşündürmektedir. Nitekim Sato ve arkadaşlarının çalışmasında da benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu bulgu, tez çalışması kapsamındaki sonuçlara göre p53 artışına rağmen p21'de anlamlı değişiklik gözlenmeyen T-98 hücrelerinin, hücre döngüsünü durdurup onarım sürecine yönelmek yerine apoptotik hücre ölümüne yönelmiş olabileceği yönündeki yorumumuzu literatür temelinde desteklemektedir (Sato et al., 2009).

Öte yandan, U373 hücrelerinde Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubunda p21 artışının kontrole göre anlamlı bulunması, bu hücre hattında p53-p21 ekseninin T-98'e kıyasla daha işlevsel kalmış olabileceğine işaret etmektedir. Bu farklılık, Sato ve arkadaşlarının yabani tip p53 taşıyan A172 hücrelerinde gözlemlediği fonksiyonel p53-p21 yanıtıyla kavramsal olarak paralellik göstermektedir. Sato ve arkadaşları da çalışmalarının sonucunda glioblastoma hatları arasında oluşan yanıt çeşitliliği nedeniyle tedavinin hastaya özgü olarak kişiselleştirilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Ayrıca bununla birlikte, mevcut çalışma bu bilinen mekanizmayı tekli ajan uygulamasının ötesine taşıyarak, eksozom aracılı SN-38 ve Etoposid

kombinasyonunun bu paterni güçlendirdiğini ve dolayısıyla eksozom tabanlı taşıyıcı sistemlerin mutant p53 taşıyan dirençli glioblastoma hücrelerinde apoptoza yönlendirme potansiyelini artırabileceğini göstermesi bakımından literatüre özgün bir katkı sunmaktadır (Sato et al., 2009).

Ayrıca Wang Y. ve arkadaşlarının insan akciğer kanseri hücre hattı H1299 üzerinde Etopozid ve sisplatin antikanser uygulamasıyla p53 ve p21 genlerinin ekspresyonlarını incelemişlerdir. Çalışmanın bulgularında özellikle sisplatine kıyasla Etoposid tedavisinden sonra p53 seviyesinin de p21 seviyesinin de anlamlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Wang et al., 1998).

BAX gen düzeyleri T-98 ve U373 hücrelerinde analiz edilmiştir. T-98 hücrelerinde Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL dozu kontrole göre %203 artarken, eksozom aracılı monoterapilere göre %70,2 artmıştır. U373 hücrelerinde BAX seviyeleri T-98'e göre daha yüksektir. Yine en yüksek grup Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubunda tespit edilmiştir.

Bcl-2 seviyelerinde her iki hücre hattında da kontrole göre her grupta azalma gözlemlenmiştir. En yüksek değişim oranını her iki hücre için de Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubu vermiştir. T-98 için %37,2 olarak tespit edilirken, U373 için bu oran %41,2 olarak belirlenmiştir.

Bu veriler, çalışma kapsamındaki sonuçlara göre apoptotik dengenin kombinasyon tedavisiyle belirgin biçimde pro-apoptotik yöne kaydığını göstermektedir. Bu bulgu, GBM hücrelerinde apoptozun moleküler temelini Bax/Bcl-2 oranı üzerinden inceleyen önceki çalışmalarla doğrudan örtüşmektedir. Hanif ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada NA-2 ve TMZ kombinasyonu U87 glioblastoma hücrelerinde incelenmiştir; iki ajanın birlikte uygulanmasının tekli uygulamalara kıyasla büyüme inhibisyonunu ve apoptozu anlamlı ölçüde artırdığı, bu kooperatif apoptoz indüksiyonunun ise artmış Bax/Bcl-2 oranı ve aktif Kaspaz-3 ekspresyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hanif et al., 2014). Suzuki K. ve arkadaşları meme kanseri ve fibroblast hücreleri üzerinde 5-FU ve 5-DFUR kullanılarak Bax, Bcl-2 ve p53 ekspresyon düzeylerini değerlendirmişlerdir. Bulgulara göre 5'-DFUR/5-FU tedavisi, özellikle p53 negatif meme kanseri hücrelerinde Bax artışı ve Bcl-2 azalması yoluyla mitokondriyal apoptotik yolu aktive ederek hücre ölümünü artırdığını ve hücrelerin kemoterapiye daha duyarlı hale gelmesinin önemli göstergelerinden biri olduğunu bildirmişlerdir (Suzuki et al., 1999).

Bax:Bcl-2 oranının glioblastoma hücrelerinde apoptotik kararın belirleyicisi olduğu, bu ilişkinin ters yönden de gösterildiği Das ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ortaya konmuştur. U87MG hücrelerinde TMZ uygulaması Bax:Bcl-2 oranını artırarak apoptozu tetiklerken,

hücrelerin deksametazon ile ön muamelesi bu oranı düşürmüştü ve apoptozu belirgin biçimde azaltmıştı. Bu çalışma, Bax:Bcl-2 oranının yalnızca apoptozla ilişkili bir gösterge olmadığını, aynı zamanda bu oranın farmakolojik olarak yönlendirilebilir, tedavi yanıtını doğrudan belirleyen işlevsel bir mekanizma olduğunu ortaya koymaktadır (Das et al., 2004). Çalışmada gözlenen belirgin Bax artışı ile Bcl-2'nin her iki hücre hattında da en yüksek oranda azalması (T-98 için %37,2, U373 için %41,2), bu literatürle birlikte değerlendirildiğinde, eksozom aracılı kombinasyon tedavisinin Bax:Bcl-2 oranını güçlü biçimde apoptoz yönüne kaydırıldığını ve bu kaydırmanın doz bağımlı olarak arttığını düşündürmektedir. Ayrıca Bcl-xL'nin de özellikle yüksek doz gruplarında baskılanmış olması, yalnızca Bcl-2'nin değil, aynı zamanda Bcl-xL'nin de apoptotik direncin ortadan kaldırılmasında hedef alındığını göstermekte olup, bu durum tedavimizin tek bir anti-apoptotik proteine değil, Bcl-2 ailesinin birden fazla üyesine eş zamanlı etki ederek daha kapsamlı bir apoptotik yanıt oluşturduğuna işaret etmektedir.

Tez çalışması kapsamında T-98 hücrelerinde Kaspaz-3 düzeyinin Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubunda kontrole göre %376,92, eksozom aracılı monoterapilere göre %87,88 oranında anlamlı artış göstermesine karşın, Kaspaz-9'un yalnızca kombinasyon gruplarında (10 ve 25 µg/mL) hem kontrole hem de diğer tedavilere kıyasla anlamlı biçimde artması, intrinsik apoptotik yolağın sıralı ve doza bağlı bir aktivasyon paterni izlediğini düşündürmektedir. Bu bulgu, TMZ-duyarlı (U87 MG) ve TMZ-dirençli (U87 MG-R) GBM hücrelerinde enzalutamidin apoptotik etkisini inceleyen güncel bir çalışmayla doğrudan örtüşmektedir (Chang et al., 2022). Bu çalışmada, enzalutamid uygulamasının her iki hücre hattında da Kaspaz-8'e kıyasla Kaspaz-9 aktivitesini belirgin biçimde daha fazla artırdığı gösterilmiş ve bu bulgu, hücre ölümünün ekstrinsik değil intrinsik yolak üzerinden gerçekleştiğinin kanıtı olarak sunulmuştur. Aynı çalışmada, Kaspaz-9 aktivasyonu: proapoptotik Bax proteininde artış, mitokondriyal membran potansiyelinde kayıp, sitokrom c'nin sitozole salınımı ve ardından Kaspaz-3 ile Kaspaz-6'nın kademeli aktivasyonu izlenmiştir. Araştırmacılar, Kaspaz-3'ün Kaspaz-9'un aşağı akış hedefi olduğunu ve sitokrom c aracılı Kaspaz-9 aktivasyonunun Kaspaz-3 aktivitesini tetiklediğini rapor etmişlerdir (Chang et al., 2022).

Bu mekanistik sıralama, elde edilen bulgularla birlikte yorumlamak için değerli bir çerçeve sunmaktadır. Enzalutamid çalışmasında olduğu gibi, T-98 hücrelerinde de Kaspaz-3'ün Kaspaz-9'un apoptoz zincirinde hedeflenerek işlev görmesi beklenir; bu nedenle Kaspaz-9'un düşük doz ve monoterapi gruplarında anlamlı artış göstermemesi, apoptozomun (sitokrom c-Apaf-1-prokaspaz-9 kompleksinin) bu koşullarda henüz yeterli düzeye gelmediğini, dolayısıyla

başlatıcı basamağın tam olarak devreye girmediğini düşündürmektedir. Buna karşın, kombinasyon gruplarında (10 ve 25 µg/mL) Kaspaz-9'un anlamlı artışı, mitokondriyal hasarın apoptozom oluşumu için gerekli eşiği aştığını ve bunu takiben Kaspaz-3'ün güçlü biçimde aktive edildiğini göstermektedir. Bu yorum, Chang ve arkadaşlarının çalışmasında tanımlanan Bax artışı, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı, sitokrom c salınımı, Kaspaz-9 aktivasyonu ve Kaspaz-3 aktivasyonu şeklindeki doğrusal apoptotik zincirle örtüşmektedir (Chang et al., 2022).

Ayrıca, her iki çalışmada da dikkat çekici bir ortak nokta bulunmaktadır: Chang ve ark., enzalutamidin TMZ-dirençli U87 MG-R hücrelerinde de Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 aktivasyonunu tetikleyebildiğini göstermiştir; bu, dirençli glioblastoma hücrelerinin dahi intrinsik apoptotik makine bakımından tamamen işlevsiz olmadığını, uygun doz ve kombinasyon stratejileriyle bu yolağın yeniden aktive edilebileceğini ortaya koymaktadır (Chang et al., 2022). Bu bulgu, çalışmamızda T-98 hücrelerinde de yüksek doz eksozom aracılı kombinasyon tedavisiyle hem Kaspaz-9'un hem de Kaspaz-3'ün anlamlı biçimde aktive edilebildiğini göstermemizle paralellik taşımakta ve eksozom aracılı SN-38 + Etopozid kombinasyonunun, tek başına yeterli mitokondriyal hasarı oluşturmamayan monoterapilerin aksine, intrinsik apoptotik yolağın tam ve sıralı aktivasyonunu sağlayabilecek bir eşiğe ulaştığını desteklemektedir.

5.12. Annexin V/FITC-DAPI İmmünofloresan Boyama Değerlendirmesi

Çalışmada, T-98 ve U373 GBM hücre hatlarında eksozom kaynaklı kombinasyon tedavilerinin apoptotik etkisi, tedaviden 72 saat sonra DAPI-Annexin V-PI boyaması ile değerlendirilmiştir. T-98 hücrelerinde Exo + Etopozid 25 µg/ml ile Exo + SN-38 + Etopozid 10 ve 25 µg/mL gruplarında, U373 hücrelerinde ise Exo + Etopozid 10 µg/ml grubunda dahi Annexin V ve PI ışımlarında kontrole kıyasla anlamlı artış saptanmıştır. Doza bağlı olarak artan bu ışımada paterni, uygulanan tedavilerin hücreleri erken ve geç apoptotik evrelere yönlendirdiğine işaret etmektedir. Bu bulgu, U87 MG hücrelerinde O6-benzilguanin ve TMZ yüklü PEG ile liposomal nanotaşıyıcı sistemini değerlendiren literatürdeki bir çalışmayla örtüşmektedir. 72 saatlik muameleden sonra Annexin V-FITC/PI ile boyanan hücrelerde ilaç yüklü liposomlarla muamele edilen grubun büyük kısmının geç apoptotik evrede veya ölü hücre popülasyonunda yer aldığı, bu etkinin saf ilaç kombinasyonuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Hegde et al., 2024).

Hücre hatları arasındaki bu fenotipik doz-yanıt farkının ötesine geçerek altta yatan moleküler mekanizmayı ortaya koymak amacıyla, çalışmamızın özgün katkısını oluşturan

eksozomal miRNA profili çıkarılmış ve TMÇ'nin düzenlenmesinde rol alan miRNA seviyelerinin tedavi ile değişimi incelenmiştir.

5.13. GBM Kaynaklı Eksozomal miRNA Seviyelerinin (miR-142-3p, miR-150-5p ve miR-21) Değerlendirilmesi

Tedaviden sonra toplanan eksozomlarda RT-qPCR ile miRNA seviyeleri incelenmiştir. Tümör baskılayıcı miR-142-3p seviyesi Exo + SN-38 + Etopozid kombinasyonlarında kontrole göre T-98 hücrelerinde %40, U373 hücrelerinde %37 oranında artmış; benzer şekilde miR-150-5p seviyesi Exo + SN-38 + Etopozid 25 µg/mL grubunda T-98'de %35, U373'te %42 artış göstermiştir. Buna karşılık, onkomiR niteliğindeki miR-21 ekspresyonu aynı kombinasyon gruplarında, özellikle 25 µg/mL dozunda hem kontrole hem de eksozom aracılı monoterapilere kıyasla en düşük seviyelere gerilemiştir.

miR-142-3p'nin tümör baskılayıcı rolü, mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomal miR-142-3p'nin büyüme faktörü bağımsız 1'i (GFI1) hedefleyerek glioma hücrelerinin agresifliğini ve M2 tipi tümör ilişkili mikrogliya infiltrasyonunu baskıladığını gösteren çalışmada ortaya konmuştur (Chen et al., 2025). Daha yakın tarihli bir çalışmada ise M1 tipi polarize makrofajlardan salgılanan eksozomal miR-142-3p'nin yüksek hareketlilik grubu kutusu 1 (HMGB1) aracılı PD-1/PD-L1 kontrol noktasını düzenleyerek GBM hücre büyümesini baskıladığı ve apoptozu tetiklediği, miR-142-3p susturulduğunda ise M1 eksozomlarıyla muamele edilen GBM hücrelerinde proliferasyonun arttığı ve apoptozun azaldığı bildirilmiştir (Wei et al., 2025). Bu bulgu, bizim çalışmamızda miR-142-3p artışının gözlemlendiği aynı gruplarda (Exo + SN-38 + Etopozid) Annexin V/PI ışımasının da artmış olmasıyla mekanistik olarak örtüşmekte; miR-142-3p yükselişinin apoptotik yanıtın bir parçası olabileceği yorumunu güçlendirmektedir.

miR-150-5p'nin GBM'ye özgü literatürü sınırlı olmakla birlikte, farklı kanser türlerinde tümör baskılayıcı etkinliği tutarlı biçimde raporlanmıştır. Kolorektal kanserde miR-150-5p'nin VEGFA/VEGFR2 ve alt akış Akt/mTOR sinyal yolağını inaktive ederek hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve anjiyogenezi baskıladığı ve tümör baskılayıcı bir molekül olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Bu kanser türünde tutarlı biçimde gözlenen tümör baskılayıcı etki, çalışmamızda kombinasyon tedavisiyle miR-150-5p'de gözlenen artışın kanser türünden bağımsız, genellenebilir bir antitümör mekanizmaya işaret edebileceğini düşündürmektedir (Xu et al., 2025).

miR-21'in GBM hastalığındaki rolüne dair literatür, çalışma bulgularının tersinden değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Glioma ilişkili makrofajlardan (GAM) salgılanan

eksozomların miR-21 açısından zenginleştığı ve miR-21'in GAM eksozomlarında en bol bulunan miRNA türü olduğu, miR-21 seviyesi ile GBM malignitesi arasında pozitif bir ilişki bulunduğu, miR-21'in tümör baskılayıcı programlanmış hücre ölümü 4 proteinini (PDCD4) hedefleyerek onkojenik etkilerini gösterdiği Chuang ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile bildirilmiştir (Chuang et al., 2019). Shi ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise beyin omurilik sıvısı kaynaklı eksozomal miR-21 seviyelerinin de glioma hastalarında kötü prognoz ve tümör nüksü ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Shi et al., 2015).

Bu çalışmaların ortak bulgusu, miR-21'in GBM TMC'de hem tümör hücreleri hem de stromal hücreler arasında bir onkojenik sinyal molekülü olarak işlev görmesidir. Bizim çalışmamızda Exo + SN-38 + Etopozid kombinasyonunun miR-21 seviyesini doza bağlı olarak baskılaması, literatürde tanımlanan bu onkojenik ekseninde bir "tersine çevirme" etkisine işaret etmekte ve kombinasyon tedavisinin antitümör etkinliğinin yalnızca doğrudan sitotoksite ile değil, tümör mikroçevresinin moleküler düzenlenmesi üzerinden de gerçekleştiğini desteklemektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, T-98 ve U373 glioblastoma hücre hatlarından izole edilen otolog eksozomların SN-38 ve etopozid ile tekli ve kombine olarak yüklenmesinin antikanser etkinliği kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. SEM görüntüleme, zeta potansiyeli analizi ve CD63 belirteci Western blot doğrulaması, her iki hücre hattından da yapısal bütünlüğü korunmuş, homojen yüzey yüküne sahip eksozomların başarıyla izole edildiğini göstermiş; elektroporasyon yöntemiyle gerçekleştirilen ilaç yüklemesinin eksozomların morfolojik ve fiziksel özelliklerini bozmadığı doğrulanmıştır. MTT ve LDH analizleri, Exo + SN-38 + Etopozid kombinasyonunun her iki hücre hattında da 25 µg/mL dozunda, kontrol grubuna ve eksozom aracılı monoteraplere kıyasla en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiğini ortaya koyarak eksozom aracılı taşınmanın SN-38 ve Etopozid'in terapötik etkinliğini artırdığını ve iki ajanın kombine kullanımının sinerjistik bir sitotoksik etki oluşturduğunu desteklemiştir.

Oksidatif stres göstergeleri incelendiğinde, kombinasyon tedavisi grubunda özellikle 25 µg/mL dozunda KAT aktivitesinde belirgin azalma ve MDA seviyelerinde belirgin artış tespit edilmiş, bu durum tedaviyle indüklenen oksidatif hasarın antioksidan savunma kapasitesini aştığını ve hücre ölümüne katkıda bulunan mekanizmalardan biri olduğunu göstermiştir. İnflamatuar yanıt açısından, kombinasyon tedavisi proinflamatuar sitokinler olan IL-1β ve IL-6 düzeylerini baskımlarken antiinflamatuar sitokin IL-10 düzeylerini belirgin biçimde artırmıştır; bu bulgu eksozom aracılı ilaç taşınmasının immünojenik olmayan bir profil sergilediğini ve tedavi sonrası oluşan inflammatuar yanıtın kontrol altına alınmasına katkı sağladığını ortaya koymuştur.

Apoptotik belirteçler bakımından, p53, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerindeki değişimler, Exo + SN-38 + Etopozid kombinasyonunun intrinsik mitokondriyal apoptotik yolağı doza bağlı ve sıralı bir şekilde aktive ettiğini göstermiştir. T-98 hücrelerinde p53 artışına rağmen p21'de anlamlı değişim gözlenmemesi, mutant p53 statüsüne bağlı olarak hücrelerin hücre döngüsünün durdurulmasından ziyade doğrudan apoptoza yöneldiğine işaret ederken, U373 hücrelerinde p21 yanıtının korunmuş olması hücre hatları arasındaki moleküler heterojenitenin tedavi yanıtını nasıl şekillendirdiğini ortaya koymuştur. Annexin V/PI boyaması bu bulguları destekleyerek kombinasyon gruplarında erken ve geç apoptotik hücre oranının belirgin biçimde arttığını göstermiştir. Tez çalışmasının özgün katkısını oluşturan eksozomal miRNA analizinde ise, tümör baskılayıcı miR-142-3p ve miR-150-5p seviyelerinin kombinasyon tedavisiyle arttığı, buna karşılık onkojenik miR-21 seviyesinin doza bağlı olarak baskılandığı belirlenmiş; bu bulgu kombinasyon tedavisinin antitümör etkisinin yalnızca

doğrudan sitotoksosite üzerinden değil, aynı zamanda tümör mikroçevresinin moleküler düzeyde yeniden şekillendirilmesi yoluyla da gerçekleştiğini göstermiştir.

Elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, otolog GBM eksozomlarının SN-38 ve Etoposid için etkili bir "Truva atı" taşıyıcı sistemi olarak işlev gördüğü ve özellikle bu iki ajanın kombine kullanımının, tekli tedavilere kıyasla hem T-98 hem de U373 hücre hatlarında sitotoksisiteyi artırdığı, apoptotik yolları güçlü biçimde aktive ettiği, oksidatif stresi yükselttiği, inflamatuvar yanıtı düzenlediği ve tümör baskılayıcı miRNA ekspresyonunu desteklerken onkojenik miRNA ekspresyonunu baskıladığı sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, dirençli ve heterojen bir tümör türü olan GBM'nin tedavisinde eksozom temelli, kombine ilaç taşıma stratejilerinin umut verici bir yaklaşım sunabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu çalışma in vitro koşullarda gerçekleştirilmiş olup, kan-beyin bariyerini geçiş etkinliği ve in vivo biyodağılım gibi parametreler değerlendirilmemiştir; ayrıca miRNA bulguları ekspresyon düzeyinde sınırlı kalmış olup hedef gen doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. Bu doğrultuda, elde edilen bulguların klinik öncesi in vivo GBM modellerinde doğrulanması, eksozomların KBB geçiş kapasitesinin araştırılması ve miR-142-3p, miR-150-5p ile miR-21'in hedef genleri üzerinden mekanistik olarak derinlemesine incelenmesi, bu çalışmanın gelecekteki uzantıları olarak önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Adamson, C., Kanu, O. O., Mehta, A. I., Di, C., Lin, N., Mattox, A. K., & Bigner, D. D. (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert opinion on investigational drugs*, 18(8), 1061-1083.
- Aili, Y., Maimaitiming, N., Mahemuti, Y., Qin, H., Wang, Y., & Wang, Z. (2021). The Role of Exosomal miRNAs in Glioma: Biological Function and Clinical Application. *Front Oncol*, 11, 686369. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.686369>
- Akers, J. C., Ramakrishnan, V., Kim, R., Skog, J., Nakano, I., Pingle, S., Kalinina, J., Hua, W., Kesari, S., & Mao, Y. (2013). MiR-21 in the extracellular vesicles (EVs) of cerebrospinal fluid (CSF): a platform for glioblastoma biomarker development. *PloS one*, 8(10), e78115.
- Anjum, K., Shagufta, B. I., Abbas, S. Q., Patel, S., Khan, I., Shah, S. A. A., Akhter, N., & Hassan, S. S. U. (2017). Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed Pharmacother*, 92, 681-689. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.125>
- Arthurs, A. L., Keating, D. J., Stringer, B. W., & Conn, S. J. (2020). The suitability of glioblastoma cell lines as models for primary glioblastoma cell metabolism. *Cancers*, 12(12), 3722.
- Ayala, A., Munoz, M. F., & Arguelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bae, W. H., Maraka, S., & Daher, A. (2024). Challenges and advances in glioblastoma targeted therapy: the promise of drug repurposing and biomarker exploration. *Front Oncol*, 14, 1441460. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1441460>
- Bang, C., & Thum, T. (2012). Exosomes: new players in cell-cell communication. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(11), 2060-2064.
- Bataille Backer, P., & Adesina, S. K. (2025). Synthesis and Characterization of Transferrin Receptor-Targeted Peptide Combination SN-38 and Rucaparib Conjugate for the Treatment of Glioblastoma. *Pharmaceutics*, 17(6), 732.
- Bayona, C., Randelovic, T., & Ochoa, I. (2026). Tumor microenvironment in glioblastoma: The central role of the hypoxic-necrotic core. *Cancer Lett*, 639, 218216. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.218216>
- Berghoff, A. S., Kiesel, B., Widhalm, G., Rajky, O., Ricken, G., Wohrer, A., Dieckmann, K., Filipits, M., Brandstetter, A., Weller, M., Kurscheid, S., Hegi, M. E., Zielinski, C. C., Marosi, C., Hainfellner, J. A., Preusser, M., & Wick, W. (2015). Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17(8), 1064-1075. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou307>
- Broekman, M. L., Maas, S. L. N., Abels, E. R., Mempel, T. R., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2018). Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol*, 14(8), 482-495. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0025-8>
- Campos, A., Sharma, S., Obermair, A., & Salomon, C. (2021). Extracellular Vesicle-Associated miRNAs and Chemoresistance: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*, 13(18). <https://doi.org/10.3390/cancers13184608>
- Camussi, G., Deregibus, M. C., Bruno, S., Cantaluppi, V., & Biancone, L. (2010). Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney international*, 78(9), 838-848.

- Chakrabarti, I., Cockburn, M., Cozen, W., Wang, Y. P., & Preston-Martin, S. (2005). A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974–1999. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(12), 2798-2806.
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M., & Kosik, K. S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer research*, 65(14), 6029-6033.
- Chang, C. Y., Chen, J. T., Chen, T. H., & Chen, R. M. (2022). Enzalutamide Induces Apoptotic Insults to Human Drug-Resistant and -Sensitive Glioblastoma Cells via an Intrinsic Bax-Mitochondrion-Cytochrome C Caspase Cascade Activation Pathway. *Molecules*, 27(19). <https://doi.org/10.3390/molecules27196666>
- Chen, H., Xue, L., Wang, X., Han, L., & Ding, X. (2025). Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes deliver microRNA-142-3p to disturb glioma progression by down-regulating GF11. *Discov Oncol*, 16(1), 143. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-01837-4>
- Chen, X., Xu, X., Pan, B., Zeng, K., Xu, M., Liu, X., He, B., Pan, Y., Sun, H., & Wang, S. (2018). miR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer. *Aging (alban NY)*, 10(11), 3421.
- Chen, Z., & Hambardzumyan, D. (2018). Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol*, 9, 1004. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01004>
- Chiou, G.-Y., Chien, C.-S., Wang, M.-L., Chen, M.-T., Yang, Y.-P., Yu, Y.-L., Chien, Y., Chang, Y.-C., Shen, C.-C., & Chio, C.-C. (2013). Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma. *Molecular cell*, 52(5), 693-706.
- Chiou, J., Impedovo, V., Huynh, Y. B., Gorgoglione, R., Penalva, L. O., Lodi, A., Brenner, A. J., & Tiziani, S. (2025). Targeting metabolic and epigenetic vulnerabilities in glioblastoma with SN-38 and rabusertib combination therapy. *International journal of molecular sciences*, 26(2), 474.
- Chuang, H.-Y., Su, Y.-k., Liu, H.-W., Chen, C.-H., Chiu, S.-C., Cho, D.-Y., Lin, S.-Z., Chen, Y.-S., & Lin, C.-M. (2019). Preclinical evidence of STAT3 inhibitor pacritinib overcoming temozolomide resistance via downregulating miR-21-enriched exosomes from M2 glioblastoma-associated macrophages. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), 959.
- Clarke, C. (2005). Neurological diseases in Kumar & Clark Clinical Medicine. Kumar P and Clark M. In: Elsevier Saunders, Edinburgh.
- Colombo, M., Moita, C., Van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*, 126(24), 5553-5565.
- Corsten, M. F., Miranda, R., Kasmieh, R., Krichevsky, A. M., Weissleder, R., & Shah, K. (2007). MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell–delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer research*, 67(19), 8994-9000.
- Cui, J. G., Zhao, Y., Sethi, P., Li, Y. Y., Mahta, A., Culicchia, F., & Lukiw, W. J. (2010). MicroRNA-128 (miRNA-128) down-regulation in glioblastoma targets ARP5 (ANGPTL6), Bmi-1 and E2F-3a, key regulators of brain cell proliferation. *J Neurooncol*, 98(3), 297-304. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-0077-0>

- Çınar, R., Yıldızhan, K., Altınar, H. İ., & Yağcı, T. (2026). TRPM2 Channel Involvement in the Hesperidin-Mediated Potentiation of Cisplatin's Antitumor Action in Laryngeal Carcinoma Cells. *International journal of molecular sciences*, 27(3), 1141.
- Da Ros, M., De Gregorio, V., Iorio, A. L., Giunti, L., Guidi, M., de Martino, M., Genitori, L., & Sardi, I. (2018). Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102879>
- Dai, F.-Q., Li, C.-R., Fan, X.-Q., Tan, L., Wang, R.-T., & Jin, H. (2019). miR-150-5p inhibits non-small-cell lung cancer metastasis and recurrence by targeting HMGA2 and β -catenin signaling. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 16, 675-685.
- Das, A., Banik, N. L., Patel, S. J., & Ray, S. K. (2004). Dexamethasone protected human glioblastoma U87MG cells from temozolomide induced apoptosis by maintaining Bax:Bcl-2 ratio and preventing proteolytic activities. *Mol Cancer*, 3(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-3-36>
- Davis, M. E. (2016). Exosomes: What Do We Love So Much About Them? *Circ Res*, 119(12), 1280-1282. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309942>
- Delgado-Martin, B., & Medina, M. A. (2020). Advances in the Knowledge of the Molecular Biology of Glioblastoma and Its Impact in Patient Diagnosis, Stratification, and Treatment. *Adv Sci (Weinh)*, 7(9), 1902971. <https://doi.org/10.1002/advs.201902971>
- Deng, B., Zhang, Y., Zhang, S., Wen, F., Miao, Y., & Guo, K. (2015). MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation and invasion of cervical cancer cells by targeting FZD7. *Tumor Biology*, 36(10), 8065-8073.
- Dillhoff, M., Liu, J., Frankel, W., Croce, C., & Bloomston, M. (2008). MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *Journal of gastrointestinal surgery*, 12(12), 2171-2176.
- Eliyasi Dashtaki, M., Tabibkhooei, A., Parvizpour, S., Soltani, R., & Ghasemi, S. (2023). Isolation of Cells and Exosomes from Glioblastoma Tissue to Investigate the Effects of Ascorbic Acid on the c-Myc, HIF-1 α , and Lnc-SNHG16 Genes. *Int J Mol Cell Med*, 12(2), 135-143. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.12.2.135>
- Elsea, C. R., Roberts, D. A., Druker, B. J., & Wood, L. J. (2008). Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *PloS one*, 3(6), e2355.
- Erices, J. I., Bizama, C., Niechi, I., Uribe, D., Rosales, A., Fabres, K., Navarro-Martinez, G., Torres, A., San Martin, R., Roa, J. C., & Quezada-Monras, C. (2023). Glioblastoma Microenvironment and Invasiveness: New Insights and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/ijms24087047>
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews cancer*, 6(4), 259-269.
- Faisal, S. M., Comba, A., Varela, M. L., Argento, A. E., Brumley, E., Abel, C., 2nd, Castro, M. G., & Lowenstein, P. R. (2022). The complex interactions between the cellular and non-cellular components of the brain tumor microenvironmental landscape and their therapeutic implications. *Front Oncol*, 12, 1005069. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1005069>
- Fang, Z., Zhang, X., Huang, H., & Wu, J. (2022). Exosome based miRNA delivery strategy for disease treatment. *Chinese Chemical Letters*, 33(4), 1693-1704.

- Feldman, L. (2024). Hypoxia within the glioblastoma tumor microenvironment: a master saboteur of novel treatments. *Front Immunol*, 15, 1384249. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1384249>
- Feldman, N. B., Gromovkykh, T. I., Sedyakina, N. E., Krasnyuk Jr, I. I., & Lutsenko, S. V. (2018). Cytotoxic and antitumor activity of liposomal silibinin. *BioNanoScience*, 8(4), 971-976.
- Fernandez, A., Artola, M., Leon, S., Otegui, N., Jimeno, A., Serrano, D., & Calvo, A. (2025). Cancer Vulnerabilities Through Targeting the ATR/Chk1 and ATM/Chk2 Axes in the Context of DNA Damage. *Cells*, 14(10), 748.
- Franceschi, E., Cavallo, G., Scopece, L., Paioli, A., Pession, A., Magrini, E., Conforti, R., Palmerini, E., Bartolini, S., & Rimondini, S. (2004). Phase II trial of carboplatin and etoposide for patients with recurrent high-grade glioma. *British journal of cancer*, 91(6), 1038-1044.
- Friebel, E., Kapolou, K., Unger, S., Nunez, N. G., Utz, S., Rushing, E. J., Regli, L., Weller, M., Greter, M., Tugues, S., Neidert, M. C., & Becher, B. (2020). Single-Cell Mapping of Human Brain Cancer Reveals Tumor-Specific Instruction of Tissue-Invasive Leukocytes. *Cell*, 181(7), 1626-1642 e1620. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.055>
- Fukuda, M., Nishio, K., Kanzawa, F., Ogasawara, H., Ishida, T., Arioka, H., Bojanowski, K., Oka, M., & Saijo, N. (1996). Synergism between cisplatin and topoisomerase I inhibitors, NB-506 and SN-38, in human small cell lung cancer cells. *Cancer research*, 56(4), 789-793.
- Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C. C., Burchard, J., Linsley, P. S., & Krichevsky, A. M. (2008). MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Molecular and cellular biology*, 28(17), 5369-5380.
- Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Torrejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskova, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., & Ribas, A. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*, 19(6), 1189-1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>
- Gecili, İ., Genç, S., Hacımüftüoğlu, A., Güner, A., Niğde, E., Karabulut, K., Okan Yıllar, D., Taghizadehghalehjoughi, A., & Abdelaty Hassibelnaby, A. M. (2026). Combined in vitro effects of temozolomide and erucic acid on U87 MG cell viability, oxidative stress, and expression of genes involved in apoptotic signalling. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 77(2), 123-130.
- Genc, S., Nadaroglu, H., Cinar, R., Nigde, E., Karabulut, K., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2025). New Anti-Cancer Impact of Cerium Oxide, Lithium, and Sn-38 Synergy via DNA Methylation-Mediated Reduction of MMP-2 and Modulation of the PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Pharmaceuticals*, 18(11), 1725.
- Genc, S., Yagci, T., Vageli, D. P., Dundar, R., Doukas, P. G., Doukas, S. G., Tolia, M., Chatzakis, N., Tsatsakis, A., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2023). Exosomal MicroRNA-223, MicroRNA-146, and MicroRNA-21 Profiles and Biochemical Changes in Laryngeal Cancer. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 6(5), 820-828. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.3c00038>
- Genç, S., Çakır, Z., Taghizadehghalehjoughi, A., Yeni, Y., Jalili, K., & Hacımüftüoğlu, A. (2021). Investigation of the exosome-based drug delivery system potential in the treatment of glioblastoma in vitro experimental models. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(3), 451-467.

- Genç, S., Karabulut, K., Niğde, E., Aydın, Y. E., Aydın, B., Aydın, A. E., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2024). Amygdalin (Vitamin B17) Effect on Glioblastoma: Focus on Oxidant Capacity and Antioxidant Status. *Recent Trends in Pharmacology*, 2(2), 75-78.
- Ghaemmaghani, A. B., Mahjoubin-Tehran, M., Movahedpour, A., Morshedi, K., Sheida, A., Taghavi, S. P., Mirzaei, H., & Hamblin, M. R. (2020). Role of exosomes in malignant glioma: microRNAs and proteins in pathogenesis and diagnosis. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 120.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gokduman, K. (2016). Strategies targeting DNA topoisomerase I in cancer chemotherapy: camptothecins, nanocarriers for camptothecins, organic non-camptothecin compounds and metal complexes. *Current drug targets*, 17(16), 1928-1939.
- Grochans, S., Cybulska, A. M., Simińska, D., Korbecki, J., Kojder, K., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2022). Epidemiology of glioblastoma multiforme—literature review. *Cancers*, 14(10), 2412.
- Gross, J. C. (2021). Extracellular WNTs: trafficking, exosomes, and ligand–receptor interaction. *Pharmacology of the WNT Signaling System*, 29-43.
- Guessous, F., Zhang, Y., Kofman, A., Catania, A., Li, Y., Schiff, D., Purow, B., & Abounader, R. (2010). microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle*, 9(6), 1031-1036.
- Gutierrez-Millan, C., Calvo Díaz, C., Lanao, J. M., & Colino, C. I. (2021). Advances in exosomes-based drug delivery systems. *Macromolecular Bioscience*, 21(1), 2000269.
- Han, Q.-F., Li, W.-J., Hu, K.-S., Gao, J., Zhai, W.-L., Yang, J.-H., & Zhang, S.-J. (2022). Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular cancer*, 21(1), 207.
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. U. (2017). Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(1), 3.
- Hanif, F., Perveen, K., Jawed, H., Ahmed, A., Malhi, S. M., Jamall, S., & Simjee, S. U. (2014). N-(2-hydroxyphenyl)acetamide (NA-2) and Temozolomide synergistically induce apoptosis in human glioblastoma cell line U87. *Cancer Cell Int*, 14(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12935-014-0133-5>
- Hashemi, Z. S., Ghavami, M., Mohammadi, F., Shokrollahi Barough, M., Shokati, F., Asghari, S., Khalili, S., Akbari Yekta, M., Ghavamzadeh, A., & Sarrami Forooshani, R. (2024). Doxorubicin-loaded NK exosomes enable cytotoxicity against triple-negative breast cancer spheroids. *Iran J Basic Med Sci*, 27(12), 1604-1615. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2024.79378.17194>
- Hegde, M. M., Palkar, P., Mutalik, S. P., Mutalik, S., Goda, J. S., & Rao, B. S. S. (2024). Enhancing glioblastoma cytotoxicity through encapsulating O6-benzylguanine and temozolomide in PEGylated liposomal nanocarrier: an in vitro study. *3 Biotech*, 14(11), 275. <https://doi.org/10.1007/s13205-024-04123-2>
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*, 75(2), 193-208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>

- Hosseini, A., Soleimani, S., Modarres, H. P., Emami, S. H., Tondar, M., Bahlakeh, G., & Hasani-Sadrabadi, M. (2016). Exosome-inspired targeting of cancer cells with enhanced affinity. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(4), 768-778.
- Hua, S., Liu, C., Liu, L., & Wu, D. (2018). miR-142-3p inhibits aerobic glycolysis and cell proliferation in hepatocellular carcinoma via targeting LDHA. *Biochemical and biophysical research communications*, 496(3), 947-954.
- Ighodaro, O., & Akinloye, O. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- Indira Chandran, V., Gopala, S., Venkat, E. H., Kjolby, M., & Nejsun, P. (2024). Extracellular vesicles in glioblastoma: a challenge and an opportunity. *NPJ Precis Oncol*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00600-2>
- Iser, I. C., Pereira, M. B., Lenz, G., & Wink, M. R. (2017). The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma: an updated systematic review and in silico investigation. *Medicinal research reviews*, 37(2), 271-313.
- Jain, R. K., di Tomaso, E., Duda, D. G., Loeffler, J. S., Sorensen, A. G., & Batchelor, T. T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*, 8(8), 610-622. <https://doi.org/10.1038/nrn2175>
- Jang, J. Y., Kim, D., Im, E., & Kim, N. D. (2025). Etoposide as a key therapeutic agent in lung cancer: Mechanisms, efficacy, and emerging strategies. *International journal of molecular sciences*, 26(2), 796.
- Jiang, X., Huang, H., Li, Z., Li, Y., Wang, X., Gurbuxani, S., Chen, P., He, C., You, D., & Zhang, S. (2012). Blockade of miR-150 maturation by MLL-fusion/MYC/LIN-28 is required for MLL-associated leukemia. *Cancer cell*, 22(4), 524-535.
- Jin, F., Zhao, L., Guo, Y.-J., Zhao, W.-J., Zhang, H., Wang, H.-T., Shao, T., Zhang, S.-L., Wei, Y.-J., & Feng, J. (2010). Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells. *Brain research*, 1336, 103-111.
- Johnstone, R. M. (2005). Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 34(3), 214-219.
- Jurisc, V., Radenkovic, S., & Konjevic, G. (2015). The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol*, 867, 115-124. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_8
- Kahlert, C., & Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of molecular medicine*, 91(4), 431-437.
- Kalaimani, L., Devarajan, B., Namperumalsamy, V. P., Veerappan, M., Daniels, J. T., & Chidambaranathan, G. P. (2022). Hsa-miR-150-5p inhibits Wnt- β -catenin signaling in human corneal epithelial stem cells. *Molecular Vision*, 28, 178.
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *science*, 367(6478), eaau6977.
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *science*, 367(6478). <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>
- Kanzawa, T., Bedwell, J., Kondo, Y., Kondo, S., & Germano, I. M. (2003). Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *Journal of neurosurgery*, 99(6), 1047-1052.

- Kashifa Fathima, J., Lavanya, V., Jamal, S., & Ahmed, N. (2022). The effectiveness of various chemotherapeutic agents in cancer treatment. *Current Pharmacology Reports*, 8(4), 236-252.
- Kawato, Y., Aonuma, M., Hirota, Y., Kuga, H., & Sato, K. (1991). Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer research*, 51(16), 4187-4191.
- Kenific, C. M., Zhang, H., & Lyden, D. (2021). An exosome pathway without an ESCRT. *Cell research*, 31(2), 105-106.
- Kim, H., Lee, S., Shin, E., Seong, K. M., Jin, Y. W., Youn, H., & Youn, B. (2020). The emerging roles of exosomes as EMT regulators in cancer. *Cells*, 9(4), 861.
- Kim, J. H., Lee, C.-H., & Baek, M.-C. (2022). Dissecting exosome inhibitors: therapeutic insights into small-molecule chemicals against cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(11), 1833-1843.
- Kleihues, P., & Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncology*, 1(1), 44-51.
- Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006502. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006502>
- Koul, D. (2008). PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer biology & therapy*, 7(9), 1321-1325.
- Krichevsky, A. M., & Gabriely, G. (2009). miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(1), 39-53.
- Krylova, S. V., & Feng, D. (2023). The machinery of exosomes: biogenesis, release, and uptake. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1337.
- Lee, Y.-Y., Yarmishyn, A. A., Wang, M.-L., Chen, H.-Y., Chiou, S.-H., Yang, Y.-P., Lin, C.-F., Huang, P.-I., Chen, Y.-W., & Ma, H.-I. (2018). MicroRNA-142-3p is involved in regulation of MGMT expression in glioblastoma cells. *Cancer management and research*, 775-785.
- Lei, Z., Xu, G., Wang, L., Yang, H., Liu, X., Zhao, J., & Zhang, H. T. (2014). MiR-142-3p represses TGF- β -induced growth inhibition through repression of TGF β R1 in non-small cell lung cancer. *The FASEB Journal*, 28(6), 2696-2704.
- Levitt, N., Propper, D., Madhusudan, S., Braybrooke, J., Echeta, C., Te Poele, R., Davies, S., Flanagan, E., Hickson, I., & Joel, S. (2005). Pharmacokinetically guided phase I trial of topotecan and etoposide phosphate in recurrent ovarian cancer. *British journal of cancer*, 93(1), 60-69.
- Li, M., Xu, H., Qi, Y., Pan, Z., Li, B., Gao, Z., Zhao, R., Xue, H., & Li, G. (2022). Tumor-derived exosomes deliver the tumor suppressor miR-3591-3p to induce M2 macrophage polarization and promote glioma progression. *Oncogene*, 41(41), 4618-4632.
- Li, T., Li, D., Sha, J., Sun, P., & Huang, Y. (2009). MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 383(3), 280-285.
- Liang, G., Zhu, Y., Ali, D. J., Tian, T., Xu, H., Si, K., Sun, B., Chen, B., & Xiao, Z. (2020). Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer. *J Nanobiotechnology*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0563-2>

- Lim, M., Xia, Y., Bettgowda, C., & Weller, M. (2018). Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 15(7), 422-442. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0003-5>
- Lin, I., Shirkani, P., & Garnis, C. (2026). miR-150-5p at the Interface of Cancer Biology and Immune Regulation: Dual Roles, Mechanisms, and Therapeutic Opportunities. *Journal of Cancer*, 17(6), 1105.
- Liu, C., Yu, J., Yu, S., Lavker, R. M., Cai, L., Liu, W., Yang, K., He, X., & Chen, S. (2010). MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 53(1), 98-107.
- Louis, D. N. (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1(1), 97-117.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803-820.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H., Pfister, S. M., & Reifenberger, G. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231-1251.
- Lu, W., Zhang, H., Niu, Y., Wu, Y., Sun, W., Li, H., Kong, J., Ding, K., Shen, H.-M., & Wu, H. (2017). Long non-coding RNA linc00673 regulated non-small cell lung cancer proliferation, migration, invasion and epithelial mesenchymal transition by sponging miR-150-5p. *Molecular cancer*, 16(1), 118.
- Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., & Sun, D. (2017). Engineering exosomes as refined biological nanoplateforms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin*, 38(6), 754-763. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.12>
- Lucero, R., Zappulli, V., Sammarco, A., Murillo, O. D., Cheah, P. S., Srinivasan, S., Tai, E., Ting, D. T., Wei, Z., & Roth, M. E. (2020). Glioma-derived miRNA-containing extracellular vesicles induce angiogenesis by reprogramming brain endothelial cells. *Cell reports*, 30(7), 2065-2074. e2064.
- Lv, L.-L., Cao, Y., Liu, D., Xu, M., Liu, H., Tang, R.-N., Ma, K.-L., & Liu, B.-C. (2013). Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *International journal of biological sciences*, 9(10), 1021.
- Magesh, V., Singh, J. P., Selvendiran, K., Ekambaram, G., & Sakthisekaran, D. (2006). Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. *Mol Cell Biochem*, 287(1-2), 127-135. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-9088-0>
- Maia, J., Caja, S., Strano Moraes, M. C., Couto, N., & Costa-Silva, B. (2018). Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 18.
- Manna, I., Iaccino, E., Dattilo, V., Barone, S., Vecchio, E., Mimmi, S., Filippelli, E., Demonte, G., Polidoro, S., & Granata, A. (2018). Exosome-associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients. *The FASEB Journal*, 32(8), 4241-4246.
- Marangon, D., & Lecca, D. (2023). Exosomal non-coding RNAs in glioma progression: insights into tumor microenvironment dynamics and therapeutic implications. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1275755. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1275755>

- Marino, S., Menna, G., Di Bonaventura, R., Lisi, L., Mattogno, P., Figa, F., Bilgin, L., D'Alessandris, Q. G., Olivi, A., & Della Pepa, G. M. (2023). The Extracellular Matrix in Glioblastomas: A Glance at Its Structural Modifications in Shaping the Tumoral Microenvironment-A Systematic Review. *Cancers (Basel)*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/cancers15061879>
- Marqués-García, F., & Isidoro-García, M. (2016). Protocols for exosome isolation and RNA profiling. In *Molecular Genetics of Asthma* (pp. 153-167). Springer.
- Masoudi, M. S., Mehrabian, E., & Mirzaei, H. (2018). MiR-21: A key player in glioblastoma pathogenesis. *J Cell Biochem*, 119(2), 1285-1290. <https://doi.org/10.1002/jcb.26300>
- McKinnon, C., Nandhabalan, M., Murray, S. A., & Plaha, P. (2021). Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. *Bmj*, 374.
- Memmel, S., Sukhorukov, V. L., Höring, M., Westerling, K., Fiedler, V., Katzer, A., Krohne, G., Flentje, M., & Djuzenova, C. S. (2014). Cell surface area and membrane folding in glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status. *PloS one*, 9(1), e87052.
- Metalloproteinase, T. M. MicroRNA 21 Promotes Glioma Invasion by.
- Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lattekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rinken, A., Andronowska, A., & Bhattacharjee, S. (2020). Zeta potential of extracellular vesicles: toward understanding the attributes that determine colloidal stability. *ACS omega*, 5(27), 16701-16710.
- Milane, L., Singh, A., Mattheolabakis, G., Suresh, M., & Amiji, M. M. (2015). Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*, 219, 278-294.
- Molinaro, A. M., Hervey-Jumper, S., Morshed, R. A., Young, J., Han, S. J., Chunduru, P., Zhang, Y., Phillips, J. J., Shai, A., & Lafontaine, M. (2020). Association of maximal extent of resection of contrast-enhanced and non-contrast-enhanced tumor with survival within molecular subgroups of patients with newly diagnosed glioblastoma. *JAMA oncology*, 6(4), 495-503.
- Montecucco, A., & Biamonti, G. (2007). Cellular response to etoposide treatment. *Cancer letters*, 252(1), 9-18.
- Munoz, J., Rodriguez-Cruz, V., Greco, S., Ramkissoon, S., Ligon, K., & Rameshwar, P. (2014). Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. *Cell death & disease*, 5(3), e1145-e1145.
- Musatova, O. E., & Rubtsov, Y. P. (2023). Effects of glioblastoma-derived extracellular vesicles on the functions of immune cells. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11, 1060000.
- Najm, M. A., Alfatlawi, W. R., Saleh, R. O., & Kadhim Al Taie, S. (2019). Evaluation of antioxidant (GSH, CAT, SOD) and MDA in Iraqi women with breast cancer. *Journal of Global Pharma Technology*, 11(7), 107-110.
- Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., Richman, A. R., Silverbush, D., Shaw, M. L., & Hebert, C. M. (2019). An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835-849. e821.
- Negoro, S., Masuda, N., Takada, Y., Sugiura, T., Kudoh, S., Katakami, N., Ariyoshi, Y., Ohashi, Y., Niitani, H., Fukuoka, M., & West, C. P. T. L. C. S. G. (2003). Randomised phase III trial of irinotecan combined with cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 88(3), 335-341. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600725>

- Niemira, M., Erol, A., Bielska, A., Zeller, A., Skwarska, A., Chwialkowska, K., Kuzmicki, M., Szamatowicz, J., Reszec, J., & Knapp, P. (2023). Identification of serum miR-1246 and miR-150-5p as novel diagnostic biomarkers for high-grade serous ovarian cancer. *Scientific reports*, 13(1), 19287.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research*, 19(4), 764-772.
- Oizumi, S., Isobe, H., Ogura, S., Ishida, T., Yamazaki, K., Nishimura, M., Kawakami, Y., & Dosaka-Akita, H. (2002). Topoisomerase inhibitor-induced apoptosis accompanied by down-regulation of Bcl-2 in human lung cancer cells. *Anticancer research*, 22(6C), 4029-4037.
- Oliver, L., Olivier, C., Marhuenda, F., Campone, M., & Vallette, F. (2009). Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy. *Current molecular pharmacology*, 2(3), 263-284.
- Osheroff, N., Zechiedrich, E. L., & Gale, K. C. (1991). Catalytic function of DNA topoisomerase II. *BioEssays*, 13(6), 269-275.
- Osti, D., Del Bene, M., Rappa, G., Santos, M., Matafora, V., Richichi, C., Faletti, S., Beznoussenko, G. V., Mironov, A., Bachi, A., Fornasari, L., Bongetta, D., Gaetani, P., DiMeco, F., Lorico, A., & Pelicci, G. (2019). Clinical Significance of Extracellular Vesicles in Plasma from Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res*, 25(1), 266-276. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1941>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., De Blank, P. M., Finlay, J. L., Gurney, J. G., McKean-Cowdin, R., Stearns, D. S., Wolff, J. E., Liu, M., & Wolinsky, Y. (2016). American brain tumor association adolescent and young adult primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*, 18(suppl_1), i1-i50.
- Pan, X., Wang, Z.-X., & Wang, R. (2010). MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer biology & therapy*, 10(12), 1224-1232.
- Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A., & Kosik, K. S. (2008). MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer research*, 68(19), 8164-8172.
- Paskeh, M. D. A., Entezari, M., Mirzaei, S., Zabolian, A., Saleki, H., Naghdi, M. J., Sabet, S., Khoshbakht, M. A., Hashemi, M., & Hushmandi, K. (2022). Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *Journal of hematology & oncology*, 15(1), 83.
- Peng, J., Liang, Q., Xu, Z., Cai, Y., Peng, B., Li, J., Zhang, W., Kang, F., Hong, Q., & Yan, Y. (2022). Current understanding of exosomal MicroRNAs in glioma immune regulation and therapeutic responses. *Frontiers in Immunology*, 12, 813747.
- Pfeffer, S. R., Yang, C. H., & Pfeffer, L. M. (2015). The role of miR-21 in cancer. *Drug development research*, 76(6), 270-277.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews cancer*, 6(10), 789-802.
- Pommier, Y. (2012). *DNA topoisomerases and cancer*. Springer.
- Poujol, S., Pinguet, F., Ychou, M., Abderrahim, A. G., Duffour, J., & Bressolle, F. M. (2007). A limited sampling strategy to estimate the pharmacokinetic parameters of irinotecan and its active metabolite, SN-38, in patients with metastatic digestive cancer receiving the FOLFIRI regimen. *Oncology reports*, 18(6), 1613-1321.
- Pourquier, P., & Pommier, Y. (2001). Topoisomerase I-mediated DNA damage.

- Price, M., Ballard, C., Benedetti, J., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J. S., & Ostrom, Q. T. (2024). CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2017–2021. *Neuro-oncology*, 26(Suppl 6), vi1.
- Pu, Y. S., Hour, T. C., Chuang, S. E., Cheng, A. L., Lai, M. K., & Kuo, M. L. (2004). Interleukin-6 is responsible for drug resistance and anti-apoptotic effects in prostatic cancer cells. *The Prostate*, 60(2), 120-129.
- Punga, T., Le Panse, R., Andersson, M., Truffault, F., Berrih-Aknin, S., & Punga, A. R. (2014). Circulating miRNAs in myasthenia gravis: miR-150-5p as a new potential biomarker. *Annals of clinical and translational neurology*, 1(1), 49-58.
- Qi, Y., Jin, C., Qiu, W., Zhao, R., Wang, S., Li, B., Zhang, Z., Guo, Q., Zhang, S., & Gao, Z. (2022). The dual role of glioma exosomal microRNAs: glioma eliminates tumor suppressor miR-1298-5p via exosomes to promote immunosuppressive effects of MDSCs. *Cell death & disease*, 13(5), 426.
- Qiao, L., Hu, S., Huang, K., Su, T., Li, Z., Vandergriff, A., Cores, J., Dinh, P.-U., Allen, T., & Shen, D. (2020). Tumor cell-derived exosomes home to their cells of origin and can be used as Trojan horses to deliver cancer drugs. *Theranostics*, 10(8), 3474.
- Qin, Y., Sun, R., Wu, C., Wang, L., & Zhang, C. (2016). Exosome: a novel approach to stimulate bone regeneration through regulation of osteogenesis and angiogenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 712.
- Qiu, S., Lin, S., Hu, D., Feng, Y., Tan, Y., & Peng, Y. (2013). Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *Journal of translational medicine*, 11(1), 10.
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2017). The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer cell*, 31(3), 326-341.
- Quintavalle, C., Garofalo, M., Zanca, C., Romano, G., Iaboni, M., Del Basso De Caro, M., Martinez-Montero, J., Incoronato, M., Nuovo, G., & Croce, C. (2012). miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTPμ. *Oncogene*, 31(7), 858-868.
- Rabah, N., Ait Mohand, F. E., & Kravchenko-Balasha, N. (2023). Understanding Glioblastoma Signaling, Heterogeneity, Invasiveness, and Drug Delivery Barriers. *Int J Mol Sci*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/ijms241814256>
- Ramesh, M., Ahlawat, P., & Srinivas, N. R. (2010). Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomedical chromatography*, 24(1), 104-123.
- Ramos-Zaldivar, H. M., Polakovicova, I., Salas-Huenuleo, E., Corvalan, A. H., Kogan, M. J., Yefi, C. P., & Andia, M. E. (2022). Extracellular vesicles through the blood-brain barrier: a review. *Fluids Barriers CNS*, 19(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00359-3>
- Read, R. D., Tapp, Z. M., Rajappa, P., & Hambardzumyan, D. (2024). Glioblastoma microenvironment-from biology to therapy. *Genes Dev*, 38(9-10), 360-379. <https://doi.org/10.1101/gad.351427.123>
- Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., & Poirot, M. (2011). Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol*, 81(10), 1171-1182. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.02.011>
- Rezaei, R., Baghaei, K., Hashemi, S. M., Zali, M. R., Ghanbarian, H., & Amani, D. (2021). Tumor-Derived Exosomes Enriched by miRNA-124 Promote Anti-tumor Immune

- Response in CT-26 Tumor-Bearing Mice. *Front Med (Lausanne)*, 8, 619939. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.619939>
- Ricklefs, F. L., Alayo, Q., Krenzlin, H., Mahmoud, A. B., Speranza, M. C., Nakashima, H., Hayes, J. L., Lee, K., Balaj, L., Passaro, C., Rooj, A. K., Krasemann, S., Carter, B. S., Chen, C. C., Steed, T., Treiber, J., Rodig, S., Yang, K., Nakano, I., . . . Chiocca, E. A. (2018). Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Sci Adv*, 4(3), eaar2766. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar2766>
- Saito, Y., & Jones, P. A. (2006). Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*, 5(19), 2220-2222. <https://doi.org/10.4161/cc.5.19.3340>
- Sakr, M., Takino, T., Sabit, H., Nakada, M., Li, Z., & Sato, H. (2016). miR-150-5p and miR-133a suppress glioma cell proliferation and migration through targeting membrane-type-1 matrix metalloproteinase. *Gene*, 587(2), 155-162.
- Salarpour, S., Forootanfar, H., Pournamdari, M., Ahmadi-Zeidabadi, M., Esmaeeli, M., & Pardakhty, A. (2019). Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques. *Daru*, 27(2), 533-539. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00280-5>
- Sato, Y., Kurose, A., Ogawa, A., Ogasawara, K., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., & Sawai, T. (2009). Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide. *Cancer Biol Ther*, 8(5), 452-457. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.5.7740>
- Schmittel, A., Fischer von Weikersthal, L., Sebastian, M., Martus, P., Schulze, K., Hortig, P., Reeb, M., Thiel, E., & Keilholz, U. (2006). A randomized phase II trial of irinotecan plus carboplatin versus etoposide plus carboplatin treatment in patients with extended disease small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 17(4), 663-667. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdj137>
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S., & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 44(1), 31-38.
- Schorey, J. S., & Bhatnagar, S. (2008). Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9(6), 871-881.
- Sharma, P., Aaroe, A., Liang, J., & Puduvalli, V. K. (2023). Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neurooncol Adv*, 5(1), vdad009. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad009>
- Shi, L., Chen, J., Yang, J., Pan, T., Zhang, S., & Wang, Z. (2010). MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain research*, 1352, 255-264.
- Shi, R., Wang, P.-Y., Li, X.-Y., Chen, J.-X., Li, Y., Zhang, X.-Z., Zhang, C.-G., Jiang, T., Li, W.-B., & Ding, W. (2015). Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. *Oncotarget*, 6(29), 26971.
- Shirzad, M., Daraei, A., Najafzadehvarzi, H., Farnoush, N., & Parsian, H. (2024). Co-culture system of breast cancer and normal cells to investigate inflammation: using doxorubicin encapsulated in adipose-derived exosomes. *Med Oncol*, 42(1), 21. <https://doi.org/10.1007/s12032-024-02568-2>

- Siddiqui, M. F., Muqaddas, M., & Sarwar, S. (2015). Biochemical mechanisms of etoposide; upshot of cell death. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(12), 4920.
- Singh, N., Miner, A., Hennis, L., & Mittal, S. (2021). Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma-a comprehensive review. *Cancer drug resistance*, 4(1), 17.
- Sinha, B. K. (1995). Topoisomerase inhibitors. A review of their therapeutic potential in cancer. *Drugs*, 49(1), 11-19. <https://doi.org/10.2165/00003495-199549010-00002>
- Sinha, B. K. (1995). Topoisomerase inhibitors: a review of their therapeutic potential in cancer. *Drugs*, 49(1), 11-19.
- Sinkule, J. A. (1984). Etoposide: a semisynthetic epipodophyllotoxin chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 4(2), 61-71.
- Sokolova, V., Ludwig, A.-K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P. A., Epple, M., & Giebel, B. (2011). Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(1), 146-150.
- Stevens Barrón, J. C., Chapa González, C., Álvarez Parrilla, E., & De la Rosa, L. A. (2023). Nanoparticle-mediated delivery of flavonoids: impact on proinflammatory cytokine production: a systematic review. *Biomolecules*, 13(7), 1158.
- Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J., & Raposo, G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 3(5), 321-330.
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., & Bogdahn, U. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England journal of medicine*, 352(10), 987-996.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Sun, L., Yan, W., Wang, Y., Sun, G., Luo, H., Zhang, J., Wang, X., You, Y., Yang, Z., & Liu, N. (2011). MicroRNA-10b induces glioma cell invasion by modulating MMP-14 and uPAR expression via HOXD10. *Brain research*, 1389, 9-18.
- Suzuki, K., Kazui, T., Yoshida, M., Uno, T., Kobayashi, T., Kimura, T., Yoshida, T., & Sugimura, H. (1999). Drug-induced apoptosis and p53, BCL-2 and BAX expression in breast cancer tissues in vivo and in fibroblast cells in vitro. *Japanese journal of clinical oncology*, 29(7), 323-331.
- Şensoy Gün, B., Aydoğan, A., Çadırcı, M., Şensoy, S., Gurbanov, R., & Tunalı, B. (2025). Green synthesis of quercetin-mediated ZnS quantum dots and their photocatalytic, antimicrobial, and cytotoxic performances. *Scientific reports*.
- Tabata, M., Tabata, R., Grabowski, D. R., Bukowski, R. M., Ganapathi, M. K., & Ganapathi, R. (2001). Roles of NF-κB and 26 S proteasome in apoptotic cell death induced by topoisomerase I and II poisons in human nonsmall cell lung carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8029-8036.
- Tamimi, A. F., & Juweid, M. (2017). Epidemiology and outcome of glioblastoma. *Exon Publications*, 143-153.

- Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., & Khasraw, M. (2020). Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(4), 299-312.
- Tanizawa, A., Fujimori, A., Fujimori, Y., & Pommier, Y. (1994). Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 86(11), 836-842.
- Tataranu, L. G., Turliuc, S., Kamel, A., Rizea, R. E., Dricu, A., Staicu, G. A., Baloi, S. C., Rodriguez, S. M. B., & Manole, A. I. M. (2024). Glioblastoma Tumor Microenvironment: An Important Modulator for Tumoral Progression and Therapy Resistance. *Curr Issues Mol Biol*, 46(9), 9881-9894. <https://doi.org/10.3390/cimb46090588>
- Thery, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., . . . Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thomas, A., & Pommier, Y. (2019). Targeting topoisomerase I in the era of precision medicine. *Clinical cancer research*, 25(22), 6581-6589.
- Tian, W., Zhu, W., & Jiang, J. (2020). miR-150-5p suppresses the stem cell-like characteristics of glioma cells by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cell Biology International*, 44(5), 1156-1167.
- Vanderbeek, A. M., Rahman, R., Fell, G., Ventz, S., Chen, T., Redd, R., Parmigiani, G., Cloughesy, T. F., Wen, P. Y., & Trippa, L. (2018). The clinical trials landscape for glioblastoma: is it adequate to develop new treatments? *Neuro-oncology*, 20(8), 1034-1043.
- Voigt, W., Matsui, S., Yin, M., Burhans, W., Minderman, H., & Rustum, Y. (1998). Topoisomerase-I inhibitor SN-38 can induce DNA damage and chromosomal aberrations independent from DNA synthesis. *Anticancer research*, 18(5A), 3499-3505.
- Wang, J., Chen, D., & Ho, E. A. (2021). Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems. *J Control Release*, 329, 894-906. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.020>
- Wang, J., Xu, J., Yang, S., He, L., Xu, W., Liu, Y., Cao, B., & Yu, S. (2024). SN-38, an active metabolite of irinotecan, inhibits transcription of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and enhances drug sensitivity of colorectal cancer cells. *Mol Carcinog*, 63(4), 742-756. <https://doi.org/10.1002/mc.23685>
- Wang, Y., Blandino, G., Oren, M., & Givol, D. (1998). Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene*, 17(15), 1923-1930.
- Waris, G., & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*, 5, 14. <https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>
- Wei, Y., Zhou, K., Wang, C., Du, X., Wang, Z., Chen, G., Zhang, H., & Hui, X. (2025). Exosomal miR-142-3p from M1-polarized macrophages suppresses cell growth and immune escape in glioblastoma through regulating HMGB1-mediated PD-1/PD-L1 checkpoint. *Journal of Neurochemistry*, 169(1), e16224.

- Whiteside, T. L. (2016a). Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1216-1223.
- Whiteside, T. L. (2016b). Tumor-derived exosomes and their role in tumor-induced immune suppression. *Vaccines*, 4(4), 35.
- Wirsching, H.-G., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. *Malignant brain tumors: state-of-the-art treatment*, 265-288.
- Wu, L., Cai, C., Wang, X., Liu, M., Li, X., & Tang, H. (2011). MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *FEBS letters*, 585(9), 1322-1330.
- Wu, L., Li, G., Feng, D., Qin, H., Gong, L., Zhang, J., & Zhang, Z. (2013). MicroRNA-21 expression is associated with overall survival in patients with glioma. *Diagnostic pathology*, 8(1), 200.
- Wu, Y., Song, Y., Xiong, Y., Wang, X., Xu, K., Han, B., Bai, Y., Li, L., Zhang, Y., & Zhou, L. (2017). MicroRNA-21 (Mir-21) promotes cell growth and invasion by repressing tumor suppressor PTEN in colorectal cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(3), 945-958.
- Xie, S., Zhang, Q., & Jiang, L. (2022). Current knowledge on exosome biogenesis, cargo-sorting mechanism and therapeutic implications. *Membranes*, 12(5), 498.
- Xu, L., Zhang, P., Zhang, G., Shen, Z., & Bai, X. (2025). CORRECTION: MiR-150-5p Inhibits Cell Proliferation and Metastasis by Targeting FTO in Osteosarcoma. *Oncol Res*, 33(7), 1797-1798. <https://doi.org/10.32604/or.2024.061279>
- Xu, S., Wei, J., Wang, F., Kong, L.-Y., Ling, X.-Y., Nduom, E., Gabrusiewicz, K., Doucette, T., Yang, Y., & Yaghi, N. K. (2014). Effect of miR-142-3p on the M2 macrophage and therapeutic efficacy against murine glioblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(8), dju162.
- Yan, L.-X., Huang, X.-F., Shao, Q., Huang, M.-Y., Deng, L., Wu, Q.-L., Zeng, Y.-X., & Shao, J.-Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *Rna*, 14(11), 2348-2360.
- Yang, J., Jia, L., He, Z., & Wang, Y. (2023). Recent advances in SN-38 drug delivery system. *Int J Pharm*, 637, 122886. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122886>
- Yeni, Y., Taghizadehghalehjoughi, A., Genc, S., Hacimuftuoglu, A., Yildirim, S., & Bolat, I. (2023). Glioblastoma cell-derived exosomes induce cell death and oxidative stress in primary cultures of olfactory neurons. Role of redox stress. *Molecular biology reports*, 50(5), 3999-4009.
- Yu, M., Gai, C., Li, Z., Ding, D., Zheng, J., Zhang, W., Lv, S., & Li, W. (2019). Targeted exosome-encapsulated erastin induced ferroptosis in triple negative breast cancer cells. *Cancer Sci*, 110(10), 3173-3182. <https://doi.org/10.1111/cas.14181>
- Yu, X., Odenthal, M., & Fries, J. W. (2016). Exosomes as miRNA carriers: formation–function–future. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2028.
- Zeng, H., Guo, S., Ren, X., Wu, Z., Liu, S., & Yao, X. (2023). Current strategies for exosome cargo loading and targeting delivery. *Cells*, 12(10), 1416.
- Zhang, C., Zhang, J., Hao, J., Shi, Z., Wang, Y., Han, L., Yu, S., You, Y., Jiang, T., & Wang, J. (2012). High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma. *Journal of translational medicine*, 10(1), 119.

- Zhang, J.-g., Wang, J.-j., Zhao, F., Liu, Q., Jiang, K., & Yang, G.-h. (2010). MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica chimica acta*, 411(11-12), 846-852.
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015). Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(1), 17-24.
- Zhang, W., Zhang, J., Hoadley, K., Kushwaha, D., Ramakrishnan, V., Li, S., Kang, C., You, Y., Jiang, C., Song, S. W., Jiang, T., & Chen, C. C. (2012). miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro Oncol*, 14(6), 712-719. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos089>
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International journal of nanomedicine*, 6917-6934.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9(1), 19.
- Zhang, Y., Wang, Y., Wang, Z., Farhangfar, F., & Zimmerman, M. (2017). In Vitro Evaluation of Anticancer Drugs with Kinetic and Static Alternating Cell Culture System. *Journal of Cancer Therapy*, 8(09), 845.