TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOPARTİKÜL TEMELLİ İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNİN GLİOBLASTOMA ANTİ-KANSER ETKİNLİĞİNİN OMİK YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Recep UYAR

VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

ANKARA
2025

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOPARTİKÜL TEMELLİ İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNİN GLİOBLASTOMA ANTİ-KANSER ETKİNLİĞİNİN OMİK YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Recep UYAR

VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

EŞDANIŞMAN
Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA

ANKARA
2025

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Nanopartikül Temelli ilaç Taşıma Sistemlerinin Glioblastoma Anti-Kanser Etkinliğinin Omik Yöntemlerle Değerlendirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Adı-Soyadı: Recep UYAR

Tarih: 10.12.2025

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında

Recep UYAR tarafından hazırlanan

"Nanopartikül Temelli ilaç Taşıma Sistemlerinin Glioblastoma Anti-Kanser Etkinliğinin Omik Yöntemlerle Değerlendirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Nanopartikül Temelli ilaç Taşıma Sistemlerinin Glioblastoma Anti-Kanser Etkinliğinin Omik Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Glioblastoma multiforme (GBM), invazif karakteri, heterojen hücre yapısı ve kemoterapiye karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları nedeniyle mevcut tedavilere yanıtı sınırlı olan, kötü prognozlu bir beyin tümörüdür. Bu tez çalışmasında, karbon bazlı nano dot (CD) yapılarının, temozolomid (TMZ) yüklenmiş formülasyonlar halinde kullanılarak GBM tedavisindeki potansiyel etkisinin *in vitro* ve *in vivo* olarak moleküler ve omik sistemlerle araştırılması amaçlandı.CD'ler sodyum bakır-klorofilin öncül maddesinden sentezlenerek, karakterizasyonları sağlandıktan sonra TMZ ile yüklenerek stabilite ve sitotoksisite analizlerine tabi tutuldu.

U87 ve $CD133^+$ hücre hatları kullanılarak oluşturulan *in vitro* sistemlerde, CD ve CD+TMZ formülasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri LDH sitotoksisite testi ile incelendi. Ardından, immun yetersizliği nedeniyle translasyonel değeri yüksek olan Nude-Balb/c fareleri kullanılarak intrakranyal tümör modeli geliştirildi. Tümör gelişimi GFP/lusiferaz ifadesi ile IVIS görüntüleme sistemi aracılığıyla noninvaziv olarak takip edildi. Tedavi sonrası biyodağılım, histolojik değerlendirmeler ve tümör morfolojisine ait veriler elde edildi. Çalışmada geniş kapsamda değerlendirme yapılabilmesi için RNA-seq tabanlı omik analizlerle tümör ve mikroçevredeki transkriptomik değişimler ortaya kondu. BBB geçişine dair özgün gen panelleri, immün dekonvolüsyon algoritmaları ve kemorezistans imzaları, biyoinformatik analizlerle detaylı biçimde değerlendirildi. Elde edilen bazı imza mekanizmları temsil eden ilişkili genler değerlendirme parametresi olarak tüm gruplarda IHC ile değerlendirildi. Bu tez çalışması, nano taşıyıcı sistemlerin GBM tedavisinde moleküler mekanizmaları nasıl etkileyebileceğini ortaya koymakta ve literatüre yeni katkılar sunmaktadır.

Bulgular, $CD133^+$ hücrelerin tedavi öncesi ve sonrası DNA onarımı, redoks dengesi, effluks pompaları ve kök hücre belirteçlerine ilişkin çoklu direnç ağlarını eşzamanlı olarak aktive ettiğini; buna karşılık WT tümörlerin daha sınırlı ve modüle edilebilir bir yanıt verdiğini göstermektedir. Hem in vitro hem de *in vivo* modellerde CD+TMZ uygulaması, WT tümörlerde belirgin bir immün aktivasyon, apoptotik yanıt ve BBB koruyucu etki oluştururken, $CD133^+$ tümörlerde bu etkinin proliferasyon, immün kaçış ve mikrovasküler yeniden şekillenme mekanizmaları tarafından gölgelendiği görülmüştür. Mikrodiseksiyon ve RNA-seq analizleri, $CD133^+$ mikroçevresinin yalnızca tedaviye daha dayanıklı değil, aynı zamanda tümör ilerleyişini kolaylaştıran immün-supresif ve vasküler olarak bozulmuş bir ortam yarattığını doğrulamıştır. Sonuç olarak, glioblastoma tedavisinde başarısızlığın temelinde $CD133^+$ alt tiplerin çoklu direnç stratejileri ve mikroçevresel yeniden programlama kapasitesi yatmakta olup, bu hücrelerin hedeflenmesi ve BBB'nin fonksiyonel stabilitesini koruyan kombinasyonel yaklaşımların geliştirilmesi terapötik başarının artırılmasında kritik bir gereklilik olarak öne çıkmaktadır.

Anahtar sözcükler: Biyoinformatik, Glioblastoma, Kanser kök hücresi, Nanotıp, Temozalamid

SUMMARY

Evaluation of the Anti-Cancer Efficacy of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems in Glioblastoma Using Omics Approaches

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive brain tumor with poor prognosis, characterized by its invasive behavior, cellular heterogeneity, and complex resistance mechanisms to chemotherapy. This thesis aimed to investigate the potential therapeutic impact of carbon-based nano dot (CD) structures, loaded with the chemotherapeutic agent temozolomide (TMZ), using both in vitro and *in vivo* models integrated with molecular and omics-based analyses.

CDs were synthesized using sodium copper chlorophyllin as the precursor, followed by structural characterization and drug loading with TMZ. Stability and cytotoxicity assays were conducted thereafter. In vitro studies were performed on U87 and $CD133^{+}$ glioma cell lines, evaluating the effects of CD and CD+TMZ formulations on cell viability via LDH cytotoxicity assays.

To mimic the tumor microenvironment more accurately, an orthotopic glioma model was developed by stereotactic injection into immunodeficient Nude-Balb/c mice, known for their high translational relevance. Tumor progression was monitored noninvasively through IVIS imaging based on GFP/luciferase expression. Post-treatment evaluations included biodistribution analysis, histopathological examination, and assessment of tumor morphology. To comprehensively analyze treatment-induced molecular alterations, RNA-seq–based transcriptomic profiling was performed on tumor and peritumoral regions. Blood–brain barrier (BBB) permeability-related gene panels, immune deconvolution algorithms, and chemoresistance signatures were analyzed through advanced bioinformatics pipelines. Key genes representing significant molecular signatures were validated across experimental groups using immunohistochemistry (IHC).

This study provides novel insights into how nano-drug delivery platforms modulate molecular pathways in GBM, and offers valuable contributions to the literature by integrating targeted therapy with spatially resolved omics analyses.

Keywords: Bioinformatics, Cancer Stem Cell, Glioblastoma, Nanomedicine, Temozolomide

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Glioblastoma Multiform	1
1.1.1. Glioma ve GBM'nin Epidemiyolojisi ve Klinik Seyri	2
1.1.2. WHO Sınıflamasında GBM ve Moleküler Alt Tipleri	3
1.1.3. GBM Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar ve Sınırlılıkları	5
1.1.4. Tedavi Sonrası Nüks ve Rezistans Mekanizmaları	6
1.1.5. GBM'nin Moleküler Patogenezi ve Genomik/Transkriptomik Profili	8
1.2. Kanser Kök Hücreleri ve Glioblastomada Rolü	9
1.2.1. Kanser Kök Hücre Teorisi ve Temel Özellikleri	9
1.2.2. GBM'de CD133+ Kanser Kök Hücrelerinin Önemi	11
1.2.3. CSC'lere Bağlı Direnç ve Tümör Yeniden Oluşumu	12
1.2.4. CSC Mikroçevresi ve Perivasküler Bölge Dinamikleri	13
1.2.5. GBM'de Kök Hücreleri Hedefleyen Terapiler	14
1.3. Tümör Mikroçevresi ve GBM	16
1.3.1. TME Elemanları: Bağ Dokusu, Ekstraselüler Matriks, İmmün Hücreler	16
1.3.2. GBM'de Mikrogliya, Makrofajlar ve Nöroenflamasyon	17
1.3.3. Hipoksi, Asidoz ve TME'nin Dirençteki Rolü	19
1.3.4. TME'de Transkripsiyonel ve Epigenetik Değişiklikler	20
1.3.5. TME'yi Modüle Eden Tedavi Yaklaşımları	21
1.4. Temozolomid'in Klinik Kullanımı ve Moleküler Etkileri	23
1.4.1. TMZ'nin Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması	23
1.4.2. TMZ Direnç Mekizmaları	24
1.4.3. TMZ Kombinasyon Tedavileri: Klinik ve Preklinik Sonuçlar	26
1.4.4. TMZ'nin CSC'ler Üzerindeki Sınırlı Etkileri	27
1.5. Nanoteknoloji ve Nanotıpta Temel Kavramla	29
1.5.1. Nanopartikül Tipleri: Polimerik, Lipidik, Metalik, Karbon Bazlı	29
1.5.2. Nanopartikül Özelliklerinin Biyo-dağılım Üzerine Etkisi	29
1.5.3. Nanosistemlerin İlaç Taşıma ve Hedefleme Mekanizmaları	31
1.5.4. Klinik Uygulamalarda Onaylanmış Nanoformülasyonlar	33
1.6. Nano Dotlar (Karbon Dotlar)	34
1.6.1. Nano Dotların Fizikokimyasal Özellikleri	34
1.6.2. Nano Dotların Biyouyumluluğu ve Toksikolojik Profili	34
1.6.3. Nano Dotların Fluoresans Özellikleri ve Biyogörüntüleme	35
1.6.4. Glioma Tedavisinde Nano Dot Kullanımı	36
1.7. Kan-Beyin Bariyeri ve Nanopartikül Geçişi	37
1.7.1. BBB'nin Yapısı ve Fizyolojik Fonksiyonu	37
1.7.2. Nanopartiküllerin BBB'den Geçiş Stratejileri	38
1.7.2.1. Taşıyıcı Vektör Kullanımı	39

1.7.3. Karbon Dotların BBB Geçişini Sağlayan Faktörler 40
1.8. Preklinik GBM Model Sistemleri 41
1.8.1. *In Vitro* GBM Modelleri 41
1.8.2. U87 ve CD133+ Glioblastoma Hücre Hatları 42
1.8.3. *İn vivo* Xenograft ve Orthotopik Modellemeler 43
1.9. Omik Teknolojilerle Tümör Modelindeki Nanoformülasyonların Değerlendirilmesi 45
1.9.1. Transkriptomik Sistemler 45
1.9.2. Nano Dotların Hücre Tipi-Spesifik Transkriptomik Etkileri 46
1.9.3. Kan-Beyin Bariyeri Hücrelerinde Gözlenen Omik Yanıtlar 47
1.9.3.1. Transkriptomik Yanıtlar 48
1.10. Literatürdeki Açıklıklar ve Araştırma Hipotezleri 49
1.10.1. Literatürdeki Eksiklikler ve Tartışmalı Noktalar 49
1.10.2. Nano Dot Temelli TMZ Taşıyıcıları 50
1.10.3. CSC'ler ve TME'yi Hedefleyen Kombinasyon Terapi Açığı 51
1.10.4. Kan-Beyin Bariyeri Geçişini Aydınlatan Moleküler İpuçları 52
1.10.5. Özgünlük ve Hipotez 53

2. GEREÇ VE YÖNTEM 56
2.1. Nanopartikül Temelli TMZ Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi 58
2.1.1. Kullanılan Nano Dotların Temini 58
2.1.2. Temozolomid ile Yükleme Protokolü 59
2.1.3. Nano Dot-TMZ Formülasyonlarının Stabilite ve Fluoresans Analizleri 60
2.1.4. Kontrollere Ait Formülasyonların Hazırlanması 60
2.2. *İn Vitro* Antikanser Etkinlik Analizleri 61
2.2.1. Hücre Hatlarının Özellikleri 61
2.2.2. LDH Sitotoksisite Analizi 62
2.3. *İn Vivo* Glioblastoma Modelinin Oluşturulması 63
2.3.1. Hayvan Etik Onayları ve Hayvanların Temini 63
2.3.2. İntrakranyal U87 ve CD133+ Tümör Enjeksiyon Protokolü 64
2.3.3. Tümör Oluşumunun GFP ve Lüsiferaz Temelli Takibi 66
2.3.4. Tedavi Gruplarının Tanımlanması ve Uygulama Şeması 66
2.3.5. Karbon Dot Biyodağılım 67
2.4. Histopatolojik Değerlendirmeler 68
2.4.1. Organ Toplama ve Doku Hazırlama 68
2.4.2. Histolojik Değerlendirmeler: Genel Morfoloji 69
2.5. Omik Tabanlı Moleküler Analizler 70
2.5.1. Tümör ve Tümör Çevresinden Doku Alma ve Ayrıştırma 70
2.5.2. RNA İzolasyonu ve Değerlendirilmesi 72
2.5.3. Kütüphane Hazırlığı ve Sekanslama İşlemi 73
2.6. Biyoinformatik Analizler 74
2.6.1. Kalite Kontrol: FastQC, MultiQC 75
2.6.2. Alignment ve Sayım: STAR/HISAT2, HTSeq 75
2.6.3. Diferansiyel Gen İfadesi Analizi: DESeq2 76
2.6.4. Yolak ve Regülatör Analizleri: GSEA, TRRUST, KEGG, Reactome 77
2.6.5. BBB Geçişine Özgü Transkriptomik İmza Tanımlama 77
2.6.6. Dekonvülasyon Analizleriyle İmmun TME Değerlendirmesi 79
2.6.7. Kemoterapik Direnç Panelleriyle Direnç Gelişiminin Değerlendirilmesi 80
2.7. İstatistiksel Değerlendirme 81

3. BULGULAR 82
3.1. Nano Dot-TMZ Formülasyonlarının Özellikleri 82
3.2. *İn Vitro* Etkinlik Sonuçları 83
3.2.1. LDH Sitotoksisite Analizi Sonuçları 83

3.3. *İn Vivo* Tümör Oluşumu ve Tedavi İzleme 84
3.3.1. Tümörlerin IVIS ile İzlenmesi 84
3.4. Histopatolojik Bulgular 85
3.4.1. Tümör ve Çevresinin Dokusal Değerlendirmesi 85
3.5. Pseudo-Spatial Transkriptom Analizi 86
3.5.1. Veri Kalitesi ve Hizalama İstatistikleri 86
3.5.2. Fare Tümör Mikroçevresi için Diferansiyel Gen Ekspresyonu Analizi 88
3.5.2.1. WT Tümör Mikroçevresinde Tedaviye Yanıt 91
3.5.2.2. $CD133^+$ Tümör Mikroçevresinde Tedaviye Yanıt 95
3.5.2.3. $CD133^+$ vs WT TME Gruplarının Terapi Altındaki Karşılaştırılması 98
3.5.2.4. $CD133^+$ vs WT Kontrol TME Gruplarının Karşılaştırılması 101
3.5.3. İnsan Tümör Kısmı Diferansiyel Gen Ekspresyonu Analizi 105
3.5.3.1. $CD133^+$ vs WT Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması 106
3.5.3.2. $CD133^+$ vs WT Terapi Gruplarının Karşılaştırılması 110
3.5.3.3. WT Tümör Mikroçevresinde Tedaviye Yanıt 113
3.5.3.4. CD133+ Tümör Mikroçevresinde Tedaviye Yanıt 115
3.6. Kan-Beyin Bariyeri ile İlişkili Bulgular 119
3.6.1. CD133+ GBM'nin BBB Geçirgenlik Genleri Üzerindeki Etkisi 119
3.6.2. ND-TMZ'nin BBB Geçirgenlik Genleri Üzerindeki Etkisi 121
3.7. Kemoterapik Direnç ile İlişkili Bulgular ve Genel Değerlendirme 123
3.7.1. $CD133^+$ vs WT (Kontrol) 124
3.7.2. $CD133^+$ vs WT (Tedavi Altında) 124
3.7.3. Terapi vs Kontrol ($CD133^+$) 124
3.7.4. Terapi vs Kontrol (WT) 125
3.8. İmmunohistokimya Analiz Sonucu 125

4. TARTIŞMA 128
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 142
KAYNAKLAR 146
EKLER 162
Ek-1. Etik Kurul Kararı 162
ÖZGEÇMİŞ 163

ÖNSÖZ

Bilim, insan aklının en saf merakının düzenli bir ifadeye dönüştüğü yoldur. Her bilimsel çaba, bilinmeyeni anlama, doğruyu arama ve bu süreçte hatalardan öğrenme isteğinin bir yansımasıdır. Bu çalışma da, tam olarak bu anlayışla, yalnızca sonuçlar üretmek için değil, sürecin kendisini yaşayabilmek, düşünmeyi öğrenebilmek ve gerçeğe biraz daha yaklaşabilmek amacıyla yapıldı. Karl Popper'in da dediği gibi, "Bilim, kesin doğruların değil, sürekli olarak yanlışlanmaya açık hakikat arayışının alanıdır." Bilimsel üretimin değerinin, atıf sayılarında veya unvanlarda değil; gerçeğe sadık kalınan, etik ilkelere bağlı, dürüst, özenli ve disiplinli bir çalışmada yattığına inanıyorum. Gerçek bilim, çıkar veya statü için değil; doğruyu arama tutkusuyla yapılan iştir.

Bilim, "kendisi için" yapıldığında anlamlıdır; bir amaç için değil, bir anlayış için. Bu sebeple, hak edilmeyen bir katkının kabul edilmesi kadar, hak edilen bir emeğin göz ardı edilmesi de bilimin ruhuna aykırıdır. Bilimsel etik, yalnızca bir kural değil, bir bilim insanının kendi vicdanıyla yaptığı en sessiz ama en güçlü anlaşmadır.

Bu tez, yıllar süren bir emeğin, sabrın ve merakın ürünü olarak ortaya çıktı. Her aşamasında bilimsel doğruluğu, etik sorumluluğu ve araştırma tutkusunu bir arada yürütmeye gayret ettim. Karşılaştığım zorluklar, bilimin ve maalesef ki akademik camianın yarattığı zorlu ama öğretici doğasının bir parçasıydı. Her bir deney, her bir analiz ve her bir sonuç, yalnızca bu tezin bir bölümü değil; aynı zamanda kişisel bir öğrenme yolculuğuydu.

Bu sürecin en önemli paydaşları olan değerli hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Başta, akademik yolculuğum boyunca bana yön veren, sabrı, titizliği ve ilham verici akademik yaklaşımıyla çalışmalarımı şekillendiren danışmanlarım Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA ve Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'e teşekkür ederim. Ayrıca, tez jürimde yer alan ve süreç boyunca yapıcı eleştirileriyle çalışmama değerli katkılar sağlayan Doç. Dr. Ahmet. CEYLAN ve Dr. Özge ÇINAR'a desteği ve anlayışı için özel teşekkürlerimi sunarım.

Bu yolculukta yalnız değildim. Her zaman yanımda olup desteğini ve sabrını esirgemeyen sevgili eşim Merve YILMAZ UYAR'a, koşulsuz sevgileri ve inançlarıyla varlıkları bana güç katan canım annem Nermin UYAR ve babam Yavuz UYAR'A gönülden

teşekkür ederim. Bu süreçte hem moral hem de akademik anlamda yanımda olan değerli arkadaşlarım Ömür BESBİNAR ve Yağmur TURGUT'a da dostlukları ve destekleri için minnettarım. Akademik yolculuğuma yön veren Doç. Dr. Altay ÜNAL'a da bir teşekkür borçluyum. Çalışmamıza büyük katkı veren; ilaç yüklü nanomalzemenin sentezlenmesi ve karakterizasyonunu Prof. Roger LEBLANC ve Dr. Emel KIRBAŞ ÇİLİNGİR'e de teşşekürlerimi sunarım.

Bu tez, sadece bilimsel bir gerekliliğin değil, bir inancın ve tutkunun ürünüdür. Gerçek bilimin, insanın kendini ve evreni anlamaya adadığı en onurlu yol olduğuna inanıyorum. Bu çalışmayı, bilimi bir yaşam biçimi olarak gören, merak etmeyi hiç bırakmayan herkes için paylaşıyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

BBB	Kan Beyin Bariyeri
Chl-CD	Klorofil Kaynaklı Karbon Dot
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Besiyeri
EDX	Enerji Dağıtıcı X-Işını
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
EPR	Arttırılmış Geçirgenlik ve Tutulma
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ESCRT	Taşıma İçin Gerekli Endozomal Sıralama Kompleksi
EV	Ekstraselüler Vezikül
EXOMKH	Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları
FBS	Fetal Bovine Serum
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-Fikslenmiş Parafin Gömülü
GBM	Glioblastoma Multiforme
GBMSCs	Glioblastoma Kanser Kök Hücreleri
GFP	Green Floresane Dye
HDACi	Histon Deasetilaz İnhibitörleri
IVIS	In Vivo Imagin System
IVIS	İn Vivo Görüntüleme Sistemi
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MGMT	O6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
µm	Mikrometre
MMR	Hatalı Tamir Mekanizması
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
NM	Nanomalzemeler
P-gp	P-Glikoprotein
RES	Retiküloendotelyal Sistem
RNA	Ribonükleik Asit
RNA-seq	RNA Sequencing
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TAM	Tümör Aktive Edilmiş Makrofajlar
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TME	Tümör Mikro Çevresi
TMZ	Temozolomid
U87	İnsan Glioblastoma Kanser Hücre Hattı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. GBM tümörlerinin oluşumu ve mikroçevresi. GBM tümörleri genellikle frontal lob, temporal lob ve serebellumda teşhis edilir 3

Şekil 1.2. Davranışa göre birincil beyin ve diğer MSS tümörlerinin dağılımı 4

Şekil 1.3. TMZ direncinin gelişiminde rol alan yolakları özetleyen görsel 8

Şekil 1.4. Gliyoblastoma oluşumu ve mikroçevresi 16

Şekil 1.5. GBM'de TMZ direnç mekanizmaları 25

Şekil 1.6. Karbon dotların BBB'den geçiş mekanizmaları 38

Şekil 2.1. Çalışmanın genel dizaynını özetleyen görsel 58

Şekil 2.2. $CD133^+$ U87 hücre hattının karakterizasyonu 61

Şekil 2.3. A. Kültürü yapılan hücrelerin mikroskop altındaki gösterimi. B. Kültürü yapılan GFP ifade eden hücrelerin floresan mikroskop altındaki gösterimi 62

Şekil 2.4. Sterotaksik sistem manipülasyonu ve intrakraniyal enjeksiyon sırasında çekilen görüntüler 65

Şekil 2.5. Temozalamidin belirlenen dalga boyunda yapılan ölçümlere göre spektrofotometrik lineer regresyon eğrisi 67

Şekil 2.6. A CD-ChlD ve MCD enjekte edilimiş BalbC farelerde 24. saat IVIS organ görüntüleri, B CD+TMZ uygulanmış farelerin beyinlerinin 24. saat görüntüleri 68

Şekil 2.7. U87 hücreleri ile elde edilen glioblastome modelinden alınan kesitlerinin 1,25x ve 10x H&E görüntüleri. B U87 hücreleri ile elde edilen glioblastome modelinden alınan kesitlerinin 1,25x ve 10x H&E görüntüleri 71

Şekil 2.8. A U87 hücre hattı ile oluşturulan glioblastoma modelinden elde edilen beyin dokusu kesitine ait konfokal mikroskop görüntüsü. B U87-CD133 hücre hattı ile oluşturulan glioblastoma modelinden elde edilen beyin dokusu kesitine ait konfokal mikroskop görüntüsü 71

Şekil 2.9. A Bir tümör örneğinin qubit analizine ait görsel. B Bir TME örneğinin nanodrop ölçüm görüntüsü 73

Şekil 3.1. Karbon dot ve temozolomid yüklü karbon dot karakterizasyonlarına ait görsel 82

Şekil 3.2. CD ve CD+TMZ kombinasyonunun U87 ve U87-$CD133^+$ hücrelerinde hücre canlılığına etkisi. (A) U87 hücrelerinde, farklı konsantrasyonlardaki karbon noktalar (CD) ve CD+TMZ uygulamaları sonrasında hücre canlılık yüzdeleri. (B) U87-$CD133^+$ hücrelerinde aynı uygulamaların etkileri ($p<0,01$, $*p<0,001$) 83

Şekil 3.3. A U87-CD133 hücre hattından tümör modelinin oluşturulmasını takiben IVIS-floresan sistemiyle GFP takibine ait gösterim. B U87 hücre hattından tümör modelinin oluşturulmasını takiben IVIS-lüminesans sistemiyle lüsiferaz takibine ait gösterim. Gösterimler manipülasyondan 2 hafta sonrasına aittir 84

Şekil 3.4. Tümör ve çevresel beyin dokusunun histopatolojik değerlendirmesi 85

Şekil 3.5. PRJ25-50-1_L01_45 kodlu örneğin iki yönlü okumalarının FastQC sonuçlarına ait grafikler 87

Şekil 3.6. Fare tümr örnekleriyle yapılan multiQC analizine ait grafikler 88

Şekil 3.7. Nude fare glioblastoma modelinde oluşturulan tümör ve TME örneklerinin grup karşılaştırmaları. $CD133^+$ ve WT U87 hücrelerinden elde edilen tümör ve çevresel dokular, kontrol ve CD+TMZ tedavi grupları altında karşılaştırılmıştır 89

Şekil 3.8. Fare TME örneklerinde dört temel karşılaştırmaya göre farklı ifade edilen genlere ait venn diagramı 89

Şekil 3.9. Fare örneklerine ait PCA analizi. Tedavi durumu (CD+TMZ/Kontrol) ve genotip ($CD133^+$ / WT) dikkate alınarak örnekler gruplandırılmıştır. PC1 %92, PC2 %3 varyansı temsil etmektedir 91

Şekil 3.10. CD + TMZ ile tedavi edilen WT tümör mikroçevresi dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi 92

Şekil 3.11. Terapi vs kontrol (WT) grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 93

Şekil 3.12. Terapi vs kontrol (WT) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik 94

Şekil 3.13. CD+TMZ tedavisinde öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi 94

Şekil 3.14. CD + TMZ ile tedavi edilen CD133+ tümör mikroçevresi dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi 95

Şekil 3.15. Terapi vs kontrol (CD133+) TME grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 96

Şekil 3.16 Terapi vs kontrol (CD133+) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik 97

Şekil 3.17. CD133+ ortamda CD+TMZ tedavisinde öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi 97

Şekil 3.18. CD133+ vs WT ile genotiplerinde terapi yapılan grupların tümör mikroçevresi dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi 98

Şekil 3.19. CD133+ vs kontrol (terapi) TME grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 99

Şekil 3.20. CD133+ vs kontrol (terapi) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik 100

Şekil 3.21. CD133+ vs WT (terapi) karşılaştırılmasında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi 100

Şekil 3.22. CD133+ vs WT ile genotiplerinde kontrol gruplarının tümör mikroçevresi dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi 102

Şekil 3.23. CD133+ vs WT kontrol grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 103

Şekil 3.24. CD133+ vs WT kontrol grubunda aşağo regüle olan yolakları gösteren grafik 104

Şekil 3.25. CD133+ vs WT (Kontrol) karşılaştırılmasında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi 104

Şekil 3.26. Tümör örneklerine ait PCA analizi. Tedavi durumu (kontrol vs CD+TMZ) ve genotip ($CD133^+$ vs WT) dikkate alınarak örnekler gruplandırılmıştır 105

Şekil 3.27. Tümör örneklerinde dört temel karşılaştırmaya göre farklı ifade edilen genlere ait venn diagramı 106

Şekil 3.28. CD133+ vs WT ile tümör genotiplerinde kontrol gruplarının belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi 107

Şekil 3.29. Tümör örneklerinde CD133+ vs WT kontrol grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 108

Şekil 3.30. Tümör örneklerinde CD133+ vs WT kontrol grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 109

Şekil 3.31. CD133+ vs WT (kontrol) karşılaştırılmasında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi 109

Şekil 3.32. CD133+ vs WT ile genotiplerinde terapi gruplarının tümör dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi 110

Şekil 3.33. Tümör örneklerinde CD133+ vs WT terapi grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 111

Şekil 3.34. Tümör örneklerinde CD133+ vs WT kontrol grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik 112

Şekil 3.35. CD133+ vs WT (terapi) karşılaştırılmasında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi 112

Şekil 3.36. CD + TMZ ile tedavi edilen WT tümör dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi 113

Şekil 3.37. Tümör örneklerinden terapi vs kontrol (WT) grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 114

Şekil 3.38. Tümör örneklerinden terapi vs kontrol (WT) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik 114

Şekil 3.39. Terapi alan WT tümör sonuçlarında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi 115

Şekil 3.40. CD + TMZ ile tedavi edilen CD133+ tümör dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi 116

Şekil 3.41. Tümör örneklerinden terapi vs kontrol (CD133+) grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik 117

Şekil 3.42. Tümör örneklerinden terapi vs kontrol (CD133+) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik 118

Şekil 3.43. Terapi alan CD133+ tümör sonuçlarında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi 118

Şekil 3.44. EnrichR ve Topplot tabanlı databankaları baz alınarak BBB ilişkili gen paneline göre $CD133^{+}$ tümörlerin WT tümörleri ile karşılaştırılması 119

Şekil 3.45. ND-TMZ'nin WT GBM modelinde BBB yapı ve geçirgenlikle ilişkili genler 121

Şekil 3.46. $CD133^{+}$ GBM modelinde BBB yapı ve geçirgenlikle ilişkili genler 122

Şekil 3.47. Kemoterapik direnç ile ilişkili mekanizmalarda rol alan genler ile oluşturulmuş direnç paneline ait grafik 123

Şekil 3.48. U87 ve CD133+ U87 tümör dokularında PGP ve Caspase-3 ekspresyonlarının gruplar arasındaki değişiminin değerlendirilmesi 127

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Gereçler listesi 56
Çizelge 2.2. Kan-beyin bariyerine özgü gen paneli 78

1. GİRİŞ

1.1. Glioblastoma Multiform

Glioblastoma Multiform (GBM), erişkinlerde görülen en yaygın ve en agresif primer malign beyin tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Grade IV difüz gliom olarak sınıflandırılan bu tümör, hızlı proliferasyon kapasitesi, invaziv büyüme paterni ve yüksek nüks oranı ile karakterize olduğu belirtilmiştir (Louis vd., 2016). GBM tipik olarak serebral hemisferlerde lokalize olur ve sıklıkla frontal ve temporal lobları tutar. Klinik olarak baş ağrısı, epileptik nöbetler, fokal nörolojik defisitler ve bilişsel bozukluklar gibi semptomlarla kendini gösterir. Tanı çoğunlukla kontrast tutulum gösteren ve çevresinde ödem alanı bulunan lezyonların manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile saptanması sonrası biyopsi ile konur(Omuro ve DeAngelis, 2013).

Moleküler düzeyde GBM, heterojen yapısı ve çeşitli genetik alt tipleri ile dikkat çeker. IDH1/2 mutasyonu taşımayan primer GBM olguları, çoğunlukla yaşlı bireylerde görülürken; sekonder GBM'ler daha genç yaş grubunda ve IDH mutasyonları ile birlikte görülür. En yaygın görülen moleküler değişiklikler arasında PTEN mutasyonu, EGFR amplifikasyonu, telomeraz promotor mutasyonları ve TP53 inaktivasyonu yer almaktadır. Bu sayılan değişimler, tümör hücrelerinin proliferatif bir özellik kazanmasında ve apoptozdan kaçınmasında rol oynar (McLendon vd., 2008).

GBM'nin tedavisinde temel yaklaşım cerrahi rezeksiyon, bu rezeksiyonu takiben radyoterapi ve Temozolomid (TMZ) gibi benzer kemoterapik ajanlardan oluşan Stupp protokolüdür (Stupp vd., 2005). Ancak bu çoklu yaklaşım ve tedaviye rağmen hastaların medyan sağkalımı süressi yaklaşık olarak 14–16 ay civarındadır. Bu kötü prognozun en önemli nedenlerinden biri, tümörün en önemli özelliklerinden biri olan yaygın invaziv özelliği ve cerrahi olarak tamamen müdahale edilemiyor olmasıdır. Bu çok bilinen sebeplerin yanı sıra, glioblastoma kök hücrelerinin (GBSCs) varlığı da, terapötik direnç ve tümör nüksünde kritik rol oynamaktadır (Sejda vd., 2022).

Son yıllarda geliştirilen moleküler sınıflandırmalar ve transkriptomik analizler sayesinde, GBM'nin pronöral, klasik, mezenkimal ve nöral gibi alt gruplara ayrılabildiği gösterilmiştir. Bu moleküler alt tipler hem prognoz hem de tedaviye yanıt açısından farklılıklar

göstermektedir. Örneğin, mesenchymal alt tip daha agresif seyretmekte olup, immün hücre infiltrasyonunun da daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Verhaak vd., 2010).

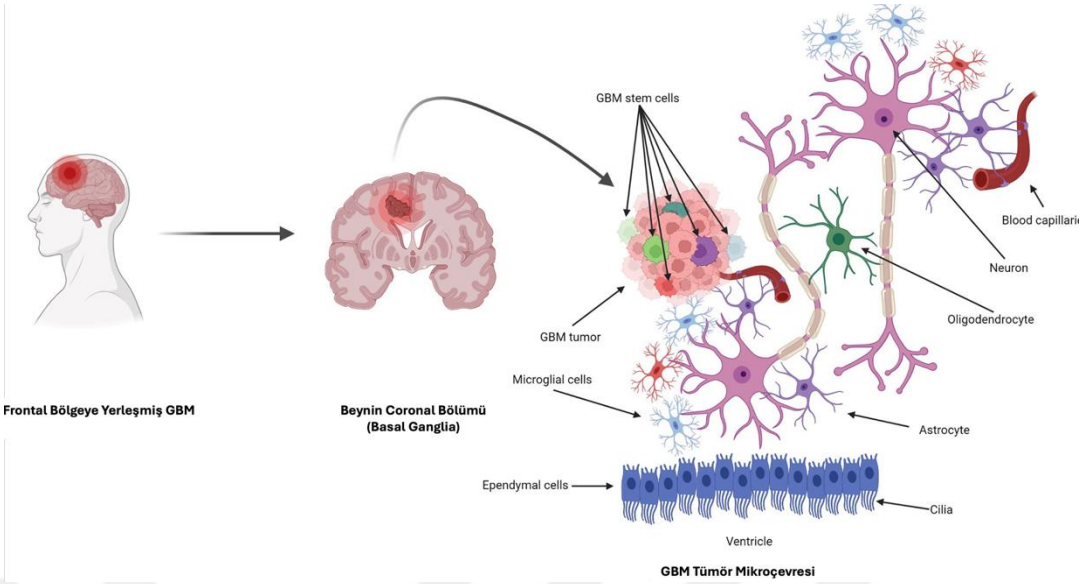
Tüm bu bilgiler ışığında, GBM günümüzde bile tedaviye dirençli ve ölümcül bir tümör olmaya devam etmektedir. Bu durum, yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasını, hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini ve moleküler alt tipleri dikkate alan kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin benimsenmesini ve buna yönelik çalışmaların artmasını zorunlu kılmaktadır.

1.1.1. Glioma ve GBM'nin Epidemiyolojisi ve Klinik Seyri

Gliomalar, merkezi sinir sisteminin (MSS) glial hücrelerinden temel alan ve genellikle beyin dokusunda ortaya çıkan en yaygın primer tümör sınıfını oluşturur. Tüm beyin ve omurilik tümörlerinin yaklaşık %30'unu ve bunların malign alt grubunun %80'ini gliomalar oluşturur (Ostrom vd., 2022). Gliomalar arasında en agresif ve ölümcül formu ise glioblastoma multiforme olarak tanımlanır. GBM, tüm primer beyin tümörlerinin yaklaşık %15'ini ve malign gliomaların %45-50'sini oluşturur (Thakkar vd., 2014).

GBM'nin insidansı yıllık 3–5/100.000 kişi olarak bildirilmiştir ve genellikle 45 yaş üzerindeki erişkinlerde daha sık rastlanır. Erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 1,6 kat daha sık izlenir ve beyaz ırkta diğer etnik gruplara göre daha yaygındır. Erken çocukluk ve çocukluk çağında görülmesi çok nadirdir ve bu yaş grubunda farklı moleküler alt tiplerle seyreder (Ostrom vd., 2022).

Klinik seyri son derece hızlı olan GBM, tanıdan itibaren ortalama 14–16 ay medyan sağkalım ile karakterizedir ve beş yıllık sağkalım oranı %5'in altındadır (Reihanian vd., 2024). Bu kötü prognozun en büyük sebepleri arasında tümörün hızlı proliferatif özelliği, yaygın infiltratif büyüme paterni ve mevcut tedavilere karşı gelişen direnç mekanizmaları yer alır. GBM çoğunlukla serebral hemisferlerde, özellikle frontal ve temporal loblarda lokalize olur (Şekil 1.1). Lezyonlar genellikle yaygın ve geniş ödemle çevrilidir ve kontrast tutulum gösterir (Omuro ve DeAngelis, 2013).



Şekil 1.1. GBM tümörlerinin oluşumu ve mikroçevresi. GBM tümörleri genellikle frontal lob, temporal lob ve serebellumda teşhis edilir (Chinot vd., 2014; Teraiya vd., 2023)

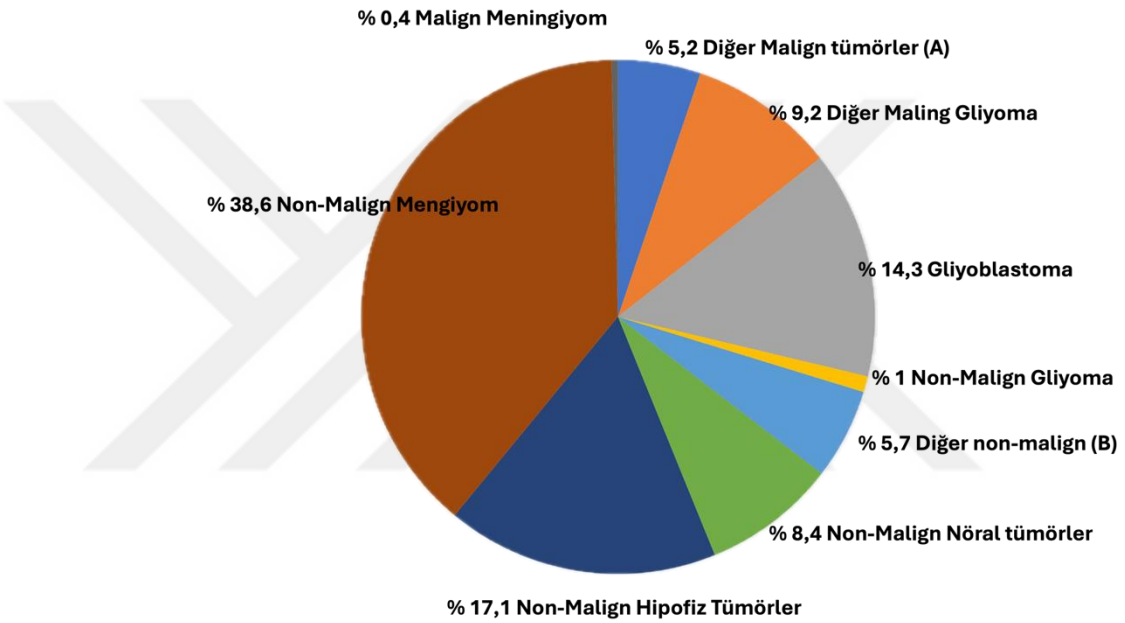
Semptomatolojisi tümörün lokalizasyonuna bağlı olarak değişmekle birlikte; baş ağrısı, epileptik nöbet, nörolojik defisitler, kişilik değişiklikleri ve bilişsel bozukluklar en sık gözlenen klinik bulgulardır. Nörolojik belirtiler, genellikle tümörün çevresindeki ödem ve kitle etkisine bağlı olarak ortaya çıkar. Bu nedenle, semptomlar hızlı bir şekilde ilerler ve hastaların yaşam kalitesini ciddi şekilde düşürür (Reithmeier vd., 2003).

Tanı genellikle kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme ile konur. Tipik olarak merkezi nekroz, periferik halkasal kontrast tutulum ve çevresel ödem gibi klasik bulgular izlenir. Kesin tanı ise stereotaktik biyopsi veya cerrahi rezeksiyon sonrası elde edilen doku örneğinin histopatolojik ve moleküler incelemesiyle sağlanır (Louis vd., 2016).

1.1.2. WHO Sınıflamasında GBM ve Moleküler Alt Tipleri

GBM, Dünya Sağlık Örgütü tarafından "Grade IV" diffüz gliom olarak sınıflandırılmaktadır. WHO'nun 2016 yılında yaptığı moleküler temelli yeni tümör sınıflaması, sadece histopatolojik bulgulara ile değil aynı zamanda moleküler profillere de dayanarak daha kesin tanı ve prognoz tahminleri yapılabilmesini mümkün kılmıştır (Şekil 1.2). Bu sınıflandırma, 2021 yılında güncellenmiş ve özellikle gliomların IDH mutasyon durumu ve 1p/19q kodensasyonu gibi moleküler parametrik bilgiler doğrultusunda yeniden tanımlanmasına öncülük etmiştir (Louis vd., 2016).

Bu yeni sınıflandırmaya göre, glioblastoma tanısı alabilmesi için tümörün IDH wild-type (vahşi tip) olması gerekir. IDH-mutant olan Grade IV gliomlar artık "IDH-mutant astrositom, Grade 4" olarak isimlendirilmektedir. Yani GBM terimi artık yalnızca IDH wild-type olan, histolojik olarak mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz bulunduran tümörlerle sınırlıdır. Bunlarla birlikte, EGFR gen amplifikasyonu, kromozomal +7/−10 eşlik eden değişiklikler ve TERT promotör mutasyonu gibi moleküler bulgular da IDH-wild type gliomların, histopatolojik olarak Grade IV özellik göstermese bile, otomatik olarak "GBM" olarak sınıflandırılmasına sebep olur (Sejda vd., 2022).



Şekil 1.2. Davranışa göre birincil beyin ve diğer MSS tümörlerinin dağılımı (Teraiya vd., 2023)

Bu moleküler yeniden sınıflandırma, GBM'nin prognozunu daha iyi öngörmemize ve tedaviye yön vermemize kolaylık sağlar. Örneğin, TERT promotor mutasyonu, MGMT metilasyon durumu, TP53 mutasyonu ve ATRX kaybı, prognozu, tümör biyolojisini ve tedaviye olan yanıtını etkileyen önemli paramattereler arasındadır. MGMT promotor metilasyonu, temozolomid tedavisine yanıtla doğrudan ilişkili bir prediktif biyomarkerdir ve hastaların kemoterapiye vereceği cevabı belirlemede kullanılmaktadır (Hegi vd., 2005).

GBM'nin moleküler alt tipleri, The Cancer Genome Atlas (TCGA) konsorsiyumu tarafından yapılan kapsamlı değerlendirme ve analizlerle dört ana transkriptomik alt gruba ayrılmıştır: Classical, Mesenchymal, Proneural ve Neural. Bu sınıflandırma, tümörlerin transkripto profiline dayanır. Klasik tip sıklıkla EGFR amplifikasyonu ve p16INK4a

(CDKN2A) delesyonu ile karakterize edilirken, Mezenkilmal tip NF1 mutasyonu ve yüksek bağışıklık hücresi infiltrasyonu ile tanımlanır. Pronöral alt tip ise PDGFRA amplifikasyonu ve IDH1 mutasyonu gibi özellikler ile tanımlanmaktadır (Verhaak vd., 2010).

Bu alt tiplerin klinik olarak önemi çok büyüktür. Mezenkimal tipin prognozunun daha kötü olduğu, Pronöral tipin ise genellikle daha genç hastalarda görüldüğü ve daha iyi seyirli olabildiği gösterilmiştir. Ancak bu moleküler alt tiplerin tedavi yanıtlarını belirlemede klinik pratiğe tam olarak entegre edilmesi halen sınırlı düzeydedir (Omuro ve DeAngelis, 2013; Stupp vd., 2005).

Sonuç olarak, WHO'nun moleküler temelli sınıflaması ve transkriptomik/genomik alt grup tanımlamaları, GBM'nin biyolojik çeşitliliğini daha iyi anlamamıza yardımcı olmakla birlikte kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri için sağlam bir temel sunmaktadır.

1.1.3. GBM Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar ve Sınırlılıkları

GBM, mevcut tedavi stratejilerine rağmen yüksek mortalite oranı ve hızlı progresyon ile seyreden en agresif primer beyin tümörlerinden biridir. Günümüzde GBM tedavisinde uygulanan standart yaklaşım, cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ve alkilleyici ajan olan TMZ ve benzeri kemoterapik ajanların kombinasyonudur (Stupp vd., 2005).

Cerrahi girişim GBM tedavisinin en önemli yaklaşımlarından biridir; ancak tümörün invaziv özelliği nedeniyle tam rezeksiyon çoğu zaman mümkün değildir. Tümör hücreleri sağlıklı beyin dokusu içine mikroskopik düzeyde infiltrasyon gösterdiğinden, cerrahi müdahale sonrasında bile rezidüel hücrelerin kalması ve hızlı bir şekilde nüks kaçınılmaz hale gelir (Sanai vd., 2011). Radyoterapi ile tümör hücrelerinin azaltılması amaçlanırken, radyasyonun çevre sağlıklı dokulara da zarar verebilmesi gibi yan etkileri ciddi riskidir. Temozolomid ise DNA'daki guanin bazının O6 pozisyonuna metil grubu ekleyerek sitotoksik etki gösterir; ancak bu etkinin MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) enzimi tarafından tamir edilebilmesi, ilaca karşı kazanılmış ya da doğuştan gelen direnç mekanizmalarının gelişerek terapi yönütle zorluklara neden olmaktadır (Hegi vd., 2005).

Son yıllarda, gen tedavisi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler gibi yeni nesil yaklaşımlar ortaya çıksa da, bu tedavilerin klinik başarı oranları GBM için hala sınırlı kalmıştır. Kontrol noktassı inhibitörleri, PD-1/PD-L1 sürecini hedefleyerek immün sistemi

aktive etmeyi amaçlasa da, GBM'nin immünca "soğuk" bir tümör olarak kabul edilmesi ve tümör mikroçevresinin baskılayıcı özellik taşıması bu tür tedavilerin etkinliğini azaltmaktadır (M. Lim vd., 2018). Aynı şekilde, anti-VEGF ajanı bevacizumab gibi anti-anjiyojenik terapiler, semptomları geçici olarak hafifletse de genel olarak sağkalıma anlamlı bir katkı sağlayamamaktadır (Chinot vd., 2014).

Benzer şekilde moleküler hedeflere yönelik ajanlar da umut verici olmakla birlikte, klonal çeşitlilik ve tümör heterojenitesi aynı şekilde bu tedavilerin etkinliğini sınırlandırmaktadır. IDH mutasyonları, EGFR amplifikasyonları ve PTEN kayıpları gibi moleküler değişikliklerin tedaviye yön vermesi beklenirken, bu biyobelirteçlerin klinikte rutin kullanılabilirliği de hala bir netlik kazanmamıştır. Bunun yanısıra kan-beyin bariyerinin seçici geçirgenliği, birçok potansiyel terapötik ajanın tümöre ulaşmasını da engellemektedir (Arvanitis vd., 2019).

Yukarıda bahsettiğimiz bütün bu tedavi zorulukları, GBM tedavisinde tek bir hedefe yönelik yaklaşımların yeterli olmadığını göstermektedir. Gelecekte başarıya ulaşabilecek tedavi protokollerinin, tümör biyolojisinin mekânsal ve hücresel heterojenliğini hesaba katan, çok katmanlı ve kişiselleştirilmiş stratejilere dayanması gerektiği ortadadır.

1.1.4. Tedavi Sonrası Nüks ve Rezistans Mekanizmaları

GBM, konvensiyonel tedaviye yanıt verse dahi neredeyse tüm olgularda kısa sürede nüks eden, tedaviye yüksek derecede dirençli bir tümör çeşididir. Standart tedavi protokolüyle (cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve ilaç kombinasyonu) hastalarda ilk başlarda kısmi bir tümör yanıtı görülse dahi, çoğu vakada tedaviden sonraki 6–9 ay içerisinde tümör yeniden nüks ederek ortaya çıkar. Bu yüksek nüks oranı, GBM'nin moleküler ve hücresel heterojenitesinin yanı sıra, çeşitli adaptif direnç mekanizmalarıyla da ilişkilidir (Weller vd., 2013).

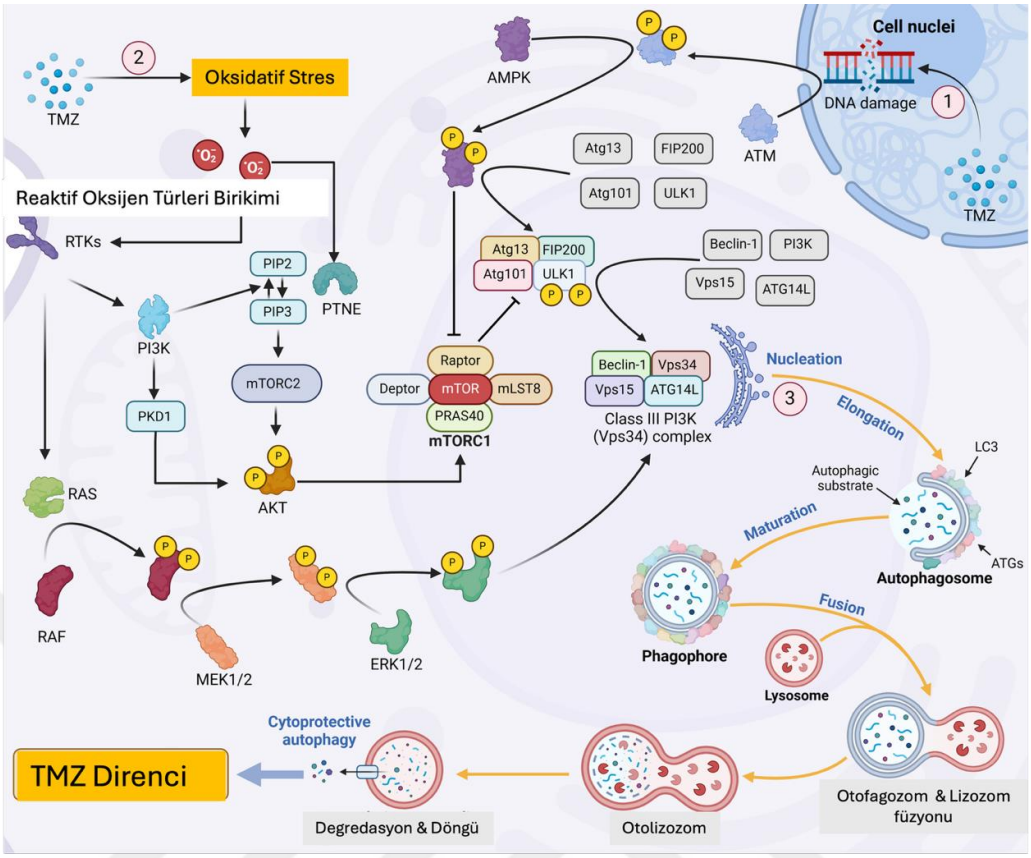
Rezidüel yani geriye kalan tümör hücreleri özellikle hipoksik bölgelerde veya kan beyin bariyerine yakın bölglerde daha çok bulunur. Bu hücreler düşük oksijen koşullarına uyum sağlamak için HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor-1α) aracılığıyla metabolik olarak yeniden programlama dediğimiz biyolojik sürece gider ve glikoliz temelli bir enerji üretimine yönelir. Bu durum hem proliferatif etkinliğini korur hem de kemoterapiye karşı bir tür direnç gelişimi olarak da kabul edilmekteidir. Hipoksik bir mikroçevre, anti-apoptotik süreçte rol alan

genlerin ifadelerini artırarak TMZ'nin DNA hasarına sebep olan etkisini azaltır (Doktorova vd., 2015).

Temozolomid antikanser ajanına ait gelişen direncin en önemli moleküler belirleyicilerinden biri O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) enzimidir. Bu enzim, TMZ ajanı tarafından meydana gelen O6-methylguanine hasarını tamir ederek ilacın sitotoksik etkisini azaltır ya da tamamen ortadan kaldırır. Bu enzime ait genin promotor bölgesinde meydana gelen metilasyonu, gen ifadesi susturduğu durumda TMZ'ye olan duyarlılık artarken; metilasyonun hiç olmadığı olgularda ise direnç gözlendiği belirtilmiştir (Hegi vd., 2005). Bununla birlikte, MGMT dışındaki DNA onarım (base excision repair, mismatch repair gibi) mekanizmaların aktivasyonu da kempterapik ajana karşı ek bir koruma sağlar (Capper vd., 2018).

GBM'nin cerrahi yaklaşımı sınrasında meydana gelen nüksünde önemli rol oynayan bir diğer etken ise, kanser kök hücreleri (cancer stem-like cells, CSCs) olarak bilinen dirençli tümör hücre popülasyonlarıdır. Bu hücreler, farklılaşma, kendini yenileme ve tümör yeniden oluşturma (nüks) yeteneğine sahiptirler. CD44 ve CD133 gibi proteinlerce zengin ve bu proteinler pozitif hücrelerin özellikle radyoterapi ve TMZ kemoterapik ajanına karşı yüksek direnç gösterdiği ve nüks eden yeni tümörlerde de bu popülasyonların daha baskın hale geldiği gösterilmiştir (Bao vd., 2006). CSC'ler DNA onarım mekanizmalarını güçlendirerek radyasyonun neden olduğu DNA çift zincir kırıklarını tamir edebilir ve apoptotik sinyalleri baskılayabilir (Şekil 1.3). Ayrıca, bu hücrelerin tümör çevresindeki hücreler ile yani mikroçevresi ile olan etkileşimi immun çevre ve diğer mekanizmalarla etkileşim gösteren direnç mekanizmalarında meydana gelen direnç artışını daha da pekiştirir (Abad vd., 2020).

Tümörde meydana gelen epigenetik değişiklikler de GBM nüksünde önemli rolü olan etkenlerden biridir. Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu, ve kodlama yapmayan RNA'lar, terapik yaklaşımlara adaptasyonu kolaylaştıran gen ifade değişikliklerine sebep olduğu belirtilmiştir (Shahani vd., 2025).



Şekil 1.3. TMZ direncinin gelişiminde rol alan yolakları özetleyen görsel (Li vd., 2025)

Yukarıda bahsedilen bütün bu direnç mekanizmaları düşünüldüğünde, GBM hücreleri hem ilaçlara hem radyasyona karşı kompleks bir direnç mekanizması ile savunma geliştirir. Bu nedenle, GBM ve diğer tümörlerin terapi yaklaşımını ve nükse önleme çalışmalarını sadece tümör hücrelerine odaklanarak değil, aynı zamanda tümör mikroçevresini, immün yanıtı ve epigenetik yeniden programlamayı da göz önünde bulunduran kombine yaklaşım stratejilerine gerek duyulmaktadır.

1.1.5. GBM'nin Moleküler Patogenezi ve Genomik/Transkriptomik Profili

GBM tümörleri sadece histolojik olarak değil, aynı zamanda moleküler düzeyde de son derece karmaşık ve heterojen bir tümördür. GBM'nin patogenezinde yer alan moleküler değişiklikler, tümörün gelişimi, ilerlemesi, tedaviye direnci ve nüks potansiyeli üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle The Cancer Genome Atlas (TCGA) konsorsiyumu tarafından tamamlanan kapsamlı multi omik analizler sayesinde GBM'nin genetik ve epigenetik mimarisi büyük ölçüde aydınlatılmıştır (Brennan vd., 2013).

GBM, genellikle üç temel sinyal yolağının bozulmasıyla karakterize edilir: RTK/RAS/PI3K, p53 ve RB yolları. RTK (Tirozin Kinaz Reseptörü) aksında en sık görülen değişiklik EGFR geninde meydana gelen amplifikasyon ve mutasyonulardır. Özellikle EGFRvIII adlı ekzon-2 ila -7 silinmiş varyant, hücre dışı ligand bağlanmasına gereksinim duymadan sürekli aktif kalabilen bir izoformdur ve GBM'ye özgü bir yapıdır. Aynı zamanda PDGFRA ve MET gibi diğer RTK'larda da aktivasyon olduğu saptanmıştır (Gan vd., 2009).

PI3K/AKT/mTOR yolaağında ise PTEN tümör baskılayıcı geninin eksikliğine sık görülür. PTEN kaybı, hücrenin büyüme ve hayatta kalma sinyallerini düzenleyen AKT yolunun kontrolsüz bir şekilde aktive olmasına sebep olur. Bu aktivasyon ise, hücre proliferasyonunu artırırken apoptozun baskılanmasına yol açar. Öte yandan, PIK3CA ve PIK3R1 gibi PI3K alt ünitelerinde meydana gelen mutasyonlar da bu yolu etkileyen diğer önemli değişkenlerdendir (McLendon vd., 2008).

Bir başka sık görülen mutasyonlardan TP53 mutasyonları, özellikle IDH-mutant alt tiplerde çok sık görülürken, IDH wild-type olarak tanımlanan GBM'lerde daha az rastlanır. Bu mutasyonlar, DNA hasarına karşı gelişen yanıtının ve hücre döngüsü kontrolünün bozulmasına sebep olur. RB1 genindeki delesyonlar veya CDKN2A/B kayıpları ise hücre döngüsü düzenleyici mekanizmaların devre dışı kalmasına sebebiyet verir, bu da hücre proliferasyonunun kontrolsüz bir şekilde oluşmasına zemin hazırlar (Verhaak vd., 2010).

Genomik profillemede dikkat çeken bir diğer bulgu ise, IDH1/2 mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, genellikle genç hastalarda görülen sekonder GBM'lerde karşılaşılır ve prognoz açısından daha iyi bir belirteçtir. IDH mutasyonu, hücre metabolizmasını etkiler; 2-hidroksiglutarat üretiminde bir artışa neden olur ve epigenetik düzeyde değişikliklere yol açar. IDH-mutant GBM'ler, genellikle G-CIMP (CpG adcıkları) pozitif olarak tanımlanır ve geniş çaplı DNA metilasyonu ile karakterize edilir (Yan vd., 2009).

1.2. Kanser Kök Hücreleri ve Glioblastomada Rolü

1.2.1. Kanser Kök Hücre Teorisi ve Temel Özellikleri

Kanser kök hücreleri (Cancer Stem Cells, CSC), tümör içindeki sınırlı sayıda hücreden oluşan ve kendini yenileme, farklı hücre tiplerine dönüşebilme ve tümör oluşturma potansiyeline sahip özel bir hücre alt popülasyonu olarak tanımlanır. CSC hipotezi, kanserin

heterojen yapısının, belirli bir "kök" hücre grubunun kontrolünde geliştiğini ve tümörün büyümesi ile birlikte nüksünden temelde bu hücrelerin sorumlu olduğunu öne sürer. Bu hücre popülasyonlarının, normal doku kök hücrelerine benzer şekilde asimetrik bir şekilde bölünme yetenekleri vardır; bir yandan kendilerini yenilerken, öte yandan farklılaşmış tümör hücrelerini üretirler (Clarke vd., 2006).

CSC'lerin en temel özellikleri arasında uzun süreler boyunca kendini yenileme kapasitesi, farklılaşma potansiyeli, yüksek tümör başlatma yeteneği ve klasik tedavilere karşı direnç yer alır. Bu hücreler genellikle quiescent (durağan) fazda bulunur ve bu da onları kemoterapi ve radyoterapi gibi hücre bölünmesinin hedeflendiği terapi yöntemlerine karşı daha dayanıklı kılar. Bunun yanısıra, DNA tamir mekanizmalarının daha etkin çalışması ve anti-apoptotik yolak sinyallerin güçlü olması, hayatta kalma becerilerinin daha fazla olmasını sağlar (Dean vd., 2005).

CSC'lerin belirlenerek tespit edilmesi ve tanımlanması, yüzey belirteçlerinin varlığı ile mümkün olmaktadır. Farklı tümör tiplerinde farklı CSC belirteçleri tanımlanmıştır. Örneğin, akut miyeloid lösemide $CD34^{+}CD38^{-}$ hücreler, meme kanserinde $CD44^{+}CD24^{-}$ fenotipi CSC'leri temsil ederken; glioblastoma özelinde CD133 (Prominin-1) yüzey proteini, en yaygın kullanılan kanser kök hücre belirteçlerindendir. CD133 pozitif glioma hücrelerinin *in vivo* koşullarda daha yüksek tümör oluşturma kapasitesine sahip olduğu ve radyoterapiye karşı belirgin direnç gösterdiği bildirilmiştir (Singh vd., 2004).

CSC'lerin bütün bu hücresel özelliklerinin yanısıra tümör mikroçevresiyle kurduğu etkileşimler, onların fenotipini ve tedaviye yanıtlarını doğrudan etkilemektedir. Örneğin, hipoksi, CSC'lerin kök hücre özelliklerini koruması için önemli bir çevresel faktördür. Hipoksi altında HIF-1α ve Notch sinyal yolaklarının aktive olması, bu hücrelerin pluripotensini idame ettirmesini sağlar. Ayrıca, bütün bu çevresel faktörler CSC'lerin epigenetik yeniden programlama sürecini de tetikleyebilir; bu da fenotipik plastisiteyi artırır ve farklı koşullara uyum sağlama yeteneğini arttırır (Soeda vd., 2009).

CSC teorisinin en etkileyici yönlerinden biri de, standart tedaviler çoğunlukla farklılaşmış ve hızlı bölünen tümör hücrelerini hedef alırken, CSC'lerin çoğunlukla bu klasik terapi yöntemlerinden etkilenmeden kalabilmesidir. Bu durum, tedaviye rağmen tümörün tekrar tekrar büyümesine ve çoğalmasına zemin hazırlar. Dolayısıyla, CSC'lere özgü

hedefleme stratejileri geliştirilmedikçe GBM gibi invaziv özellik gösteren letal yeteğini yüksek tümörlerde uzun süreli tedavi başarısı elde edilmesinin güç olduğu görülmektedir.

1.2.2. GBM'de CD133+ Kanser Kök Hücrelerinin Önemi

GBM, yoğun hücresel heterojenite ve tedaviye karşı dirençle karakterize edilen son derece agresif bir beyin tümörüdür. Bu direnç ve heterojenitenin en temel nedenlerinden biri, tümör içinde yer alan küçük ama etkili bir hücre popülasyonu olan kanser kök hücreleri olarak tanımlanmaktadır. GBM bağlamında, bu hücrelerin tespitinde en yaygın kullanılan yüzey belirteci CD133 (Prominin-1) olup, bu hücreler genellikle "$CD133^+$ glioma stem-like cells" olarak adlandırılmaktadır (S.K. Singh vd., 2004).

$CD133^+$ hücre popülasyonlarının varlığı; tümörün başlatılması ve sürdürülebilirliği, tedavi sonrası nüks ve terapiye karşı direnç gibi birçok kritik süreci yönlendiren temel faktörlerden biri olarak görülmektedir. $CD133^+$ tümör hücreleri, *in vivo* koşullarda sadece birkaç yüz hücre ile tümör oluşturma yeteneğine sahiptir; buna karşın $CD133^-$ hücrelerin bu kapasitesi belirgin bir şekilde daha düşüktür ve daha yüksek sayıda hücre ile tümör oluşturma yeteneği gösterirler (Bao vd., 2006; S.K. Singh vd., 2004). Bu durum, $CD133^+$ alt popülasyonun tümör başlatıcı kapasitesini doğrudan ortaya koymaktadır.

Bu CSC özelliği gösteren tümör hücre popülasyonlarının önemi yalnızca tümör başlatma yetenekleri ile sınırlı değildir; aynı zamanda radyoterapi ve kemoterapiye karşı belirgin direnç göstermeleri, GBM tedavisindeki başarısızlığın ya yetersizliğin başlıca nedenlerinden biri olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle literatür ve klinik bilgilere dayalı olarak TMZ tedavisine karşı gösterdikleri direnç, bu hücrelerde DNA tamir mekanizmalarının daha etkin bir şekilde çalışıyor olmasıyla ilişkilidir. $CD133^+$ hücreler, DNA çift zincir kırıklarını daha hızlı tamir edebilmekte ve apoptotik sinyalleri baskılayabilmektedir (Abad vd., 2020; Lathia vd., 2015). Ayrıca, bu hücre popülasyonları yüksek seviyelerde ABC taşıyıcı protein ekspresyonu sayesinde ilaçları hücre dışına aktif olarak atabilirler (H. Li vd., 2025; Teraiya vd., 2023).

$CD133^+$ hücrelerin hipoksik niş bölgelerde yoğunlaşması da dikkat çekici bir başka konudur. Hipoksik ortamda HIF-1α ve Notch gibi kök hücre yanıtlarını artıran yolaklar aktive olur ve $CD133^+$ hücrelerin kendini yenileme kapasitesi artar (Soeda vd., 2009a). Bu

mikroçevresel destek, tümör mikroekolojisiyle CSC'ler arasındaki güçlü etkileşimin bir göstergesidir.

Öte yandan, CD133 ifadesinin mutlak bir CSC belirteci olup olmadığı konusu halen tartışma konusudur. Bazı çalışmalar, $CD133^-$ hücrelerin de belirli koşullarda tümör oluşturabildiğini öne sürse de, $CD133^+$ hücrelerin genel olarak daha agresif fenotipler taşıdığı, kötü prognozla ilişkili olduğu ve nüks eden tümörlerde daha sık gözlendiği birçok çalışmayla desteklenmiştir (Beier vd., 2007). Bu nedenle CD133 yüzey belirteci, hem GBM biyolojisinin anlaşılması hem de hedefe yönelik tedavi stratejileri geliştirilmesi açısından önemli bir moleküler belirteçtir.

Bütün bu bilgiler ışığında, $CD133^+$ GBM hücreleri, tümörün agresif doğasını belirleyen ve tedavi sonrası nüksü kolaylaştıran temel hücresel aktörlerden biridr. Bu nedenle, gelecekteki tedavi yaklaşımlarında bu hücrelerin hedeflenmesi, GBM'nin yönetiminde dönüştürücü bir etkiye sahip olabilir.

1.2.3. CSC'lere Bağlı Direnç ve Tümör Yeniden Oluşumu

CSC'ler, sahip oldukları kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma yetenekleri sayesinde, tedavi süreçlerine rağmen hayatta kalabilen ve yeniden tümör kitleleri oluşturabilen hücrelerdir. Standart tedavi yöntemleri, çoğunlukla hızlı bölünen ve farklılaşmış tümör hücrelerini hedef alırken; çoğu zaman hücre döngüsünün durağan evresinde bulunan CSC'ler bu terapötik yaklaşımlardan etkilenmeden kalır. Bu yetenek, özellikle TMZ ve radyoterapi gibi hücre proliferasyonuna bağlı tedavilerin sınırlı başarısına açıklık getirmektedir (J. Chen vd., 2012).

CSC'lerin tedaviye dirençli olmasında birden fazla moleküler mekanizma rol oynadığı belirtilmiştir. Bu hücre popülasynlarında DNA hasar yanıt sistemleri daha etkin çalışmaktadır; örneğin ATM, Chk1/2 ve RAD51 gibi ilişkili proteinler yüksek düzeyde ifade gösterir (Bao vd., 2006). Böylece, DNA'ya verilen zarar hızlı şekilde onarılır ve hücreyi hücre ölümüne götüren sinyaller bloke edilir. Buna ek olarak CSC'ler, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltmak için ABC taşıyıcı pompalarını (özellikle ABCG2 ve ABCB1) aktif şekilde kullanarak kemoterapik ajanları hücre dışına atabilirler (Dean vd., 2005).

Epigenetik düzenleme de benzer şekilde CSC özelliği gösteren hücrelerin direnç potansiyelinde önemli rol oynar. Bu hücrelerdeki epigenetik reüglasyonlarla histon modifikasyonları ve mikroRNA'lar aracılığıyla apoptotik genler susturulabilirken, kök hücreliği sürdüren genler aktif tutulur. Özellikle miR-21, miR-10b gibi mikroRNA'lar bu süreçte ön plana çıkmaktadır. Aynı zamanda hipoksi, Notch ve Hedgehog gibi embriyonal gelişim yolları, bu hücrelerin pluripotent karakterini de korumasını sağlar (Charbit ve Lavon, 2024).

Tedavi sonrası yeniden tümör oluşumu çoğu zaman aynı lokalizasyonda ve daha invaziv fenotipte meydana gelmesi, CSC'lerin hayatta kalma başarısının yanısra, aynı zamanda daha agresif hücre klonları da geliştirebildiğini göstermektedir. Yapılan izleme çalışmalarında, tedavi öncesi $CD133^{+}$ hücre oranı düşük olan hastalarda dahi, nüks tümörlerde bu popülasyonun belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (Tamura vd., 2010). Bu durum, klasik teadavi yaklaşımlarının CSC'leri yeterince hedeflemediğini ve bu hücrelerin tümör yeniden yapılanmasında merkezi rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Bütün bunlar göz önüne alındığında, kanser kök hücreleri GBM'de dirençli bir tümör rezervuarı gibi işlev görmektedir. Bu hücreler tedaviden kaçmakla kalmayıp, aynı zamanda nüks tümörün kaynağını oluşturmaktadır. Bu nedenle gelecekte geliştirilecek tedavi protokollerinin, yalnızca tümör kütlesini değil, aynı zamanda bu dirençli hücre popülasyonunu da hedeflemesi zorunlu olduğu düşünülmektedir.

1.2.4. CSC Mikroçevresi ve Perivasküler Bölge Dinamikleri

CSC davranışı, sadece hücre içi moleküler programlara değil, aynı zamanda içinde bulundukları mikroskobik çevreye sıkı sıkıya bağlıdır. GBM gibi yüksek dereceli beyin tümörlerinde, bu mikronişler çoğunlukla perivasküler bölgeler olarak tanımlanır ve CSC'lerin korunması, çoğalması ve tedaviye direnç kazanması açısından kritik roller üstlenir (Calabrese vd., 2007).

Perivasküler mikroniş, CSC'leri çevreleyen damar endoteli, perisitler, astrositler, mikroglia ve ekstrasellüler matriks gibi dokuya özel bileşenlerden meydana gelir. Bu yapı, hem fiziksel bir destek hem de hücresel sinyaller açısından zengin bir ortam sunar. Özellikle endotel hücrelerinden salgılanan Notch ligandı (örneğin Jagged-1) ve "vascular endothelial growth factor (VEGF)" gibi faktörler, CSC'lerin kök hücre benzeri özelliklerini sürdürmesine

katkı sağlar. Notch sinyal yolunun aktif kalması, kendini yenileme kapasitesini ve tedaviye karşı dirençli fenotipi pekiştirir (Charles vd., 2011).

CSC'lerin bu bölgelerde konumlanmasının bir başka nedeni ise, perivasküler nişin hipoksik stresi tamponlayabilmesi ve nispeten daha iyi oksijenlenmiş alanlar sunmasıdır. Ancak ironik bir şekilde, tümör büyüdükçe damarların yapısı ve işlevselliği bozulur; mikronişler yeniden hipoksik hale gelir. Bu hipoksi, HIF-1α aracılığıyla CD133 ekspresyonunu artırır ve CSC'lerin daha invazif, göç edebilen alt popülasyonlara dönüşmesine neden olur (Z. Li vd., 2009).

Mikroniş aynı zamanda immün modülasyon açısından da stratejik bir konum sağlar. CSC'ler, perivasküler alanlarda lokal immün hücrelerin baskılanmasına aracılık eden TGF-β ve IL-10 gibi sitokinleri daha yoğun şekilde salgılayarak daha geniş bir alana yayılmasını sağlar ve immün kaçışı kolaylaştırır (Sipos ve Müzes, 2023). Mikroglia ve tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) arasındaki etkileşimler, M2 fenotipindeki immün hücrelerin aktivasyonunu teşvik ederek tümör destekleyici bir çevre oluşturur.

Perivasküler nişin bir diğer önemli özelliği de, BBB'ye olan yakınlığıdır. CSC'lerin bu bölgede yoğunlaşması, hem ilaçların bu hücrelere ulaşmasını zorlaştırır hem de vasküler nişten uzaklaştıklarında farklılaşmalarını tetikleyen sinyallerden uzak kalmalarını sağlar. Bu anlamda, niş yalnızca bir koruma kalkanı değil, aynı zamanda CSC güçlü tümörejenite özelliklerinin sürekliliği için bir "kimlik doğrulayıcı" olarak da işlev görür.

Sonuç olarak, CSC mikronişi ve özellikle perivasküler bölge, glioblastoma biyolojisinin anlaşılmasında merkezi bir yere sahiptir. Bu mikrosistem, hücrelerin fenotipini ve fonksiyonunu şekillendirmenin ötesinde, terapötik başarısızlığın ve tümör nüksünün de altında yatan temel nedenlerden biridir. Bu nedenle, sadece hücreyi değil, hücreyi şekillendiren çevreyi de hedef alan yaklaşımlar GBM tedavisinde yeni bir paradigma sunabilir.

1.2.5. GBM'de Kök Hücreleri Hedefleyen Terapiler

GBM, tedaviye dirençli kök hücre benzeri hücre popülasyonları içerdiğinden, standart terapötik yaklaşımlar genellikle tümör eliminasyonunda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda GBM'de tedavi başarısını daha etkin kılmak amacıyla kanser kök hücrelerini doğrudan hedefleyen stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yaklaşımlar, kök hücrelerin

kendini yenileme, farklılaşma ve hayatta kalma mekanizmalarını baskılayarak tümörün tekrarlama riskini azaltmayı hedeflemektedir (Lathia vd., 2015).

Bu terapilerden ilki, Notch, Hedgehog ve Wnt gibi embriyonal gelişim sinyal yolaklarının inhibisyonuna dayalıdır. CSC'ler, bu yolakların aktivitesine bağımlı olarak pluripotenslerini korur ve daimi hale getirir. Özellikle γ-sekretaz inhibitörleri gibi Notch yoluna müdahale eden moleküller, $CD133^{+}$ hücrelerin proliferasyonunu ve tümör başlatma kapasitesini azaltabilmektedir. Benzer şekilde, vismodegib gibi Hedgehog yolak inhibitörleri, glioma kök hücrelerinde kendini yenileme özelliğini baskılayarak tümöral gelişimi ve tümör yükünü gerilettiği belirtilmiştir (Fan vd., 2010).

Bir diğer önemli yaklaşım, CSC yüzey belirteçlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar veya CAR-T hücre tedavi yaklaşımlarıdır. Özellikle CD133 yüzey belirtecini hedefleyen antikorların, bu hücrelerin eliminasyonunda etkili olduğu çeşitli preklinik modellerde gösterilmiştir (Luksik vd., 2023). Bununla birlikte, CD133'ün normal kök hücrelerde de ifade ediliyor olması, seçicilik ve güvenlik açısından halen çözülmesi gereken problemler yaratmaktadır. Alternatif olarak, CD44, A2B5 ve L1CAM gibi diğer belirteçler üzerine de çalışmalar sürmektedir (Lathia vd., 2015).

Bir diğer yenilikçi strateji, farklılaşmayı indükleyici tedavilerdir. Bu yaklaşımda, CSC'lerin kök hücre fenotipinden çıkarak daha diferansiye ve dolayısıyla tedaviye daha duyarlı hale getirilmesi hedeflenir. All-trans retinoik asit (ATRA) gibi ajanlar bu amaçla test edilmiş ve bazı glioma modellerinde kök hücre özelliklerinin bastırılmasını sağlamıştır (Campos vd., 2010).

Ayrıca, epigenetik modülatörler de CSC hedefli tedavilerde ön plana çıkmaktadır. DNA metilasyon inhibitörleri veya histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, kök hücrelikle ilişkili genlerin ekspresyonunu yeniden programlayarak diferansiyasyonun teşvik edilmesine katkı sağlayabilir (Eyler ve Rich, 2008).

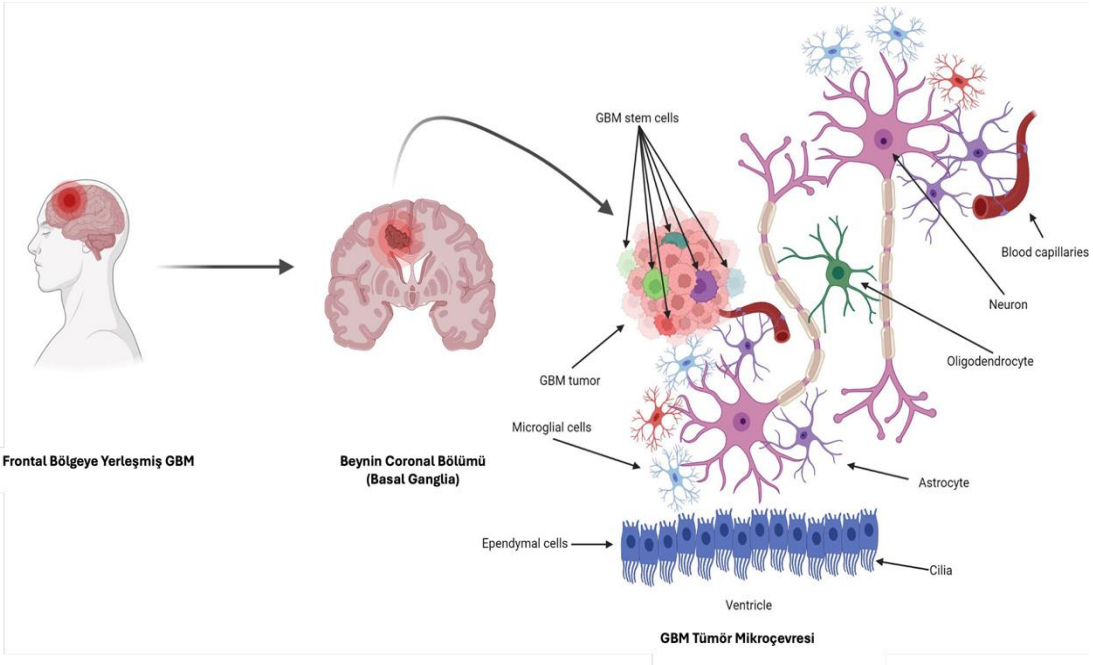
Bunların yanı sıra, kök hücrelerin bulunmuş olduğu mikroçevrenin hedeflenmesi de terapötik potansiyel taşımaktadır. Anti-anjiyojenik ajanlar veya TGF-β inhibitörleri gibi mikroçevre modülatörleri, CSC nişini destabilize ederek bu hücrelerin hayatta kalmasını ve yenilenmesini zorlaştırabilmektedir (Lathia vd., 2015).

1.3. Tümör Mikroçevresi ve GBM

1.3.1. TME Elemanları: Bağ Dokusu, Ekstraselüler Matriks, İmmün Hücreler

GBM, sadece tümör hücrelerinin bulunduğu bir çevre değil; aksine, tümörün ilerlemesinde ve tedaviye yanıtın şekillenmesinde belirleyici rol oynayan oldukça karmaşık bir TME içerisinde gelişir. TME, immün sistem bileşenlerinde bağ dokusu hücrelerine, vasküler yapılardan ekstrasellüler matrikse (ECM) kadar birçok hücresel ve hücre dışı unsurun dinamik etkileşiminden meydana gelir (Şekil 1.4). Bu karmaşık mikroekosistem, tümör hücreleriyle çift yönlü iletişim kurarak tümörün invazivliğini, direnç mekanizmalarını ve yeniden oluşma kapasitesini doğrudan etkiler (Quail ve Joyce, 2017).

Bu kompleks yapılardan bir tanesi olan bağ dokusu bileşenleri arasında özellikle tümörle ilişkili fibroblastlar (TAF) dikkat çeker. GBM her ne kadar beyin parankiminden kaynaklansa da, TAF-benzeri hücreler bu tümörlerde de saptanmış ve stromal yapılaşma, ECM 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 (H. He vd., 2025).



Şekil 1.4. Gliyoblastoma oluşumu ve mikroçevresi (Teraiya vd., 2023)

ECM, TME'nin hücre dışı temel bileşenlerinden biridir ve glioma hücreleri için hem fiziksel bir zemin hem de biyokimyasal sinyal kaynağı olarak işlev görür. GBM'de ECM bileşimi, normal beyinden önemli ölçüde farklıdır. Özellikle tenascin-C, fibronectin, brevican ve versican gibi glia hücresine spesifik ECM proteinlerinin aşırı ekspresyonu, hücre adezyonunun azalmasına, motilitenin artmasına ve kemoterapiye dirençli fenotipin gelişmesine neden olur. Ayrıca, ECM'in yapısal yoğunluğu ilaç penetrasyonunu da sınırlayarak tedavi etkinliğini azaltır (Marino vd., 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 TME'sinde baskın olarak yer alan hücreler arasında mikroglialar, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) ve sınırlı sayıda T hücresi bulunur (Hambardzumyan vd., 2015). TAM'lar 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 immünoterapilere daha zayıf bir yanıt verilmesiyle sonuçlarır (Mantovani vd., 2002).

TME'deki bu hücresel ve yapısal bileşenler, sadece pasif destek sunmakla kalmaz; aynı zamanda GBM'nin fenotipini şekillendiren aktif katılımcılardır. İmmün baskılanma, stromal aktivasyon ve ECM yeniden yapılanması gibi süreçler, tümörün evrimsel olarak avantajlı alt klonlarının seçilimini kolaylaştırır. Bu nedenle TME, hem hedeflenmesi gereken bir terapötik odak hem de tümör biyolojisini anlamada kritik bir parametredir (Quail ve Joyce, 2017).

1.3.2. GBM'de Mikrogliya, Makrofajlar ve Nöroenflamasyon

GBM, yalnızca malign tümör hücrelerinden ibaret olmayıp, tümör mikroçevresiyle sürekli etkileşim halinde olan karmaşık bir yapı sergiler. Bu mikroçevrenin en kritik immün hücrelerinden ikisi mikrogliya ve TAM'lardır ve bu hücreler tümör büyümesi, invazyon, anjiyogenez ve immün baskı mekanizmalarında merkezi roller üstlenir. GBM'de bu hücrelerin kollektif aktivitesi, aktif nöroenflamasyon ile kronik ve tümör destekleyici bir inflamatuar sürecin temelini oluşturur (Poon vd., 2017).

Mikrogliya, merkezi sinir sisteminin lokal immün hücreleri olarak görev yapar ve fizyolojik koşullarda beyin homeostazını korumakla görevlidirler. Ancak GBM gibi patolojik durumlarda, tümör hücrelerinden salınan kemokinler (örneğin: CCL2, CX3CL1) ve büyüme

faktörleri (örneğin: CSF-1, TGF-β), mikrogliyanın fenotipini değiştirerek tümör destekleyici bir yapıya evrilmesine neden olur. Bu aktivasyon çoğunlukla M2-benzeri polarizasyon ile karakterizedir; bu fenotipte mikrogliya, pro-immün yanıtları baskılar, hücre dışı matriks yıkımını kolaylaştırır ve anjiyogenezi teşvik eder (Hambardzumyan vd., 2015).

Makrofajlar, GBM mikroçevresinde mikrogliya ile birlikte en yoğun bulunan hücre gruplarından biridir. Kaynak olarak dolaşımdaki monositlerde n türeyerek beyin parankimine göç eden bu hücreler, tümör bölgesinde TGF-β, IL-10 ve VEGF gibi mediyatörler salarak hem immün baskı ortamını güçlendirir hem de yeni damar oluşumunu destekler. TAM'ların immün süpresif özellikleri, T hücresi infiltrasyonunun engellenmesine ve immünoterapilere karşı düşük yanıt oluşumuna yol açar (Pyonteck vd., 2013).

GBM'de meydana gelen nöroenflamasyon, klasik inflamasyondan farklı bir şekilde seyreder. Burada pro-inflamatuvar sitokinlerden ziyade anti-inflamatuvar ve tümör-promotör faktörlerin hakim olduğu bir denge söz konusudur. Bu mikroçevresel inflamasyon, T-hücrelerini etkisizleştirir, dendritik hücrelerin aktivasyonunu engeller ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin migrasyonunu sınırlar. Böylece, tümör immün kaçış mekanizmalarını daha kolay aktive eder (Bikfalvi vd., 2023).

Son yıllarda yapılan tek hücreli RNA dizileme ve uzaysal transkriptomik çalışmalar ile, mikrogliya ve TAM'ların sadece yüzey belirteçleriyle değil, fonksiyonel durumları ve lokalizasyonlarına göre farklı alt tiplere ayrılabileceğini göstermektedir. Özellikle perivasküler bölgelerde lokalize olan M2-TAM'ların, kök hücre benzeri glioma hücrelerini desteklediği, invazif sınırda bulunan mikrogliyanın ise tümör yayılımını kolaylaştırdığı ortaya konmuştur (Z. Chen vd., 2017).

Bütün bu yukarıda bahsedilen sebepler göz önüne alındığında GBM'de mikrogliya ve makrofajlara yönelik hedefleme stratejileri önemli bir çalışma alanı haline gelmektedir. CSF-1R inhibitörleri, TAM'ların tümör destekleyici fenotipten pro-inflamatuvar fenotipe dönüşmesini sağlayarak antitümör bağışıklığı artırma potansiyeli taşımaktadır. Bununla birlikte, bu hücrelerin yüksek plastisitesi, tedaviye adaptif direnç geliştirme olasılığını da beraberinde getirir.

Sonuç olarak, mikrogliya ve TAM'lar, GBM'nin evriminde yalnızca pasif destek hücreleri değil; aksine, tümörün agresifliğini besleyen ve bu süreçte aktif rol alan oyunculardır. Nöroenflamatuar ortamın kontrolü, GBM'ye karşı geliştirilecek yeni kuşak tedavi stratejileri, umut vaadeden yaklaşımlardan biri olduğunu düşündürmektedir.

1.3.3. Hipoksi, Asidoz ve TME'nin Dirençteki Rolü

GBM, yalnızca genetik ve epigenetik değişikliklerle değil, aynı zamanda içinde geliştiği mikroçevrenin sunduğu ekstrem fizyolojik koşullarla da şekillenen agresif bir tümördür. Özellikle hipoksi ve asidoz, tümör mikroçevresinin iki temel belirleyicileri olarak GBM'nin tedaviye direnç geliştirmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu mikroortam faktörleri, hem tümör hücrelerinin davranışlarını yeniden programlamakta hem de çevresel bağışıklık yanıtlarını baskılamaktadır (Vaupel ve Multhoff, 2021).

Hipoksi, GBM'de sıklıkla gözlenen bir biyokimyasal süreçtir. Hızla büyüyen tümör kitlesi, damar oluşumunu aşarak oksijen arzının azalmasına yol açar. Bu durum, hücre içinde hipoksiyle indüklenen faktörlerin (özellikle HIF-1α) stabilize olmasına neden olur. HIF-1α, oksijen seviyesindeki düşüşe karşı hücrenin adaptasyonunu sağlayan genleri aktive eder; bu genler arasında VEGF, GLUT1, PDK1 ve CA9 gibi anjiyogenez, glikolitik metabolizma ve asid & baz regülasyonunda rol alan moleküller yer alır. Bu adaptif yanıtlar, GBM hücrelerini kemoterapi ve radyoterapiye karşı daha dayanıklı hale getirir (Vaupel ve Multhoff, 2021).

Hipoksinin etkisi yalnızca metabolik değişimle sınırlı değildir; aynı zamanda kök hücre benzeri fenotipin korunması ve tümör invazivliğinin artmasıyla da doğrudan ilişkilidir. Örneğin, Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hipoksik bölgelerde $CD133^+$ hücrelerin sayısında artış gözlenmiş ve bu hücrelerin kendini yenileme kapasitesinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, hipoksi Notch, Wnt ve TGF-β sinyal yollarını da aktive ederek kök hücre ve EMT (epitelyal-mezenkimal geçiş) süreçlerini destekle (Z. Li vd., 2009).

Asidoz, hipoksinin dolaylı bir sonucu olarak gelişen bir diğer önemli TME özelliğidir. Yetersiz oksijen koşullarında glikoliz baskın enerji elde etme yolu haline gelir ve laktat üretimi artar. Biriken laktat molekülleri, tümör çevresinde pH'nın düşmesine neden olur. Bu asidik ortam, pek çok kemoterapi ajanının etkinliğini azaltır; çünkü ilaçların çoğu zayıf baz yapısında olup, düşük pH'da hücre içine difüze olamaz. Aynı zamanda asidoz, apoptoz sinyallerini baskılar ve stres adaptasyon mekanizmalarını aktive eder (Estrella vd., 2013).

TME'deki bu ekstrem koşullar, immün sistemin işlevselliğini de zayıflatır. Hipoksi, T hücrelerinin aktivasyonunu engelleyen moleküllerin (örneğin: PD-L1, IDO, TGF-β) ekspresyonunu artırırken; asidoz ise $CD8^+$ sitotoksik T hücrelerinin sitolitik fonksiyonlarını doğrudan baskılar. Böylece GBM, immün sistemin kontrolünden kaçarak ilerlemesini sürdürebilir (Chouaib vd., 2012).

Yukarıda bahsetdilen bu koşulların oluşturduğu dirençli tümör mikroçevresi, klasik tedavi yaklaşımlarının etkinliğini önemli ölçüde sınırlar. Bu nedenle son yıllarda HIF inhibitörleri, karbonik anhidraz (CAIX) blokerleri ve pH-düzenleyici taşıyıcı hedeflemeleri gibi TME'ye yönelik stratejiler yeni tedavi kombinasyonları olarak yer almaya başlamıştır.

1.3.4. TME'de Transkripsiyonel ve Epigenetik Değişiklikler

Gliyoblastomalar, moleküler kompleks yapısı yalnızca genomik mutasyonlarla değil, aynı zamanda transkripsiyonel yeniden programlama ve epigenetik düzenlemelerle şekillenen bir tümördür. Bu yeniden programlamanın önemli bir kısmı, tümörün geliştiği mikroçevre yani TME tarafından indüklenir. TME; hipoksi, inflamasyon, immün hücre etkileşimleri ve mekanik stres gibi çeşitli sinyaller aracılığıyla GBM hücrelerinde kalıcı veya geçici transkripsiyonel değişikliklere yol açar ve bu durum tümörün invazivliği, direnç potansiyeli ve heterojenliğini artırır (Lu vd., 2012).

Transkripsiyonel yeniden programlama, TME'deki moleküler sinyallerin hücre içi yolakları aktive etmesiyle başlar. Özellikle hipoksiye yanıt olarak HIF-1α ve HIF-2α gibi transkripsiyon faktörleri aktive olur ve hücrede anaerobik metabolizmaya geçiş, anjiyogenez ve kök hücre benzeri fenotipin korunması gibi süreçleri tetikleyen genlerin ifadesini artırır. Aynı şekilde TGF-β, IL-6 gibi sitokinler de STAT3 ve SMAD gibi transkripsiyon faktörleri üzerinden glioma hücrelerinin immün kaçış ve invazyon kapasitelerini artıracak transkripsiyonel süreçleri aktive eder (Lu vd., 2012).

Bununla birlikte, bu transkripsiyonel değişimlerin kalıcılığını ve hücre belleğini sağlayan en önemli mekanizma epigenetik düzenlemelerdir. GBM TME'sinde özellikle DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlama yapmayan RNA'lar yoluyla gen ifadelerini baskılanmakta veya artırımaktadır. Örneğin, MGMT gen promotör metilasyonu, TMZ tedavisine duyarlılığı artırırken, EZH2 gibi histon metiltransferazların aktivasyonu kök hücre benzeri özellikleri destekleyen genleri aktif tutar (Safa vd., 2015).

Mikroçevresel sinyaller, epigenetik enzimlerin regülasyonunu da etkiler. Hipoksi, örneğin, DNA metiltransferazların (DNMT) ve histon deasetilazların (HDAC) ekspresyonunu artırarak, diferansiyasyonla ilgili genlerin susturulmasına neden olabilir. Bu sayede GBM hücreleri daha esnek, daha dirençli bir fenotipe evrilir (Ul Aleí U-Paz vd., 2012).

Son dönemde yapılan uzaysal transkriptomik ve ATAC-seq gibi ileri tekniklerle, tümör dokusu içerisinde farklı lokasyonlarda bulunan hücrelerin transkripsiyonel ve epigenetik profillerinin belirgin şekilde değiştiği ortaya konmuştur. Özellikle tümör sınırındaki hücrelerin, çekirdek bölgede bulunan hücrelerden daha migrasyona yatkın ve inflamatuvar profilde olduğu; bu farklılaşmanın ise lokal mikroçevresel faktörlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Moncada vd., 2020).

Tüm bu veriler, GBM'nin tedaviye dirençli doğasının yalnızca genetik mutasyonlardan değil, aynı zamanda TME kaynaklı epigenetik baskılayıcı veya aktive edici sinyallerden beslendiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle epigenetik hedefli tedavi yaklaşımları (örneğin DNMT inhibitörleri, HDAC blokerleri veya bromodomain protein (BET) inhibitörleri), gelecekte TME'nin etkisini baskılayarak GBM tedavisinde dönüşüm yaratma potansiyeline sahiptir (Marei, 2025).

1.3.5. TME'yi Modüle Eden Tedavi Yaklaşımları

Bu beyin tümörleri, yalnızca genetik olarak anormal tümör hücrelerinden değil, aynı zamanda bu hücrelerin içinde büyüdüğü karmaşık bir mikroçevreden, yani TME'den oluşur. Bu mikroçevre, bağışıklık hücrelerinden endotelyal yapılara, stromal bileşenlerden metabolik sinyallere kadar çok sayıda aktörün etkileşimiyle şekillenir. Standart tedavi stratejilerinin büyük ölçüde tümör hücrelerine odaklanması, TME'nin sunduğu koruyucu yapının göz ardı edilmesine neden olmuş; bu da tedavi başarısızlıklarında önemli rol oynamıştır. GBM tedavisinde TME'yi modüle eden terapötik yaklaşımların önemli bir potansiyeli olduğu belirtilmektedir (Quail ve Joyce, 2017).

İmmün mikroçevrenin modülasyonu, şu anda en yaygın tümör terapi yaklaşımlarından biridir. GBM, genel olarak immün baskılayıcı bir ortam yaratır; T-hücrelerin aktivasyonu azalır, Treg'ler artar ve TAM'lar çoğunlukla M2-polarize fenotipte bulunur. Bu durumu tersine çevirmek amacıyla geliştirilen CSF-1R inhibitörleri, TAM'ların fenotipini M1-benzeri proinflamatuvar yapıya dönüştürerek tümör baskılanmasını teşvik eder (Pyonteck vd., 2013).

Ayrıca, immune checkpoint blokajı (ör. PD-1, CTLA-4 inhibitörleri), klasik olarak GBM'de sınırlı başarı gösterse de, TME'nin yeniden programlanmasıyla birlikte bu terapilere duyarlılığın artırılabileceği düşünülmektedir (Y. Liu vd., 2024).

Diğer yaklaşımlardan biri olan anjiyogenezin hedeflenmesi, TME'yi modüle eden bir başka stratejidir. GBM'de anormal damar yapısı, hipoksiyi artırarak hem tümör agresifliğini hem de tedaviye direnci tetikler. Anti-VEGF ajanları (örneğin bevacizumab), anjiyogenezi baskılayarak hipoksi-indüklenen direnç yollarını sekteye uğratabilir. Ancak bu ajanların tek başına kullanımı tümörün uzun vadeli kontrolünde yetersiz kalabildiğinden, kombine tedavi protokolleri geliştirilmektedir (Lu vd., 2012; Wick vd., 2017).

TME'nin epigenetik yapısının modülasyonu da son dönemde ilgi gören bir yaklaşımdır. Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), DNA metilasyon düzenleyicileri ve BET protein inhibitörleri gibi ajanlar, TME içerisindeki hücrelerin gen ekspresyon profilini yeniden düzenleyerek immün aktiviteyi artırabilir ve kök hücre benzeri tümör hücrelerinin bastırılmasına katkı sağlayabilir (Tehrani vd., 2025).

ECM yoğunluğunun azaltılması ve stromal yapının gevşetilmesi, ilaç penetrasyonunu artırmak ve hücre göçünü sınırlandırmak için öne çıkan başka bir modülasyon yaklaşımıdır. ECM parçalayabilen enzimatik ajanlar (örneğin. hyaluronidaz), tümör içi basıncı azaltarak kemoterapi ve nanoterapötiklein daha etkin şekilde tümöre ulaşmasını sağlayabilir (Heldin vd., 2004).

Son olarak, TME'yi hedefleyen yaklaşımlar arasında son zamanlarda oldukça popüler bir alan haline gelen nanoteknoloji tabanlı sistemler de yer alır. Özellikle pH-duyarlı, hipoksi-aktive veya immün mikroçevreye yanıt veren nanotaşıyıcılar geliştirilerek, TME'nin kendine özgü biyokimyasal ortamından yararlanılarak ilaçların hedefe özgü salımı sağlanabilmektedir. Böylece hem sistemik toksisite azaltılmış olur hem de terapötik etkinlik artar.

Bu çok katmanlı modülasyon stratejileri, tek başına hücreye değil; tümörün içinde geliştiği "ekosisteme" müdahale ederek GBM'nin tedaviye dirençli doğasına karşı yeni bir yaklaşım sunmaktadır. Gelecekte, bu modülasyonların kişiselleştirilmiş tedavi algoritmalarına entegre edilmesiyle daha etkin sonuçlara ulaşmak mümkün olabilir.

1.4. Temozolomid'in Klinik Kullanımı ve Moleküler Etkileri

1.4.1. TMZ'nin Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

Temozolomid, GBM ve anaplastik astrositom gibi yüksek dereceli gliomların tedavisinde yaygın olarak kullanılan, alkilleme ile etki gösteren bir kemoterapötiktir. Molekül yapısı itibariyle imidazotetrazin türevi olan TMZ, küçük, lipofilik ve non-enzimatik olarak aktifleşebilen bir ajandır. Bu özellikleri sayesinde kan-beyin bariyerini diğer birçok kemoterapik ajana göre daha etkin biçimde geçerek merkezi sinir sistemi tümörlerinde sistemik kemoterapi açısından büyük bir avantaj sağlar (Newlands vd., 1997).

Temozolomid'in kimyasal formülü $C_6H_6N_6O_2$ olup, yapısal stabilitesi fizyolojik pH'da kısa sürede bozulmaya meyillidir. Oral yolla alındığında, mide ve ince bağırsaktaki hafif asidik pH ortamında stabil kalabilen TMZ, kan dolaşımına geçtiğinde yaklaşık pH 7,4 olan fizyolojik koşullarda hızla dekarboksilasyona uğrayarak aktif alkilleyici formu olan methyltriazeno imidazole carboxamide (MTIC) bileşiğine dönüşür. Bu dönüşüm, karaciğer metabolizmasına yani karaciğerde gerçekleşecek bir biyotransformasyona ihtiyaç duymadan gerçekleşir; bu da TMZ'yi diğer alkilleyici ajanlardan ayıran önemli bir özelliktir. (Newlands vd., 1997).

MTIC, hücre içine girerek DNA üzerinde O6-metilguanin, N7-metilguanin ve N3-metiladenin gibi metilasyon hasarları oluşturur. Özellikle O6-metilguanin, TMZ'nin sitotoksik etkisinin merkezinde yer alır. Bu modifikasyon, DNA replikasyonu sırasında G yerine T ile eşleşerek yanlış baz eşleşmesine neden olur. Bu hatalı eşleşmeler, DNA tamir mekanizmaları tarafından fark edilip sürekli olarak onarılmaya çalışıldığında, hücre replikasyon stresine ve ardından apoptoza sürüklenir (Ostermann vd., 2004).

TMZ'nin etkinliği, büyük ölçüde hücredeki DNA onarım mekanizmalarının aktivasyonuna ve çalışma mekanizmasına bağlıdır. Özellikle MGMT enzimi, bu metil gruplarını ortadan kaldırarak TMZ'nin etkisini nötralize edebilir. Bu nedenle MGMT ekspresyonunun yüksek olduğu tümörlerde TMZ'ye karşı direnç gelişmesi sık görülür. Klinik pratikte, MGMT gen promotör bölgesinin metilasyon durumu, hastaların TMZ tedavisine vereceği yanıtı öngörmek için önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Hegi vd., 2005).

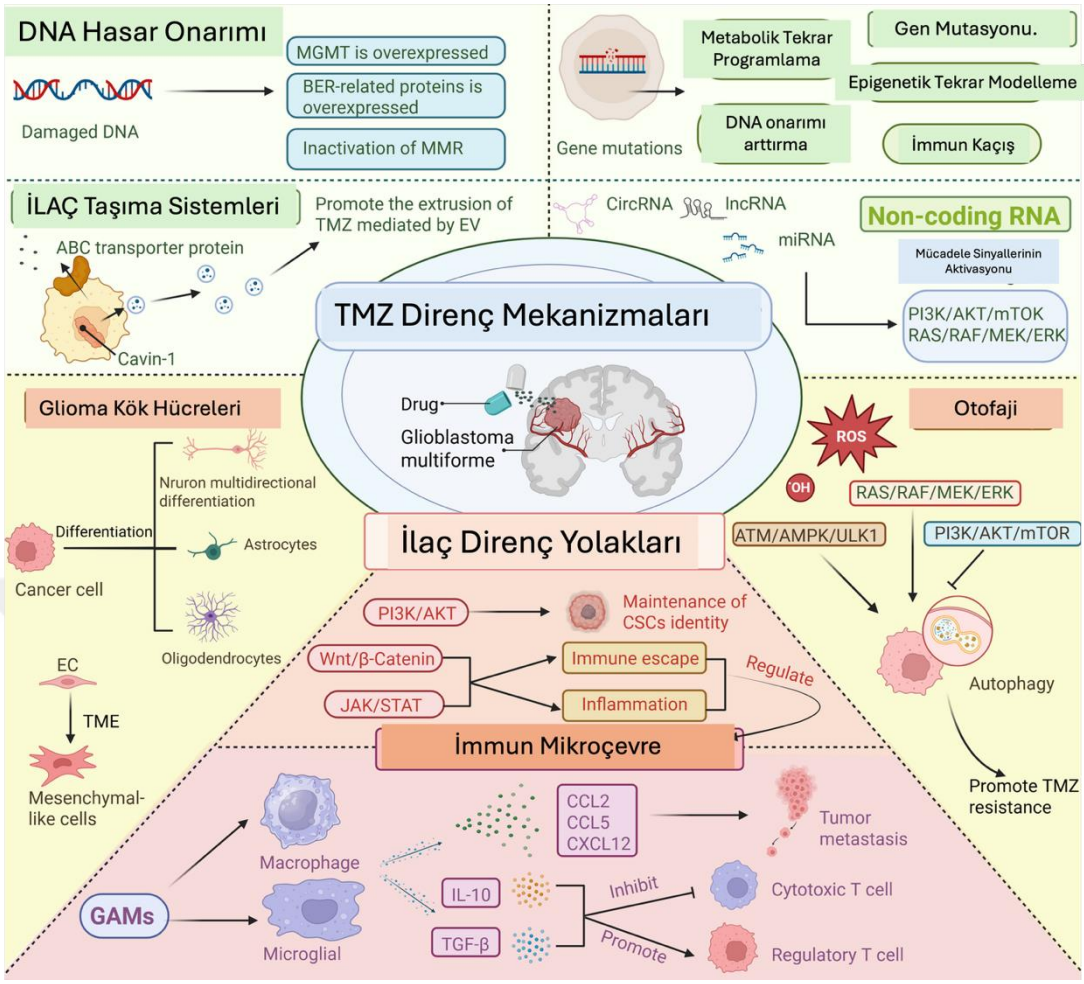
TMZ'nin etki mekanizması sadece DNA metilasyonu ile sınırlı değildir. Aynı zamanda oksidatif stres yanıtı, mitokondriyal disfonksiyon ve p53 aracılı hücre döngüsündeki etkileri gibi çeşitli hücresel yolları da tetikleyerek tümör hücresinin apoptozla yok edilmesine yol açar. Bununla birlikte, bazı glioblastoma hücrelerinin bu stres faktörlerine karşı geliştirdiği adaptasyon ile hayatta kalabildiği ve tedavi sonrası nükslerin temelinde bu dirençli alt popülasyonların yer aldığı düşünülmektedir (Zhan vd., 2012).

TMZ'nin yukarıda bahsedilen etkinlik mekanizmaları; biyokimyasal özellikleri, hedef DNA hasar mekanizmaları ve tümör hücresinin moleküler profili ile yakından ilişkilidir. Her ne kadar GBM tedavisinde ilk basamak ajan olarak kabul edilse de, ilaca karşı gelişen direnç mekanizmaları nedeniyle tek başına kullanımı sınırlı kalmakta, bu yüzden taşıyıcı sistemlerle veya diğer ajanlarla kombinasyon stratejileri giderek önem kazanmaktadır.

1.4.2. TMZ Direnç Mekizmaları

TMZ, glioblastoma multiforme tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olmasına rağmen, klinik başarı oranı maalesef ki sınırlıdır. Hastaların büyük bir kısmında, tedaviye başta yanıt alınsa dahi kısa sürede ilaca karşı direnç gelişmektedir. Bu direnç, hem doğal (intrinsik) hem de kazanılmış (adaptif) mekanizmalarla ilişkilidir ve genellikle DNA onarım sistemleri, hücresel stres yanıtları ve tümörün transkripsiyonel plastisitesi tarafından düzenlenir (Zhang vd., 2012).

TMZ'nin başlıca sitotoksik etkisi, DNA üzerinde O6-metilguanin hasarı oluşturmasıdır. Ancak hücre, bu hasarı onarabilecek mekanizmalara sahipse ya da bu yanıtı geliştirebilirse, ilacın etkinliği azalır. Direnç mekanizmalarının en iyi tanımlanmış olanı, MGMT enziminin aracılık ettiği DNA tamir yoludur (Şekil 1.5). MGMT, metil gruplarını doğrudan O6-pozisyonundaki guaninden kaldırarak hasarı tersine çevirir ve TMZ'nin öldürücü etkisini ortadan kaldırır. MGMT ifadesi, gen promotör bölgesindeki metilasyon durumu tarafından epigenetik olarak düzenlenir. Promotör metilasyonu, MGMT'nin transkripsiyonel susturulmasına yol açarak TMZ'ye duyarlılığı artırırken; metilasyonun olmaması, aktif MGMT üretimini sürdürür ve dirençle sonuçlanır (Hegi vd., 2005).



Şekil 1.5. GBM'de TMZ direnç mekanizmaları (H. Li vd., 2025)

TMZ direncinde ikinci önemli mekanizma, Mismatch Repair sistemindeki bozulmalardır. Normalde MMR sistemi, O6-metilguanin ve timin arasında yanlış baz eşleşmelerini tanıyarak DNA onarımını tetikler. Ancak MMR proteinlerinden biri olan MSH6'nın mutasyonu veya kaybı, bu hatalı eşleşmelerin tanınmasını engeller. Sonuç olarak, hücre TMZ kaynaklı hasarı algılamaz ve apoptoz yerine hayatta kalmayı başarır. Bu süreç, özellikle uzun süreli TMZ tedavisi sonrası gelişen sonradan kazanılmış direnç oluşumunda sıkça gözlemlenmiştir (Yip vd., 2009).

Bir diğer önemli direnç unsuru, p53 tümör baskılayıcı proteininin işlev kaybıdır. p53, DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü durduran ve apoptozu tetikleyen bir ana düzenleyicidir. Ancak GBM'de sıkça görülen TP53 mutasyonları, bu yanıtın bozulmasına yol açar. p53'ün inaktif hale gelmesi, TMZ'nin DNA hasarı yoluyla başlattığı apoptoz sinyallerini engeller ve hücrelerin proliferasyonuna devam etmesine olanak tanır (Yip vd., 2009).

Bunun yanında, TMZ direncinde "base excision repair – (BER)" gibi bazal DNA tamir yollarının ve "nükleotid eksizyon tamiri (NER)" sistemlerinin aşırı aktivasyonu da rol oynar. Bu mekanizmalar, TMZ'nin neden olduğu küçük DNA hasarlarını ortadan kaldırarak hücrelerin hayatta kalmasını kolaylaştırır. Ayrıca, TMZ tedavisi altında autofaji ve EMT gibi süreçlerin artması, hücrelerin metabolik esnekliğini artırarak dirençli fenotipin daha da artmasına katkı sağlar (Lefranc vd., 2005).

Tüm bu mekanizmaların ortak sonucu, TMZ'nin sitotoksik etkisinin azalması ve tümörün yeniden büyüme potansiyelinin korunmasıdır. Bu nedenle, güncel terapötik stratejiler genellikle MGMT inhibitörleri, MMR sistemi aktivatörleri veya p53 yolunu yeniden aktive eden ajanlar ile kombinasyon tedavilerini hedeflemektedir. Ayrıca, MGMT metilasyon durumu artık klinik pratikte yalnızca prognostik değil, aynı zamanda tedavi seçiminde belirleyici bir biyobelirteç olarak da kullanılmaktadır.

1.4.3. TMZ Kombinasyon Tedavileri: Klinik ve Preklinik Sonuçlar

TMZ ile GBM tedavisinde standardize edilmiş ilk basamak kemoterapötik ajan olmasına rağmen, tek başına kullanımı çoğu hastada uzun dönemli remisyon sağlayamamaktadır. Bu durum, TMZ'nin etkinliğini artırmak ve direnç gelişimini önlemek adına kombinasyon tedavilerine yönelimi gerektirmiştir. Gerek preklinik gerekse klinik düzeyde yürütülen çalışmalar, TMZ'nin farklı biyolojik hedeflere yönelik ajanlarla birlikte kullanımının terapötik sinerji yaratabileceğini ortaya koymuştur (N. Singh vd., 2021).

Preklinik düzeyde, TMZ çoğunlukla DNA onarımı, epigenetik düzenleme, hücre döngüsü kontrolü ve immün yanıt gibi temel tümör biyolojisi süreçlerini hedefleyen moleküllerle birlikte test edilmiştir. Örneğin, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) ile yapılan çalışmalar, TMZ'ye karşı duyarlılığın artırılabildiğini ve MGMT ekspresyonunun baskılanabileceğini göstermiştir (Tehrani vd., 2025). Benzer şekilde, PARP inhibitörleri, BER mekanizmasını bloke ederek TMZ kaynaklı DNA hasarının birikmesini sağlamakta ve tümör hücrelerinin apoptoza gitmesine sebep olmaktadır. Bu kombinasyonların hücre kültürü ve hayvan modellerinde yüksek etkinlik gösterdiği, özellikle MGMT metilasyon durumu negatif olan dirençli GBM hücrelerinde önem arz ettiği bildirilmiştir (Gueble vd., 2022).

Bir diğer strateji, immünoterapötik ajanlar ile TMZ'nin birlikte kullanımıdır. TMZ, bağışıklık sistemini baskılayıcı etkileri nedeniyle tek başına sınırlı bir immün yanıt oluştururken, PD-1 veya CTLA-4 inhibitörleri gibi kontrol noktası blokerleriyle birlikte uygulandığında, tümör mikroçevresindeki immün baskı kırılabilir. Bu yaklaşım özellikle "immün soğuk" GBM tümörlerini "immün sıcak" fenotipe dönüştürerek, immünoterapilere daha iyi yanıt alınmasını mümkün kılmaktadır (Reardon vd., 2016).

Klinik düzeyde, TMZ kombinasyonlarının etkinliği çeşitli faz I/II çalışmalarda klinik düzeyde değerlendirilmiştir. Örneğin, TMZ + bevacizumab (anti-VEGF monoklonal antikor) kombinasyonu, vaskülariteyi azaltarak TMZ'nin dokuya olan penetrasyonunu artırmakta; ancak uzun vadede tümör adaptasyonu ve alternatif anjiyogenik yolakların devreye girmesiyle sınırlı seviyede başarı sunmaktadır. Ayrıca, TMZ ile lapatinib (EGFR ve HER2 inhibitörü) gibi moleküllerin eşzamanlı kullanımı da preklinik düzeyde umut verici sonuçlar vermiş; ancak klinik uygulamada sınırlı oranda başarı sağlamıştır. Bu durum, kombinasyonlarda ilaç-ilaç etkileşimleri, toksisite ve farklı hasta profili gibi değişkenlerin dikkate alınması gerektiğini göstermektedir (Chinot vd., 2014).

Yeni nesil çalışmalar ise nanoformülasyonlar ve akıllı taşıyıcı sistemlerle TMZ'nin kombinasyonunu içermektedir. pH-duyarlı lipozomlar, polimerik nanoparçacıklar ve hedefe yönelik ligand taşıyıcıları ile TMZ ve ikinci ajan aynı anda tümöre iletilebilmekte, böylece terapötik pencere genişletilmekte ve sistemik toksisite azaltılmaktadır (K. Wang vd., 2025).

Bütün bu bilgiler TMZ kombinasyon tedavileri hem preklinik hem klinik alanda önemli bir stratejik dönüşüm yaratma potansiyelini göstermektedir. Ancak bu kombinasyonların başarılı olabilmesi için hasta seçiminin moleküler alt tiplere göre yapılması, tedavi sıralamasının doğru planlanması ve taşıyıcı sistemlerin optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır. Gelecekte daha kişiselleştirilmiş ve hedef odaklı kombinasyonlar, GBM tedavisinde gerçek ilerlemelerin kapısını aralayabilir.

1.4.4. TMZ'nin CSC'ler Üzerindeki Sınırlı Etkileri

Antikanser ilaçlardan temozalamidler gliyoblastoma multiform ttedavisinde standart kemoterapötik ajan olarak kabul edilse de, tedaviye yanıt alınan hastalarda dahi kısa sürede nüks görülmesi, tümörün belirli hücre alt popülasyonlarının bu tedaviye dirençli kaldığını düşündürmektedir. Bu alt popülasyonların başında, kendini yenileme kapasitesine ve tümör

oluşturma yeteneğine sahip CSC'ler gelmektedir. Özellikle $CD133^+$ glioma kök hücreleri, TMZ tedavisine karşı gösterdikleri yüksek direnç nedeniyle tedavi başarısızlığının ve tümör rekürensinin ana etkenlerinden biri olarak görülmektedir (Bao vd., 2006).

TMZ'nin hücre içi etki mekanizması, DNA alkilasyonu yoluyla hücresel hasar oluşturmaya dayanır. Ancak CSC'ler, bu hasara karşı çok daha etkin bir şekilde yanıt verebilen moleküler savunma mekanizmalarına sahiptir. Örneğin, GBM kök hücrelerinde DNA tamir sistemlerinin daha yüksek düzeyde gen ifadesi gösterdiği, ayrıca MGMT aktivitesinin de daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Bu durum, TMZ'nin hedeflediği O6-metilguanin hasarının hızla onarılmasına ve hücre ölümünün önlenmesine neden olmaktadır (G. Liu vd., 2006).

CSC'lerin TMZ'ye dirençli olmalarının bir diğer nedeni de hücre döngüsü dinamiklerinin farklılığıdır. TMZ, en etkin olarak proliferatif hücreler üzerinde etkilidir. Ancak CSC'ler genellikle G0 fazında yani durağan bir süreçte bulunur. Bu durum, onları kemoterapinin hedef alanı dışına çıkarır ve tedavi sonrasında hala canlı kalmalarına olanak tanır. Tedavi sonrasında bu hücreler, tekrar aktifleşerek yeni tümör oluşumuna sebebiyet verebilir (Lee, 2016; Zhang vd., 2012).

Ayrıca, glioma kök hücrelerinin anti-apoptotik protein ifaedleri de artmış durumdadır. Özellikle Bcl-2, Survivin ve Mcl-1 gibi proteinlerin yüksek düzeyde ifadeleri, TMZ'nin apoptoz başlatıcı etkisini baskılar. Bu moleküllerin yanı sıra, CSC'ler üzerinde etkili olan sinyal yolları (örneğin Notch, Hedgehog, Wnt/β-catenin gibi sinayl lyolakları) TMZ tarafından doğrudan hedeflenmediğinden, bu yolaklar aracılığıyla kök hücre benzeri fenotip korunmaktadır.

Son dönemde yapılan mekansal transkriptomik ve single-cell RNA-seq çalışmaları, tümörün farklı bölgelerinde yerleşik CSC alt tiplerinin, lokal mikroçevresel etmenlere bağlı olarak farklı direnç mekanizmaları sergileyebileceğini göstermiştir. Bu çeşitlilik, TMZ'nin etkinliğini sınırlayan bir başka faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Zhang vd., 2012).

1.5. Nanoteknoloji ve Nanotıpta Temel Kavramla

1.5.1. Nanopartikül Tipleri: Polimerik, Lipidik, Metalik, Karbon Bazlı

Nanoteknoloji, özellikle onkolojide ilaca özgü hedefleme, biyoyararlanımın artırılması ve toksisitenin azaltılması gibi potansiyelleriyle giderek daha fazla dikkat çeken bir alandır. Bu teknolojinin temel yapı taşlarından biri, boyutları genellikle 1–100 nm arasında değişen nanopartiküllerdir (Chang vd., 2015). Nanopartiküller, kimyasal yapılarına ve biyofiziksel özelliklerine göre farklı gruplara ayrılır ve her biri farklı biyomedikal uygulamalar için avantajlar sunar. Bu başlık altında, tez kapsamında kullanılan karbon bazlı nanopartikül sınıfı ele alınacaktır.

Karbon nanotüpler (CNT), grafen oksit, karbon noktalar (carbon dots) ve fullerene gibi yapılar, karbon bazlı nanopartiküller sınıfını oluşturur. Bu yapıların yüksek yüzey alanı, elektriksel iletkenlik ve fonksiyonelleştirilebilirliği, özellikle gen tedavisi, fotodinamik terapi ve ilaç taşıma gibi alanlarda kullanılmalarını mümkün kılar. Örneğin, karbon noktalar, hem görüntüleme hem de ilaç taşıma kapasitesine sahip olup, GBM gibi beyin tümörlerinde hedefli tedavi potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca, yüzey modifikasyonları sayesinde immün hücrelerle etkileşime girerek mikroçevre modülasyonuna da katkı sağlayabilirler (Lim vd., 2014).

1.5.2. Nanopartikül Özelliklerinin Biyo-dağılım Üzerine Etkisi

Nanopartiküller, biyolojik sistemlerle etkileşimleri sonucunda vücut içinde belirli dokulara veya hücrelere yönlenebilir, burada birikir veya sistemik dolaşımdan hızla elimine edilebilir. Bu özellikler, yalnızca yüklenen molekülün değil, aynı zamanda partikülün kendi fizikokimyasal özelliklerine doğrudan bağlıdır. Özellikle boyut, yüzey yükü, hidrofobiklik/hidrofilik denge, şekil ve yüzey modifikasyonları, nanopartiküllerin farmakokinetik davranışlarını, dokular arası dağılımını (biyo-dağılım) ve biyolojik bariyerleri geçme kapasitesini belirleyen temel faktörler arasında yer alır (Blanco vd., 2015).

Nanopartikül boyutu, biyo-dağılımı etkileyen en belirleyici parametrelerden biridir. Genellikle 10–100 nm aralığındaki partiküller, hem retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından hızla temizlenmez hem de pasif hedefleme yoluyla anormal damar geçirgenliği olan, örneğin GBM gibi tümör dokularına erişebilir. Bu özelliğe “enhanced permeability and retention” (EPR) etkisi denir. Ancak boyutun 200 nm’yi aşması durumunda karaciğer ve

dalakta hızlı birikim ve eliminasyon meydana gelirken, 10 nm'den küçük partiküller ise böbrek yoluyla hızla atılabilir (Cabral vd., 2011).

Nanopartiküllerin yüzey yükü, plazma proteinleriyle etkileşimini ve hücre zarlarıyla olan elektrostatik olarak bağlanma eğilimini belirler. Pozitif yüklü partiküller, negatif yüklü hücre membranlarıyla güçlü etkileşime girerek daha iyi internalizasyon sağlayabilir, ancak bu durum aynı zamanda negatif olarak toksisiteyi de artırabilir. Buna karşın, nötral veya hafif negatif yük taşıyan partiküller, daha uzun dolaşım süresi gösterir ve sistemik stabilite açısından avantaj sağlar. Ayrıca yüzeye polietilen glikol gibi polimerlerin eklenmesi, protein adsorpsiyonunu azaltarak ekstra bir etki yaratır ve RES tarafından tanınıp temizlenmelerini geciktirir (Owens ve Peppas, 2006).

Geleneksel küresel nanopartiküllerin dışında, son yıllarda çubuk, disk, sarmal gibi farklı geometrilere sahip yapılar geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin şekli, partikülün akışkan sistemlerdeki davranışını, damar dışına çıkma potansiyelini ve hücrelerle temas alanını etkiler. Örneğin, çubuk şeklindeki partiküller, bazı çalışmalarda daha uzun dolaşım süresi ve tümör akümülasyonu göstermiştir. Ancak bu avantaj şekil, boyut ve yüzey kaplamayla birlikte değerlendirildiğinde anlam kazanmaktadır (Owens ve Peppas, 2006).

Nanopartiküller, yüzeylerine eklenen ligandlar (örneğin antikor, aptamer, peptid) sayesinde belirli hücre yüzey reseptörlerine yönlendirilebilir. Bu strateji, aktif hedefleme olarak tanımlanır ve EPR etkisinin ötesinde spesifik hücre içi alımını artırır. GBM gibi heterojen tümörlerde, $CD133^{+}$ veya transferrin reseptör pozitif hücreler hedeflenerek, ilacın yalnızca hedef hücrelere ulaştırılması sağlanabilir (Zhao vd., 2024).

Nanopartiküller kan gibi vücut sıvılarıyla temas ettiğinde, yüzeylerine plazma proteinleri adsorbe olur ve bu yeni biyolojik tabaka, partikülün aslında gerçek yüzeyi haline gelir. Bu "biyokorona", hedefleme kapasitesini değiştirebilir, hücre tanıma mekanizmalarını etkileyebilir ve beklenmeyen biyo-dağılım paternlerine yol açabilir. Bu nedenle, *in vivo* koşullarda nanopartikül davranışı, yalnızca tasarım parametrelerine değil, aynı zamanda ortam koşullarına da bağlıdır (Monopoli vd., 2011).

1.5.3. Nanosistemlerin İlaç Taşıma ve Hedefleme Mekanizmaları

Nanomalzeme ile yapılan ilaç sistemleri, özellikle kanser tedavisinde ilaçların biyoyararlanımını artırmak, hedef dokuya yönlendirmek ve sistemik toksisiteyi azaltmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu sistemlerin başarısı, sadece taşıyıcı materyalin biyouyumluluğuna değil, aynı zamanda ilaç taşıma stratejilerine ve hedefleme mekanizmalarının etkinliğine de bağlıdır. Nanosistemler, genellikle taşıyıcı platformun üzerine yüklenen terapötik ajanların, biyolojik ortama verildikten sonra kontrollü salım, biyolojik bariyerleri aşma ve özgül hücre hedefleme yetenekleri doğrultusunda tasarlanır (Farokhzad ve Langer, 2009).

Nanosistemlerde ilaçlar çeşitli yollarla yüklenebilir. En yaygın yöntemler: Fiziksel kapsülleme (encapsulation): Hidrofobik ilaçlar genellikle polimerik veya lipidik çekirdeğin içine entegre edilir. Yüzey adsorpsiyonu: Pozitif-negatif yük etkileşimleri ile ilaçlar yüzeye bağlanabilir. Kovalent bağlama: Özellikle kontrollü salım istenen durumlarda, ilaçlar taşıyıcının yüzeyine kimyasal bağlarla bağlanabilir. Bu yöntem salım sürecini pH, enzim veya redoks durumu gibi çevresel faktörlere duyarlı hale getirerek akıllı ilaç salımı sağlar (Kamaly vd., 2016; Torchilin, 2014).

Kontrollü ve Uyarılabilir Salım

Nanosistemler pasif olarak veya çevresel sinyallere yanıt vererek yükledikleri ilacı salabilir. Örneğin:

- pH duyarlı sistemler, tümör mikroçevresinin asidik yapısını kullanarak, yalnızca hedef bölgede ilacın salınmasını sağlar.
- Redoks duyarlı sistemler, hücre içi yüksek glutatyon konsantrasyonuna yanıt vererek yüklerini sitozolde serbest bırakabilir.
- Enzim duyarlı partiküller, tümörle ilişkili proteazlar (ör. MMP'ler) tarafından parçalanarak ilaç salımını aktive eder (Kamaly vd., 2016; B. Wang vd., 2024).

Bu yaklaşımlar sayesinde ilaç, yalnızca hedef hücrede aktifleşir ve sağlıklı hücrelerde minimum toksisite oluşturur.

İlaçların doğru hücreye yönlendirilmesi, nanosistemlerin terapötik başarısını belirleyen en kritik aşamalardan biridir. Hedefleme stratejileri iki temel gruba ayrılır:

- 1. Pasif Hedefleme: Pasif hedefleme, nanopartiküllerin anatomik ve fizyolojik özellikler nedeniyle belirli dokularda birikmesini temel alır. Özellikle tümör dokularında anormal damar geçirgenliği ve zayıf lenfatik drenajın yol açtığı EPR etkisi, nanopartiküllerin tümör bölgesinde birikmesine olanak tanır. Ancak bu strateji her tümör için etkili değildir; GBM gibi bazı beyin tümörlerinde EPR etkisi heterojen olabilir (Kamaly vd., 2016; B. Wang vd., 2024).

2. Aktif hedefleme: Nanosistemin yüzeyine spesifik ligandların eklenmesiyle hedef hücre yüzeyindeki reseptörlere yönlenmesini sağlar. En yaygın kullanılan ligandlar şunlardır:

- Monoklonal antikorlar (örneğin anti-EGFR, anti-CD133)
- Peptidler (örneğin RGD, transferrin)
- Aptamerler ve folat gibi küçük moleküller

Aktif hedefleme sayesinde, özellikle $CD133^{+}$ glioma kök hücreleri gibi dirençli alt popülasyonlara yönelik yüksek özgüllük sağlanabilir.

Nanopartiküller, hedef hücreye bağlandıktan sonra genellikle reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınır. Ancak burada önemli bir engel, ilacın lizozomal degradasyona uğramadan sitozole geçişidir. Bu nedenle, bazı taşıyıcı sistemler endozomal kaçış sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. pH duyarlı polimerler veya proton süngeri etkisi (örneğin PEI içeren sistemler), bu aşamada partikülün lizozomdan kaçmasını sağlayarak etkinliği artırır (Kamaly vd., 2016; B. Wang vd., 2024).

Nanosistemlerin ilaç taşıma ve hedefleme başarısı, yalnızca yapısal optimizasyona değil, aynı zamanda biyolojik ortama uygun olarak programlanmış salım stratejilerine ve hücre düzeyindeki hedefleme mekanizmalarının doğruluğuna bağlıdır. Bu sistemler, özellikle GBM gibi tedaviye dirençli ve heterojen yapıya sahip tümörlerde hem terapötik hem de diagnostik araçlar olarak devrimsel potansiyel taşımaktadır (Kamaly vd., 2016; B. Wang vd., 2024).

.

1.5.4. Klinik Uygulamalarda Onaylanmış Nanoformülasyonlar

Nanoteknoloji tabanlı ilaç sistemleri, ilaçların farmakokinetik özelliklerini iyileştirme, biyoyararlanım artırma, toksisiteyi azaltma ve hedefli tedavi sağlama potansiyelleri sayesinde klinik onay alma yolunda önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Bugüne kadar, çeşitli kanser türlerinde FDA onayı almış çok sayıda nanoformülasyon örnekleri bulunmaktadır. Ancak glioblastoma multiforme gibi beyin tümörleri için bu alanda ilerleme görece daha sınırlı olmuştur (Krauss vd., 2019)

Klinikte Kullanılan Başlıca Onaylı Nanoformülasyonlar:

- Doxil (doksorubisin yüklü PEGile liposom): İlk FDA onaylı nanoliposomal kemoterapi ilacıdır. Kaposi sarkomu, ovaryum kanseri ve multipl miyelom gibi malignite özelliği gösteren tümörlerde kullanılır. Liposomal yapı sayesinde sistemik toksisite düşürülür ve dolaşım süresi uzar (Barenholz, 2012).

- Abraxane (albumin-bağlı paklitaksel nanopartikülü): Meme, akciğer ve pankreas kanseri tedavisinde onaylanmıştır. Çözücü içermemesi nedeniyle klasik paklitaksele kıyasla daha az toksisiteye sahiptir (Miele vd., 2009).

- Onivyde (irinotekan yüklü liposom): Özellikle metastatik pankreas kanserinde FDA onayı almıştır. Nanoliposomal taşıyıcı sayesinde ilaç tümöre daha etkili ulaşır (Milano vd., 2022).

- Vyxeos (daunorubisin + sitarabin liposomal kombinasyonu): Akut myeloid lösemi tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Krauss vd., 2019).

Glioblastoma tedavisine yönelik özel olarak onaylanmış bir nanoformülasyon henüz bulunmamaktadır. Bunun temel nedenleri arasında, BBB yapısının getirdiğii zorluk, tümör içi heterojenlik, GBM'nin hızlı invaziv yapısı ve bu tümör türünün klinik olarak agresif seyri yer almaktadır.

Buna karşın, bazı nanoformülasyonlar GBM için klinik araştırma aşamasında test edilmektedir. Örneğin:

- Nanoliposomal irinotekan (Onivyde) ve nano-TMZ sistemleri, beyin penetrasyonu artırmak amacıyla çeşitli klinik çalışmalarda test edilmektedir.

- Nanopartikül taşıyıcılarla $CD133^+$ GBM kök hücrelerinin hedeflenmesi üzerine faz I-II denemeler yürütülmektedir (Vora vd., 2020).

GBM gibi agresif tümörler için onaylı nanoformülasyon geliştirme süreci, klasik faz I–III klinik aşamalarına ek olarak, beyin dokusuna özgü farmakodinamik testler, kan-beyin bariyeri geçiş analizleri ve görüntüleme destekli doz takibi gibi parametrelerin dikkatle değerlendirilmesini gerektirmektedir. Özellikle teranostik sistemler ve beyin hedefli ligand içeren taşıyıcılar, bu süreci hızlandırma potansiyeline sahiptir (Zhao vd., 2020).

1.6. Nano Dotlar (Karbon Dotlar)

1.6.1. Nano Dotların Fizikokimyasal Özellikleri

Nano dotlar, genellikle <10 nm boyutlarında olan, küresel ve amorf yapılı nanomalzemelerdir. Kuantum benzeri özellik gösteren bu yapılarda, yüzey fonksiyonel gruplarının türü ve çekirdek yapısı, hem optoelektronik davranışı hem de biyolojik stabiliteyi belirleyen temel faktörlerdir. Karbon bazlı nano dotlar (CD), en yaygın sınıftır ve karbon çekirdek yapısına sahiptir. Bu yapı genellikle sp^2/sp^3 hibritleşmiş karbon atomları ile çevrili oksijen, azot veya kükürt gibi heteroatomların oluşturduğu hidrofilik yüzey grupları sayesinde suda yüksek çözünürlük gösterir (H. Li vd., 2012).

Fizikokimyasal açıdan CD'lerin temel avantajı, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, çekirdek-çevre ilişkili çok yönlü yüzey fonksiyonlandırma kapasitesi ve üretim yöntemine bağlı olarak ayarlanabilir parçacık boyutu ve yüzey yükü parametreleridir. Bu özellikler, taşıyıcı sistemlerde ilaç yükleme, biyogörüntüleme ve hedefleme stratejileri için fonksiyonel çeşitlilik sağlar (Sun vd., 2006).

1.6.2. Nano Dotların Biyouyumluluğu ve Toksikolojik Profili

Nano dotların klinik veya preklinik uygulamalarda değerlendirilebilir olması, yalnızca teknik performanslarına değil, aynı zamanda biyouyumluluk ve toksikolojik profillerine de doğrudan bağlıdır. Karbon bazlı nano dotlar, çoğu metal bazlı kuantum noktaya göre daha düşük toksisite profiline sahiptir; bu durum özellikle ağır metal iyonu sızıntısı gibi risklerin olmaması ile ilişkilendirilir (Yang vd., 2009).

Karbon dotların canlı sistemlerle etkileşimi, yüzey yükü, partikül boyutu ve fonksiyonel gruplar gibi parametrelere bağlıdır. Genellikle negatif yüzey yükü taşıyan hidrofilik CDs'ler, hem hücre dışı matris ile daha iyi uyum sağlar hem de non-spesifik protein adsorpsiyonunu azaltarak immün sistemi tetikletme riskini düşürür. Farelerde ve zebrafish modellerinde yapılan toksikolojik analizler, doz bağımlı olmakla birlikte, 10–100 mg/kg düzeyine kadar minimal sitotoksisite ve immün yanıt gözlendiğini göstermektedir (Chung vd., 2021; Yang vd., 2009).

Ancak bu veriler, yüzey modifikasyonuna duyarlı olduğundan, her yeni CD formulasyonu için kapsamlı toksikoloji testlerinin yapılması zorunludur. Klinik translasyonel acıdan ısından bu, ciddi bir değerlendirme adımıdır.

1.6.3. Nano Dotların Fluoresans Özellikleri ve Biyogörüntüleme

Karbon dotların biyomedikal uygulamalarda öne çıkmasını sağlayan en önemli özelliklerinden biri, yüksek kuantum verimliliğine sahip fotolüminesans davranışlarıdır. Özellikle mavi-yeşil spektrumda güçlü emisyon özellikleri sunan CD'ler, farklı dalga boylarına ayarlanabilen uyarılma-emisyon çiftleri sayesinde çok kanallı biyogörüntüleme için idealdir (Zhu vd., 2015).

Fluoresansın mekanizması, çekirdek yapısı, yüzey geçişleri ve dopant elementlerle (N, S, P vb.) ilişkilidir. Bu yapı, çevresel pH, iyonik kuvvet, protein varlığı gibi faktörlere duyarlı olduğundan, CDs'ler sadece görüntüleme değil aynı zamanda biyosensör olarak da değerlendirilmektedir. Mevcur literatürlere göre zaten hücre içi ROS düzeylerini, pH değişikliklerini ve enzim aktivitelerini raporlayabilen sensör CD sistemleri mevcuttur (Qu vd., 2012).

Yukarıda bahsedilen bütün bu avantajlar, CD'lerin hem *in vitro* hem *in vivo* uygulamalarda konfokal mikroskopi, IVIS görüntüleme ve akış sitometrisi gibi platformlarla entegrasyonuna olanak tanır. Özetle, karbon dotlar, klasik boyalardan farklı olarak hem düşük toksisite hem de stabil sinyal üretimi ile görüntüleme ve theranostik sistemlerin temel taşı olma potansiyeline sahiptir.

1.6.4. Glioma Tedavisinde Nano Dot Kullanımı

Glioma, özellikle de GBM, tedavisi oldukça zor olan, invaziv büyüme özelliği gösteren ve standart tedavilere direnç geliştirme potansiyeli yüksek bir tümör grubudur. Bu nedenle, son yıllarda alternatif tedavi platformları arasında yer alan nano dot sistemleri, glioma tedavisinde yenilikçi ve hedefe yönelik bir yaklaşım sunmaktadır. Özellikle karbon bazlı nano dotlar, hem görüntüleme hem de ilaç taşıma potansiyelleri sayesinde glioma gibi kompleks tümörlerde çift yönlü kullanım olanağı tanımaktadır (Baker ve Baker, 2010).

Literatürde, karbon dotların glioma hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etkiler gösterebildiği ilk olarak Chen vd. (2016) tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada, amino-gruplarla modifiye edilmiş CD'lerin, insan U87 glioma hücre hattında hücre içi alımı takiben ROS ürettiği ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir. Önemli olarak, bu etkiler sağlıklı hücrelerde gözlemlenmemiştir; bu da CDs'lerin kanser-seçici biyolojik aktivite potansiyelini ortaya koymaktadır (Y. Wang vd., 2025).

Karbon dotların glioma mikromimarisi içerisindeki dağılımını görsel olarak değerlendirebilmek amacıyla yapılan preklinik çalışmalarda ilgi çekici sonuçlar alınmıştır. Yine bir çok çalışmada CD bazlı nanomalzemeler kullanarak glioma dokularını canlı fare modellerinde görüntülemiş ve tümör lokalizasyonunun yüksek hassasiyetle belirlenebildiğini göstermiştir. Bu çalışma, CDs'lerin yalnızca taşıyıcı değil, aynı zamanda görüntüleme ajanı olarak da etkili kullanılabileceğini ortaya koymuştur (C. He vd., 2022).

Ayrıca, fotodinamik terapi ile entegre edilmiş karbon dot sistemleri de glioma tedavisi için araştırma konularından biridir. Jovanović vd. (2023) ışıkla aktive edilen CDs'lerin, glioma hücrelerinde lokal ROS üretimi yoluyla hücre ölümünü indükleyebildiğini ve bu etkinin lazer ışığı altında hedefli bir şekilde artırılabildiğini raporlamıştır. Bu yaklaşım, geleneksel kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişen tümörlerde alternatif tedavi stratejisi olarak öne çıkmaktadır.

Ancak, tüm bu öncü bulgulara rağmen, karbon dot bazlı sistemlerin glioma tedavisinde klinik uygulama düzeyine ulaşmadığı, halen preklinik fazda olduğu unutulmamalıdır. Bu sistemlerin *in vivo* biyodağılım, uzun dönem toksisite, immünojenite ve metabolik yıkım profilleri gibi kritik parametreleri detaylı şekilde analiz edilmeden klinik fazlara ilerlemesi mümkün değildir.

1.7. Kan-Beyin Bariyeri ve Nanopartikül Geçişi

1.7.1. BBB'nin Yapısı ve Fizyolojik Fonksiyonu

Kan-beyin bariyeri (Blood-Brain Barrier, BBB), merkezi sinir sistemini (MSS) çevreleyen en kritik anatomik ve fizyolojik yapılardan biridir. Temel görevi, beynin homeostatik dengesini korumak ve periferik dolaşımdaki toksik moleküller, patojenler ve immün hücrelerin beyin dokusuna geçişini engellemektir. Ancak bu koruyucu yapı, aynı zamanda terapötik ajanların beyin tümörlerine etkin şekilde ulaşmasını büyük ölçüde sınırlandırmakta ve glioma gibi hastalıkların tedavisinde önemli bir engel oluşturmaktadır (Obermeier vd., 2013).

BBB, yapısal olarak kapiller endotel hücreleri, bazal membran, perisitler ve astroglial ayakçıklar olmak üzere dört ana bileşenden oluşur. Endotel hücreleri, periferik dokulardaki kapillerlerden farklı olarak sıkı bağlantılar (tight junctions) ile birbirine bağlanmıştır. Bu sıkı bağlantılar, paracellular geçişi kısıtlayarak yalnızca lipofilik ve küçük moleküllerin pasif difüzyonuna izin vermekte ve büyük moleküllerin ya da hidrofilik ajanların geçişini engellemektedir (Obermeier vd., 2013).

BBB'nin bir diğer belirleyici özelliği, transporter proteinlerin ve enzimatik bariyerlerin yoğun şekilde bulunmasıdır. P-glikoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP) ve multidrug resistance-associated proteins (MRPs) gibi taşıyıcılar proteinler, birçok terapötik ajanın beyne geçişini engelleyen aktif dışa atım sistemleri olarak görev yapar. Bu durum özellikle kemoterapi ilaçları için farmakokinetik engel oluşturmaktadır. Temozolomid gibi az sayıda ajan, moleküler yapısal özellikleri sayesinde BBB'yi geçebilmektedir; ancak yüksek etkili dozlara ulaşmak çoğu zaman mümkün olamamaktadır (Deeken ve Löscher, 2007).

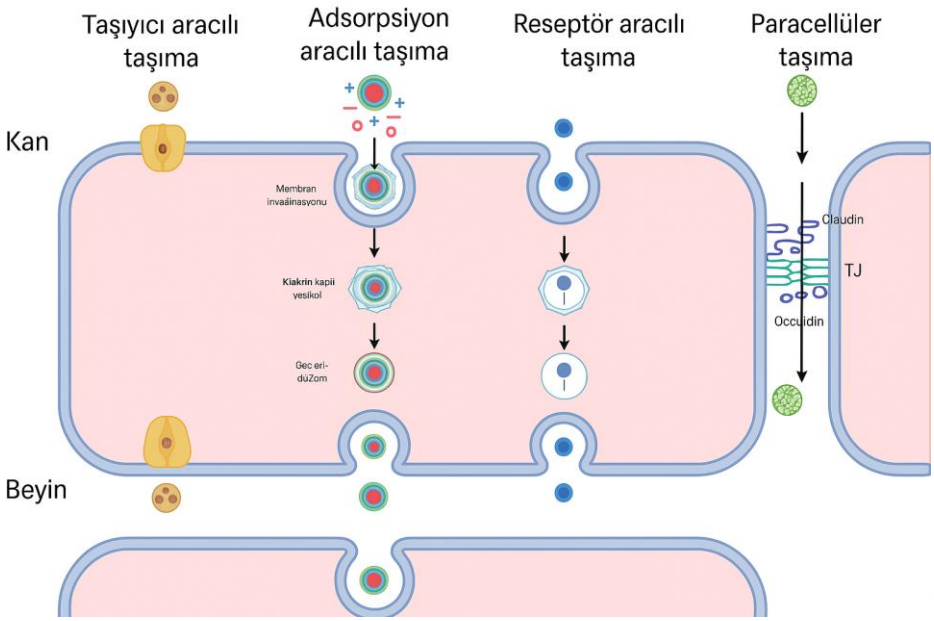
BBB'nin yapısal oluşumu ve fonksiyonel stabilitesi, yalnızca hücresel bileşenlerle değil, aynı zamanda nörovasküler ünite içindeki sinyal iletişimi ile sağlanır. Astroglial hücreler, endotellerin fenotipini ve sıkı bağlantı yapısını düzenleyen sinyaller üretir. Öte yandan perisitler, kapiller geçirgenliğin azaltılmasında görev alırken, mikroglial hücreler inflamatuar yanıtları dengeleyerek bariyer bütünlüğünü korur (Deeken ve Löscher, 2007; Lacoste vd., 2025).

BBB'nin tüm bu koruyucu özellikleri, nörolojik hastalıklarda tedaviye erişimi sınırlarken; glioma gibi malign tümörlerde yapı bozulmasına bağlı olarak bölgesel geçirgenlik artışları görülebilir. Ancak bu artış heterojen ve öngörülemez düzeydedir; dolayısıyla hedefe yönelik ilaç taşıma sistemleri tasarlanırken BBB'nin yapısal özellikleri mutlaka dikkate alınmalıdır.

1.7.2. Nanopartiküllerin BBB'den Geçiş Stratejileri

BBB, sistemik dolaşımdaki birçok terapötik ajanın beyin parenkimine geçişini sınırlayan oldukça selektif bir yapıdır (Şekil 1.6). Bu durum, GBM gibi merkezi sinir sistemi tümörlerinde farmakolojik tedavi etkinliğine ciddi biçimde sınırlar getirmektedir. Son yıllarda geliştirilen nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemleri, BBB'yi aşmak ve hedef dokuya ilaç iletimini artırmak amacıyla stratejik olarak tasarlanmıştır. Bu stratejiler, nanopartikülün fiziksel özelliklerinden yararlanmanın yanı sıra biyolojik sistemlerle etkileşim kurarak geçişi kolaylaştırmaya dayanmaktadır (Saraiva vd., 2016).

Nanopartiküller, çapları genellikle 100 nm'den küçük olduğunda, BBB'nin belirli bölgelerinde gözlemlenen seçici geçirgenlik artışlarından faydalanarak pasif olarak beyin parenkimine geçebilir. Glioma gibi patolojik durumlarda tümör çevresindeki damar yapılarında görülen anormal geçirgenlik etkisi, bu geçişi kolaylaştırır. Ancak bu etki tümörün tüm bölgelerinde eşit değildir ve çoğu zaman yetersiz kalmaktadır (Wilhelm vd., 2016).



Şekil 1.6. Karbon dotların BBB'den geçiş mekanizmaları (Hersh vd., 2022)

1.7.2.1. Taşıyıcı Vektör Kullanımı

En yaygın kullanılan stratejilerden biri, nanopartikül yüzeyine spesifik taşıyıcı reseptörleri hedefleyen ligandların eklenmesidir. BBB'de yüksek oranda ifade gösteren transferrin reseptörü (TfR), insülin reseptörü ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR) gibi yapılar bu amaçla sıklıkla hedeflenir. Ligand–reseptör etkileşimi sayesinde, nanopartikül reseptör aracılı endositoz yoluyla endotel hücreler tarafından içeri alınır ve beyin dokusuna iletilir (Mittal vd., 2022).

Bazı nanopartiküller, yüzeylerine hücre penetran peptidler eklenerek elektrostatik etkileşimlerle endotel hücre zarını geçebilir. Özellikle TAT peptidi gibi kısa aminoasit dizileri, bu amaçla kullanılmış ve BBB'yi etkili şekilde aşabildiği gösterilmiştir. Ancak bu strateji, taşıyıcı sistemlerin non-spesifik dokulara da geçiş riskini artırabileceği için dikkatle optimize edilmelidir (Ulbrich vd., 2011).

Doğal biyolojik taşıyıcılar olan eksozomlar ve lipozomlar, BBB'den geçişte önemli bir alternatif olarak görülmektedir. Özellikle, beyin kökenli hücrelerden türetilmiş eksozomlar, endojen sistem tarafından tanındıkları için bağışıklık sistemi tarafından yok edilmeden beyin dokusuna ulaşabilir. Bu sistemler, nanoformülasyonlara entegre edilerek ilaçların seçici olarak beyne taşınmasını sağlar (Ha vd., 2016).

Nanopartikül geçişini artırmak için invazif olmayan yardımcı yöntemler de geliştirilmektedir. Özellikle odaklanmış ultrason ile birlikte mikrobaloncuk kullanımı, lokal olarak BBB'yi geçici ve güvenli biçimde açmakta kullanılabilir. Bu teknik sayesinde, nanopartiküllerin hedef bölgeye geçişi büyük oranda artar, ancak uygulama kontrolü açısından ileri teknoloji gerektirir (Hersh vd., 2022).

BBB'yi aşmak, nöro-onkoloji alanındaki en büyük farmakolojik zorluklardan biridir. Nanopartikül teknolojisi, fiziksel, kimyasal ve biyolojik düzeyde geliştirilen çok katmanlı stratejilerle bu engeli aşmak için önemli fırsatlar sunmaktadır. Ancak etkinlik kadar güvenlik, spesifiklik ve uzun dönem nörotoksisite değerlendirmeleri de bu stratejilerin gelecekteki klinik uygulamaları açısından kritik önem taşır.

1.7.3. Karbon Dotların BBB Geçişini Sağlayan Faktörler

Nano dotlardan özellikle karbon bazlı olanlar, sahip oldukları özgün fizikokimyasal özellikler sayesinde BBB geçebilen az sayıdaki nanopartikül sınıfı arasında yer almaktadır. BBB'nin seçici geçirgen yapısı, çoğu kemoterapötik ajanın geçişini engellerken, nano dotlar bu bariyeri aşmak için pasif ve aktif mekanizmaları bir arada kullanma potansiyeline sahiptir. Bu geçişte rol oynayan faktörler, nano dotların boyut, yüzey yapısı, yük durumu, hidrofobiklik düzeyi ve biyolojik fonksiyonlandırmalarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (W. Zhang vd., 2021).

Karbon dotlar genellikle <10 nm boyutlarındadır. Bu ultra-küçük boyut, özellikle endositoz ve transsitoz gibi hücresel geçiş mekanizmalarını destekler. Küçük çaplı partiküller, klatrin- veya kaveola- aracılı endositoz yollarıyla beyin kapiller endotel hücrelerine daha kolay alınabilir. Ayrıca negatif yüzey yüküne sahip karbon dotların, plazma proteinleriyle etkileşimi azalttığı ve bu sayede retiküloendotelyal sistemden kaçınarak dolaşım süresini uzattığı gösterilmiştir (Seven vd., 2021).

Karbon dotların yüzeyleri karboksil, hidroksil, amin gibi gruplarla kolayca modifiye edilebilir. Bu durum, onları reseptör aracılı transsitoz mekanizmalarına uygun hale getirir. Örneğin transferrin ya da apolipoprotein gibi BBB reseptörlerine özgü ligandlar ile fonksiyonlandırılan karbon dotlar, beyin endotel hücrelerinde hedefli alım sağlayarak daha etkin geçiş elde etmektedir (Ren vd., 2024).

Hafif hidrofilik karakter taşıyan karbon dotlar, hem dolaşımda uzun süre kalabilir hem de hücre zarlarıyla yeterli etkileşim kurarak endositozla alınabilir. Aşırı hidrofobik yapı toksisiteyi artırabilirken, fazla hidrofilik yapılar geçişi engelleyebilir. Bu nedenle amfipatik yapıların tercih edilmesi, BBB geçişinde dengeli bir strateji sunmaktadır (Zhu vd., 2013).

Bazı karbon dotlar, tümör mikroçevresine veya endozomal pH seviyesine duyarlı olacak şekilde tasarlanarak, yalnızca hedef bölgede aktifleşen taşıyıcı sistemler haline getirilebilir. Bu tür "akıllı" yapılar, BBB geçişi sonrası kontrollü ilaç salımına izin verirken, sistemik toksisiteyi azaltır. Örneğin pH-duyarlı karbodiimid–PEG kaplı karbon dot sistemlerinin beyin tümörlerinde etkin taşınma sağladığı bildirilmiştir (Pourmadadi vd., 2025).

Nano dotların biyolojik sıvılarda agregasyona uğramadan stabil kalabilmesi, BBB'yi geçme sürecinde son derece önemlidir. PEGilasyon gibi yüzey kaplamaları, opsonizasyonu azaltarak parçacıkların immün sistemden kaçmasına ve dolaşım süresinin uzamasına olanak tanır. Bu da beyin damarlarında daha uzun süre kalma ve geçiş için fırsat yaratır (Y. Wang vd., 2025b).

Nano dotlar, düşük boyut, yüzey mühendisliği potansiyeli ve fonksiyonel çeşitlilikleri sayesinde BBB'yi aşmak üzere avantajlı bir profil sergiler. Bu özellikleri, onları özellikle glioma gibi merkezi sinir sistemi tümörlerinde umut verici theranostik taşıyıcılar haline getirmektedir. Ancak bu sistemlerin güvenliğini artırmak ve klinik düzeye geçişini hızlandırmak adına, geçiş mekanizmalarının moleküler düzeyde daha ayrıntılı aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

1.8. Preklinik GBM Model Sistemleri

1.8.1. *In Vitro* GBM Modelleri

Glioblastoma multiforme, klinik seyri oldukçaa hızlı, mikroskobik invazyon kapasitesi yüksek ve genetik heterojenliği belirgin bir tümör alt tipidir. Bu karmaşık biyolojik yapının anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için çeşitli in vitro modeller kullanılmaktadır. Geleneksel 2D kültür sistemlerinden başlayarak günümüzde 3D sferoid ve organoid sistemlere evrilen modelleme yaklaşımları, tümör hücre biyolojisini farklı boyutlarda temsil etmektedir (Neal vd., 2018).

En yaygın kullanılan in vitro modeller arasında yer alan 2D kültürler, çoğunlukla U87, U251 ve T98G gibi insan GBM hücre hatlarını monolayer olarak kültüre ederek çalışılmaktadır. Bu sistemler, ucuz, hızlı ve tekrarlanabilir olmaları sayesinde gen ifadeleri, ilaç duyarlılık testleri ve temel sinyal yolaklarının analizi gibi deneylerde halen kullanılmaktadır. Ancak hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini yeterince yansıtamayan yapıları nedeniyle *in vivo* tümör davranışını modelleme kapasitesi sınırlıdır (Lee vd., 2006).

3D kültür sistemleri, hücrelerin üç boyutlu bir yapıda bir araya getirilmesiyle oluşturulan sferoid yapılardır. Özellikle kanser kök hücresi zenginliği açısından önemli olan $CD133^+$ GBM alt popülasyonlarının korunmasını sağlarlar. Ayrıca hipoksik çekirdek, proliferatif çeper ve gradyanlı besin difüzyonu gibi tümöre özgü mikroçevresel koşulları da

daha iyi taklit edebilirler. Bu sistemler, temozolomid gibi ajanların penetrasyonunu test etmekte ve direnç mekanizmalarının değerlendirilmesinde oldukça değerlidir (Che vd., 2023).

Son dönemde geliştirilen organoid sistemleri, ya hasta kaynaklı tümör dokularından ya da kök hücre kaynaklı farklılaştırmalarla oluşturulan 3D yapılardır. Organoidler, GBM'nin heterojen hücre popülasyonunu (proliferatif, invaziv, nekrotik alanlar da dahil olmak üzere) daha gerçekçi biçimde yansıtır. Ayrıca tek hücreli analizlere, ilaç taramalarına ve hatta co-kültür sistemleriyle immün mikroçevre çalışmalarına olanak tanır (Jacob vd., 2020). Ancak bu sistemlerin yüksek maliyet, teknik açıdan uzmanlık gerekliliği ve uzun süreli kültür zorlukları, yaygın kullanımını kısıtlamaktadır (Polak vd., 2024).

2D kültürler, yüksek verimli analizler için halen vazgeçilmez araçlar olsa da GBM gibi heterojen tümörlerde 3D sferoid ve organoid modeller biyolojik gerçekçiliği artırmaktadır. Her bir sistemin avantajları ve sınırlılıkları göz önüne alınarak, araştırma amacına göre hibrit stratejilerin geliştirilmesi, translasyonel başarı oranını yükselteceği değerlendirilmektedir (Neal vd., 2018).

1.8.2. U87 ve CD133+ Glioblastoma Hücre Hatları

Glioblastoma araştırmalarında kullanılan hücre hatları, tümörün genetik, fenotipik ve davranışsal özelliklerini modellemek açısından kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, U87 hücre hattı en yaygın kullanılan klasik GBM modelidir. Ancak U87, temsiliyet açısından bazı sınırlılıklar taşımaktadır. Bu nedenle, kanser kök hücresi özellikleri taşıyan $CD133^+$ alt popülasyonlar, glioma biyolojisini daha yakından yansıtan ve tedavi direncini anlamaya olanak tanıyan alternatif sistemler olarak öne çıkmaktadır (Galli vd., 2004).

Uppsala Üniversitesi'nde 1968 yılında elde edilen U87-MG hücre hattı, adherent şekilde büyüyen, hızlı proliferatif bir insan GBM modelidir. Temel avantajları, kolay kültürlenebilir olması, hızlı çoğalma kapasitesi ve in vitro deneylerde yüksek tekrar üretilebilirlik sağlaması gibi avantajlar sağlamaktadır. Ancak bu hücre hattı, uzun süreli kültür adaptasyonu nedeniyle orijinal tümör heterojenitesini büyük ölçüde kaybetmiştir. Örneğin, U87 hücreleri *in vivo* ortamda GBM'nin karakteristik invazyon davranışını tam olarak sergilemez ve klasik TMZ tedavisine duyarlılığı doğal tümörlere kıyasla daha fazladır (Allen vd., 2016).

Son yıllarda glioblastomada CSC hipotezinin öne çıkmasıyla birlikte, CD133 (Prominin-1) ifadesini taşıyan alt popülasyonlar yoğun şekilde araştırılmaktadır. $CD133^+$ hücreler, kendi kendini yenileyebilme, farklılaşma ve *in vivo* tümör oluşturma kapasitesine sahiptir. Beyin tümörlerinin nüks etme ve kemoterapiye direnç gösterme özellikleri büyük ölçüde bu hücre grubuna atfedilmektedir (Singh vd., 2004). Ayrıca bu hücreler, hipoksik ortama adapte olabilme, invazif yayılım gösterme ve temozolomid gibi alkilleyici kemoterapikajanlara karşı yüksek direnç gösterme gibi özelliklere sahip olması sebebiyle klinik açıdan da zorluklar göstermektedir (Dean vd., 2005).

Preklinik modellerde $CD133^+$ hücrelerin kullanımı, gerçek tümör davranışlarını modellemek açısından önemlidir. Bu hücreler genellikle nörosfer kültürü altında, büyüme faktörleri (bFGF, EGF) ile zenginleştirilmiş serum içermeyen ortamda kültüre edilir. Bu yaklaşım, in vitro sferoid ve *in vivo* ortotopik GBM modelleri için yüksek translasyonel açıdan da önem taşır (Dean vd., 2005).

Bazı çalışmalar, klasik U87 hücre hattının $CD133^+$ alt popülasyonları izole edilerek daha heterojen bir modelleme elde etmeyi hedeflemiştir. Bu sayede aynı hücre hattından türetilen kök hücre benzeri ve farklılaşmış hücreler bir arada değerlendirilebilmekte, tedavi yanıtları arasındaki farklar daha net ortaya konabilmektedir (Beier vd., 2007). Bu tür stratejiler, kök hücre hedefli ilaç taramaları ve immün direnç mekanizmalarının aydınlatılması açısından önemli bir altyapı sunar.

1.8.3. *İn vivo* Xenograft ve Orthotopik Modellemeler

GBM, yüksek dereceli maligniteye sahip, invazif ve heterojen özellikler gösteren bir beyin tümörüdür. Bu tümörün moleküler mekanizmalarını anlamak ve tedavi stratejilerini test etmek amacıyla geliştirilen in vitro modeller belirli bir seviyeye kadar bilgi sunsa da, hastalığın gerçek biyolojik davranışlarını anlamak için *in vivo* modeller vazgeçilmezdir. Bu bağlamda en yaygın kullanılan sistemler zenograft modelleridir ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış fareler kullanılarak insan tümör hücrelerinin hayvanda yaşatılması esasına dayanır (Irtenkauf vd., 2017).

Xenograft çalışmalarda translasyonel açıdan zenginlik sağlaması amacıyla sıklıkla nude fareler tercih edilmektedir. Nude fareler T hücreleri yönüyle sınırlı olması sebebiyle, insan kökenli hücreleri reddetmeden tümörün büyümesine olanak tanırlar. Bu bağlamda U87

gibi konvansiyonel glioblastoma hücre hatları veya CD133 pozitif kök hücre benzeri GBM alt popülasyonları, bu farelere uygulanarak in vivo tümör modelleri oluşturulur. Bu sistemler, tümör büyüme kinetiği, ilaç yanıtı, invazyon yeteneği ve hatta yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğini değerlendirmede oldukça kullanışlıdır bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Candolfi vd., 2007).

Xenograft modeller genellikle iki ana kategoride uygulanır: subkutan ve ortotopik. Subkutan modellerde tümör hücreleri genellikle sırt bölgesine deri altına enjekte edilir ve tümör oluşumu dışarıdan gözlemlenebilir. Bu modellerin avantajı kolay uygulanabilir olmaları ve tümör hacminin fiziksel olarak ölçülebilmesidir. Ancak, subkutan modellerin en büyük dezavantajı, gerçek beyin mikroçevresini – özellikle BBB, hipoksik niş, mikrogliya etkileşimi gibi özgül koşulları – taklit edememesidir. Dolayısıyla, glioblastomanın karakteristik özelliklerini çalışmak açısından sınırlı translasyonel değer taşır (Sarkaria vd., 2006).

Bu sınırlamaları aşmak amacıyla geliştirilen ortotopik modeller, tümör hücrelerinin doğrudan beynin belirli bölgelerine (örneğin striatum veya korteks) enjeksiyonu ile oluşturulur. Bu yaklaşımda en yaygın kullanılan teknik stereotaksik enjeksiyondur. Fareler anestezi altında stereotaksik cihazlara sabitlenir ve bregma noktası referans alınarak beyin üzerine hassas koordinatlarla enjeksiyon yapılır. Bu yöntemde genellikle 1×10^5 ila 5×10^5 arasında değişen sayıda U87 veya $CD133^+$ hücre, belirli bir derinliğe çok yavaş bir şekilde enjekte edilir. Enjeksiyon sonrası tümör gelişimi genellikle 2–3 hafta içerisinde başlar ve IVIS (in vivo imaging system), MRI veya histopatolojik yöntemlerle takibi yapılarak izlenebilir (Huszthy vd., 2012).

Bu modelin en büyük avantajlarından birtanesi, GBM'nin gerçekçi invazyon paternini, mikrovasküler proliferasyonunu ve çevresel baskı mekanizmalarını yansıtabilmesidir. Özellikle kan-beyin bariyerinin ilaç geçirgenliğine etkisi, hipoksik bölgelerdeki kök hücre aktivasyonu ve mikrogliyal inflamatuvar yanıt gibi unsurlar, bu modellerde gerçek bağlamıyla çalışılabilir. Ayrıca, tümörün merkez ve çevre bölgelerinden ayrı ayrı örnekleme yapılabildiği bu yapı sayesinde, uzamsal düzeyde transkriptomik analizlerin uygulanması da mümkün hale gelir.

Bizim modelimizde de, insan kaynaklı U87 hücrelerinin CD133 pozitif alt populasyonu ile klasik U87 WT hücreleri, nude farelere stereotaksik enjeksiyon yoluyla beyin içine enjekte edilerek iki farklı glioblastoma modeli oluşturulmuştur. Bu sayede sadece tedavi

etkinliği değil, aynı zamanda tümör çevresiyle olan transkriptomik etkileşimler ve bölgesel tedaviye yanıt farklılıkları da detaylı olarak analiz edilmek istenmiştir.

1.9. Omik Teknolojilerle Tümör Modelindeki Nanoformülasyonların Değerlendirilmesi

1.9.1. Transkriptomik Sistemler

Nanopartikül temelli tedavi yaklaşımlarının biyolojik etkilerini değerlendirmek için kullanılan omik teknolojiler, klasik biyokimyasal ölçüm yöntemlerine kıyasla çok daha kapsamlı ve hassas bir veri üretim kapasitesine sahiptir. Bu teknolojiler arasında, özellikle transkriptomik analizler, hücresel yanıtların gen düzeyinde ortaya konulmasına olanak tanıması bakımından ön plana çıkmaktadır. Nanopartiküllerin hücre içi dağılımı, hedef hücrelerdeki stres yanıtları, sinyal yolaklarının aktivasyonu, immün modülasyon ve hatta direnç mekanizmaları gibi birçok biyolojik sürecin ilk ve en güçlü tepkisi transkriptom düzeyinde gerçekleşir. Bu nedenle, nanopartikül ve ilaç taşıma sistemlerinin moleküler yönüyle sistematik analizi için transkriptomik sistemler temel bir araştırma aracıdır (Kinaret vd., 2017).

RNA-seq (RNA sequencing), transkriptom analizinde altın standart olarak kabul edilen yüksek verimli bir tekniktir. Bu yöntemle tüm hücresel mRNA profili, tek nükleotid hassasiyetinde ölçülebilir ve farklı koşullar arasındaki ifade değişiklikleri belirlenebilir. RNA-seq, sadece gen ekspresyon düzeylerini değil, aynı zamanda alternatif splaysing, füzyon transkriptleri ve uzun kodlamayan RNA'ları da tespit edebilir. Özellikle bulk RNA-seq kullanımı, doku seviyesinde ortalama gen yanıtlarını verirken, single-cell RNA-seq sistemleri hücre heterojenitesini çözümleyebilme kapasitesine de sahiptir (Conesa vd., 2016).

Nanopartikül ya da nanapartikül temelli ilaç sistemlerinin GBM gibi tümörlerdeki etkisini değerlendirmek amacıyla transkriptomik analizler, farklı zaman noktalarında ve farklı dozlarda uygulanarak zamana bağlı genetik tepkilerin ortaya konulmasına imkân verir. Bu da, terapötik ajanların sadece etkinliklerini değil, aynı zamanda olası toksisite veya kompansatuar adaptasyon süreçlerini de anlamaya yardımcı olur. Örneğin, nanopartikül uygulaması sonrası artan oksidatif stres yanıtı, inflamatuvar gen ekspresyonlarında artış, hücre siklusu duraksaması veya apoptoz sinyallerinin aktivasyonu gibi bulgular doğrudan RNA-seq verilerinden elde edilebilir (Y. Liu vd., 2017).

Ayrıca, nanoparçacıkların taşıdığı ilaçların hücresel hedeflere etkisi de transkriptom düzeyinde izlenebilir. TMZ gibi kemoterapötik ajanların DNA hasarı aracılı genleri nasıl etkilediği, bu etkinin nanopartikül formülasyonla sunulup sunulmadığına göre değişip değişmediği bu teknolojiyle analiz edilebilir. Aynı zamanda bu analizler, kök hücre benzeri alt popülasyonlarda gen ekspresyonunun nasıl değiştiğini değerlendirme konusunda da önemli bilgiler sunar (Stupp vd., 2005; Suvà vd., 2014).

Son yıllarda geliştirilen mekansal tranksriptomik teknolojileri ise, gen ekspresyon profilini uzamsal bağlamda değerlendirme imkânı tanımaktadır. Özellikle tümör mikroçevresindeki bölgesel farklılıkların (örneğin tümör merkezi ve çevresi) ayrıştırılmasında, nanopartiküllerin spesifik bölgelere etkilerinin analizinde bu teknolojiler devreye girmektedir. Örneğin, nanoparçacıkların tümör kenarına ulaşıp ulaşmadığını, hipoksik bölgelerde etkinliğini kaybedip kaybetmediğini veya immün hücre popülasyonları üzerindeki lokal etkilerini spatial transkriptomik ile değerlendirmek mümkündür. Ekibimizin 2024 yılında yaptığı bir çalışmada da benzer şekilde nanomalzemenin dağılımına bağlı olarak tümör çevresi ve tümördeki transkriptom profilini mekansal olarak değerlendirmiştir (Ceylan vd., 2024).

1.9.2. Nano Dotların Hücre Tipi-Spesifik Transkriptomik Etkileri

Nano dotlar, özellikle karbon bazlı yapıları nedeniyle biyolojik sistemlerle yüksek oranda etkileşime giren ve hücre tipi-spesifik etkiler gösterebilen nanomalzemelerdir. Bu etkiler, sadece hücre yaşam döngüsü, metabolizma ya da apoptoz gibi genel süreçlerle sınırlı kalmaz; aynı zamanda her bir hücre tipi içerisinde farklı gen ekspresyon profillerini tetikleyerek daha karmaşık transkriptomik tepkiler yaratabilir. Bu nedenle nano dotların biyolojik güvenlik ve terapötik potansiyelinin değerlendirilmesinde hücre tipi-spesifik transkriptomik analizler kritik öneme sahiptir (Yan vd., 2025).

Yapılan çalışmalar, karbon dotların farklı hücre hatlarında birbirinden bağımsız gen ifade yanıtlarına yol açabildiğini göstermektedir. Örneğin, insan glioblastoma hücreleri olan U87-MG'de carbon dot maruziyeti sonrası oksidatif stresle ilişkili genlerin yukarı regüle olduğu gösterilmiştir. Buna karşın, aynı nanopartikül profili normal astrosit hücrelerinde benzer düzeyde genetik yanıt yaratmamaktadır; bu durum, nano dotların tümör seçiciliği açısından da değerli olabileceğini düşündürmektedir (Yan vd., 2025).

Bununla birlikte, bağışıklık sistemine ait hücrelerde – özellikle mikrogliya, makrofaj veya T lenfositlerde – nano dotlar, proinflamatuvar sinyal yolaklarını aktive edebilmektedir. IL6, TNFα, CCL2 gibi sitokinlerin ekspresyonunda artış, NF-κB ya da JAK-STAT yolaklarının aktivasyonu ile birlikte rapor edilmiştir. Bu durum, nano dotların tümör mikroçevresinde yalnızca tümör hücrelerini değil, bağışıklık hücrelerini de yeniden programlayabileceğini göstermektedir (Z. Yang vd., 2020).

Kök hücre özellikleri taşıyan $CD133^{+}$ glioma alt popülasyonlarında ise nano dot uygulaması, özellikle pluripotensiyle ilişkili transkripsiyon faktörlerinin (örneğin SOX2, NANOG, OCT4) ekspresyonunu modifiye edebilmekte ve hücre proliferasyonunu baskılayabilmektedir. Bu gözlem, kanser kök hücresi hedefli tedavilerde nano dotların farklılaşmayı indükleyici veya proliferatif sinyalleri baskılayıcı etkileri olabileceğini düşündürmektedir (X. Wang vd., 2020).

Hücre tipi-spesifik bu farklı yanıtların oluşmasında birden fazla faktör rol oynar: partikülün yüzey fonksiyonelleştirilmesi, zeta potansiyeli, boyutu, yük durumu ve uygulama süresi gibi fizikokimyasal parametrelerin yanı sıra, hücreye özgü endositoz mekanizmaları ve bazal transkriptomik profiller de belirleyicidir (Ceyltan vd., 2024).

Tüm bu bulgular, nano dotların terapötik kullanımında "tek ajan–tek etki" yaklaşımının yetersiz kalacağını ve kişiselleştirilmiş, hatta hücre tipi-temelli değerlendirmelerin yapılmasının şart olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, nano dot temelli platformlar geliştirilirken sadece ortalama gen yanıtları değil, hücre alt tiplerinin ayrı ayrı transkriptomik analizleri yapılmalı ve yan etkilerden çok fonksiyonel farklılaşmalara kadar tüm spektrum dikkate alınmalıdır.

1.9.3. Kan-Beyin Bariyeri Hücrelerinde Gözlenen Omik Yanıtlar

BBB, merkezi sinir sistemi ile sistemik dolaşım arasındaki seçici geçirgenliği düzenleyen dinamik bir yapıdır. Endotel hücreleri, perisitler, astrosit uç ayakları ve bazal lamina gibi yapıların oluşturduğu bu bariyer, fizyolojik homeostazı sürdürmekle kalmaz; aynı zamanda farmakolojik ajanların ve nanopartiküllerin beyin parankimine ulaşmasını da sınırlayan kritik bir savunma hattıdır (Obermeier vd., 2013).

Son yıllarda gelişen omik teknolojiler, BBB bileşenlerinin nanopartiküllere verdiği yanıtların daha bütüncül bir şekilde anlaşılmasını mümkün kılmıştır. Özellikle transkriptomik, proteomik ve metabolomik düzeyde yapılan analizler, nanoformülasyonlara maruz kalan BBB hücrelerinin genetik, işlevsel ve biyokimyasal yanıt profillerini ortaya koymaktadır.

1.9.3.1. Transkriptomik Yanıtlar

Nanopartiküller ile temas eden beyin endotel hücrelerinde, genellikle sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerini kodlayan genlerde belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, inflamatuar yanıt ve hücre iskeleti organizasyonu ile ilişkili genlerde de regülasyon bozulmaları bildirilmektedir. Bu durum, nanopartikül-bariyer etkileşiminin sadece pasif taşınım değil, aynı zamanda aktif biyolojik sinyalleşme içerdiğini göstermektedir (Tyumentseva vd., 2024).

BBB endotel hücrelerinde nanoparçacıklarla indüklenen proteomik değişiklikler, genellikle hücre iskeleti, aktin filament organizasyonu, hücre adezyon molekülleri ve taşıyıcı proteinlerde görülmektedir. Özellikle P-gp gibi ilaç taşıyıcılarının ekspresyonunda artış ya da baskılanma, beyin giriş çıkış dengesinde ciddi değişikliklere yol açabilir. Nanoformülasyonların bu taşıyıcılar üzerindeki etkileri, ilaç farmakokinetiği açısından oldukça kritiktir (Wilhelm vd., 2016; Y. Zhang vd., 2022).

BBB hücrelerinin nanoparçacıklarla karşılaştığında gösterdiği metabolik adaptasyonlar, özellikle enerji metabolizması, glikolitik akış ve redoks dengesinde belirgindir. Yapılan bazı çalışmalar, karbon nanoparçacıklarının glikoz alımını ve mitokondriyal respirasyonu etkileyerek hücre içi ATP üretiminde azalma, ROS üretiminde ise artışa neden olabileceğini göstermiştir. Bu durum, hücre stresine ve bariyer geçirgenliğinde artışa neden olabilir (Fang ve Tang, 2024; K. He vd., 2020).

BBB'yi oluşturan hücrelerin her biri, nanopartiküllere farklı omik düzeylerde yanıt verebilir. Örneğin, perisitler çoğunlukla vasküler stabilite ile ilişkili genlerde değişim gösterirken, astrositlerde ise inflamasyon ve metabolik stres yanıtları daha baskındır. Bu nedenle, BBB modeli olarak yalnızca endotel hücrelerinin değil, çok hücreli 3D BBB organoidleri veya mikroakışkan sistemlerin kullanılması daha anlamlı biyolojik çıktılar sağlamaktadır (Qi vd., 2023).

1.10. Literatürdeki Açıklıklar ve Araştırma Hipotezleri

1.10.1. Literatürdeki Eksiklikler ve Tartışmalı Noktalar

GBM, son derece invaziv doğası ve heterojen mikromimarisi ile onkoloji literatüründe hala tam olarak çözülememiş bir problem olarak yer almaktadır. Klinik, moleküler ve hücresel düzeyde elde edilen önemli bulgulara rağmen, GBM'nin tedavisinde elde edilen genel sağkalım oranlarının düşük seyretmesi, bu alandaki araştırmaların kritik yönlerinin hâlâ eksik olduğunu ortaya koymaktadır (Tan vd., 2020). Literatürdeki bu eksiklikler hem deneysel modellerin sınırlılığına hem de kullanılan teknolojik yaklaşımların karmaşıklığına dayanmaktadır.

En belirgin eksikliklerden biri, CSC ve özellikle $CD133^+$ hücre alt popülasyonları üzerindeki hedefli tedavi yaklaşımlarının hala yeterince tanımlanamamış olmasıdır. $CD133^+$ hücrelerin kemoterapiye dirençli ve tümör nüksünden sorumlu olduğu yaygın olarak kabul edilmesine rağmen, bu hücrelerin tanımlanması, izolasyonu ve fonksiyonel doğrulaması konusunda literatürde farklı protokoller ve çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Özellikle CD133 ekspresyonunun hücre kültür koşullarına bağlı değişkenlik göstermesi, bu popülasyonun klinik olarak hedeflenebilirliğini tartışmalı hale getirmektedir (Lathia vd., 2015).

Bir diğer tartışmalı alan, nanoformülasyonların GBM tedavisinde etkinliği ile ilgilidir. Pek çok çalışmada karbon bazlı veya metalik nanoparçacıkların hücre içi alımı, sitotoksik etkileri ve hedefe özel ilaç taşıma kapasiteleri gösterilmiş olsa da, bu verilerin büyük bölümü subkutan tümör modellerinde elde edilmiştir. Bu modeller, BBB gibi doğal engelleri taklit etmede yetersizdir ve bu nedenle ortotopik GBM modellerinde bu nanoparçacıkların aynı etkinliği gösterip göstermeyeceği net değildir (Wilhelm vd., 2016).

Ayrıca, bulk RNA-seq analizlerinin tümör heterojenliğini ve çevresinin etkisini maskeliyor olması da önemli bir metodolojik eksikliktir. GBM, bölgesel genetik ve fonksiyonel farklılıklar gösteren bir tümördür; dolayısıyla spatial transcriptomics gibi lokal yanıta bağlı yeni teknolojilerin kullanılmadığı çalışmalarda tümör merkezinde ve çevresinde yer alan hücrelerin birbirinden farklı tepkileri göz ardı edilebilmektedir (Marx, 2021; Ravi vd., 2022). Ancak bu tür uzamsal analizlerin kullanımı hâlâ sınırlıdır ve çoğu çalışma bu farklılığı hesaba katmadan genelleme yapmaktadır.

Son olarak, GBM'nin mikromilieu'sü olan tümör mikroçevresine yönelik çalışmalar her ne kadar artış göstermiş olsa da, bu çevrenin bağışıklık hücreleriyle olan etkileşimi hâlâ tam olarak çözülememiştir. Özellikle mikrogliya/makrofaj heterojenitesi, inflamatuvar polarizasyon dengesi ve bağışıklık kaçış mekanizmalarının dokuya özgü dinamikleri üzerine yapılan çalışmalar henüz sınırlı sayıdadır (Pombo Antunes vd., 2021).

Sonuç olarak, glioblastoma literatürü hızla büyüyor olsa da, modelleme yaklaşımları, kök hücre hedeflemesi, nanoformülasyon etkinliği ve uzamsal çözünürlük gibi alanlarda hâlâ ciddi eksiklikler ve metodolojik belirsizlikler mevcuttur. Bu durum, daha derinlemesine analizlerin yapılması ve multidisipliner yöntemlerin entegre edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

1.10.2. Nano Dot Temelli TMZ Taşıyıcıları

Temozolomid, GBM tedavisinde standart kemoterapötik ajan olarak kullanılmasına rağmen, kısa yarı ömrü, sınırlı BBB geçirgenliği ve özellikle MGMT-metilasyon durumuna bağlı gelişen kemoresistans nedeniyle etkinliği klinik düzeyde yetersiz kalmaktadır. Bu bağlamda, TMZ'nin farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek ve hedefe yönelik iletimini sağlamak amacıyla geliştirilen nanotaşıyıcı sistemleri, son yıllarda literatürde önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir (Stupp vd., 2005).

Nanoformülasyonlar içerisinde karbon bazlı nano yapılar, özellikle carbon dotlar ve graphene quantum dotlar, biyouyumlulukları, floresan özellikleri ve yüzey fonksiyonelleştirilebilirlikleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu yapılara entegre edilen TMZ, hem daha kontrollü salınım hem de tümör bölgesine spesifik hedeflenme potansiyeli sunmaktadır. Ancak, nano dot platformlarının TMZ taşıyıcısı olarak kullanıldığı çalışmalar, diğer nanotaşıyıcı sistemlere (lipid, polimerik, metalik nanopartiküller) kıyasla hâlâ sınırlı sayıdadır ve çoğunlukla in vitro veya erken dönem in vivo modellerde sınırlı kalmıştır (Wang vd., 2025).

Bazı öncü çalışmalarda, yüzeyi poliamin veya PEG ile modifiye edilmiş carbon dot'lara TMZ yüklenerek, GBM hücrelerinde daha etkili hücre içi alım sağlandığı ve DNA alkilasyonu üzerinden apoptoz indüklenmesinin artırıldığı raporlanmıştır (L. Wang vd., 2021). Ayrıca bu sistemlerin, doğal floresan özellikleri sayesinde ilaç dağılımının noninvazif görüntüleme yoluyla izlenebilmesine olanak sağladığı da belirtilmiştir. Ancak bu tür

çalışmalarda genellikle kullanılan hücre hatlarının (örneğin U251, U87) klasik 2D kültür sistemlerinde modellenmiş olması, sonuçların klinik relevansını sınırlamaktadır.

TMZ yüklü carbon dot sistemlerinin hayvan modellerinde test edildiği sınırlı sayıdaki çalışmada ise, tümör hacminde anlamlı azalma, proliferasyon markerlarında düşüş, ve apoptozda artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu sistemlerin BBB geçiş yetenekleri hâlâ tartışmalıdır ve çoğu zaman enjeksiyon bölgesine doğrudan uygulama "intrakranial/locoregional delivery" tekniği gerektirmektedir (L. Wang vd., 2021). Bu da sistemik uygulamaya uygunluğun henüz yeterince optimize edilmediğini göstermektedir.

Özetle, nano dot temelli TMZ taşıyıcı sistemler, teorik olarak GBM tedavisinde hem hedeflenebilirlik hem de ilaç stabilitesi açısından önemli avantajlar sunsa da, bu sistemlerin literatürdeki uygulamaları hâlâ sınırlı, protokoller arası karşılaştırmalar eksik ve translasyonel düzeyde net sonuçlar yetersizdir. Dolayısıyla bu alanda daha rafine edilmiş, hücre tipi-spesifik, BBB uyumlu ve uzamsal biyolojiyi dikkate alan deneysel modellere ihtiyaç duyulmaktadır.

1.10.3. CSC'ler ve TME'yi Hedefleyen Kombinasyon Terapi Açığı

GBM, yalnızca yüksek proliferatif kapasitesi değil, aynı zamanda nüks eğilimi ve tedaviye direnç geliştirme potansiyeli ile de bilinen, merkezi sinir sisteminin en agresif tümörlerinden biridir. Bu dirençte temel rol oynayan iki ana biyolojik bileşen, kanser kök hücreleri ve tümör mikroçevresi olarak öne çıkmaktadır. Ancak mevcut literatürde bu iki yapının eş zamanlı hedeflendiği kombine tedavi yaklaşımlarının sayısı oldukça sınırlıdır. Bu da klinik başarının önünde ciddi bir translasyonel engel teşkil etmektedir (Hambardzumyan ve Bergers, 2015; Lathia vd., 2015).

GBM'nin kök hücre benzeri alt popülasyonları olan $CD133^+$ hücreler, kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel tedavilere yüksek direnç göstermektedir. Bu hücrelerin temozolomid TMZ gibi ajanlara karşı duyarsız kalmasının temelinde MGMT ifadesis, DNA tamir mekanizmalarının aktivitesi ve hücrel siklusun yavaşlığı gibi biyolojik özellikler yer almaktadır. Mevcut tedavilerin çoğu, bu alt popülasyonları ortadan kaldıramadığı için, tedavi sonrası nüks neredeyse kaçınılmazdır. Bu durum, CSC'lere özgü hedeflenebilir yolakların (örneğin Notch, Hedgehog, Wnt/β-catenin) klinik açıdan yeterince etkin şekilde bastırılamadığını göstermektedir (Bao vd., 2006).

Öte yandan, TME de tedaviye karşı önemli bir koruyucu ortam sağlar. Özellikle mikrogliya ve TAM, anti-inflamatuvar fenotipe kayarak tümör hücrelerine destek sağlar. Ayrıca hipoksi, asidoz, bağ dokusu yoğunluğu ve bozulmuş vasküler mimari gibi TME'nin fizikokimyasal parametreleri, ilaç difüzyonunu engelleyerek tedavi etkinliğini sınırlar (Quail ve Joyce, 2017). Bu mikroçevresel koşullarda CSC'ler korunarak daha da agresif hale gelebilmektedir.

Ancak literatür incelendiğinde, bu iki dirence neden olan yapı taşının aynı anda hedeflendiği kombinasyon stratejilerinin nadiren çalışıldığı görülmektedir. Örneğin TMZ ile birlikte kullanılan bazı CSC inhibitörleri, mikroçevresel bağlamı dikkate almadan uygulanmakta, bu da ilacın etkinliğini sınırlamaktadır. Tersine, TME'yi hedefleyen anti-anjiyojenik veya immünoterapötik ajanlar da çoğu zaman kök hücre dinamiklerini baskılamada yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla, CSC–TME etkileşimini birbirinden ayrı değil, entegre ve dinamik bir sistem olarak ele alan kombine terapi modellerine ihtiyaç vardır (Plaks vd., 2015).

Bu boşluk, özellikle yeni nesil nanoteknolojik taşıyıcı sistemler kullanılarak aşılabilir. Örneğin, hedefe yönlendirilmiş nanoformülasyonlarla hem $CD133^+$ hücreleri hem de mikrogliya/makrofaj hücrelerini eş zamanlı olarak modüle etmek, geleneksel yaklaşımlardan çok daha etkili sonuçlar doğurabilir. Ayrıca spatial transcriptomics gibi yüksek çözünürlüklü analizler, bu kombinasyonların tümör merkezinde ve çevresinde nasıl farklı etki yarattığını anlamaya yardımcı olabilir.

1.10.4. Kan-Beyin Bariyeri Geçişini Aydınlatan Moleküler İpuçları

BBB, merkezi sinir sistemi ile periferik dolaşım arasında fiziksel, kimyasal ve metabolik bir engel görevi gören, yüksek seçiciliğe sahip bir yapıdır. Beyin endotelyumu, sıkı bağlantı (tight junction) proteinleri, taşıyıcılar ve transsitoz mekanizmaları sayesinde zararlı molekülleri ve büyük ilaçları dışarda tutarken; besin, hormon ve sinyal moleküllerinin geçişini düzenler. Ancak bu seçicilik, beyin tümörleri dahil birçok nörolojik hastalığın etkin tedavisini zorlaştırır. Bu nedenle, BBB'nin moleküler mimarisini ve geçiş stratejilerini aydınlatan ipuçları, özellikle hedefe yönelik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde hayati öneme sahiptir (Obermeier vd., 2013).

BBB'nin geçiş mekanizmalarının temelini, başta sıkı bağlantı proteinleri (Claudin-5, Claudin 3, Occludin, ZO-1), efluks pompaları (P-gp, BCRP, MRPs) ve selektif taşıyıcı proteinler (GLUT1, LAT1, TfR) oluşturmaktadır. Nanopartiküllerle yapılan birçok çalışma, özellikle bu moleküler kapıların modülasyonu yoluyla BBB'nin geçici olarak geçirgen hale geldiğini göstermektedir (Haqqani vd., 2024). Örneğin, karbon dot gibi yüzey özellikleri değiştirilebilen yapılar, özellikle TfR veya LDLR gibi endojen taşıyıcıları hedefleyen ligandlarla fonksiyonelleştirildiğinde, reseptör aracılı endositozu tetikleyerek beyin endoteline alınabilmektedir (Wu vd., 2023).

BBB üzerinden geçişi yöneten bir diğer önemli mekanizma da transsitoz sistemleridir. Kaveola aracılı ve klatrin aracılı endositoz yolları, nanoparçacıkların beyin endotelyumu içinde vezikülize olarak taşıma kabiliyetini belirler. Bu süreçte *caveolin-1*, *clathrin*, *dynamin*, *Rab* proteinleri gibi moleküler işaretçiler anahtar rol oynar. Literatürde, BBB'yi geçen nanoparçacıkların bu yolları aktive eden gen ve protein ekspresyonlarını modüle ettiğine dair artan sayıda transkriptomik ve proteomik veri mevcuttur (Larsen vd., 2025).

Ek olarak, inflamasyon, hipoksi ve ROS artışı gibi tümör mikroçevresi koşulları, hem sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu azaltmakta hem de permeabiliteyi artırmaktadır. Bu mikroçevresel ipuçları, bazı nanoparçacıkların yalnızca tümör bölgesinde daha yüksek penetrasyon göstermesine neden olmakta; böylece hedefleme spesifikliği moleküler düzeyde güçlenmektedir (Pardridge, 2020).

Sonuç olarak, BBB'nin geçişine dair moleküler düzeyde ortaya çıkan bu yeni veriler, nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcılarının rasyonel tasarımı için güçlü ipuçları sunmaktadır. Özellikle transkriptomik ve proteomik düzeyde BBB'nin dinamik yapısının daha iyi anlaşılması, glioma gibi zor hedeflenebilir tümörlerde terapötik başarıyı artırabilecek stratejilerin geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.

1.10.5. Özgünlük ve Hipotez

Glioblastoma multiforme, tedaviye dirençli kanser kök hücreleri ($CD133^{+}$) ve immünsüpresif tümör mikroçevresi ile karakterize edilen, oldukça agresif bir beyin tümörüdür. Bu tez çalışması, GBM tedavisinde en büyük zorluklardan biri olan nüks ve kemoterapi direncini; hücre tipi-spesifik transkriptomik yanıtlar, nanoformülasyon temelli hedefleme ve

tümör–çevre ayrımı yapılmış spatial-like (mekansal benzeri) doku analizi üzerinden ele alarak, multidisipliner bir yaklaşımla literatüre özgün katkılar sağlamayı amaçlamaktadır.

Tezin özgünlüğünü belirleyen ilk nokta, insan $CD133^+$ ve WT U87 hücre hatlarıyla oluşturulmuş, stereotaksik enjeksiyon temelli, ortotopik GBM modelidir. Bu modelde fare beyin dokusu içine doğrudan enjeksiyon yapılması sayesinde tümör, doğal mikroçevresiyle birlikte gelişmekte ve bu sayede sistemik dolaşımın, beyin parankim mimarisinin ve BBB'nin etkileri korunarak daha translasyonel bir model elde edilmektedir. Özellikle her bir tümör kesitinden tümör merkezi ve çevresi ayrılarak RNA izolasyonu yapılması, bulk RNA-seq verilerinin spatial biyolojiyi taklit edecek şekilde yorumlanmasını mümkün kılmaktadır.

Modelde kullanılan nude fareler, T hücrelerince eksik olmaları nedeniyle adaptif immün yanıt eksikliği yaratır. Bu durum, makrofajlar, mikrogliya ve doğal öldürücü hücreler gibi doğuştan gelen immün sistem bileşenlerinin daha net analiz edilmesine imkân tanır (Ito vd., 2002). Böylece bu tez, TME'nin bağışıklık dinamiklerini anlamada daha seçici bir pencere sunar ve bağışıklık sistemiyle tümör arasındaki etkileşimi tek yönlü değil, hücre tipi düzeyinde çözümlemeye olanak sağlar.

Bu özgün hayvan modeli üzerinde temozolomid ve karbon bazlı nano dot taşıyıcılarının kombine etkisi değerlendirilecektir. Bu kombinasyonun, özellikle $CD133^+$ hücre alt popülasyonlarına yönelik transkriptomik etkilerinin analiz edileceği bu tezde, kemorezistansın moleküler mekanizmaları çok daha detaylı biçimde ortaya konacaktır (Bao vd., 2006). Ayrıca nano dot'ların BBB'yi geçme potansiyelleri de hücre tipi-spesifik ve bölge bazlı RNA düzeyinde yorumlanarak, taşıyıcı sistemlerin etkinliği gerçek dokusal ortamda değerlendirilecektir (Wilhelm vd., 2016).

Tezin bir diğer önemli katkısı, klasik diferansiyel gen ekspresyonu analizlerinin ötesine geçerek, transkripsiyon faktörü–gen ağı modellemesi, yolak aktivite profillemesi, ve gen imzası skorlaması gibi çok katmanlı biyoinformatik analizlerle yorumlama yapacak olmasıdır. Bu sayede elde edilen veriler, yalnızca gözlemsel değil, fonksiyonel bağlamda da değerlendirilebilecektir.

Son olarak, nano dot temelli TMZ taşıyıcılarının glioma mikroçevresindeki transkriptomik etkilerinin tümör merkezinden çevresine kadar bölgesel düzeyde incelenmesi, literatürde oldukça sınırlı olarak yer bulan bir alanı zenginleştireceği düşünülmektedr. Bu

açıdan tez çalışması, hem hedefli kemoterapi stratejilerinin hem de TME'nin bağışıklık düzenleyici bileşenlerinin yeni nesil omik teknolojilerle birlikte değerlendirilmesini sağlayarak GBM tedavisinde çığır açabilecek bulgulara kapı aralayabilir.

Bütün bu yukarıda sayılan katkıları özetlemek gerekirse; bu tez çalışması, $CD133^+$ kanser kök hücrelerinin, glioblastoma tümör mikroçevresinde terapötik direnci artıran özgün transkriptomik ve immünomodülatör imzalar sergilediğini; bu hücre alt popülasyonunun, temozolomid tedavisine ve kan beyin bariyeri işlevine karşı daha dirençli bir moleküler fenotip ortaya koyduğunu; ayrıca bu direnç mekanizmalarının, karbon-bazlı nano taşıyıcı sistemlerle hedeflenmesi halinde, spatial-like transkriptomik düzeyde kırılabileceğini hipotez olarak ileri sürmektedir. Bu hipotez, ortotopik GBM fare modelinde, $CD133^+$ ve WT tümörlerin tümör merkezi ve çevresinden ayrı ayrı elde edilen doku bölgeleri üzerinden yapılan bulk RNA-seq tabanlı bölgesel analizlere dayanmaktadır. Böylece, tek hücreli bir çözünürlük sağlanmasa da, spatial biyolojiye benzer şekilde mikroçevre ve tümör yoğuluklu konum farklılıkları hücre tipi spesifik düzeyde ayrıştırılarak yorumlanmakta, tümör, çevresi ve terapi yanıtı çok boyutlu olarak değerlendirilmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında kullanılan sarf ve cihaz gereçleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Gereçler listesi

Kategori	Gereç / Malzeme	Marka / Detaylar
Hücre Hatları	U87MG (WT)	ATCC kaynaklı
U87MG-CD133^{+}	FACS ile zenginleştirilmiş hücre hattı	
Hücre Kültürü	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS)	%10 oranında, Gibco	
Penicillin/Streptomycin	%1 oranında, Gibco	
Trypsin-EDTA	Hücre pasajlama için	
T25 ve T75 kültür flaskları	Sarstedt, Falcon vb.	
Hücre sayım lamı ve sayım cihazı	(örn. Thoma lam, Countess)	
Hayvan Modelleri	Nude fareler	BALB/c nu/nu, 6–8 haftalık erkek
Stereotaksik Sistem	Stereotaksik enjeksiyon cihazı	Stoelting Co., dijital kontrollü
Mikrolitre şırınga	Hamilton, 10 µL	
Cerrahi aletler	Mikro makas, penset, retraktör	
İnhalasyon anestezi cihazı	İzofluran ile	
İlaçlar	Temozolomid (TMZ)	Sigma-Aldrich
Karbon Dot (CD) nanoformülasyonu	Klorofil türevi, laboratuvar üretimi	
DMSO	Çözücü	
Doku İşleme ve Boyama	Formalin	%10 NBF (Nötral Buffered Formalin)
Parafin	Embed kasetleri, bloklama cihazı	
Hematoksilen ve Eozin boyaları	H&E boyama için	
Ksilen ve etanol serileri	Dehidratasyon ve saydamlaştırma	
Entellan veya benzeri mounting medyum	Lamel kapatma için	
Lamel ve lam	Mikroskopi için	
Leica DM2500 ışık mikroskobu	Görüntüleme	
Leica DFC350 veya DFC450 dijital kamera	Görüntü kaydı	

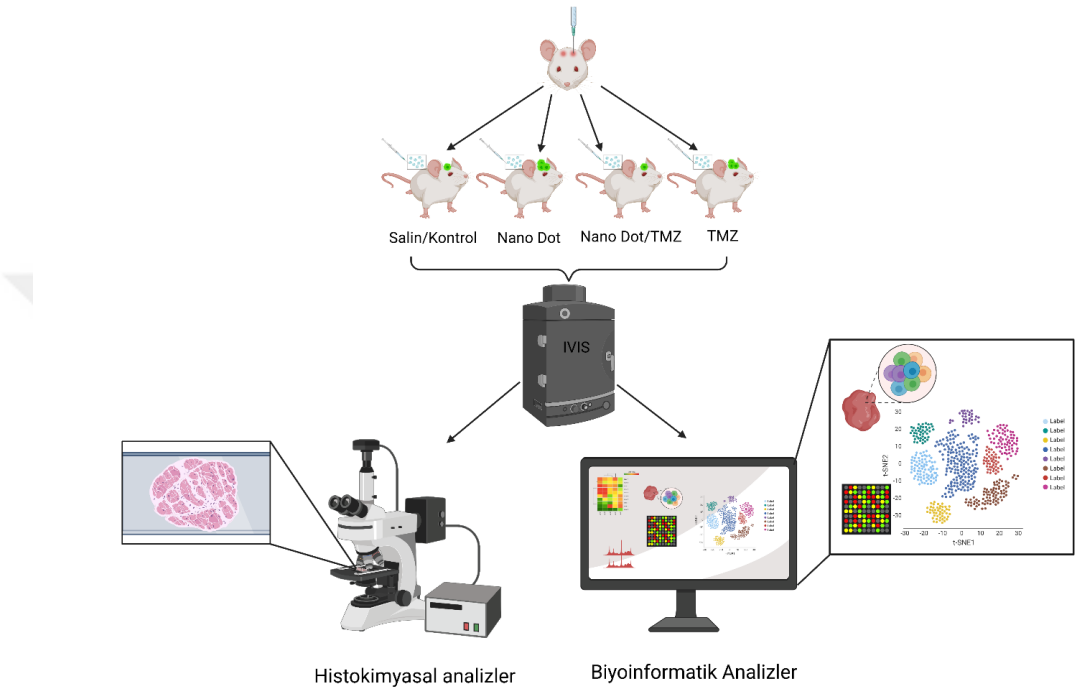
Çizelge 2.1. Devam. Gereçler listesi

Kategori	Gereç / Malzeme	Marka / Detaylar
İmmün Boyama	Antijen geri kazanım tamponları (sitrat tamponu, pH 6.0)	Mikrodalga bazlı geri kazanım
Hidrojen peroksit (%3, metanol ile hazırlanmış)	Endojen peroksidaz inhibisyonu için	
Primer antikorlar (ABCB1, caspase 3, cldn3, SOD1, P53, P21)	Hücre tipi spesifik	Medchem, Abcam
Sekonder antikorlar (fluorofor konjuge)	Alexa Fluor 488, 594 vs.	
DAPI veya Hoechst	Nükleer boyama	
Konfokal mikroskop	Leica TCS SP5/SP8 vb.	
Moleküler Biyoloji	RNA izolasyon kiti	Qiagen RNeasy Micro/Mini Kit
NanoDrop Spektrofotometre	RNA kalitesi ölçümü	
Bioanalyzer veya TapeStation	RIN değer analizi	
cDNA sentez kiti	(örn. SuperScript IV)	
RNA-seq kütüphane hazırlama kiti	Illumina TruSeq veya eşdeğeri	
NGS platformu	Illumina NovaSeq / NextSeq	
Biyoinformatik Yazılımlar	FastQC, STAR, featureCounts, DESeq2	RNA-seq veri işleme
clusterProfiler, topGO, ReactomePA	Yolak analizi	
Cytoscape	Ağ analizi	
R ve Bioconductor paketleri	Gen ekspresyon analizi	
TRUBA (HPC) Sistemi	Yüksek Başarılı ve Grip Hesaplama Merkezi	
Diğer	PBS (phosphate buffered saline)	Tüm inkübasyonlar ve yıkama adımları için
Pipet ve pipet uçları	0.1–1000 µL arası	
Buz kovası, santrifüj, vortex	Genel laboratuvar ekipmanları	

Tez çalışmaları Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü laboratuvarlarında yapılmıştır. *In vivo* deneyler ise Bilkent Üniversitesi UNAM, Deney Hayvanları Bölümü'nde tamamlanmıştır.

Tez kapsamında nude farelere iki farklı genotipteki U87 glioblastoma hücre hatları sterotaksik yöntemle enjekte edilerek gfp/lusiferaz ifade edeln bu hücrelerin takibi IVIS sisteminde takip edildi. Belirli büyüklüğe ulaşan tümörlü fareler CD+TMZ, TMZ, CD olmak üzere 3 farklı terapi ve kontrol grubu olmak üzere grup elde edildi. Tüm gruplardan alınan doku örneklerinden elde edilen kesitler ile histopatolojik değerlendirmeler yapıldı ve CD+TMZ ve kontrol gruplarına ait doku örneklerinden mekansal benzeri RNAseq analizi ile transkriptom verisi elde edildi. Daha sonrasında elde edilen verilerin biyoinformatik analizleri

tamamlandı ve elde edilen moleküler sonuçlardan bazıları birer değerlendirme kriteri olarak belirlendikten sonra hem tranksriptom sonucu olan gruplarda validasyon amacıyla hem de transkriptome analizi yapılamayan diğer terapi grupları immunohistokimya analizleri ile doğrulandı. Tez çalışmasıda yapılan tüm deneysel dizayn Şekil 2.1'deki görsel ile şematize edilerek özetlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çalışmanın genel dizaynını özetleyen görsel

2.1. Nanopartikül Temelli TMZ Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

2.1.1. Kullanılan Nano Dotların Temini

Bu tez kapsamında kullanılan karbon bazlı nano dotlar (CD), klorofil türevi organik bileşiklerden elde edilen, biyouyumlu ve floresan özellik taşıyan nanoyapılardır. Özellikle bitkisel kaynaklı pigmentler, karbonizasyon süreçlerinde yüksek verimle nanoparçacık üretimine olanak tanımakta olup; bu yönüyle çevre dostu, sürdürülebilir ve toksik olmayan sentez stratejilerinin temelini oluşturur. Bu doğrultuda çalışmada tercih edilen karbon dotlar, yüksek oranda klorofil türevleri içeren bir bileşik olan sodyum bakır klorofilin (Sodium Copper Chlorophyllin, Sigma-Aldrich) kullanılarak sentezlenmiştir.

Sentezde, literatürde de yaygın olarak uygulanan aşağıdan yukarıya (bottom-up) karbonizasyon yaklaşımı benimsenmiştir. Bu yöntemde organik öncül madde, kontrollü ısıtma ve piroliz işlemleriyle karbon çekirdekli, fonksiyonel gruplar içeren floresan nanoparçacıklara dönüştürülmektedir (Liu vd., 2019). Kullanılan klorofil türevi, aynı zamanda yakın kızılötesi (NIR) emisyon özellikleri de taşıdığı için, elde edilen CD'ların in vivo görüntüleme potansiyeli de desteklenmiş olmaktadır (Kirbas Cilingir vd., 2024). Bu özellik, hem hücre içi takip hem de biyolojik dokularda penetrasyon kabiliyeti açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada kullanılan klorofil kaynaklı karbon dotlar (Chl-CD), Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Miami Üniversitesi Kimya Bölümü laboratuvarlarında sentezlenmiş ve ilgili protokollerin ardından iş birliği çerçevesinde Türkiye'ye transfer edilmiştir (Kirbas Cilingir vd., 2024). Sentez sonrası ürünler, partikül boyutu, morfolojisi, yüzey yükü (Zeta potansiyel), spektral özellikler (UV-Vis ve floresan spektroskopisi) gibi karakterizasyon adımlarından geçirilmiş ve uygulama öncesi kalite kontrolleri tamamlanmıştır.

Bu tez kapsamında, elde edilen CD'ler temozolomid yüklemesi için taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır. Bu bağlamda, nanoparçacıkların ilaç taşıma kapasiteleri, yüzey fonksiyonelleştirme kabiliyetleri ve biyolojik ortamda kararlılıkları da sistematik olarak test edilmiştir.

2.1.2. Temozolomid ile Yükleme Protokolü

Tez kapsamında kullanılan klorofil-türevli karbon dotlara (Chl-CD), kemoterapötik ajan temozolomid yüklemesi, fiziksel adsorpsiyon temelli bir non-kovalent konjugasyon stratejisi ile gerçekleştirilmiştir. Yükleme işlemi öncesinde, Chl-CD'ler saf suda çözüldü ve ultrasonik banyoda 10 dakika süreyle homojenize edildi. Ardından, temozolomid stoğu dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü ve farklı molar oranlarda (örneğin 1:5, 1:10, 1:20) Chl-CD çözeltisine eklenerek karışım 24 saat boyunca oda sıcaklığında yavaş çalkalamaya bırakıldı. Bu süre zarfında TMZ moleküllerinin, Chl-CD yüzeyindeki fonksiyonel gruplar (örneğin –COOH, –OH) ile hidrojen bağları ve π–π etkileşimleri kurarak bağlanması hedeflendi.

İn vitro ve *in vivo* uygulamalar için optimal yükleme oranını belirlemek amacıyla süpernatanlardan ultraviyole–görünür (UV–Vis) spektroskopik ölçümler yapıldı. TMZ'nin karakteristik 330–340 nm aralığındaki absorbans bandı, yükleme verimliliğinin dolaylı ölçümü için kullanıldı (Kirbas Cilingir vd., 2024).

2.1.3. Nano Dot-TMZ Formülasyonlarının Stabilite ve Fluoresans Analizleri

TMZ yüklü Chl-CD formülasyonlarının kimyasal ve optik stabiliteleri, farklı koşullar altında (pH 5,5 ve 7,4, 4 °C ve 37 °C) zaman serisi boyunca test edilmiştir. Stabilite testlerinde, partikül boyutunun dinamik ışık saçılımı (DLS) ile takibi yapılmış, yüzey yükündeki değişimler zeta potansiyel ölçümleriyle belirlenmiştir. Bu analizler, partikül agregasyonu veya çökelmesi olup olmadığını göstermek açısından kritik önem taşımaktadır.

Optik özelliklerin korunup korunmadığını değerlendirmek amacıyla, floresan spektrumları 600–750 nm aralığında kaydedilmiştir. Özellikle 660–680 nm bandında gözlenen maksimum emisyon, Chl-CD'lerin NIR özelliklerinin korunduğunu ve ilaca bağlı sönümleme (quenching) yaşanmadığını göstermiştir. Ayrıca, yükleme sonrası Chl-CD'lerin fotostabiliteleri, 24 saatlik ışık maruziyeti sonrası ölçülerek karakterize edilmiştir (Kirbas Cilingir vd., 2024).

2.1.4. Kontrollere Ait Formülasyonların Hazırlanması

Deneysel doğruluk ve karşılaştırmalı analizler için negatif kontroller olarak yalnızca Chl-CD içeren formülasyonlar (sadece CD) ve yalnızca temozolomid çözeltisi (sadece TMZ) hazırlandı. Chl-CD'ler saf suda çözülüp filtrelenerek sterilize edildi; bu formülasyonlar, partikül kaynaklı biyolojik etkilerin değerlendirilmesinde kullanıldı. Diğer yandan, temozolomid yalnız başına DMSO içinde çözülerek aynı hacim ve konsantrasyon aralığında hazırlanarak kontrol gruplarına dahil edildi.

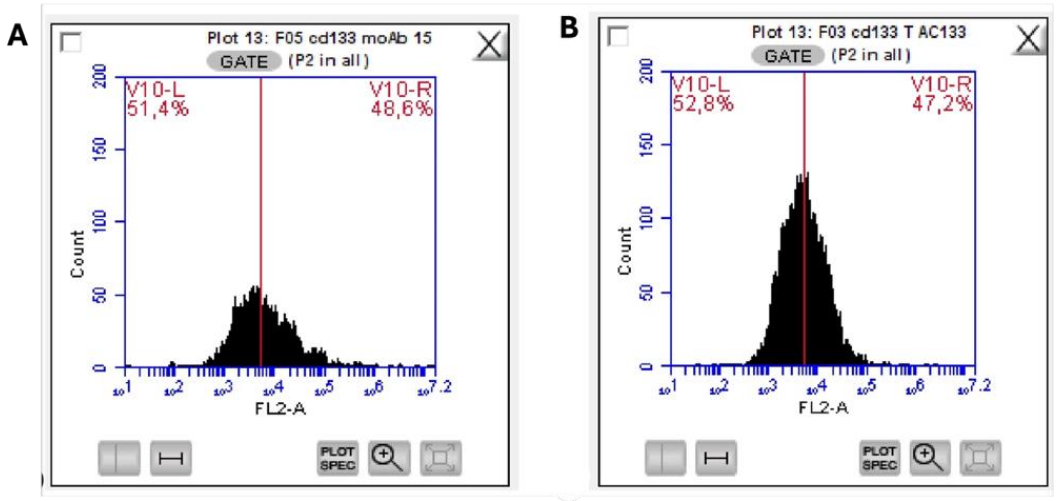
Bu kontrollere ait çözeltiler, tüm hücre kültürü ve hayvan uygulamalarında referans karşılaştırma grupları olarak kullanıldı. Böylece, nano dot yapısının veya taşıyıcılığın etkileri ile doğrudan TMZ'nin farmakolojik etkileri birbirinden ayrıştırılabilir şekilde analiz edilebildi.

2.2. *İn Vitro* Antikanser Etkinlik Analizleri

2.2.1. Hücre Hatlarının Özellikleri

Bu çalışmada glioblastoma mikromimarisi, kemoterapi direnci ve kanser kök hücre ilişkisini in vitro düzeyde modellemek amacıyla iki farklı insan glioblastoma hücre hattı kullanılmıştır: U87-GFP-Luc ve U87-CD133^{+}-GFP. U87-GFP-Luc hücre hattı, klasik U87-MG hattının stabil olarak yeşil floresan protein (GFP) ve lusiferaz genleri ile lentiviral sistem aracılığıyla transdükte edilmiş versiyonudur. GFP etiketi hücresel düzeyde floresan izlemeye olanak tanırken, lusiferaz ekspresyonu özellikle in vivo görüntüleme uygulamaları için biyolüminesans sinyali üretiminde kullanılmaktadır.

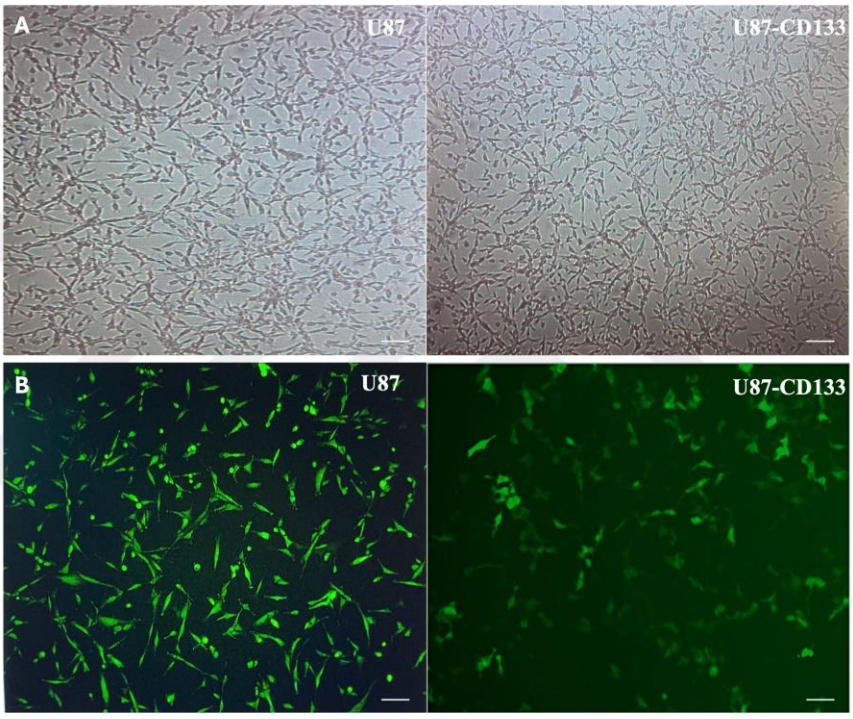
U87-CD133^{+}-GFP hattı ise, CD133 ekspresyonunu artıracak şekilde genetik olarak modifiye edildi, kanser kök hücresi-benzeri fenotip taşıyan bir glioblastoma alt hattıdır. Bu hücreler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu'dan temin edildi. Herhangi bir selektif izolasyon işlemi yapılmamış olup, hücrelerin CD133 ekspresyon düzeyi deney öncesinde flow cytometry (akış sitometrisi) ile doğrulandı. Yapılan analizlerde, hücre popülasyonunun yaklaşık %50'sinin CD133 pozitif olduğu saptanmıştır (Şekil 2.2). Bu sonuçlar, hücre hattının CD133 ekspresyonu açısından zenginleştirilmiş olduğunu göstermektedir (Cetinkaya vd., 2025). Böylece, CSC özellikleri taşıyan stabil bir hücre alt modeli ile klasik tümör hücrelerinin farmakolojik yanıtları karşılaştırmalı olarak incelendi.



Şekil 2.2. CD133^{+} U87 hücre hattının farklı CD133 antikorları ile karakterizasyonu (Çetinkaya vd, 2025).

A ve B panellerinde, sırasıyla PE-konjuge 7D7 ve AC133 antikorları ile yapılan boyamalarda CD133 pozitifliğinin %48,6 ve %47,2 olduğu tespit edildi.

Hücreler yüksek glukozlu DMEM ortamında, %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 antibiyotik–antimiyotik ilavesiyle kültüre edildi. Kültürler %5 CO_2 içeren inkübatörde, 37 °C'de sürdürülmüş, her iki hücre hattı da kontaminasyondan arındırılmış koşullarda 4–10 pasaj aralığında deneylerde kullanıldı (Şekil 2.3A). GFP sinyalleri, canlı hücre floresan mikroskobu (Leica DMi8) ile görüntülendi ve Şekil 2.3B'de gösterildi.



Şekil 2.3. A. Kültürü yapılan hücrelerin ışık mikroskop altındaki gösterimi. B. Kültürü yapılan GFP ifade eden hücrelerin floresan mikroskop altındaki gösterimi

2.2.2. LDH Sitotoksisite Analizi

Bu tez çalışmasında, klorofil türevi CD'lerin ve temozolomid ile yüklenmiş nanoformülasyonlarının (CD+TMZ) glioblastoma hücre hatları üzerindeki olası sitotoksik etkileri Laktat Dehidrogenaz (LDH) salınımına dayalı kolorimetrik yöntem ile değerlendirildi. Hücre membranı hasarı sonrası ortama salınan LDH enziminin miktarı, hücresel toksisite ile orantılı olarak artış gösterdiğinden; bu test, nanoparçacıkların biyolojik güvenliği ve terapötik potansiyelinin karşılaştırılmasında oldukça hassas bir yöntemdir. Ölçümler, CyQUANT™

LDH Cytotoxicity Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Kat. No: C20300) kullanılarak gerçekleştirildi.

U87-GFP-Luc ve U87-CD133^{+}-GFP hücreleri, her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş, 24 saat boyunca %5 CO_2 ve 37 °C koşullarında kültüre edildi. Ardından hücreler iki deney grubuna ayrıldı:

1. Yalnız CD uygulaması (0–500 µg/mL)
2. TMZ yüklenmiş CD (CD+TMZ) – eşdeğer Chl-CD konsantrasyonlarında

Her iki formülasyon, tamamlayıcı medyum içinde 24 saat boyunca uygulandı. İnkübasyon süreleri sonunda, hücreler bir kez PBS ile yıkanarak medyumları tazelenmiş ve ardından her kuyucuğa 10 µL lysis buffer eklendi. Plakalar 37 °C'de 45 dakika inkübe edilmiş, daha sonra süpernatantlar toplanarak 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve üst faz yeni bir plakaya aktarıldı. Reaksiyon karışımı ilavesi sonrası 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon yapılmış, sonrasında absorbans değerleri 680 nm dalga boyunda, mikroplate spektrofotometresi (Synergy HT, BioTek) ile ölçüldü.

Elde edilen veriler pozitif kontrol ile normalize edilerek % sitotoksisite-canlılık olarak ifade edildi. Böylece hem CCD partiküllerinin doğrudan biyouyumluluğu, hem de TMZ yüklü versiyonunun hücre hatlarına etkisi kantitatif olarak değerlendirildi.

2.3. *İn Vivo* Glioblastoma Modelinin Oluşturulması

2.3.1. Hayvan Etik Onayları ve Hayvanların Temini

Tüm in vivo deneysel protokoller, Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından incelenmiş ve onaylanmıştır. Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA'nın yürütücülüğünde planlanan ve 2023/6 karar numarası ile daha önce onaylanan "Nanopartikül Temelli İlaç Taşıma Sistemlerinin Glioblastoma Anti-Kanser Etkinliğinin Omik Yöntemlerle Değerlendirilmesi" başlıklı araştırma protokolünde, deneysel düzenleme değişiklikleri talebi 24.10.2024 tarihli 10. toplantıda görüşülmüş ve 2024/17 karar numarası ile oy birliğiyle kabul edilmiştir (Etik Belge No: 2024/17).

Tüm hayvan çalışmaları, Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde yürütülmüş olup, hayvan temini ve barındırma koşulları aynı birim bünyesinde sağlandı. Çalışmada kullanılan deney hayvanları, ortalama 8–10 haftalık yaşta ve yaklaşık 25 gram vücut ağırlığına ulaşmış, bağışıklık sistemi baskılanmış atimik erkek fareler (BALB/c-nude) olarak belirlenmiştir. Sadece erkek bireyler kullanılarak hormonal değişkenliğin önüne geçilmesi hedeflendi.

Her bir deney grubu için minimum 3 hayvan kullanılmış olup, bu sayı hem istatistiksel güvenilirlik hem de 3R prensiplerine uygunluk çerçevesinde belirlendi. Hayvanlar, sabit sıcaklık (22 ± 2 °C) ve nem oranı (%50–60) olan, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde tutulan standart koşullarda barındırıldı. Deney süresince tüm prosedürler, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi ve Avrupa Konseyi'nin 2010/63/EU direktifine uygun şekilde yürütülmüş, hayvan refahı en üst düzeyde korundu.

2.3.2. İntrakranyal U87 ve CD133+ Tümör Enjeksiyon Protokolü

Bu tez çalışmasında in vivo glioblastoma modeli oluşturmak amacıyla, immünsüprese (nude) erkek BALB/c-nude farelere, insan glioblastoma hücrelerinin stereotaksik olarak intrakraniyal enjeksiyonu gerçekleştirildi. Tüm uygulamalar, Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi bünyesinde, etik kurul onayı (Karar No: 2024/17) doğrultusunda ve veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirildi.

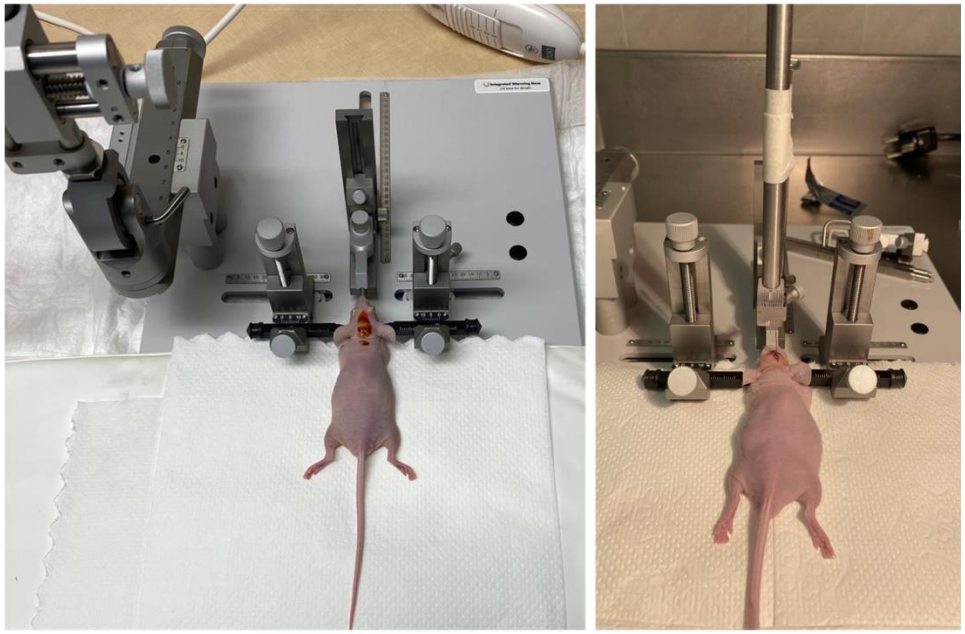
Toplamda 24 deney hayvanı, U87-GFP-Luc ve U87-CD133^{+}-GFP olmak üzere iki farklı glioblastoma hücre hattı ile tümör oluşturmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde tedavi ve kontrol alt kollarına bölündü. Hücre enjeksiyonları öncesinde, hücreler kültür ortamından toplanarak sayılmış ve 1×10^5 hücre olacak şekilde hazırlandı. Hücreler, steril %0,9 salin solüsyonu içinde 10 µL hacimde süspanse edildi.

Anestezi uygulaması, intraperitoneal olarak ketamin (80 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) kombinasyonu ile sağlandı. Anestezi derinliği refleks kontrolleri ile doğrulandıktan sonra, fareler özel stereotaksik aparata alınmış ve kafatası bölgeleri iyotlu antiseptik ile dezenfekte edildi. Bregma referans noktası esas alınarak, hedef enjeksiyon bölgesi olarak belirlenen serebral korteksin subkortikal alanına, koordinatlar yardımıyla yönlenildi (Cecyn ve Abrahao, 2023). Hücre enjeksiyonu için hedeflenen intrakraniyal bölge, önceki çalışmalarla uyumlu şekilde bregma noktasından 1,0 mm anterior ve 2,5 mm lateral olarak belirlendi (de

Lázaro vd., 2021). Bu koordinatlar, özellikle kortikal-subkortikal düzeyde glioblastoma oluşumunu modelleyebilmek için yaygın olarak tercih edilen bir bölgeyi işaret etmektedir. Dikey derinlik, iğne ucunun hedeflenen subkortikal alana ulaşmasını sağlamak üzere dikkatle ayarlandı ve enjeksiyonun homojen şekilde dağılımı için mikroenjeksiyon hızı sabit tutuldu. Bu lokalizasyon, fare beyin anatomisinde motor korteksin alt tabakalarında birikim gösteren insan glioblastoma hücrelerinin tutunma ve tümör oluşturma başarısını optimize etmek amacıyla seçildi.

Hücre enjeksiyonu, Guanj mikroenjeksiyon sistemi kullanılarak, 26-gauge kalınlığında Hamilton mikroiğne aracılığıyla gerçekleştirildi. Her hayvana yalnızca bir enjeksiyon yapılmış ve enjeksiyon hızı sabit tutularak minimum mekanik hasar hedeflendi. İşlem sonrası iğne birkaç dakika yerinde tutulmuş, ardından yavaşça çıkarıldı. Enjeksiyon sonrasında hayvanlar ısıtıcı ped üzerinde gözlemlendi ve anesteziden tamamen uyanmaları sağlandı.

Postoperatif süreçte, hayvanlar günlük olarak izlenmiş; nörolojik defisitler, vücut ağırlığı kaybı, konvülsiyon, letarji gibi parametreler veteriner hekimler tarafından dikkatle takip edildi. Tüm enjeksiyonlar, daha önce benzer modellemelerde başarıyla görev almış, deneyimli araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiş ve bu sayede uygulama standartlarının yüksek düzeyde korunması sağlandı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Sterotaksik sistem manipülasyonu ve intrakraniyal enjeksiyon sırasında çekilen görüntüler

Bu prosedür, glioblastomanın ortotopik, tek odaklı ve insan kaynaklı bir tümör modeli çerçevesinde, hem $CD133^+$ kök hücre karakterli hem de klasik U87 hücrelerine dayalı iki farklı tümör mikromimarisi oluşturulmasına olanak tanımıştır. Model, sonraki in vivo tedavi ve moleküler analiz aşamaları için translasyonel olarak uygun bir platform sunmuştur.

2.3.3. Tümör Oluşumunun GFP ve Lüsiferaz Temelli Takibi

İntrakranyal tümör modelinin oluşturulmasının ardından, glioblastoma hücrelerinin beyin içerisinde başarılı şekilde tutunup proliferatif koloni oluşturduğunun doğrulanması amacıyla, tümör progresyonu in vivo biyolüminesans görüntüleme ve GFP temelli görselleştirme teknikleriyle izlendi. Bu amaçla, deney gruplarında yer alan fareler belirli aralıklarla IVIS Spectrum (PerkinElmer, MA, ABD) cihazı kullanılarak görüntülendi.

Tümör oluşumunun takip edildiği IVIS taramaları, implantasyondan sonraki ilk haftadan itibaren haftalık periyotlarla gerçekleştirildi. Görüntüleme öncesinde hayvanlar, isofluran gaz anestezisi ile güvenli şekilde sedatize edildi (%3–5 indüksiyon, %1–3 idame). Her görüntüleme seansında hayvanlar sabit sıcaklıktaki platform üzerine yerleştirildi, optimum pozisyonlandırma sonrası önce GFP floresan, ardından lusiferin uygulamasını takiben biyolüminesans sinyal elde edildi.

Kullanılan U87-GFP-Luc hücreleri, hem GFP hem de lusiferaz genlerini stabil olarak ifade etmekte olup, bu sayede canlı görüntüleme altında tümör kütlesinin hem floresan hem de biyolüminesans sinyal ile izlenebilmesini mümkün kılmaktadır. Tümör implantasyonundan itibaren, haftalık periyotlarla yapılan IVIS taramalarıyla tümörün lokalizasyonu, büyüklüğü ve sinyal yoğunluğu dinamik olarak takip edildi.

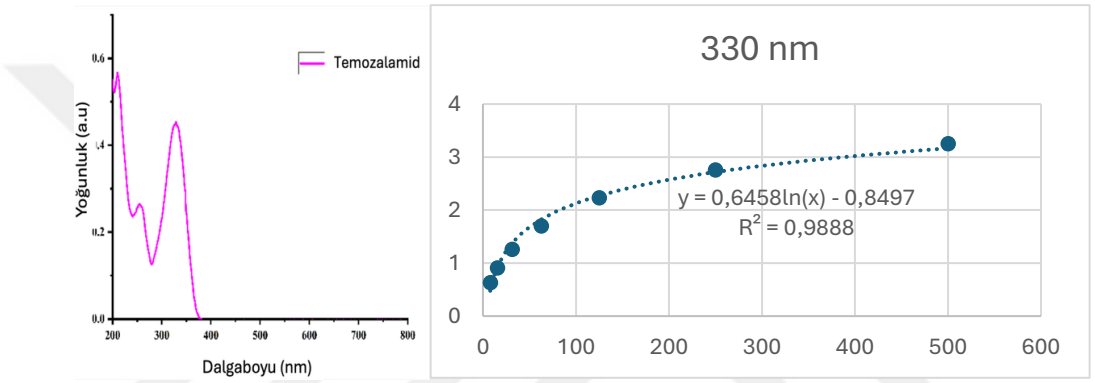
Biyolüminesans görüntüleme için, farelere enjeksiyondan yaklaşık 10 dakika önce D-Lusiferin potasyum tuzu (150 mg/kg, i.p.) uygulanmıştır. Anestezi altında tutulan hayvanlar IVIS cihazına yerleştirildi ve görüntüleme, belirlenen ışık şiddeti ve poz süresi ayarlarında gerçekleştirildi.

2.3.4. Tedavi Gruplarının Tanımlanması ve Uygulama Şeması

İn vivo tedavi protokolü kapsamında, deney gruplarına uygulanan doz ve formülasyon içeriği, önceki literatürler ve *in vitro* doz-cevap analizleri göz önünde bulundurularak optimize edildi. CD, TMZ ve CD+TMZ formülasyonlarının her birine ait uygulama dozları, karbon dot

miktarına ve karbondotun taşıdığı TMZ miktarına göre belirlendi ve enjeksiyon hacmi 100 µL olarak sabitlendi.

Yalnız CD grubu, her enjeksiyonda 200 µg CD/100 µL dozunda, fizyolojik salin içerisinde çözündürülerek intraperitoneal yoldan uygulandı. CD+TMZ grubunda ise her enjeksiyon için yine 200 µg CD içeren bir formülasyon kullanılmış, bu formülasyonun içerdiği yaklaşık 30 µg TMZ yükü, laboratuvar içi spektrofotometrik optimizasyon analizi ve literatürle uyumlu hesaplamalar temel alınarak belirlendi (Şekil 2.5). Belirlenen bu TMZ miktarınca da sadece TMZ grubunun uygulaması yapıldı.



Şekil 2.5. Temozalamidin belirlenen dalga boyunda yapılan ölçümlere göre spektrofotometrik lineer regresyon eğrisi

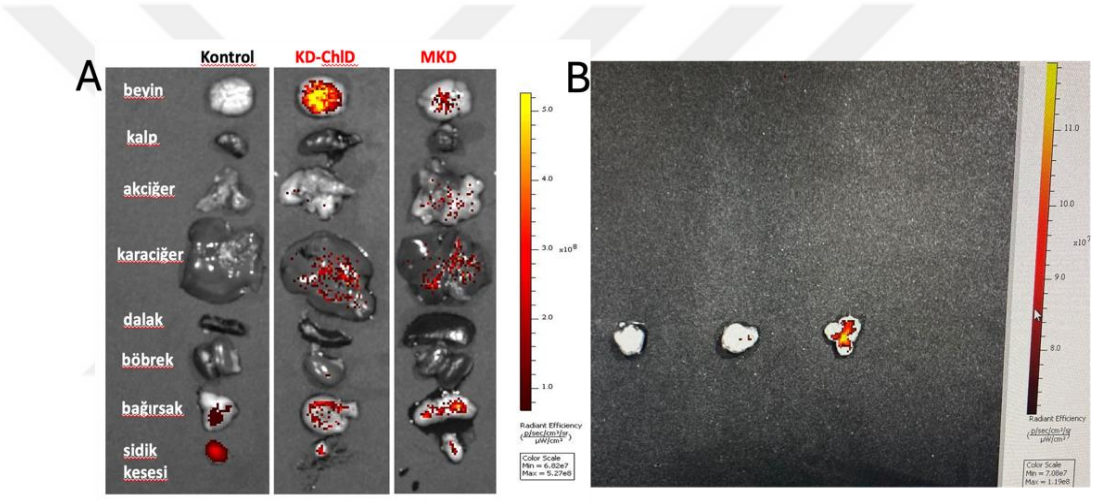
Uygulamalar, tümör oluşumunun IVIS ile doğrulanmasının ardında, 48 saat sonra enjeksiyonlar yapıldı. Enjeksiyonlar intraperitoneal iv olarak yapıldı ve doz uygulamasından sonra hayvanlar günlük olarak ağırlık, motor aktivite ve nörolojik parametreler açısından izlendi. Farelerde herhangi bir akut toksisite veya hayati bozulma izlenmedi.

2.3.5. Karbon Dot Biyodağılım

Karbon dotların *in vivo* biyodağılım profili ve hedef doku birikimi, floresan özelliklerinden yararlanılarak IVIS Spectrum (PerkinElmer, MA, ABD) görüntüleme sistemi ile değerlendirildi. Uygulama sonrası 6, 12 ve 24. saatte görüntüler alındıktan sonra 24. saat sonunda deney hayvanları etik onaylara uygun şekilde sakrifiye edilerek, başta beyin, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve kalp olmak üzere tüm ana organlar dikkatlice diseke edildi ve floresan görüntülemeye uygun şekilde hazırlandı.

Yalnız CD grubu hayvanlarında, organlar doğrudan IVIS platformuna yerleştirilerek kırmızı bölgedeki emisyon sinyali (exc: 640 nm / em: 700 nm) üzerinden görüntülendi. Bu sayede karbon dotların farklı organlarda gösterdiği birikim dereceleri değerlendirildi.

CD+TMZ grubu farelerinde ise biyodağılım analizi doğrudan tümör implantasyon bölgesi olan beyin dokusuna odaklanarak gerçekleştirildi. Sakrifikasyon sonrası izole edilen beyin dokuları, ex vivo IVIS görüntüleme işlemine tabi tutuldu. Böylece taşıyıcı partiküllerin tümör bölgesine yönelimi ve lokal birikimi değerlendirilmiş oldu. Bu görüntüleme verileri, uygulanan nanoformülasyonların *in vivo* davranışını mekânsal düzeyde incelemek, hedefleme potansiyelini doğrulamak ve tedavi grupları arasındaki dağılım farklılıklarını görselleştirmek amacıyla kullanıdı (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. A CD-ChlD ve MCD enjekte edilimiş BalbC farelerde 24. saat IVIS organ görüntüleri, B CD+TMZ uygulanmış farelerin beyinlerinin 24. saat görüntüleri

2.4. Histopatolojik Değerlendirmeler

2.4.1. Organ Toplama ve Doku Hazırlama

Tedavi uygulamalarının ardından, deney gruplarındaki hayvanlar etik protokol doğrultusunda sakrifiye edildi. Sakrifikasyon işlemi, derin anestezi altında kardiyak ponksiyon ile eksanguinasyon şeklinde gerçekleştirildi; ardından sistematik doku toplama işlemine geçildi.

Makroskopik histopatolojik değerlendirmeler ve biyodağılım analizlerine olanak sağlamak amacıyla, her hayvandan başta beyin, karaciğer, böbrek, dalak, akciğer ve kalp olmak üzere majör organlar dikkatlice diseke edilerek ayrı steril plaklara yerleştirilmiştir.

Beyin dokusu ayrıca tümör bölgesinin histolojik sınırlanmasını kolaylaştırmak amacıyla koronal düzlemde orta hattın her iki yanından simetrik şekilde ikiye bölünerek alındı.

Toplanan tüm dokular, %10'luk nötral tamponlanmış formalin solüsyonu içinde en az 24–48 saat boyunca fiksasyona bırakılmıştır. Bu süreç, hem doku bütünlüğünün korunmasını hem de parafin blok aşamasında mikroskobik detayların kaybolmamasını sağlamak adına kritik bir adımdır.

Bu süreci takiben asıl araştırma konusuna odaklanılarak beyin örnekleri alınarak, gruplara ve hayvan kodlarına göre etiketlenmiş; dokuların konumlandırılması, tümör ve çevre bölge ayrımını doğru yapabilmek için detaylı bir şekildde kayıt altına alınmıştır.

2.4.2. Histolojik Değerlendirmeler: Genel Morfoloji

Toplanan tüm beyin ve organ dokuları, %10'luk nötral tamponlanmış formalin solüsyonunda en az 18 saat süreyle fiksasyona bırakıldıktan sonra, sırasıyla dereceli alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek parafin blok haline getirildi. Bloklanan dokulardan 4–5 µm kalınlığında kesitler, poly-L-lizin kaplı lamlar üzerine alındıktan sonra 37 °C etüvde bir gece boyunca kurutuldu.

Kesitlerin genel morfolojik yapısını değerlendirmek amacıyla Hematoksilen&Eozin (H&E) boyama işlemi uygulandı. Bu kapsamda, çekirdek yapıların seçici olarak mavi-mor tonlarında boyanması amacıyla lamlar hematoksilen solüsyonunda 5–10 dakika inkübe edilmiş, ardından musluk suyu ile yıkanmdı ve 1 dakikalık asidik çözelti ile farklılaştırıldı. Sitoplazmik yapılar ise eozin ile 3 dakika süreyle boyanarak pembe tonlar kazandırıldı. Boyama sonrası kesitler, dereceli alkol serilerinde dehidrate edilip ksilol ile saydamlaştırıdı ve Entellan ile lamel altında kapatıldı. Hazırlanan preparatlar, Leica DM2500 ışık mikroskobu ile incelendi ve Leica DFC350/450 dijital kamera ile görüntülendi (Fischer vd., 2008).

İmmünofloresan analizler kapsamında, dokular deparafinizasyon ve rehidrasyon adımlarından geçirildi, ardından %3'lük H_2O_2 (metanolle hazırlanmış) çözeltide 20 dakika inkübe edilerek endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi. Antijen geri kazanımı için 0,01 M sitrat tamponu (pH 6,0) içeren mikro dalga şalesine yerleştirilen lamlar, 600 W gücünde mikrodalga fırında 4 kez 5 dakika ısıtılarak epitoplar açığa çıkarıldı. Kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğutulduktan sonra, PBS ile yıkanarak çevreleri PAP pen ile çevrilmiş ve non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla %10 normal fare serumu ile bloklanmıştır (Ramos-Vara, 2005).

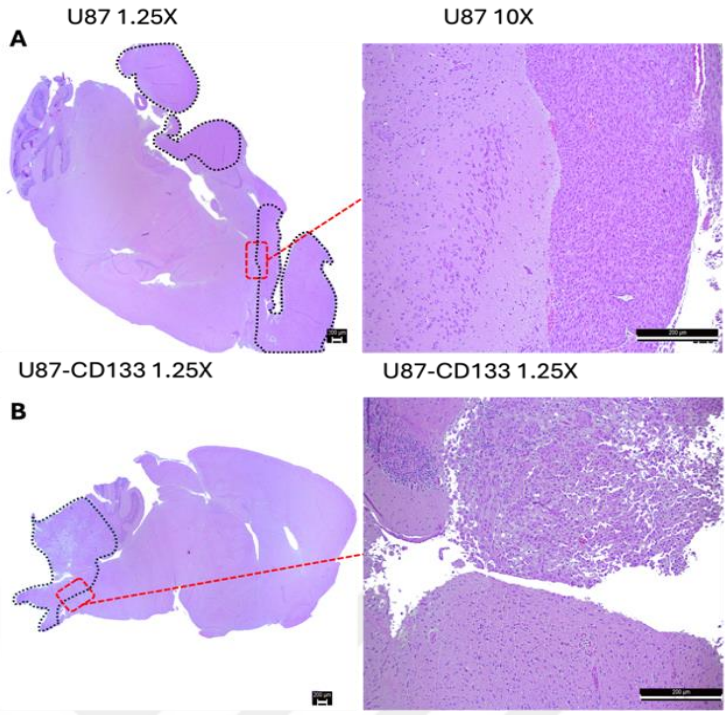
2.5. Omik Tabanlı Moleküler Analizler

2.5.1. Tümör ve Tümör Çevresinden Doku Alma ve Ayrıştırma

Histolojik analizler ve kesitlerin analizler için hazırlanması süreçlerinin hepsi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında Doç.Dr. Ahmet Ceylan gözetiminde gerçekleştirilmiştir.

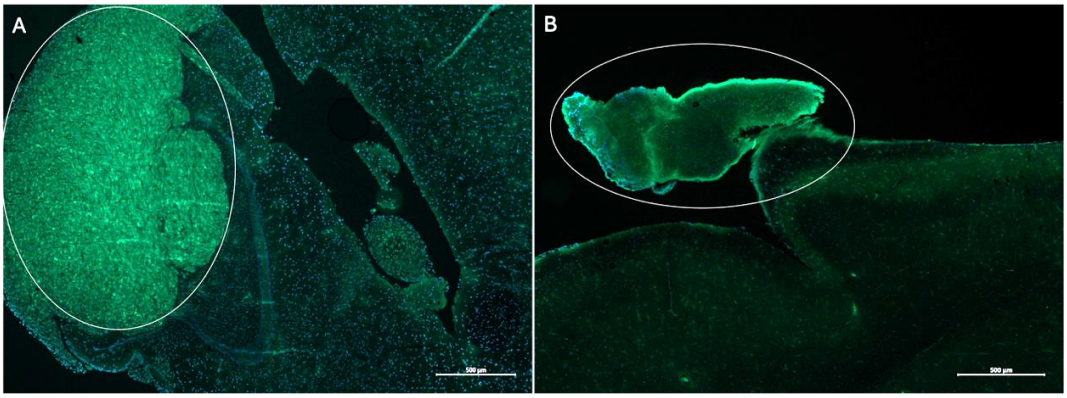
Glioblastoma hücrelerinin serebral kortekse başarılı şekilde enjeksiyonu sonrasında gelişen intrakranyal tümör oluşumu, hem GFP floresan sinyali hem de Hematoksilen&Eozin (H&E) boyalı histolojik kesitlerle doğrulandı. GFP+ tümör hücrelerinin yoğunluk gösterdiği bölgeler, stereolojik olarak tümör kitlesi olarak tanımlanırken, bu bölgelerin hemen çevresinde yer alan ancak GFP sinyali göstermeyen doku alanları tümör çevresi (peritümoral alan) olarak kabul edildi.

Tümör ve çevresel mikroçevre ayrımını doğru yapabilmek amacıyla, *in vivo* izlem sonrası sakrifiye edilen farelerin beyin dokuları, koronal düzlemde dikkatlice kesildi ve tümör odaklarını içerecek şekilde parafin bloklar oluşturuldu. Elde edilen 5 µm'lik kesitler hem genel morfolojiyi ortaya koymak hem de moleküler analizler için bölgeleri net şekilde tanımlamak üzere H&E ile boyandı. Bu kesitlerde tümör kitlesi ve çevresel doku arasındaki sınırlar hücre yoğunluğu, çekirdek morfolojisi, vasküler yapı değişimi ve doku düzeni gibi parametrelere göre mikroskobik olarak belirlendi (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. U87 hücreleri ile elde edilen glioblastome modelinden alınan kesitlerinin 1,25x ve 10x H&E görüntüleri. B U87 hücreleri ile elde edilen glioblastome modelinden alınan kesitlerinin 1,25x ve 10x H&E görüntüleri

Ayrıca, GFP+ sinyal veren U87 ve U87-CD133^{+} hücrelerinin *in vivo* ekspresyonu, tümör dokularında net bir şekilde gözlendi, bu floresan yoğunluklar tümör–çevre ayrımı için ek görsel destek sağlandı (Şekil 2.8). GFP pozitif bölgeler, Spatial-transkriptomik benzeri yaklaşım için referans alındı; bu bölgelerden tümör çekirdeği, çevresindeki sinyal-negatif dokulardan ise peritümoral mikroçevre dokuları seçilerek ayrıştırıldı.



Şekil 2.8. A U87 hücre hattı ile oluşturulan glioblastoma modelinden elde edilen beyin dokusu kesitine ait konfokal mikroskop görüntüsü. B U87-CD133 hücre hattı ile oluşturulan glioblastoma modelinden elde edilen beyin dokusu kesitine ait konfokal mikroskop görüntüsü

Her fareden ayrı ayrı tümör ve çevre dokular manuel mikrodiseksiyon ile ayrıldıktan sonra, ilgili alanlara ait kesitler RNA izolasyonu için hazırlandı. Bu ayrıştırma işlemi sırasında doku bütünlüğü, RNaz kontaminasyonuna karşı önlemler alınarak korundu. Her örnek, spatial karakteristiğe uygun şekilde kategorize edilerek aşağıdaki analiz aşamalarında "Tümör" ve "Tümör Çevresi" olarak etiketlendi.

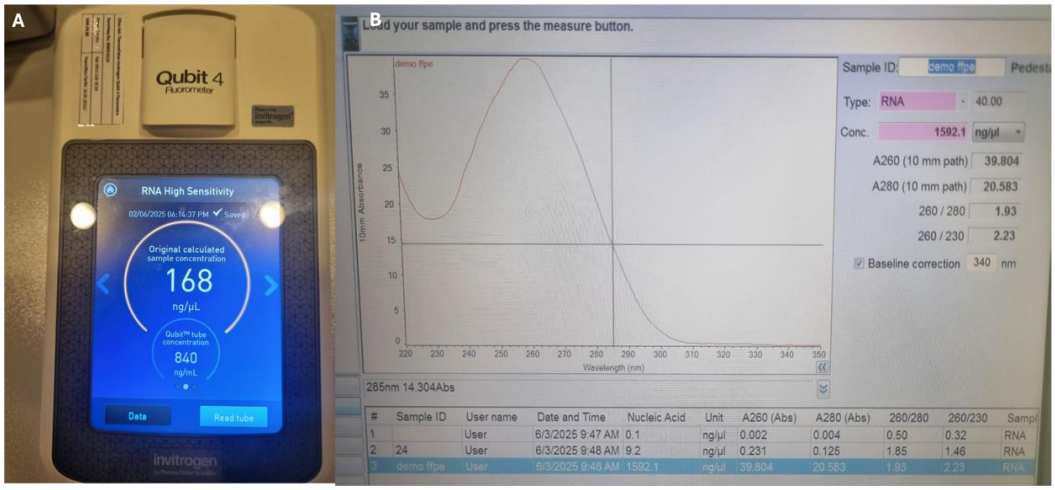
2.5.2. RNA İzolasyonu ve Değerlendirilmesi

Parafin bloklardan ayrıştırılan tümör ve tümör çevresi dokularından toplam RNA izolasyonu, yüksek kaliteli transkriptomik analizler için optimize edilmiş protokoller doğrultusunda gerçekleştirildi. FFPE (formalin-fikslenmiş parafin gömülü) dokulardan RNA izolasyonu için RNaz kontaminasyonuna karşı steril koşullarda çalışıdı, her bir bölgeye özgü kesitler ayrı mikrodiseksiyonla alındı.

İzolasyon işlemi, FFPE dokulara özel bir kit kullanılarak (Qiagen RNeasy FFPE Kit) yapılmış; deparafinizasyon, proteinaz K ile doku sindirimi ve ardından silika membran temelli saflaştırma adımları takip edildi. Elüsyon RNaz-free su ile gerçekleştirildi.

İzole edilen RNA'ların kantitatif değerlendirmesi için Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) cihazı ve RNA High Sensitivity kit kullanıldı. Temsili olarak gösterilen bir örneğin Qubit ile ölçülen RNA konsantrasyonu 168 ng/µL olarak kaydedildi (Şekil 2.9A). Bu değer, Qubit'in interkalant boya temelli hassas ölçüm yöntemi sayesinde yalnızca çift sarmallı RNA'ya spesifik konsantrasyonu göstermektedir. Diğer örneklere ait RNA analizleri de tamamlanarak 30 ng/µL ve üzeri olan örnekler ile çalışılmaya devam edildi.

RNA örneklerinin niteliksel değerlendirmesi ise NanoDrop ND-1000 spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. A260/280 oranı ~1,93 ve A260/230 oranı ~2,23 olarak ölçülmüş olup bu değerler RNA saflık kriterlerini karşılamaktadır (Şekil 2.9B). Konsantrasyon değeri ise bu örnekte 1592 ng/µL olarak tespit edildi. NanoDrop ölçümleri, özellikle kontaminantlara karşı genel bir izlenim sunmak açısından tamamlayıcı değerlendirme aracı olarak kullanıldı. A260/280 oranı ve A260/230 oranı 1,8 ile 2,3 arasında olan örneklerle çalışmalara devam edildi.



Şekil 2.9. A Bir tümör örneğinin qubit analizine ait görsel. B Bir TME örneğinin nanodrop ölçüm görüntüsü

İki farklı sistemin karşılaştırmalı olarak kullanılması, hem RNA bütünlüğü hem de saflığının kapsamlı bir şekilde kontrol edilmesini sağladı. Bu çift değerlendirme yaklaşımı, özellikle FFPE kaynaklı RNA örneklerinde yaygın görülen parçalanma ve kontaminasyon problemlerini minimize etmeye yönelik güvenilir bir yallaşım sundu.

2.5.3. Kütüphane Hazırlığı ve Sekanslama İşlemi

RNA izolasyonu başarıyla tamamlanan ve kalite kontrol adımlarından (konsantrasyon, saflık oranları) geçen örnekler, transkriptomik profil analizi için kütüphane hazırlama sürecine dahil edildi. FFPE dokulardan elde edilen RNA'ların fragmente doğası göz önüne alınarak, bu tür örnekler için özel olarak optimize edilmiş bir kütüphane hazırlama kiti tercih edildi. Bu tez kapsamında kullanılan kit, düşük miktarda ve kısmen parçalanmış RNA örnekleri ile uyumlu olan NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, MA, ABD) oldu.

Kütüphane hazırlama süreci, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde şu adımlarla gerçekleştirilmiş olup Genoks firmasıyla iş birliği halinde gerçekleştirilerek hizmvdımı şeklinde tamamlandı.

1. rRNA Deplesyonu / mRNA Zenginleştirme: FFPE örneklerden elde edilen RNA'lar için ribozomal RNA'yı uzaklaştırmak amacıyla özel rRNA depletion modülü uygulandı. Bu adım, kodlayan transkriptlerin daha verimli sekanslanmasını sağlamak amacıyla kritik önem taşımaktadır.

2. Fragmentasyon ve cDNA Sentezi: rRNA'sı uzaklaştırılmış RNA'lar, random priming ile fragmente edilerek, çift sarmallı cDNA sentezine dönüştürüldü. Reverse transcription işlemi, yüksek verimlilik sağlayan M-MuLV reverse transcriptase ile gerçekleştirildi.

3. End Repair, A-Tailing ve Adapter Ligation: cDNA uçları enzimatik olarak düzgün hale getirildi, ardından A-tailing işlemi ile adaptör ligasyonu için uygun yapı oluşturuldu. Her örneğe özel indeks barkod adaptörleri liglenerek örneklerin aynı sekanslama lane'inde karıştırılmasına olanak tanındı (multiplexing).

4. PCR Amplifikasyonu ve Temizleme: Ligasyon sonrası kütüphaneler, minimum döngü sayısıyla PCR ile çoğaltılmış, ardından AMPure XP beads ile temizlenerek saflaştırıldı. Kütüphane kalitesi Bioanalyzer 2100 cihazı ile değerlendirildiğinde, beklenen 250–450 bp aralığında tepe profilleri elde edildi.

5. Konsantrasyon Tayini ve Normalizasyon: Her kütüphane, Qubit Fluorometer ile konsantrasyon açısından ölçülmüş, eşit miktarda DNA içerecek şekilde normalize edilerek sekanslama için havuzlandı.

Sekanslama işlemi, dış hizmvdımı yoluyla gerçekleştirilen Illumina NovaSeq 6000 platformunda, paired-end 2 × 150 bp okuma uzunluğu formatında yapılmıştır. Her örnek için ortalama 40–50 milyon okuma hedeflendi. Bu derinlik, düşük bolluklu transkriptlerin güvenilir şekilde tespiti ve diferansiyel ekspresyon analizlerinde istatistiksel anlamlılık sağlayacak gücü sunmaktadır.

2.6. Biyoinformatik Analizler

Bu analizler sürecince elde edilen deneysel verilerin değerlendirilmesi, R ve Python tabanlı istatistiksel analiz ve görselleştirme ortamları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri düzenleme ve temel istatistiksel karşılaştırmalar için R dilinde *tidyverse*, *dplyr*, *stats* ve *ggpubr* paketleri; görsel sunumların hazırlanmasında ise *ggplot2*, *pheatmap* ve *ComplexHeatmap* kütüphanelerinden yararlanılmıştır. Python ortamında ek grafiksel doğrulamalar *matplotlib* ve *seaborn* paketleri ile yapılmıştır. Gruplar arası farkların belirlenmesinde bağımsız örneklem t-testleri ve tek yönlü ANOVA analizleri uygulanmış, çoklu karşılaştırmalarda *post-hoc* testler kullanılmıştır. H-score verileri için ortalama ± standart hata (SEM) değerleri hesaplanmış ve anlamlılık düzeyleri p-değerlerine göre sınıflandırılmıştır. Tüm grafikler, karşılaştırmaların hem nicel hem de görsel olarak açık biçimde sunulabilmesi amacıyla standart hata çubukları

ve ilgili p-değerleri eklenerek oluşturulmuştur. Analiz süreci boyunca kullanılan tüm kodlar yeniden üretilebilirlik ilkesi doğrultusunda yapılandırılmıştır.

2.6.1. Kalite Kontrol: FastQC, MultiQC

RNA-seq verilerinin güvenilirliği, downstream analizlerden önce uygulanan kalite kontrol adımlarının titizlikle yürütülmesine bağlıdır. Bu doğrultuda, Illumina NovaSeq 6000 platformu ile elde edilen ham FASTQ verileri, ilk olarak FastQC (v0.11.9, Babraham Bioinformatics) yazılımı ile kalite açısından değerlendirildi.

FastQC analizi kapsamında her bir örnek için:

Tüm baz pozisyonları boyunca ortalama kalite değerleri hesaplandış, Q30 üzerinde kalan örnekler yüksek kalite olarak kabul edildi. A/T/G/C oranları grafiksel olarak değerlendirildi, adaptör kontaminasyonu ve dizileme yanlılıkları tarandı. Örneklerin beklenen organizmaya (insan/mouse) ait referans GC profiliyle uyumu gözlemlendi. Tekrarlı okuma oranları ve sekans uzunluğu profilleri belirlendi. Adaptör dizileri, primer kalıntıları veya kontaminant diziler analiz edildi.

Tüm örneklere ait FastQC çıktıları topluca değerlendirilmek üzere MultiQC (v1.12) aracı ile birleştirildi. MultiQC, farklı örneklerin kalite metriklerini karşılaştırmalı olarak tek bir raporda sunarak örnekler arası varyasyonu görselleştirmeye olanak tanımaktadır.

Yapılan değerlendirme sonucunda, dizileme kalitesinin genel olarak yüksek olduğu ve örneklerin bioinformatik analizler için yeterli veri kalitesine sahip olduğu tespit edildi. Gerektiğinde, low-quality read'ler ve adaptör sekansları, fastp aracı kullanılarak temizlendi ve bu adım sonrası yeniden FastQC analizi yapılarak kalite iyileştirmesi doğrulandı.

2.6.2. Alignment ve Sayım: STAR/HISAT2, HTSeq

Ham FASTQ verileri kalite kontrol ve trimming işlemlerinden geçirildikten sonra, sıralı analiz sürecinde ilk adım olarak hizalama (alignment) gerçekleştirildi. Bu tez çalışmasında tümör dokusu olarak insan hücrelerinden (U87 ve U87-CD133^{+}) elde edilen kesitlerdeki transkriptom verileri insan referans genomu GRCh38 ile, peritümoral mikroçevreyi temsil eden doku örnekleri ise fare referans genomu GRCm39 ile hizalandı. Bu farklı referans stratejisi, xenograft modellerin karma doğasına uyum sağlamak ve okuma

haritalama doğruluğunu artırmak amacıyla uygulandı (Göcz vd., 2025; Nichterwitz vd., 2018; Sheng vd., 2025).

İnsan verileri için hızlı ve doğruluk oranı yüksek olan HISAT2 (v2.2.1) yazılımı tercih edildi. Fare örneklerinde ise bazı örneklerde eş zamanlı STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference) algoritması ile paralel kıyaslamalar yapıldı. Her iki durumda da hizalama çıktıları SAM/BAM formatına dönüştürülerek indekslenmiş, hizalama istatistikleri samtools flagstat ve Qualimap araçlarıyla değerlendirildi.

Gen seviyesinde sayım işlemleri için, referans gen anotasyon dosyaları (GTF formatında) kullanılarak HTSeq-count (v0.13.5) aracı ile her bir gende kaç adet okumanın hizalandığı belirlendi. Bu işlemde union modunda sayım yapılmış ve sadece "uniquely mapped read" okumaları dahil edildi. Elde edilen sayım matrisi, diferansiyel ifade analizlerine temel oluşturdu. Bu işlemlerin hepsi Tübitak yüksek hızlı bilgisayar sistemi olan TRUBA üzerinden linux işletim sistemi ile tamamlandı.

2.6.3. Diferansiyel Gen İfadesi Analizi: DESeq2

Sayım matrisi, daha sonra DESeq2 (v1.38.3) paketinin kullanıldığı diferansiyel gen ifadesi (DEG) analizine dahil edilmiştir. Analizler, R ortamında yürütülmüş ve örnekler arasındaki biyolojik varyasyonları kontrol eden normalize edildi sayım değerleri kullanıldı. Normalizasyon işlemi, DESeq2'nin varsayılan "median-of-ratios" yöntemiyle gerçekleştirildi ve dispersiyon değerleri örnekler arasında karşılaştırılabilir hale getiridi.

Her bir karşılaştırma için log2 kat değişimi (log2FC) ve adj. p-value (Benjamini-Hochberg FDR) hesaplanmış, istatistiksel olarak anlamlı genler (padj < 0,05 ve |log2FC| > 1) farklı gruplarda saptandı. Bu analizde tedaviye karşı verilen yanıtları içeren transkriptlerin ortaya çıkarılması hedeflendi. Elde edilen sonuçlar, volkan plotları ve ısı haritaları ile görsel olarak sunuldu. Ayrıca örnekler arası varyasyonu ve örneklerin kümeleşme yapısını anlamak amacıyla Principal Component Analysis (PCA) uygulandı.

2.6.4. Yolak ve Regülatör Analizleri: GSEA, TRRUST, KEGG, Reactome

Diferansiyel genler belirlendikten sonra bu genlerin biyolojik işlevsel olarak anlamlılığını ortaya koymak amacıyla çeşitli yolak zenginleştirme analizleri uygulandı. Öncelikle, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) ile Hallmark gen setleri kullanılarak yönlü (ranked-based) analiz gerçekleştirildi; bu sayede, tüm gen ifadesi dağılımına dayalı olarak, yükselmiş ya da baskılanmış biyolojik süreçler tespit edildi.

Ayrıca, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), Reactome ve Gene Ontology (GO:BP) veritabanları kullanılarak over-representation analysis (ORA) yürütülmüş, özellikle hücre siklusu, DNA tamiri, immün regülasyon ve kök hücre dinamikleriyle ilişkili sinyaller öne çıkarıldı.

Transkripsiyonel düzenleyici (TF) analizleri için TRRUST v2 veritabanından yararlanıldı ve istatistiksel olarak anlamlı DEG listelerine karşılık gelen TF-gen ilişkileri incelendi. Bu analiz, özellikle direnç ve tümör mikronişine özgü transkripsiyonel kontrol mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağladı. Elde edilen TF–hedef ağları Cytoscape (v3.9.1) yazılımı ile görselleştirildi.

2.6.5. BBB Geçişine Özgü Transkriptomik İmza Tanımlama

Çalışmanın odak noktalarından biri olan nanopartikül taşıyıcı sistemlerin beyin tümörlerine spesifik geçiş potansiyelini değerlendirebilmek amacıyla, BBB biyolojisine özgü genetik imzalar analiz edildi. Bu doğrultuda, diferansiyel gen ekspresyon analizlerinde (DESeq2) elde edilen sonuçlar, hem literatürde tanımlanmış BBB geçişinde rol alan genler hem de çeşitli biyoinformatik veri tabanlarında (EnrichR ve ToppGene) zenginleştirme analizi yapılarak oluşturulmuş panel bazında değerlendirildi.

İlk aşamada, Gene Set Enrichment Analysis *(*GSEA) kullanılarak Reactome, KEGG, ve GO Biological Process veri tabanları üzerinden “blood-brain barrier development”, “tight junction assembly”, “endothelial cell migration” ve “transendothelial transport” gibi terimlere karşılık gelen yolaklar incelendi. Bu analizler sonucunda elde edilen zenginleştirilmiş gen setleri, *EnrichR* platformu üzerinde “Allen Brain Atlas, ARCHS4, BioGPS ve Human Brain Transcriptome” kaynaklarıyla entegre edilerek genişletildi. Özellikle Cdh5, Pecam1, Tjp1, Cldn5, Ocln, Mfsd2a, Slc2a1, Abcb1a, Jam2, Esam ve Plvap gibi literatürde BBB bütünlüğü,

geçirgenlik ve transport fonksiyonları ile ilişkili olduğu bilinen genler ön plana çıkarıldı. EnrichR veritabanı kullanılarak, kan-beyin bariyerinin yapısal bütünlüğü, geçirgenlik kontrolü, immün yanıt, hücre-hücre bağlantıları, taşıyıcı proteinler ve endotel hücre aktivitesi ile ilişkili en yüksek skorlu 100 gen listesine erişildi (Çizelge 2.2). Bu panel, çalışmada BBB ile ilişkili transkriptomik imza tanımlamaları ve gen ekspresyon değişimlerinin değerlendirilmesinde temel referans olarak kullanıldı.

Çizelge 2.2. Kan-beyin bariyerine özgü gen paneli

ABCB1	ABCG2	ADGRG7	AGRN	ANGPT2
APBA3	APOE	APP	AQP4	BBIP1
CAPN15	CCL2	CDH5	CEACAM21	CHRNA4
CLDN11	CLDN3	CLDN5	CPT1A	CTSA
EBPL	EGFR	F2R	FAM156A	FBXW2
FLG	FXYD7	GAGE12H	GPR179	HOMER3
HOXA2	HTR3D	ICAM1	IL17A	IL22
IL6	ISM1	KIR2DL4	KIR2DS4	KIR3DP1
LINC03100	LRP1	LRRC72	LZTR1	MAPT
MFSD2A	MIR23C	MIR3615	MMP2	MMP9
OCLN	OR4C46	PATE4	PCDHGC5	PECAM1
PLVAP	PPP1R26	RAC1	RASL10A	RBM47
RETNLB	RNA5S1	RNA5S17	RNA5S2	RNA5S3
RNA5S4	ROBO4	S100B	S1PR1	S1PR3
SALRNA3	SCGB1C1	SFRP2	SH3GL2	SIRT1
SIRT2	SLC27A4	SLC2A1	SLCO1C1	SLFN14
SNORA79B	TAS2R50	TJP1	TMEM132E	TMEM178B
TMEM40	TMUB2	TNF	TP53	TPSAB1
TSGA13	TUBB1	USP34	VEGFA	WBP1L
WDR46	ZFP2	ZNF442	ZNF511	ZSCAN1

Bu aday genler, nihai olarak ToppGene Suite üzerinden analiz edilerek “functional similarity” ve “disease-gene prioritization” algoritmalarıyla validasyon sürecine tabi tutuldu. ToppGene, kullanıcı tarafından girilen gen listelerini fonksiyonel anotasyonlar, fenotipler, protein–protein etkileşimleri ve literatür destekli veri setleri ile karşılaştırarak öncelikli adayları sınıflandırmaktadır. Bu analiz sonucunda, çalışma kapsamında elde edilen transkriptomik profillerin, BBB’ye özgü moleküler geçirgenlik ve hücre-hücre bağlantı dinamiklerini yansıttığı gösterildi.

Bulgular, hem $CD133^+$ hem de WT GBM modelleri üzerinden tedavi etkisinin BBB'ye spesifik transkriptomik imzaya nasıl yansıdığını göstermekte olup, çalışmanın translasyonel değerini artıracak nitelikte bir moleküler içgörü sunmuştur. Ayrıca, bu panelin grafiksel sunumu için Şekil 3.45'te yer alan barplot görselinde genlerin $\log_2$ (fold change) değerleri, fonksiyonel kategorilere (örneğin tight junction, adherens junction, efflux transporter vs.) göre renklendirilmiş olarak gösterildi.

2.6.6. Dekonvülasyon Analizleriyle İmmun TME Değerlendirmesi

Çalışma kapsamında tümör mikroçevresinin immün hücre kompozisyonunu belirlemek ve tedaviye bağlı immün yanıt değişimlerini çözümleyebilmek amacıyla transkriptomik tabanlı dekonvolüsyon analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, gen ekspresyon verilerinden immün hücre alt tiplerinin kantitatif dağılımını tahmin etmeye yönelik çalışan birçok öncü algoritma test edildi. Bunlar arasında TIMER, CIBERSORT, quanTIseq, xCell, MCP-counter, EPIC, ESTIMATE, ABIS, ImmuCellAI ve ConsensusTME gibi yaygın kullanılan 10 farklı metodoloji yer aldı (Sutton vd., 2022).

Her algoritma, TCGA (The Cancer Genome Atlas) ve benzeri büyük ölçekli referans veri setlerini temel alarak belirli bir immün hücre spektrumunun tahminini yapar. Bu analizlerde kullanılan inputlar normalize edilmiş gen ekspresyon matrisi olup, her bir yöntem kendi özgün imza matrisleri ve regresyon modelleri aracılığıyla immün hücre oranlarını hesaplamaktadır.

Yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda, özellikle CIBERSORT ve ABIS algoritmalarının, glioblastoma kontekstinde daha duyarlı ve biyolojik olarak anlamlı hücre dağılımları sunduğu gözlemlendi. Bu iki metodun sonuçları, referans literatürdeki GBM TME özellikleriyle en yüksek korelasyonu gösterdi. Bu nedenle nihai değerlendirmede CIBERSORT-ABIS consensus yaklaşımı benimsendi (Newman vd., 2015). Bu yaklaşım, her iki aracın tahmin ettiği hücre alt tiplerinin ortak ve tutarlı çıktılarından elde edilen bileşik hücre kompozisyonlarını temel alır.

Dekonvülasyon analizleri, $CD133^+$ ve WT GBM modellerinde tedaviye verilen immünolojik yanıtların ayrıştırılmasını mümkün kılmış, özellikle T hücreleri, makrofaj alt tipleri, mikrogliya, NK hücreleri ve B hücreleri gibi TME'nin temel bileşenlerinin dinamiklerini detaylı olarak ortaya koymuştur. Elde edilen hücre dağılım profilleri, tedavi

gruplarının TME'yi nasıl yeniden şekillendirdiğine dair önemli ipuçları sağladı ve bu verilerle korele şekilde moleküler yolak düzeyindeki değişiklikler de analiz edildi (bkz. Bölüm 2.6.4).

2.6.7. Kemoterapik Direnç Panelleriyle Direnç Gelişiminin Değerlendirilmesi

Direnç mekanizmaları; DNA onarım yollarının aktivasyonu, anti-apoptotik proteinlerin artışı, ilaç dışa atım pompalarının (efflux transporters) ekspresyonu, redoks homeostazını düzenleyen genlerin yukarı regülasyonu ve kök hücre benzeri (stemness) fenotiplerin baskınlaşması gibi çok sayıda biyolojik süreci kapsadığı için tez çalışmasında,, literatürde temozolomid direnciyle ilişkisi güçlü bir şekilde gösterilmiş genler kullanılarak oluşturulan bir kemorezistans paneli temel alındı (Dean vd., 2005; G. Liu vd., 2006; Singh vd., 2021; Teraiya vd., 2023; Zhang vd., 2012). Panel; XRCC1, MGMT, ABCB1, ABCG2, GPX4, PRDX1, TXN, BIRC5, HMOX1, CD44, NQO1, ERCC1, MLH1, BAX, SLC1A5, SOX2, BRCA1, BRCA2 ve benzeri anahtar genleri içermektedir. Bu genler beş temel biyolojik kategori altında sınıflandırıldı: (i) DNA onarım, (ii) anti-apoptotik sinyalleme, (iii) redoks regülasyonu, (iv) kök hücresel direnç (stemness), (v) ilaç dışa atım (efflux) (Jackson vd., 2019; Johannessen ve Bjerkvig, 2012; H. Li vd., 2025; N. Singh vd., 2021; Teraiya vd., 2023).

Tümör dokularından elde edilen transkriptom verileri, bu paneldeki genler üzerinden filtrelenerek değerlendirildi. Analize yalnızca log2 fold change >2 olan ve FDR <0,05 kriterini sağlayan genler dahil edildi. Bu seçilmiş genler farklı tedavi ve kontrol grupları arasında karşılaştırmalı olarak incelendi ve her bir kategorinin direnç mekanizmasına katkısı görsel olarak haritalandı.

Elde edilen bulgular, özellikle $CD133^{+}$ tümör alt grubunda temozolomid tedavisinin ardından DNA tamir genlerinde (örneğin p53), apoptotik proteinlerde (örneğin Caspase3), redoks dengeleyicilerinde (örneğin SOD1, GPX4) ve kök hücre belirteçlerinde (örneğin SOX2, CD44) anlamlı bir yukarı regülasyon olduğunu ortaya koydu. Bu durum, kanser kök hücre benzeri hücrelerin tedavi sonrası direnç geliştirme eğiliminin bir göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Bu panel yaklaşımı, sadece diferansiyel gen ekspresyon analizinin ötesine geçerek, kemoterapi sonrası hücresel yanıtın moleküler düzeyde sistematik değerlendirmesine olanak sağlammak ve potansiyel hedeflerin belirlenmesi için uygulandı.

2.7. İstatistiksel Değerlendirme

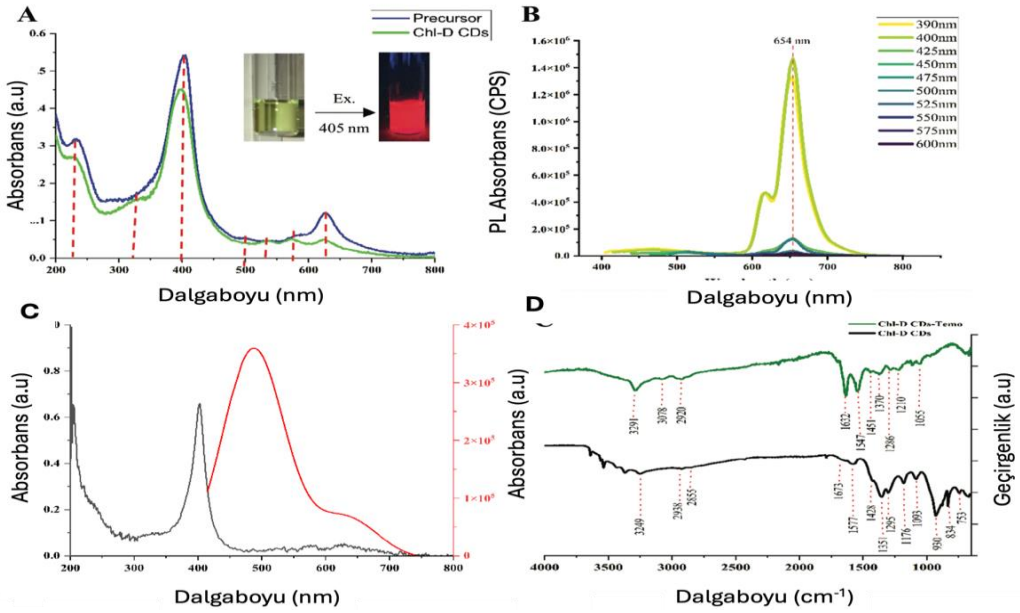
İn vivo ve *in vitro* deneysel analizler için elde edilen sayısal verilerin istatistiksel değerlendirmeleri, tekrarlayan ölçümler için varyans analizine (Repeated Measures ANOVA) dayandırıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar post-hoc analizlerle detaylandırılmış, anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Analizler, GraphPad Prism (v.9.0, GraphPad Software, USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özellikle LDH sitotoksisite testi ve *in vivo* tümör boyutu ölçümleri bu yöntemle değerlendirildi.

RNA-seq verilerinin analizi için ise DESeq2 aracı kullanılmıştır. Bu analizlerde diferansiyel gen ifadesi belirlemek amacıyla log2 kat değişim ($\log2FC) \geq \pm1$ ve düzeltilmiş p-değeri (padj) $<0,05$ eşikleri filtreleme kriteri olarak benimsenmiştir. Yanlış keşif oranı (False Discovery Rate; FDR), Benjamini-Hochberg yöntemiyle kontrol edilmiştir. Omik veri analizlerinde istatistiksel anlamlılık yalnızca tek bir parametreye değil, biyolojik bağlamda anlamlı yolaklar ve hücresel süreçlerle ilişkili gen setlerine göre de yorumlandı.

3. BULGULAR

3.1. Nano Dot-TMZ Formülasyonlarının Özellikleri

CD ve temozolomid ile konjuge edilmiş CD'lere ait karakterizasyon sonuçları, daha önce yayınlanan çalışmamızda ayrıntılı olarak sunuldu. Bu verilere göre; UV–Vis (ultraviyole–görünür bölge) ölçümlerinde, 400 nm'de kaydedilen karakteristik absorbans piki, klorofil kaynaklı porfirin halkasına atfedildi (Şekil 3.1A). Bu bulgu; CD'lerin öncül maddesi olan klorofile ait porfirin halkasının sentez sürecinde korunarak CD yapısına dâhil edildiğini göstermektedir. Floresans (PL) ölçümlerinde, 400 nm uyarım altında en yüksek emisyonun 654 nm dalga boyunda elde edildiği gözlendi (Şekil 3.1B). Bu yönüyle CD'ler, "biyolojik pencere" olarak adlandırılan kırmızı bölgede emisyon göstererek, canlı doku görüntülemesinde daha derin penetrasyon ve yüksek sinyal/gürültü oranı elde edilmesini mümkün kılmaktadır. TMZ yüklü CD'lerde en yüksek emisyonunun 500 nm'ye kayarak yeşil bölgeye geçtiği, ancak 400 nm'deki karakteristik absorbansın korunduğu gözlendi (Şekil 3.1D). FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi) sonuçlarına göre, TMZ konjugasyonu sonrasında 3249, 2938–2855, 1577 ve 1176 cm^{-1} bölgelerinde fonksiyonel gruplara ait titreşim bantlarında değişiklikler kaydedildi (Şekil 3.1C). Bu değişiklikler, TMZ molekülü ile CD yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasında etkileşimler meydana geldiğini ve konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

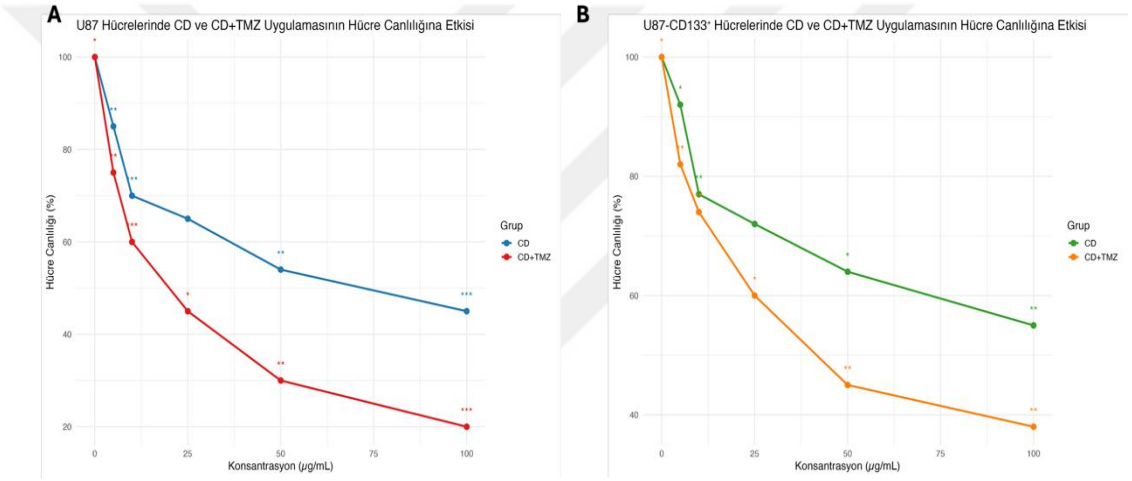


Şekil 3.1. Karbon dot ve temozolomid yüklü karbon dot karakterizasyonlarına ait görsel

3.2. *İn Vitro* Etkinlik Sonuçları

3.2.1. LDH Sitotoksisite Analizi Sonuçları

CD ve CD+Temozolomid kombinasyonunun U87 ve U87-CD133^{+} hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi, doz-bağımlı bir azalma eğilimi gösterdi (Şekil 3.2A-B). U87 hücrelerinde, CD+TMZ kombinasyonu, yalnızca CD uygulamasına kıyasla belirgin şekilde daha yüksek sitotoksisite oluşturmuş ve bu etki artan dozlarla birlikte anlamlı şekilde ilerledi. Benzer şekilde, CD133^{+} hücrelerinde de kombinasyon uygulaması, özellikle 25 µg/mL ve üzeri dozlarda, CD grubuna kıyasla hücre canlılığında anlamlı düşüşler meydana getirdi.



Şekil 3.2. CD ve CD+TMZ kombinasyonunun U87 ve U87-CD133^{+} hücrelerinde hücre canlılığına etkisi. (A) U87 hücrelerinde, farklı konsantrasyonlardaki karbon noktalar (CD) ve CD+TMZ uygulamaları sonrasında hücre canlılık yüzdeleri. (B) U87-CD133^{+} hücrelerinde aynı uygulamaların etkileri ($p<0,01$, $*p<0,001$)

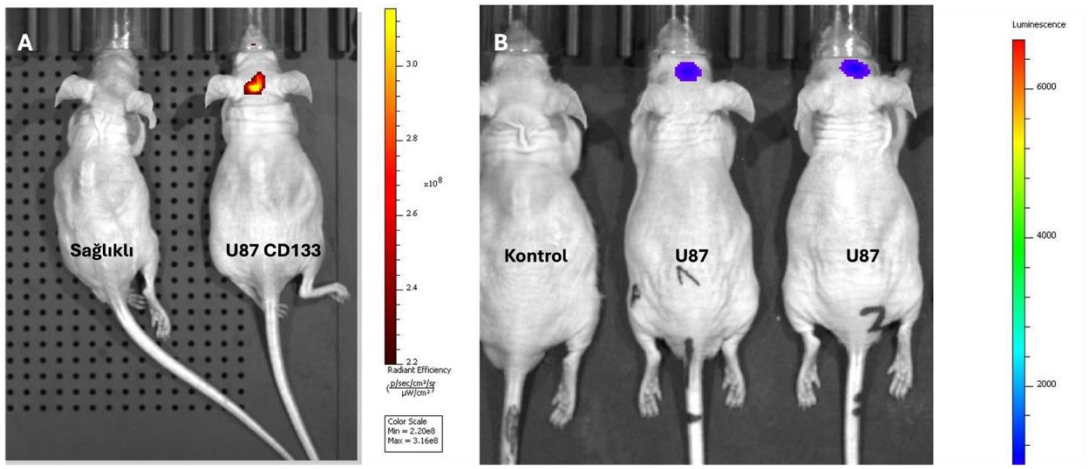
Özellikle 100 µg/mL dozunda, CD uygulaması canlılığı yaklaşık %45'e kadar düşürürken, CD+TMZ kombinasyonu aynı dozda hücre canlılığını yaklaşık %20 (WT) ve %38 (CD133^{+}) seviyelerine indirdi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar, özellikle yüksek konsantrasyonlarda her iki hücre hattında da belirgin şekilde gözlendi. Bu sonuçlar, CD ve TMZ'nin sinerjik etkisinin, özellikle CD133^{+} kök hücre benzeri hücrelerde, yaklaşık %18 daha zayıf bir sitotoksik etki sağladığını göstermektedir.

3.3. *İn Vivo* Tümör Oluşumu ve Tedavi İzleme

3.3.1. Tümörlerin IVIS ile İzlenmesi

Tümör progresyonunu *in vivo* düzeyde takip edebilmek amacıyla, IVIS görüntüleme sistemi ile floresan ve lüminesans tabanlı izleme yaklaşımları kullanıldı. GFP ekspresyonu taşıyan U87-CD133^{+} hücre hattıyla oluşturulan tümör modeli, enjeksiyondan sonraki uygun zaman noktasında IVIS Spectrum cihazı ile değerlendirildiğinde, ilgili bölgedeki tümör dokusunda belirgin bir floresan sinyali elde edilmiştir (Şekil 3.3A). Bu sinyal, hedeflenen tümör alanında CD133^{+} hücrelerin başarılı bir şekilde tümör oluşturduğunu ve floresan düzeyde izlenebilirliğin mümkün olduğunu göstermektedir.

Benzer şekilde, lusiferase ile işaretlenmiş U87 hücreleriyle oluşturulan tümör modelinde, intraperitoneal D-lusiferin enjeksiyonu sonrası yapılan IVIS-lüminesans görüntülemesinde, kafa bölgesinde güçlü bir biyolüminesans sinyali saptandı (Şekil 3.3B). Kontrol grubunda herhangi bir sinyal tespit edilmedi. Bu bulgular, her iki tümör modelinin de *in vivo* takip açısından kullanılabilir olduğunu ve hem floresan (GFP) hem de lüminesans (lusiferaz) sinyal yoğunluklarının tümör büyümesiyle uyumlu şekilde arttığını göstermektedir.



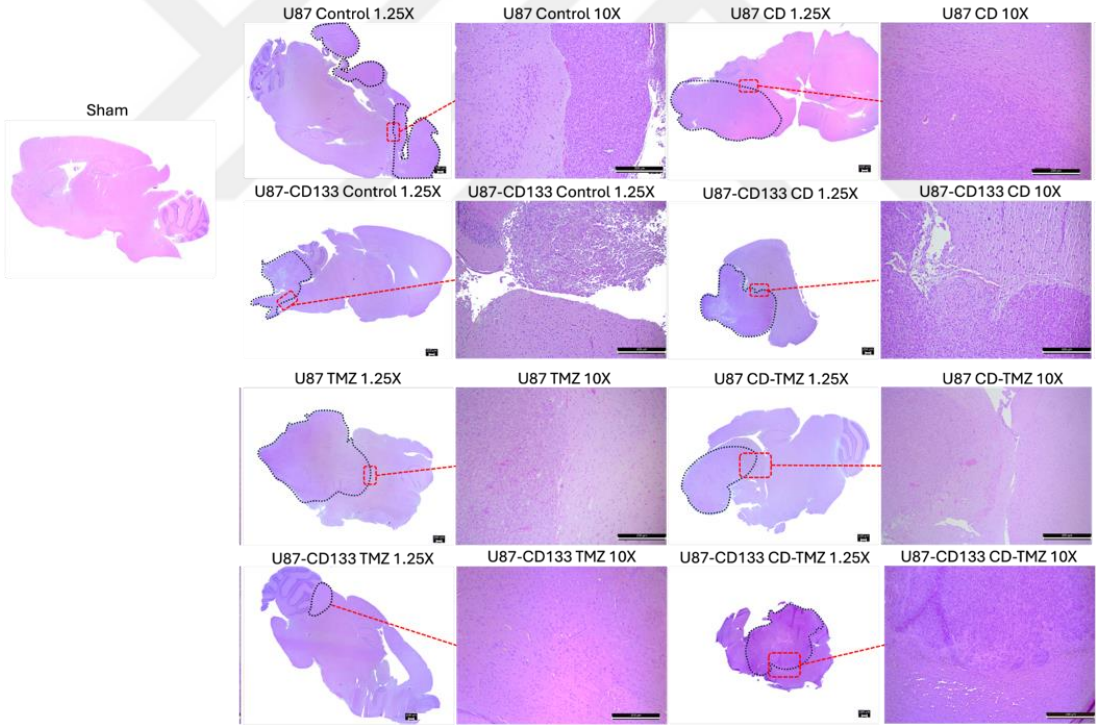
Şekil 3.3. A U87-CD133 hücre hattından tümör modelinin oluşturulmasını takiben IVIS-floresan sistemiyle GFP takibine ait gösterim. B U87 hücre hattından tümör modelinin oluşturulmasını takiben IVIS-lüminesans sistemiyle lüsiferaz takibine ait gösterim. Gösterimler manipülasyondan 2 hafta sonrasına aittir

3.4. Histopatolojik Bulgular

3.4.1. Tümör ve Çevresinin Dokusal Değerlendirmesi

Makroskopik ve mikroskopik düzeyde gerçekleştirilen histopatolojik incelemelerde, hematoksilen-eozin (H&E) boyaması ile tümör oluşumu ve çevresel doku etkileşimleri net bir şekilde gözlemlendi (Şekil 3.4). U87 ve U87-CD133^{+} hücreleriyle oluşturulan gruplarda, tümöral kitlelerin belirgin olarak oluştuğu ve beyin parankimi içerisinde invaziv şekilde yayıldığı görüldü. Özellikle CD133^{+} hücrelerle oluşturulan modellerde daha yaygın yoğun hücre içeriğine sahip bölgeler olduğu dikkat çekmektedir.

Tümör çevresinde ise ödem, damar proliferasyonu ve mikrovasküler yapının bozulduğu alanlar izlendi. Nöronal dokunun normal mimarisinin bozulduğu, gliotik alanların geliştiği ve peritümoral bölgelerde bazı hayvanlarda hemoraji odaklarına rastlandığı gözlendi.



Şekil 3.4. Tümör ve çevresel beyin dokusunun histopatolojik değerlendirmesi

Farklı deney gruplarına ait beyin kesitlerinin hematoksilen-eozin (H&E) ile boyanmış temsili görüntüleri sunulmuştur. Her grup için düşük büyütme (1,25×, sol) ve yüksek büyütme (10×, sağ) düzeyinde tümör ve çevresel dokular gösterilmiştir. Gruplar: Kontrol: Tümör oluşumu gözlenmemiştir; normal beyin hücre mimarisi korunmuştur. TMZ: Sadece

Temozolomid uygulanan grupta kısmi doku bozulmaları izlenmiştir. CD: Sadece Karbon Noktalar uygulanan grupta belirgin tümör kütlesi ve infiltratif sınırlar görülmüştür. CD+TMZ: Kombinasyon tedavisi uygulanan grupta tümör kütlesinin küçüldüğü ve daha az invazif sınırlar gösterdiği izlenmiştir. SHAM: SHAM grubunda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır.

Sadece TMZ uygulanan grupta sınırlı düzeyde doku düzensizlikleri ve küçük dejenerasyon alanları izlendi. Bazı bölgelerde glial hücrelerde hafif sitoplazmik yoğunlaşma, nöronlarda ise kısmi küçülme dikkat çekmiştir. Ancak belirgin nekroz, mitotik aktivite artışı veya infiltratif tümöral hücre formasyonu tespit edilmedi. Bulgular, Temozolomid'e bağlı hafif sitotoksik etkiyi işaret etmektedir.

Sadece CD grubunda belirgin tümöral alanların geliştiği görüldü. Artan hücresellik, belirgin nükleer pleomorfizm, düzensiz hücre dağılımı ve çevredeki sağlam beyin dokusuna doğru infiltratif bir büyüme paterni tespit edildi. Mikrovasküler proliferasyon ve yer yer psödopalisadik nekroz alanları izlendi.

CD+TMZ kombinasyon tedavisi uygulanan örneklerde, CD grubuna kıyasla tümöral alanlarda belirgin gerileme gözlendi. Tümör kütlesi küçülmüş, hücresel yoğunluk azalmış ve sınırlar daha belirgin hale geldi. Nükleer pleomorfizm ve mitotik aktivite belirgin şekilde azalmış, nekrotik bölgeler sınırlı kaldığı görüldü. Mikrovasküler proliferasyonun da azaldığı dikkati çekmiştir. Bulgular, kombinasyon tedavisinin güçlü bir antitümör etkisi yarattığını düşündürmektedir.

SHAM örneklerine ait dokularda beyin parankimi genel olarak sağlam görünümde olup, nöronal ve glial yapılarda herhangi bir patolojik değişiklik saptanmadı. Damar yapıları normal morfolojisini korumaktadır.

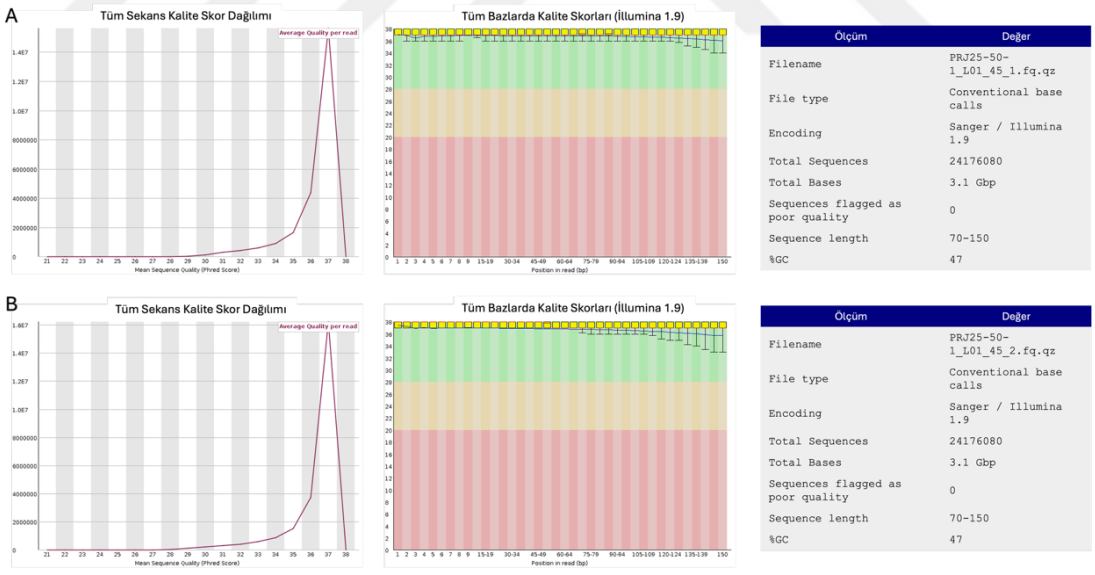
3.5. Pseudo-Spatial Transkriptom Analizi

3.5.1. Veri Kalitesi ve Hizalama İstatistikleri

İnsan kökenli tümör dokularına ait RNA-seq verilerinin kalite değerlendirmesi, FastQC analiz çıktıları üzerinden yapıldı. Örnek olarak sunulan PRJ25-50-1_L01_45_1 ve PRJ25-50-1_L01_45_2 numaralı paired-end (çift taraflı okuma) dizilerinde, toplamda

24.176.080 okuma elde edilmiş ve bu okumalar 3.1 Gbp baz içermektedir. Kalite analizlerine göre, tüm baz pozisyonlarında ortalama Phred skorları 36 ve üzerindedir (Şekil 3.5A ve 3.5B). Ayrıca, ortalama kalite dağılımı verileri, tüm sekansların çoğunluğunun yüksek kalite aralığında olduğunu göstermektedir (Phred > 35). Her iki pair için de düşük kaliteli sekans oranı %0 olup, herhangi bir adaptör kontaminasyonu tespit edilmdi. Bu sonuçlar, dizileme verilerinin trimleme işlemi sonrası yüksek kalitede olduğunu ve analiz için uygun olduğunu göstermektedir. Trimleme işlemi sonrası ortalama GC içeriği %47 civarında ölçülmüş ve bu değer insan transkriptom verisi için beklenen aralıkta kalmadığı görüldü.

Hizalama işlemleri Hisat2 algoritması kullanılarak GRCh38 referans genomuna karşı gerçekleştirildi. Elde edilen hizalama sonuçlarına göre ortalama haritalanma oranı %92–96 arasında değimekte, çok sayıda örnekte %95'in üzerinde başarı elde edildiği görüldü. Bu oranlar, transkriptomik analiz için verilerin yüksek doğrulukla hizalandığını göstermektedir. Ortalama olarak her örnek için 22–27 milyon uniquely mapped okuma alındı. Okuma sayısı normalde çok daha fazla olup tümör bölgesindeki fare sekansına ait çapraz okumalar ve kontaminasyonlar çıkarılarak temizlenme yapıldı. Bu sebeple okuma sayısı fare okumasına göre biraz daha düşük olduğu görüldü.

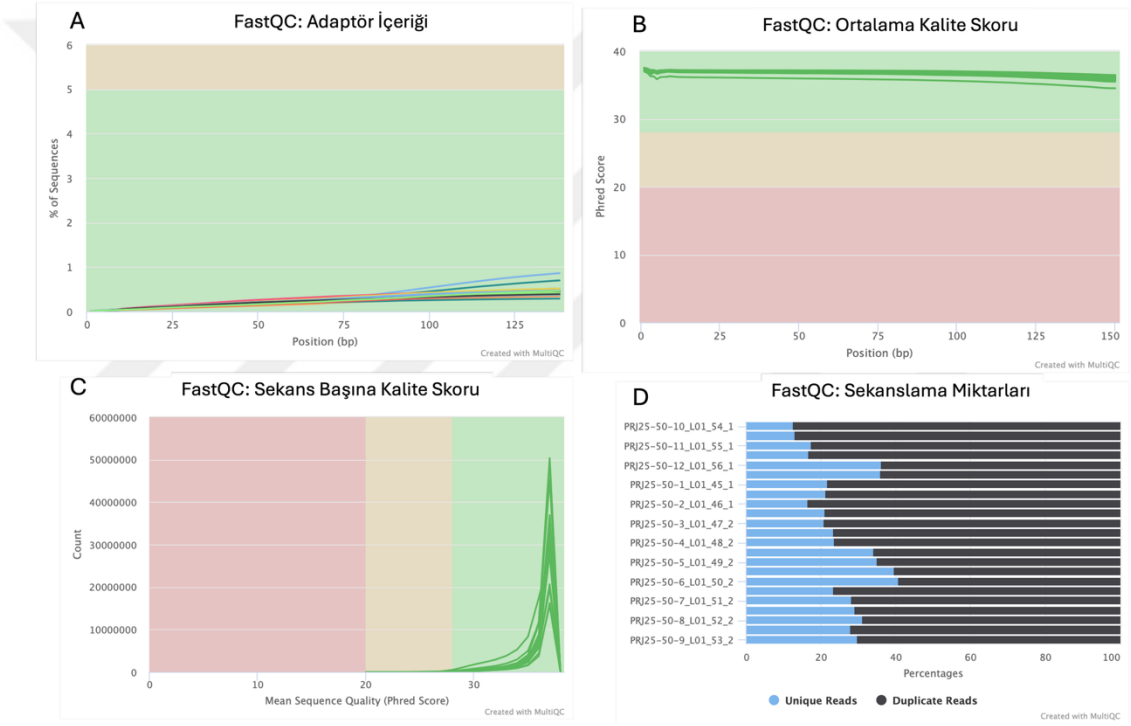


Şekil 3.5. PRJ25-50-1_L01_45 kodlu örneğin iki yönlü okumalarının FastQC sonuçlarına ait grafikler

Fare örnekleri için yapılan kalite değerlendirmesi, tüm numuneleri kapsayan MultiQC raporu üzerinden yapıldı. MultiQC çıktısında yeralan adaptör içeriğine ilişkin analizler herhangi bir adaptör kontaminasyonuna işaret etmemektedir (Şekil 3.6A). Ortalama kalite skorları tüm örneklerde 35'in üzerinde yoğunlaşmış ve baz bazına kalite dağılımı da okuma

boyunca istikrarlı kaldı (Şekil 3.6B). Sekans başına kalite skoru metriği ise Şekil 3.6'de gösterilmiştir (Şekil 3.6C). Ayrıca sekanslama miktarları (Şekil 3.6D) tüm örneklerde yeterli seviyededir ve çoğu örnekte yüksek oranda benzersiz okuma elde edildi. Trimleme sonrası elde edilen bu sonuçlar, tüm fare örneklerinin downstream analizler için yüksek kalite standardını sağladığını göstermektedir.

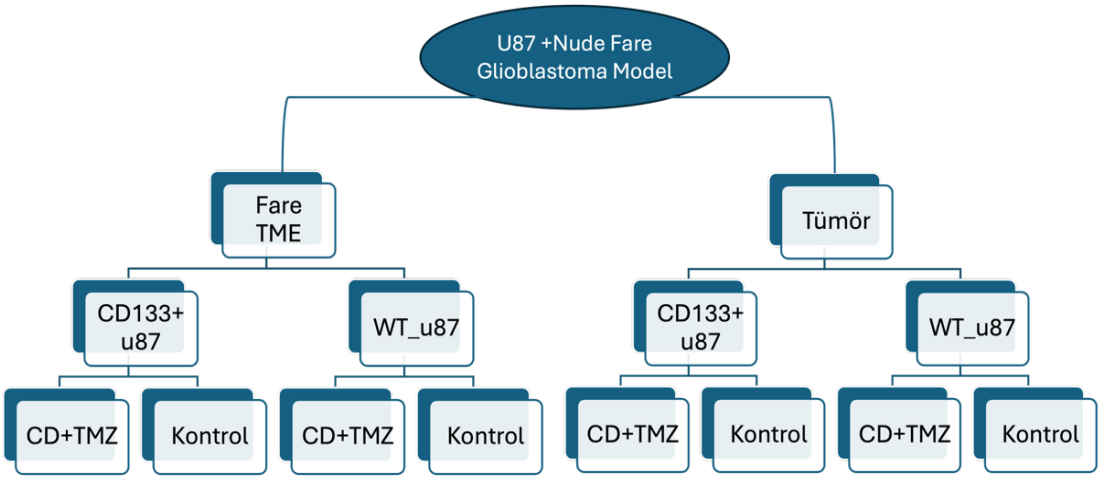
Fare örneklerinde de benzer şekilde, MultiQC raporları, tüm örneklerin trimlenmiş verilerinde yüksek kaliteyi doğruladı. GC içeriği %46–49 aralığında raporlanmış olup, bu değer *Mus musculus* için literatürle uyumludur. Hizalama için HISAT2 algoritması kullanılarak GRCm39 referans genomuna hizalama yapıldı.



Şekil 3.6. Fare tümr örnekleriyle yapılan multiQC analizine ait grafikler

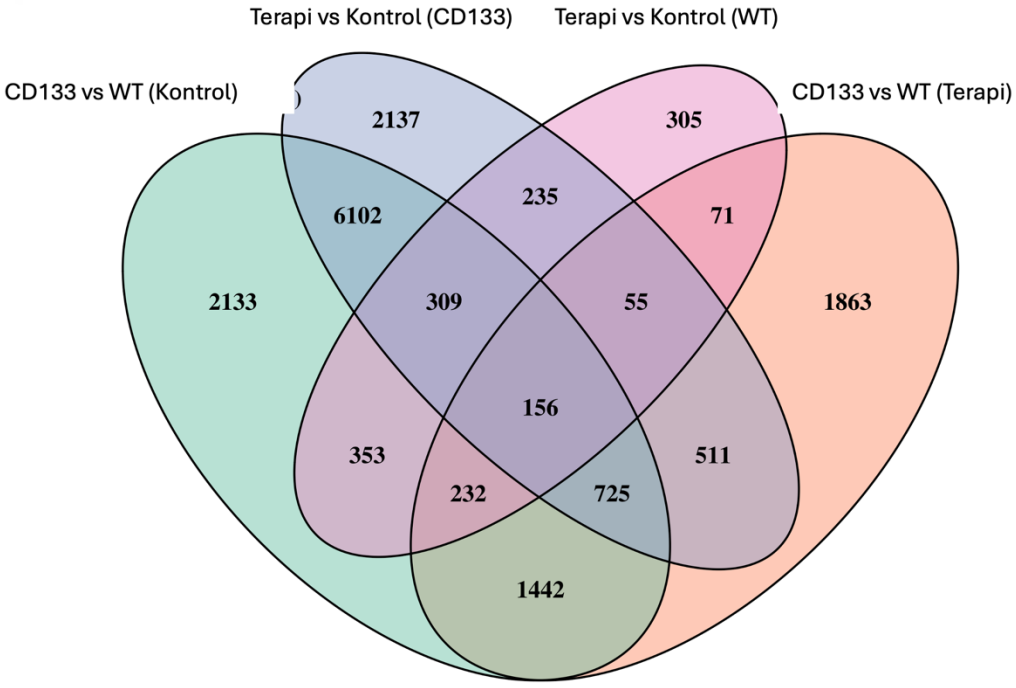
3.5.2. Fare Tümör Mikroçevresi için Diferansiyel Gen Ekspresyonu Analizi

Bu çalışmada, oluşturulan nude fare glioblastoma modelinde her bir tümör alt grubu ($CD133^+$ U87 ve WT_U87) ve bu grupların tümör mikroçevresi ayrı ayrı değerlendirilerek tedavi (CD+TMZ) ve kontrol koşulları altında karşılaştırmalı diferansiyel gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Aşağıda gösterilen şematik sunum, her grup için yapılan tümör ve çevre karşılaştırmalarını özetlemektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Nude fare glioblastoma modelinde oluşturulan tümör ve TME örneklerinin grup karşılaştırmaları. CD133⁺ ve WT U87 hücrelerinden elde edilen tümör ve çevresel dokular, kontrol ve CD+TMZ tedavi grupları altında karşılaştırılmıştır

Fare TME örneklerine ait CD133⁺ ve WT tümör alt gruplarında, hem kontrol hem de TMZ tedavi koşullarına göre yapılan dört temel karşılaştırmanın (CD133 vs WT - Kontrol, Terapi vs Kontrol - CD133, Terapi vs Kontrol - WT, CD133 vs WT - Terapi) diferansiyel gen ekspresyonu (DEG) analiz sonuçları, kapsamlı bir Venn diyagramı ile sunuldu (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Fare TME örneklerinde dört temel karşılaştırmaya göre farklı ifade edilen genlere ait venn diagramı

Bu ortak gen kümesi, tedavi ve genotip farklarından bağımsız olarak glioblastoma mikroçevresinde tutarlı biçimde değişim gösteren temel biyolojik süreçlerin varlığını işaret etmektedir.

Özellikle CD133 vs WT (Kontrol) grubuna ait 2133 genin yalnızca bu karşılaştırmada yer alması, kök hücre benzeri $CD133^+$ tümör alt tipinin, tedavi uygulanmamış ortamda bile WT hücrelere göre belirgin ve özgün bir transkriptomik imza sergilediğini göstermektedir. Bu, $CD133^+$ hücrelerin tümör mikroçevresiyle kurduğu etkileşimin daha özgün ve baskın olduğunu düşündürmektedir.

Buna karşın, CD133 vs WT (Terapi) karşılaştırmasında 1863 gen yalnızca bu gruba özgü olarak saptandı. Bu durum, TMZ tedavisinin özellikle $CD133^+$ hücre popülasyonunda yeni biyolojik programları devreye soktuğunu ve bu alt popülasyonda tedaviye özgü regülasyonların daha belirgin olduğunu göstermektedir.

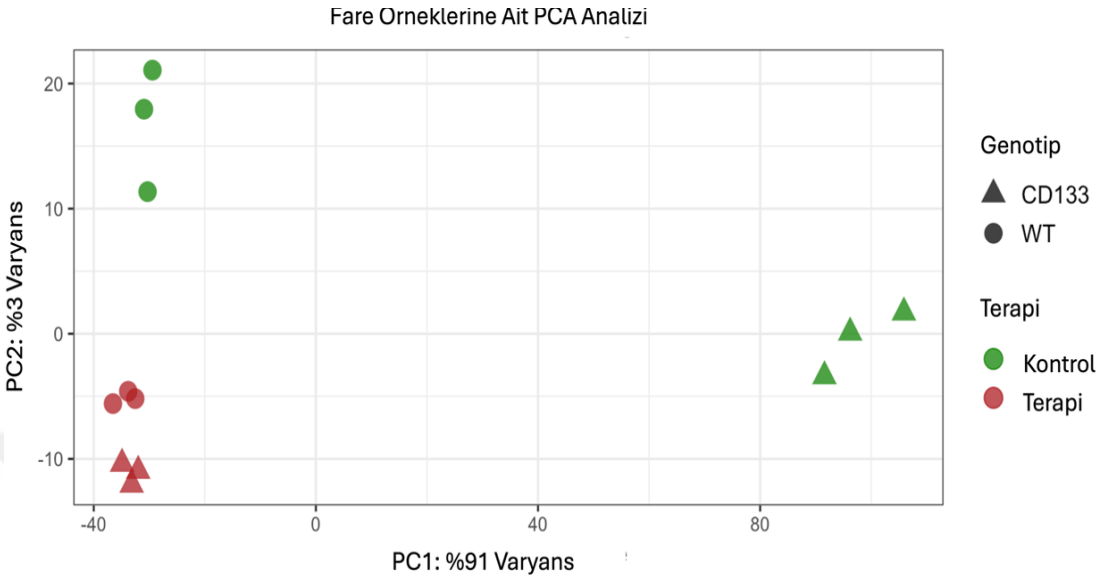
Öte yandan, Terapi vs Kontrol (CD133) grubunda 2137 genin yalnızca bu karşılaştırmada yer alması, TMZ'nin $CD133^+$ tümörlerin mikroçevresinde kök hücrelere özgü bağışıklık ve stres adaptasyonu yanıtlarını farklılaştırdığını göstermektedir. Benzer şekilde, Terapi vs Kontrol (WT) karşılaştırmasında saptanan 305 özgün gen ise, WT hücrelerin tedaviye verdiği yanıtın daha sınırlı ancak spesifik olduğunu düşündürmektedir.

Tüm karşılaştırmalarda ortak olarak değişen 156 gen, CD133 pozitifliği ve TMZ tedavisinin sinerjik etkisi altında tutarlı şekilde farklılaşan bir gen alt kümesini temsil etmektedir. Bu genler, glioblastoma tedavisinde potansiyel terapötik hedefler ya da biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmelidir.

Sonuç olarak, bu karşılaştırmalı analiz, glioblastoma mikroçevresinde hem tümör hücre alt tipi ($CD133^+$ vs WT) hem de kemoterapötik baskı (TMZ) etkilerinin transkriptomik düzeyde farklı yanıtlar oluşturduğunu; bu etkilerin ise kısmen örtüşen ancak büyük oranda ayrışan gen setleri aracılığıyla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Bu karşılaştırmalara ait gen ekspresyon profillerinn genel varyasyonları Başlıca Bileşenler Analizi (PCA) ile değerlendirildi. PCA sonucunda, örneklerin genotip ($CD133^+$ vs WT) ve tedavi durumuna (Kontrol vs CD+TMZ) göre net bir şekilde gruplandığı görülmektedir (Şekil 3.9). Özellikle CD+TMZ tedavisi alan tümör çevresi örnekleri, kontrol

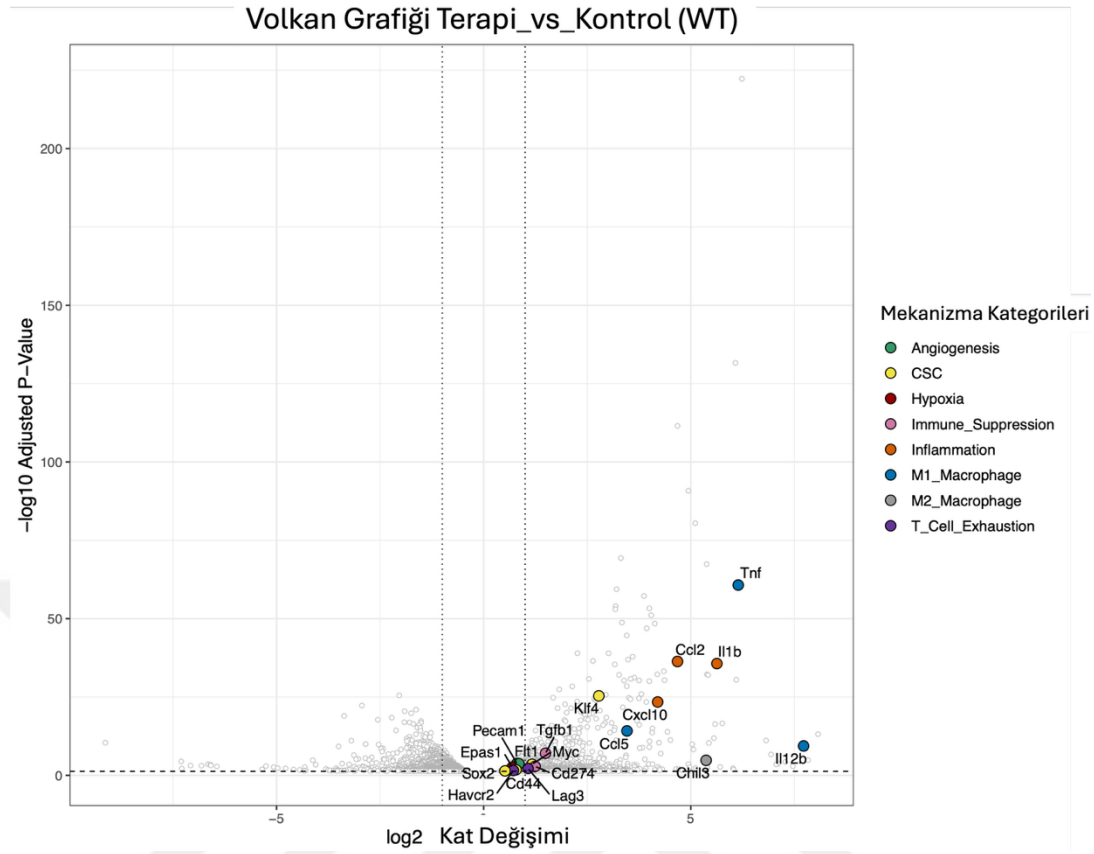
gruplarından belirgin şekilde ayrıldığı görülmektedir. Bu durum, tedavinin gen ekspresyon düzeyinde anlamlı değişikliklere yol açtığını göstermektedir.



Şekil 3.9. Fare örneklerine ait PCA analizi. Tedavi durumu (CD+TMZ/Kontrol) ve genotip ($CD133^+$ / WT) dikkate alınarak örnekler gruplandırılmıştır. PC1 %92, PC2 %3 varyansı temsil etmektedir

3.5.2.1. WT Tümör Mikroçevresinde Tedaviye Yanıt

CD+TMZ ile tedavi edilen WT tümör mikroçevresi dokularında birçok genin anlamlı şekilde yukarı veya aşağı regüle olduğunu göstermektedir (Şekil 3.10). Özellikle yukarı regüle olanlar arasında Tnf, Ccl2, Il1b, Cxcl10 ve Il12b gibi inflamatuvar yanıtın öncül genleri öne çıkmaktadır. Öte yandan aşağı regüle olanlar arasında Sox2, Cd44, Epas1, Cd274 (PD-L1) gibi kök hücre, hipoksi ve immün baskılanma ile ilişkili genlerin baskılandığı görüldü. Bu durum, tedavinin bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve kök hücre benzeri fenotipin baskılanması açısından etkili olduğunu düşündürmektedir.

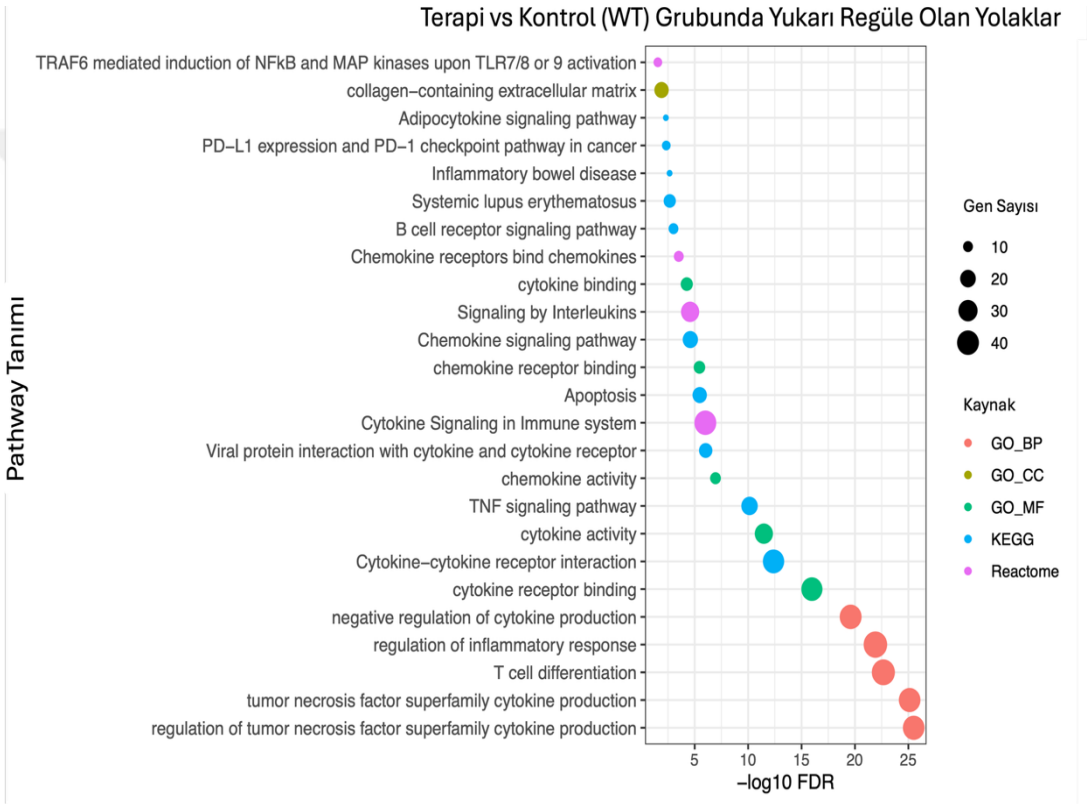


Şekil 3.10. CD + TMZ ile tedavi edilen WT tümör mikroçevresi dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi

Yolak zenginleştirme analizleri, diferansiyel gen ekspresyon değişimlerinin fonksiyonel sonuçlarını daha kapsamlı biçimde ortaya koymuştur. CD+TMZ uygulaması sonrasında WT tümör mikroçevresinde kemokin ve sitokin sinyal iletimi, TNF ve IL-6 aracılı inflamasyon, T hücre farklılaşması ve PD-1/PD-L1 kontrol noktası ile ilişkili yolakların anlamlı biçimde yukarı regüle olduğu görülmüştür (Şekil 3.11). Bu sonuçlar, TMZ tedavisinin yalnızca doğuştan gelen bağışıklık yanıtını değil, aynı zamanda adaptif bağışıklık bileşenlerini de güçlü biçimde aktive ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu aktivasyonun PD-1/PD-L1 ekseninde artış gibi immün baskılayıcı mekanizmaları da tetikleyebileceği ve uzun dönemde T hücre tükenmesi (exhaustion) veya Treg artışı gibi süreçleri destekleyebileceğini düşündrümektedir. Nude farede elde edilen pathway sonuçlarında görülern T hücresi ilişkili bu yolakların görülmesi, örneği T-hücresi baskılanması imzaları, T-hücresi varlığını değil; tümör ve myeloid hücrelerin PD-L1/IDO1/TGF-β/STAT1-IRF1 eksenlerini sürerek T-hücresi-yönelimli düzenleyici ağları aktif tutmasını yansıttığı şeklinde yorumlanabilir. Bunun dışında en anlamlı ve süreçte rol alan gen sayısı açısından oldukça yüksek olan TNF ilişkili sitokin üretim yolaklarının görülmesi TME'de TNF alfa üretiminin arttığı ve bu sinyalin çevre

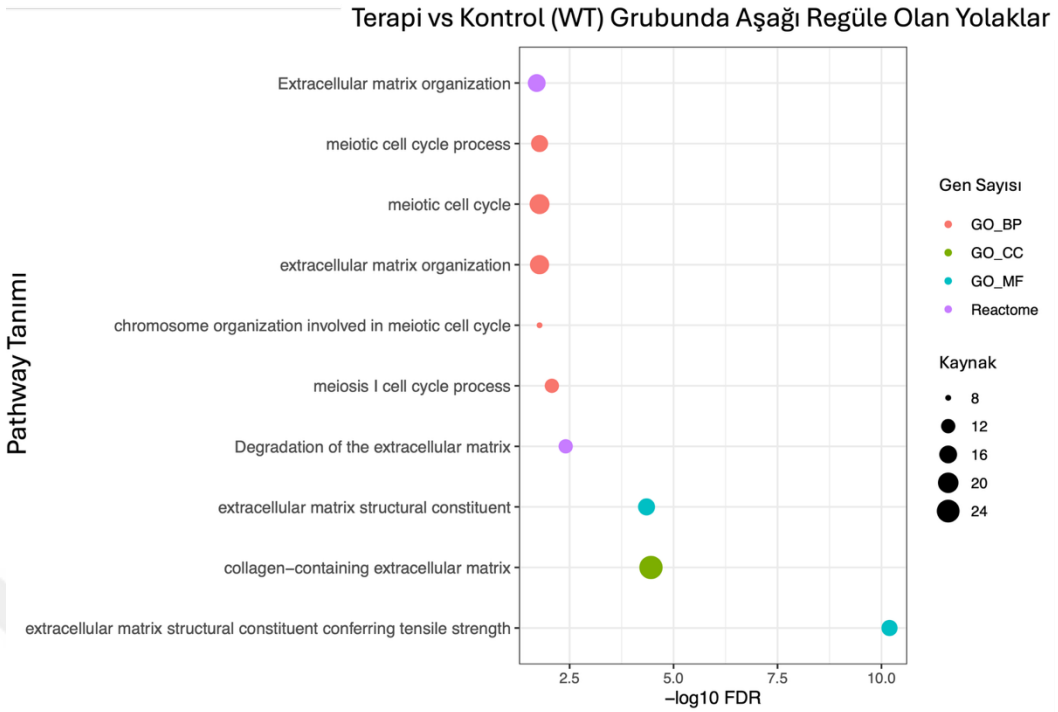
hücrelerce algılanarak yanıt oluştuğu şeklinde yorumlanabilir. TME'de myeloid hücre kaynaklı TNF-α üretimi artmış ve bu TNF-α, tümör hücreleri üzerinde NF-κB aktivasyonu ve stres yanıtlarını başlatmıştır.

Genel olarak, elde edilen transkriptomik bulgular, TMZ'nin immün mikroçevre üzerinde çift yönlü bir düzenleyici rol oynayabileceğine, kısa vadede inflamatuvar ve sitotoksik yanıtı artırırken uzun vadede immün sistemin diğer elemanları olan makrofaj, dentrik hücrelerce bir aktivasyona zemin hazırlayabileceğine işaret etmektedir.



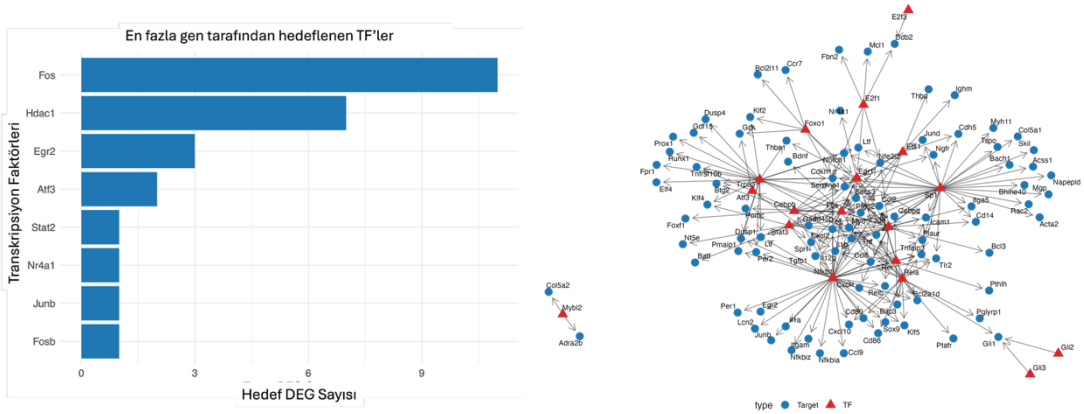
Şekil 3.11. Terapi vs kontrol (WT) grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

Buna karşılık aşağı regüle edilen yolaklar (Şekil 3.12) çoğunlukla hücre döngüsü ve ekstraselüler matriks organizasyonu ile ilişkilidir. Bu durum, tedavinin tümör hücre proliferasyonu ve invazyon yeteneğini azaltıcı bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Özellikle "extracellular matrix structural constituent" gibi yolakların susturulması, tümörün çevresel destek sistemlerinin bozulduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.12. Terapi vs kontrol (WT) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik

Son olarak, TF analizleri (Şekil 3.13) ile bu farklılıkların hangi üst düzenleyici genler tarafından yönlendirildiği incelenmiştir. Fos, Hdac1, Egr2, Atf3 ve Stat2 gibi TF'lerin, farklılaşan gen ekspresyonlarını yönlendiren ana düzenleyiciler olduğu belirlenmiştir. Özellikle Fos ve Hdac1'in birden fazla hedef geni regüle etmesi, bu TF'lerin CD+TMZ tedavisinin oluşturduğu moleküler programın merkezinde yer aldığını göstermektedir.

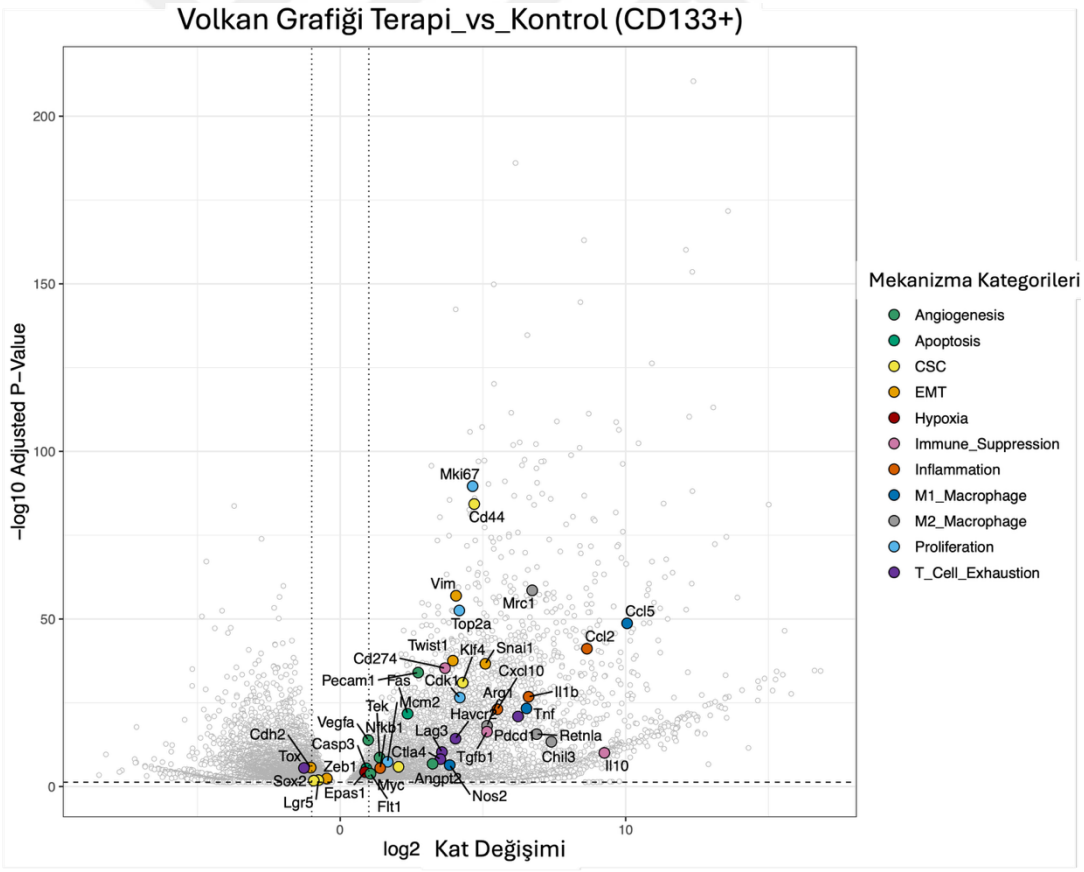


Şekil 3.13. CD+TMZ tedavisinde öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi

3.5.2.2. CD133⁺ Tümör Mikroçevresinde Tedaviye Yanıt

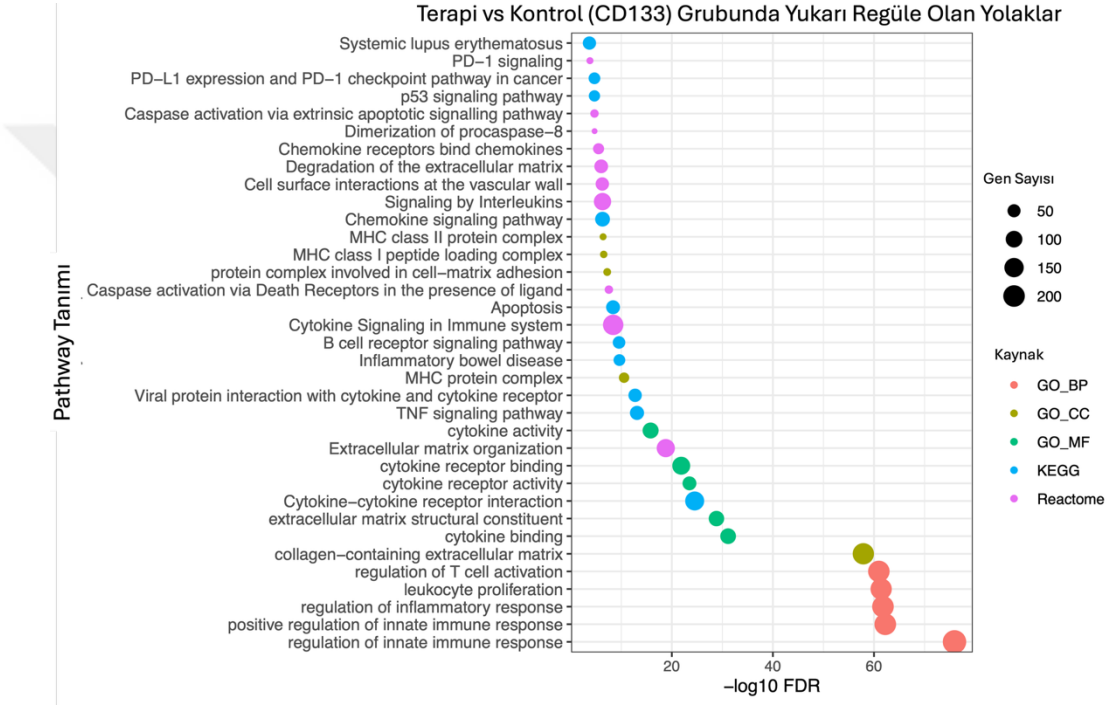
CD133⁺ hücreleri içeren glioblastoma tümör mikroçevresinde temozolomid tedavisine verilen transkriptomik yanıt, hem farklı gen ekspresyon profilleri hem de biyolojik süreçlerdeki belirgin değişimlerle karakterize edilmiştir.

Terapötik uygulama sonrası elde edilen diferansiyel gen ekspresyonu analizinde (Şekil 3.14), birçok bağışıklıkla ilişkili, inflamatuvar ve kök hücrele ilgili genin anlamlı şekilde yukarı veya aşağı regüle edildiği saptanmıştır. CD44 ve MKi67 gibi tümör proliferasyonu ve kanser kök hücresi fenotipiyle ilişkili genler artmış, ayrıca EMT ve hipoksiyle bağlantılı genlerin (Twist1, Epas1, Vegfa) ekspresyon seviyelerinde yükselme gözlemlenmiştir. Tnf, Cxcl10, Ccl2 ve Il1b gibi inflamatuvar mediatörler de belirgin şekilde artış göstermiştir; bu durum tedavinin TME üzerinde güçlü bir immün aktivasyon yanıtı oluşturduğunu düşündürmektedir.



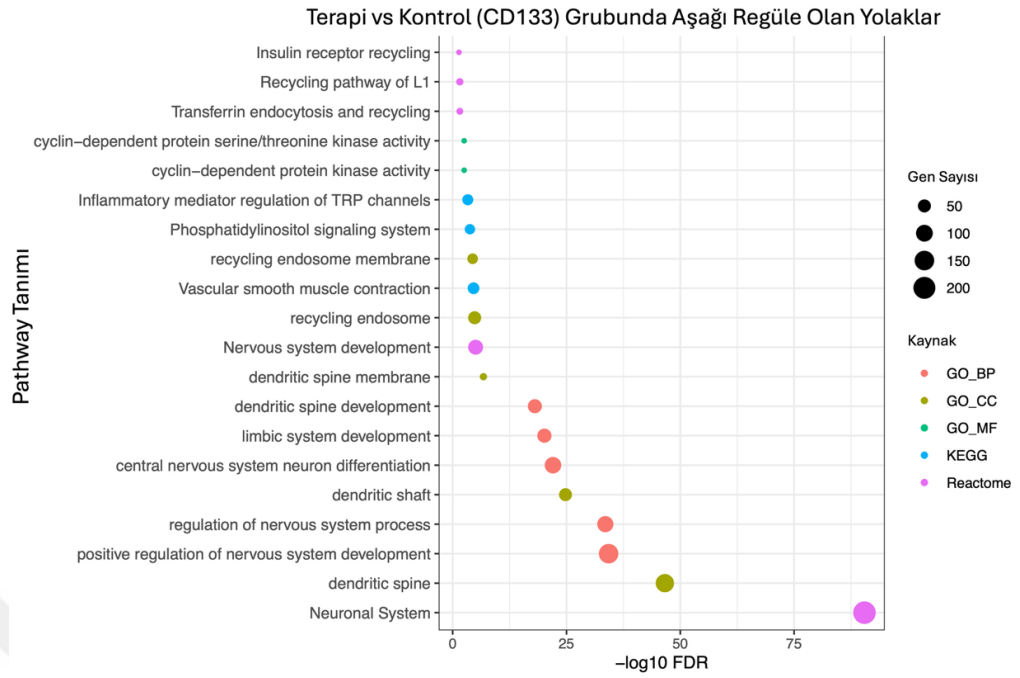
Şekil 3.14. CD + TMZ ile tedavi edilen CD133+ tümör mikroçevresi dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi

Terapötik uygulama sonrası yukarı regüle edilen genlerin zenginleştirme analizleri (Şekil 3.15), PD-1/PD-L1 checkpoint yolağı, TNF sinyal yolağı, interlökinler aracılığıyla sinyal iletimi, B hücresi reseptör aktivasyonu, apoptoz, MHC kompleks sunumu ve kemokin sinyallemesi gibi başlıca bağışıklık yanıtlarını içeren yolakların aktive edildiğini ortaya koymuştur. "Innate immune response" ilişkili yolakların hem istatisksel hem de gen sayısı yönüyle oldukça anlamlı bir şekilde öne çıktığı görülmüştür. Bu bulgular, TMZ tedavisinin $CD133^{+}$ GBM mikroçevresinde doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive ettiğini ve tümöre karşı bir enflamatuvar ortam oluşturduğunu göstermektedir.



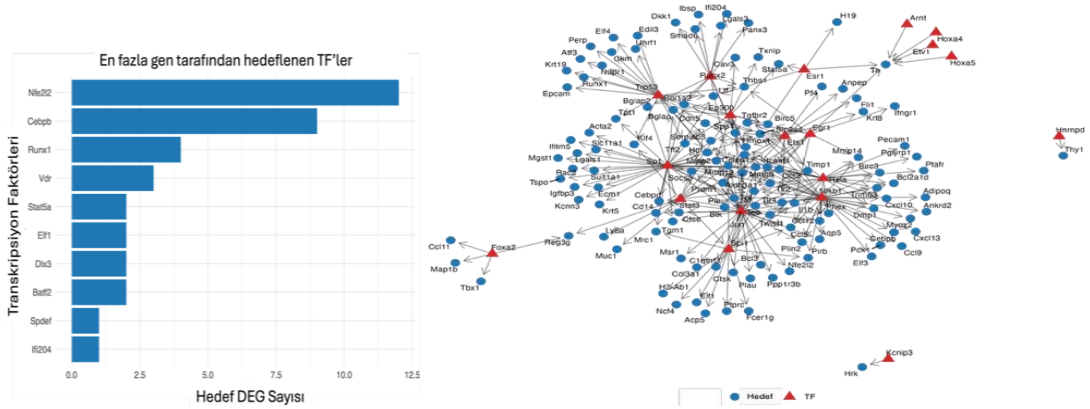
Şekil 3.15. Terapi vs kontrol (CD133+) TME grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

Diğer yandan aşağı regüle edilen yolaklar incelendiğinde (Şekil 3.16), özellikle sinir sistemi gelişimi, dendritik hücre farklılaşması, TRP kanal regülasyonu, protein kinaz aktivitesi ve vasküler düz kas kasılması gibi sinyalleme yollarında anlamlı bir baskılanma olduğu saptanmıştır. Bu durum, tedavi sonrası TME'de nörolojik yapıların ve sinir hücresi farklılaşma programlarının baskılandığını, tümörün mikrosinirsel çevresinde bir değişim yaşandığını göstermektedir. Ayrıca hücre içi sinyal geri dönüşüm yollarının da baskılanması, tedavinin tümör hücrelerinin yeniden programlanmasına katkıda bulunduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.16. Terapi vs kontrol (CD133+) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik

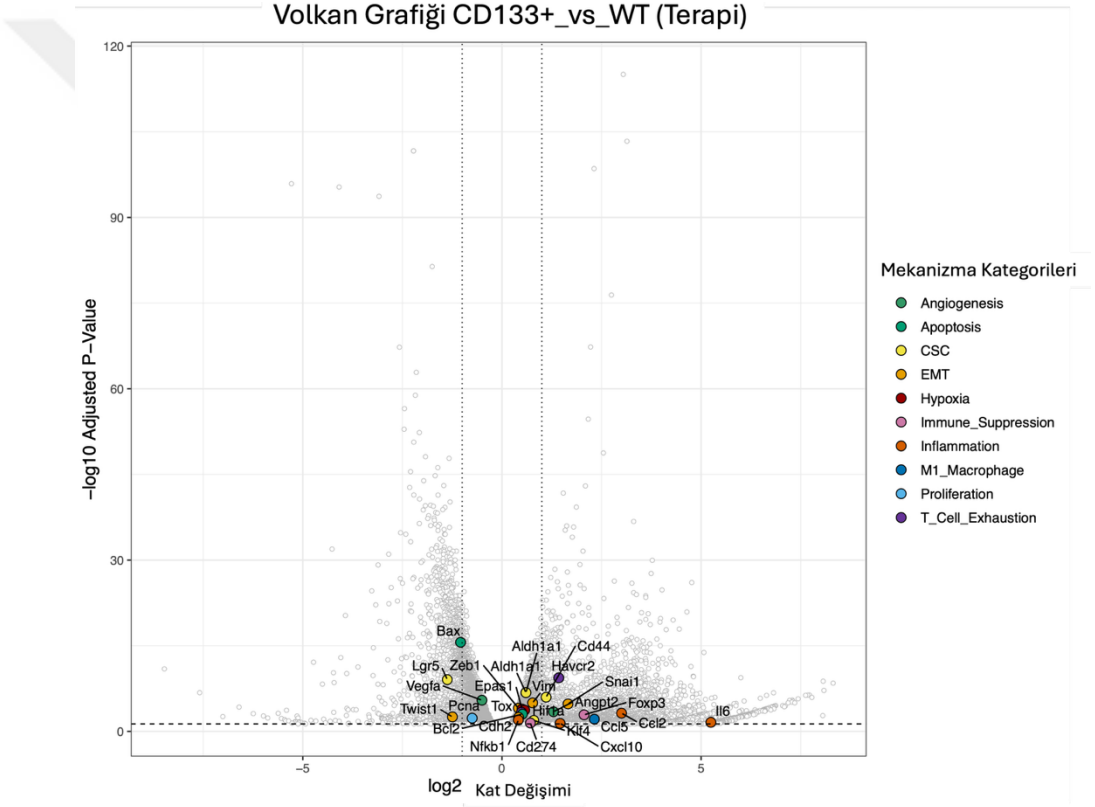
Zenginleştirme analizleri ve TF-DEG etkileşim ağları (Şekil 3.17) sonucunda Nfe2l2 (Nrf2) ve Cebpb gibi transkripsiyon faktörlerinin en fazla farklı ifade edilen genleri hedeflediği belirlenmiştir. Nfe2l2, hücredeki oksidatif stres yanıtını düzenleyen temel bir TF olup, kemoterapiye karşı hücre savunmasını artırma potansiyeline sahiptir. Cebpb ise immün yanıtı şekillendiren ve makrofaj polarizasyonunda görev alan bir TF olarak bilinmektedir. Bu TF'lerin aktivasyonu, TMZ tedavisine karşı hücresel savunma mekanizmalarının aktive olduğunu ve aynı zamanda immunolojik yeniden şekillenmenin yaşandığını göstermektedir. T hücrece zayıf bir mikroçevre olması sebebiyle makrofaj bağımlı immun yanıtın ön plana çıktığı görülmektedir.



Şekil 3.17. CD133+ ortamda CD+TMZ tedavisinde öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi

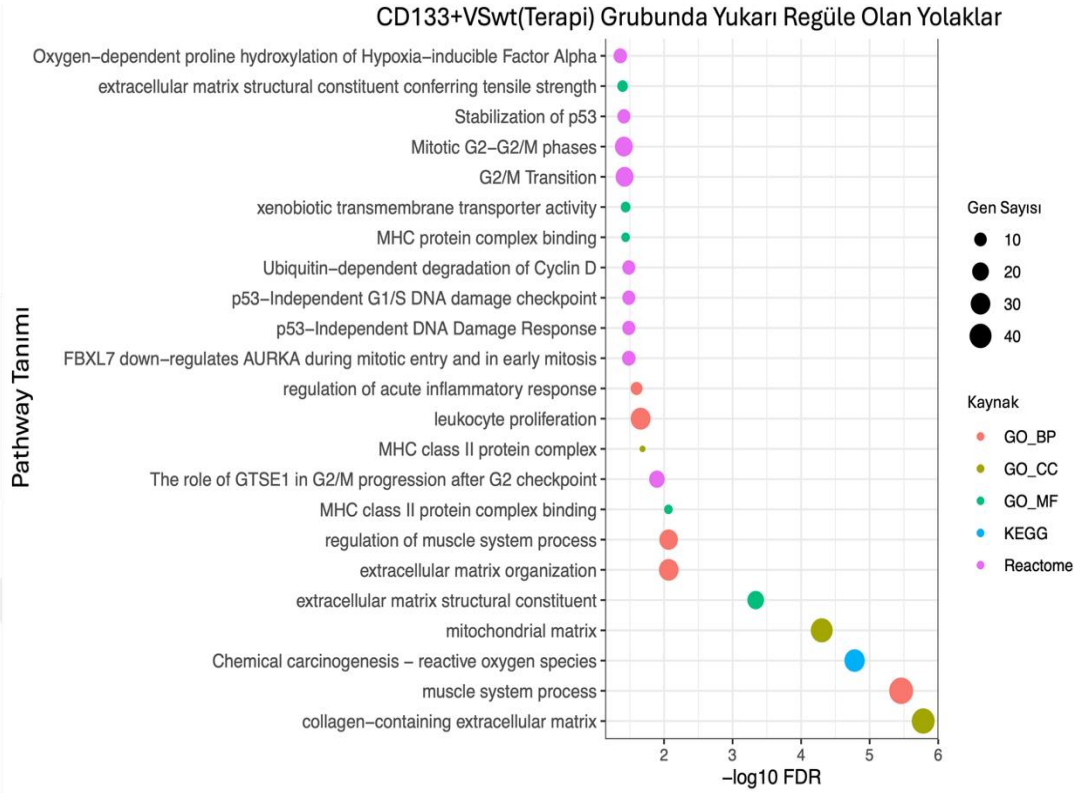
3.5.2.3. CD133⁺ vs WT TME Gruplarının Terapi Altındaki Karşılaştırılması

CD133⁺ ve WT tümör mikroçevresi örneklerinin tedavi altındaki transkriptomik farklılıkları, özellikle immün yanıt, hücre döngüsü ve ekstraselüler matriks ile ilişkili biyolojik mekanizmalar üzerinden belirgin bir şekilde ayrışmaktadır. Volcano plot analizi (Şekil 3.18), birçok immunolojik ve tümörojenik yolakta görev alan genlerin farklı yönlerde regülasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle Cd44, Aldh1a1, Havcr2, Foxp3, Il6, Ccl2, Cxcl10, Cd274 (PD-L1), Tox, Vegfa, Epas1, Hif1a ve Tnf gibi immün baskılayıcı, hipoksik yanıtla ilişkili ve kök hücre benzeri fenotipleri temsil eden genlerin ekspresyon düzeyleri, CD133⁺ grubunda önemli değişiklikler sergilemiştir.



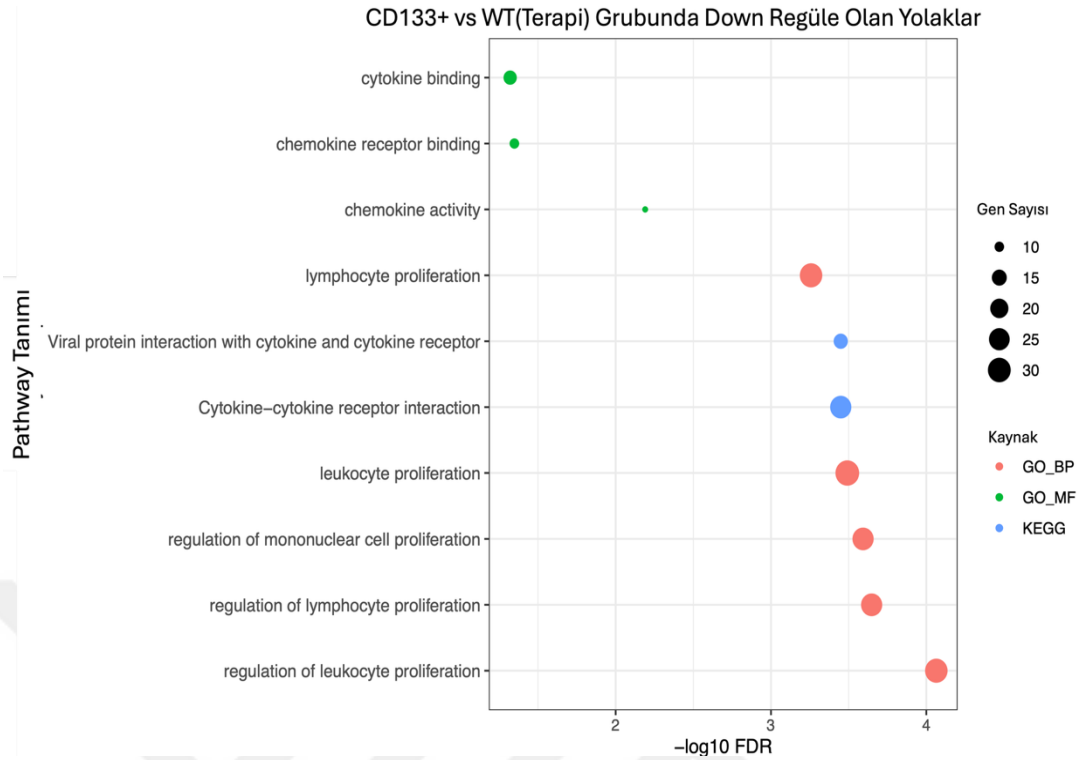
Şekil 3.18. CD133+ vs WT ile genotiplerinde terapi yapılan grupların tümör mikroçevresi dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi

Öte yandan, yukarı regüle edilen yolaklar (Şekil 3.20), tümör biyolojisinin proliferatif ve stres adaptasyonu yönünde yeniden yapılandığını göstermektedir. Özellikle "p53 stabilizasyonu", "G2/M geçişi", "DNA hasar yanıtı", "mitokondriyal matriks", "reaktif oksijen türlerine karşı yanıt" ve "hücre dışı matriks organizasyonu" gibi yolaklar, CD133⁺ hücrelerin tedaviye rağmen büyüme döngüsünü sürdürebildiğine işaret etmektedir.



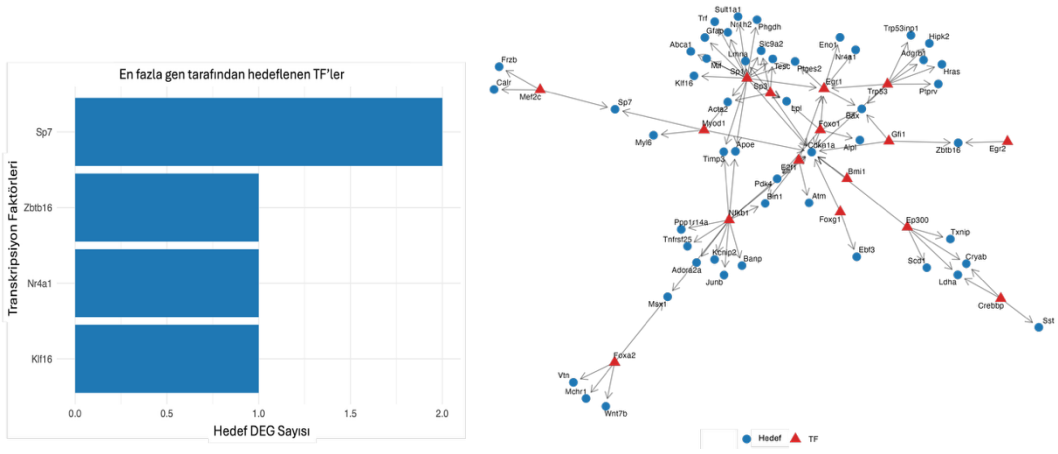
Şekil 3.19. CD133+ vs kontrol (terapi) TME grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

Yolak analizlerine göre CD133^{+} grubunda aşağı regüle olan yolaklar (Şekil 3.20) arasında "sitokin bağlanması", "kemokin reseptör bağlanması", "lenfosit proliferasyonu" ve "immün hücre–sitokin etkileşimi" gibi kazanılmış bağışıklık yanıtının temel yapı taşlarını temsil eden süreçler yer almıştır. Bu bulgular, tedavi sonrası CD133^{+} mikroçevresinde immün baskılamanın daha güçlü olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 3.20. CD133+ vs kontrol (terapi) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik

Transkripsiyon faktörü–hedef gen etkileşim ağı analizi (Şekil 3.21) bu değişiklikleri yöneten potansiyel regülatörleri tanımlamıştır. Sp7, Zbtb16, Nr4a1 ve Klf16, CD133⁺ grubunda farklı şekilde hedeflenen transkripsiyon faktörleri olarak öne çıkarken, bu faktörlerin etkilediği genler özellikle bağışıklıkla ilişkili yolakları modüle etmektedir.

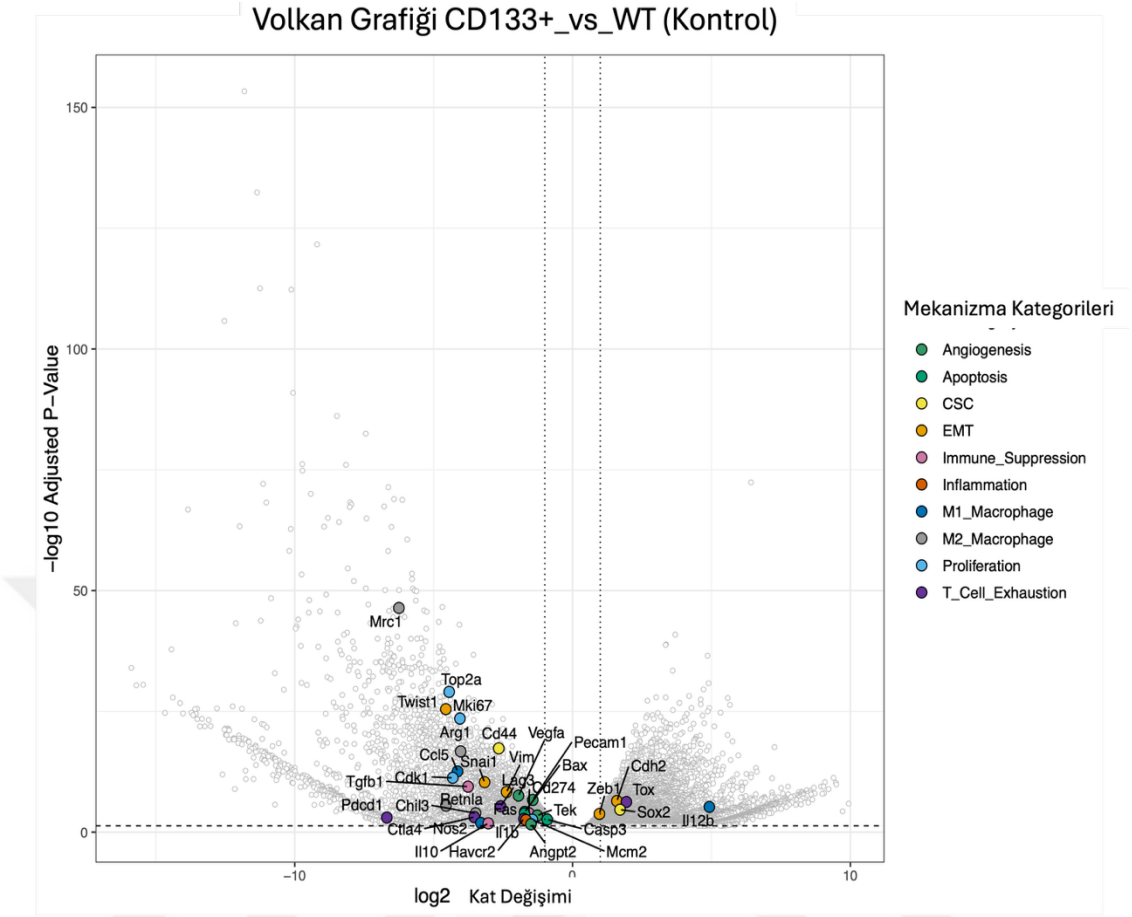


Şekil 3.21. CD133+ vs WT (terapi) karşılaştırılmasında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi

Bu sonuçlar, kök hücre benzeri özellikler taşıyan CD133$^+$ tümör hücrelerinin mikroçevresinde TMZ tedavisi sonrası bağışıklıkla ilişkili proliferatif yolakları baskılarken, aynı anda DNA tamiri, hücre siklusu ve tümör progresyonuna katkıda bulunan mekanizmaları aktive ettiğini göstermektedir. CD133$^+$ tümör alt tiplerinin, tedaviye karşı daha dirençli ve immün baskılayıcı bir fenotipe sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, immün sistemin yeniden programlanması ve spesifik transkripsiyonel düzenleyicilerin hedeflenmesi gibi stratejilerin CD133$^+$ tümörlerin tedavisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

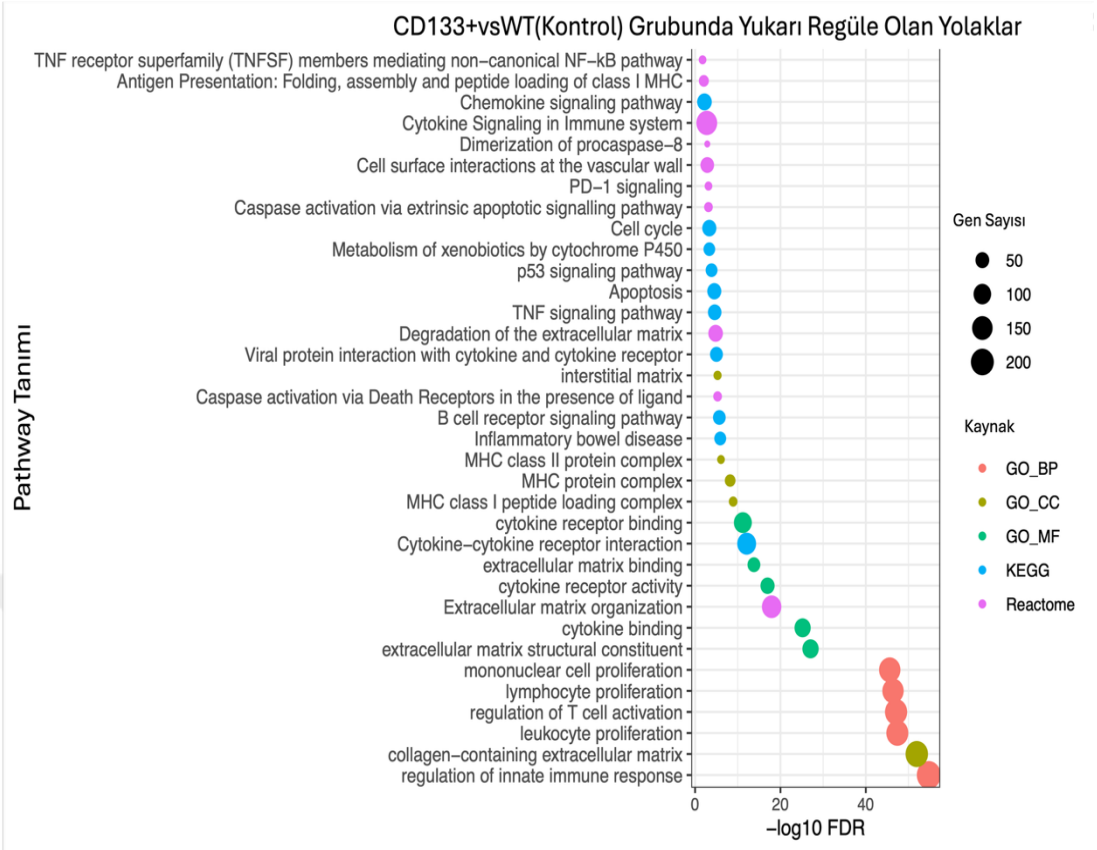
3.5.2.4. CD133$^+$ vs WT Kontrol TME Gruplarının Karşılaştırılması

Volkan analizinde CD133$^+$ hücre alt popülasyonuna ait tümör mikroçevresi, WT grubuyla karşılaştırıldığında belirgin transkriptomik farklılıklar sergilemiştir (Şekil 3.22). Diferansiyel olarak yukarı regüle edilen genler arasında özellikle CD133$^+$ tümörlerin biyolojik kimliğini temsil eden kök hücre ilişkili (Sox2, Lgr5, Cd44), epitel-mezenkimal geçiş (EMT) (Zeb1, Snai1, Twist1), anjiogenez (Vegfa, Angpt2, Tek), hipoksi (Epas1, Nos2), bağışıklık baskılanması (Cd274, Havcr2, Il10), inflamasyon (Il1b, Ccl5, Tnf) ve M2 makrofaj polarizasyonunu (Mrc1, Chil3) temsil eden genler öne çıkmıştır. Özellikle CD44, Sox2 ve Zeb1 gibi genlerin bu profilde yüksek ekspresyon göstermesi, CD133$^+$ hücrelerin kök hücre benzeri özellikleri koruduğunu ve potansiyel olarak tedaviye dirençli bir fenotipe sahip olduğunu göstermektedir.



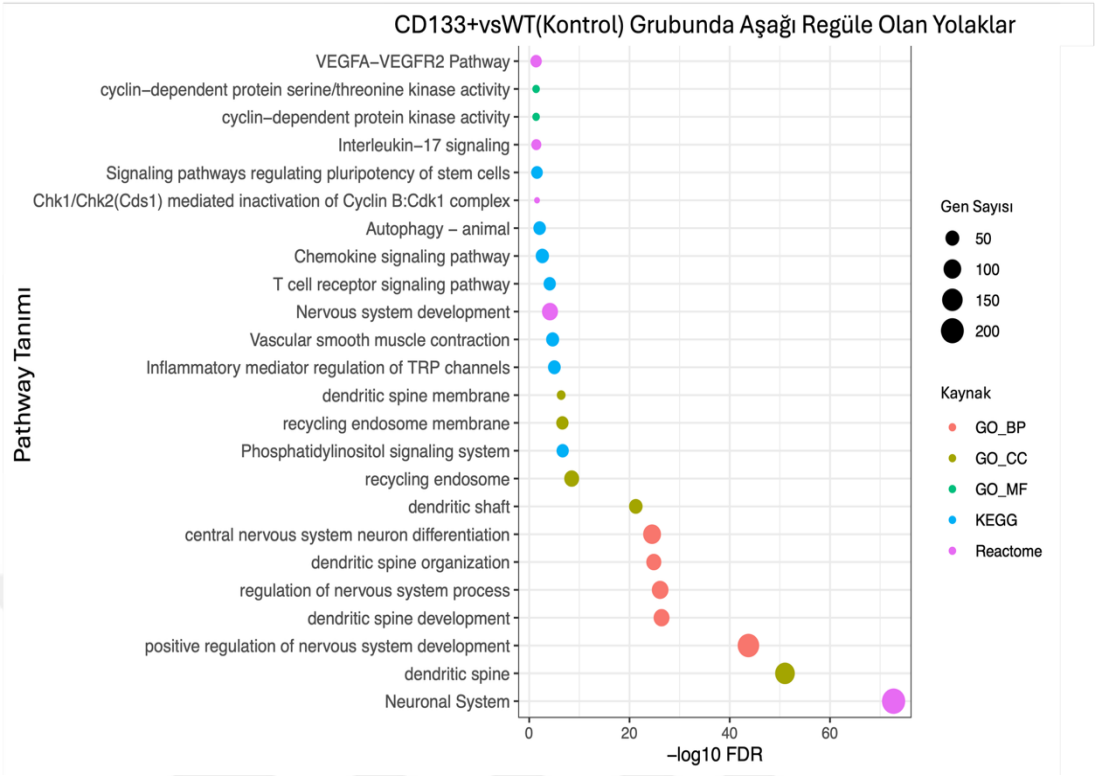
Şekil 3.22. CD133+ vs WT ile genotiplerinde kontrol gruplarının tümör mikroçevresi dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi

Yolak zenginleştirme analizleri bu farklılıkların biyolojik sonuçlarını daha iyi açıklamaktadır (Şekil 3.23). CD133^{+} grubunda yukarı regüle edilen yolaklar arasında doğuştan gelen immun yanıt ile ilişkili yolaklarla birlikte, TNF süperfamilyası aracılığıyla non-kanonik NF-κB aktivasyonu, PD-1 sinyali, kemokin sinyal yolağı, sitokin-sitokin reseptör etkileşimleri, p53 sinyalizasyonu, apoptoz ve MHC sınıf I-II ilişkili antijen sunumu dikkat çekmektedir. Bu durum, CD133^{+} hücrelerin bağışıklık sisteminden kaçma mekanizmalarını daha aktif biçimde kullandığını ve immün sistemle etkileşim halinde olduklarını göstermektedir. Aynı zamanda hücre döngüsü, DNA hasar yanıtı ve apoptotik regülasyon gibi proliferatif programların da aktive olduğu görülmektedir.



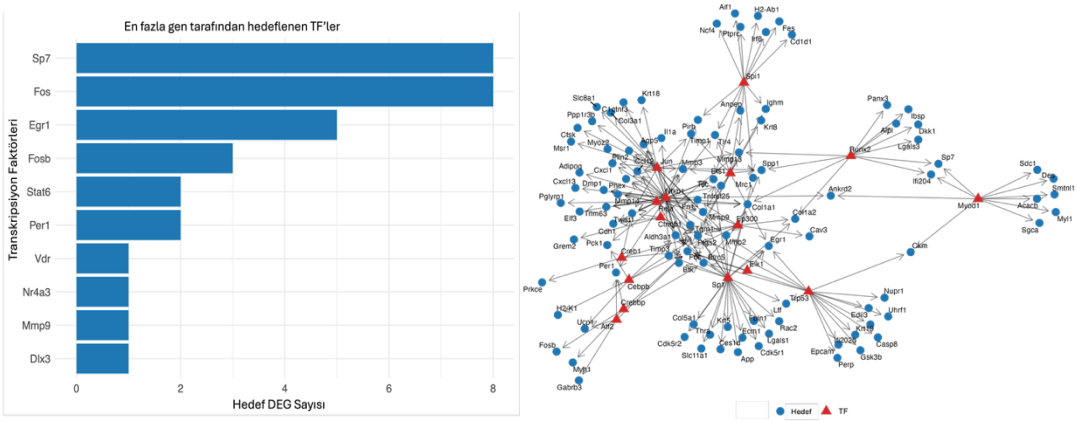
Şekil 3.23. CD133+ vs WT kontrol grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

Öte yandan, aşağı regüle edilen yolaklar özellikle nöronal gelişim ve sinir sistemi ile ilişkili hücresel süreçler etrafında kümelenmiştir (Şekil 3.24). Bunlar arasında dendritik omurga gelişimi, sinir hücresi farklılaşması, nöronal sistem gelişimi, geri dönüşüm endozom membran yapıları ve fosfoinozitol sinyalleme sistemi gibi süreçler yer almaktadır. Bu durum, $CD133^{+}$ hücrelerin tümör mikroçevresinde nöronal farklılaşma kapasitesini kaybettiğini ya da bu yönde baskılanmış bir durumda olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 3.24. CD133+ vs WT kontrol grubunda aşağo regüle olan yolakları gösteren grafik

Transkripsiyon faktörü analizleri, CD133⁺ grubunda en fazla hedeflenen TF'ler arasında Sp7, Fos, Egr1 ve Stat6 gibi bağışıklık regülasyonunda ve hücre farklılaşmasında görevli faktörlerin yer aldığını ortaya koymuştur. Bu TF'ler, yukarı regüle genlerin birçoğunu hedef alarak transkripsiyonel yeniden programlamayı yönlendirmektedir (Şekil 3.25).

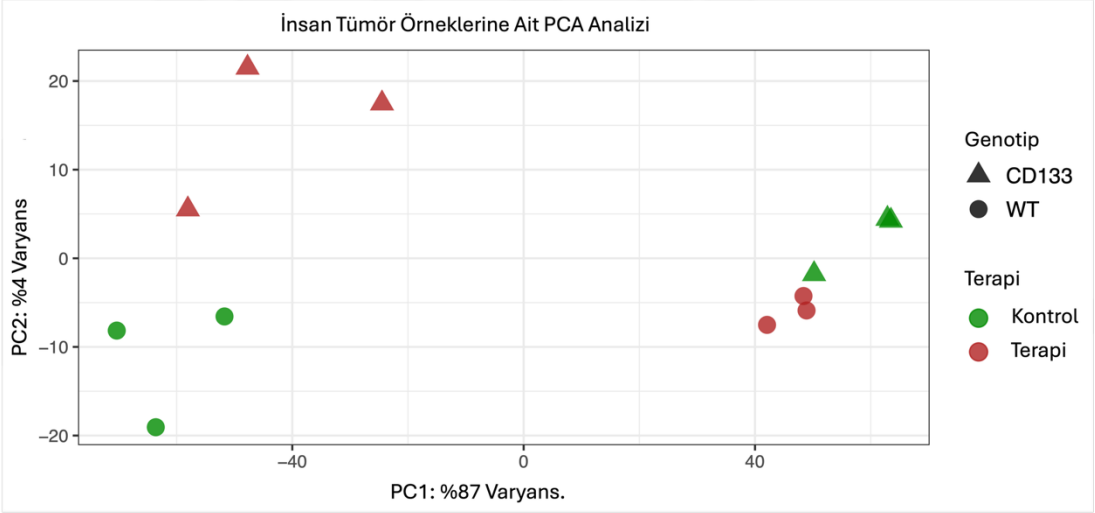


Şekil 3.25. CD133+ vs WT (Kontrol) karşılaştırılmasında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi

Toplamda bu veriler, CD133⁺ hücre popülasyonunun WT'ye göre daha agresif, bağışıklık sisteminden daha iyi kaçan, proliferatif ve dirençli bir fenotipe sahip olduğunu; buna karşın sinir sistemi ile ilişkili farklılaşma sinyallerini kaybetmiş olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, CD133⁺ hücrelerin glioblastom tedavisinde özel hedeflenmesi gereken bir alt popülasyon olduğunu desteklemektedir.

3.5.3. İnsan Tümör Kısmı Diferansiyel Gen Ekspresyonu Analizi

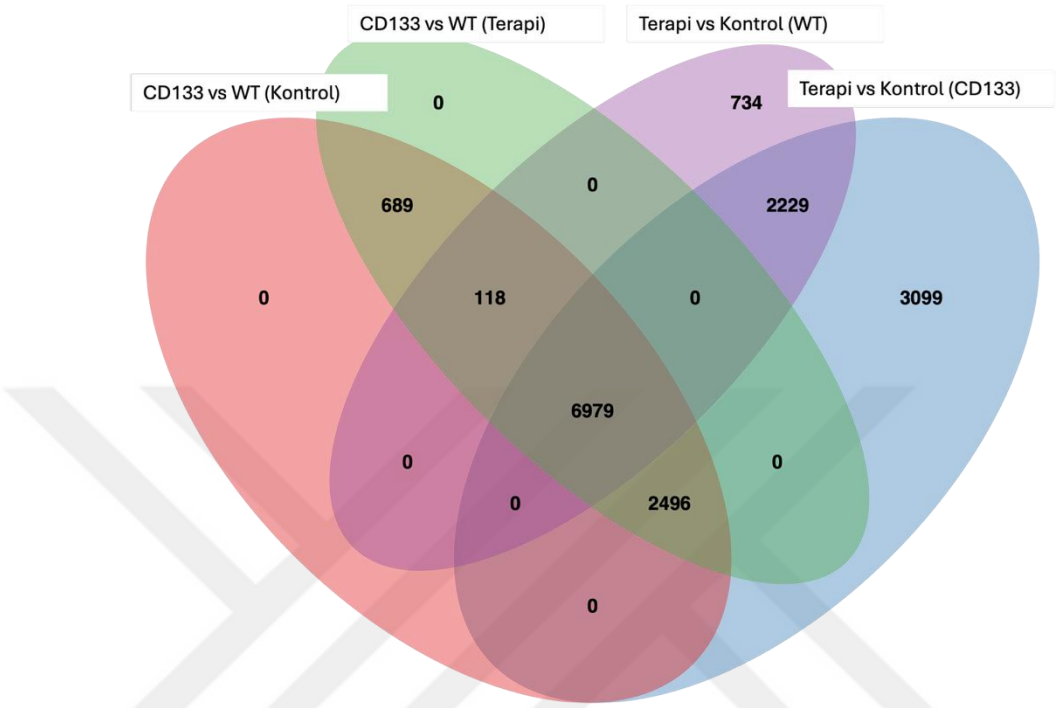
PCA analizine göre, CD133⁺ ve WT tümör grupları, hem kontrol hem de TMZ tedavisi sonrası örnekleri temel bileşenler düzleminde belirgin şekilde ayrışmaktadır. Bu ayrışma, özellikle birinci bileşende (%87 varyans), genotip farklılığının ifade profilleri üzerinde baskın bir etkisi olduğunu göstermektedir. Tedavi uygulaması da ikinci bileşende (%4 varyans) belirli bir katkı sağlamaktadır. Bu sonuçlar, CD133 pozitifliğinin, tümör hücrelerinin tedaviye verdiği transkriptomik yanıtı önemli ölçüde şekillendirdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. Tümör örneklerine ait PCA analizi. Tedavi durumu (kontrol vs CD+TMZ) ve genotip (CD133⁺ vs WT) dikkate alınarak örnekler gruplandırılmıştır

Venn diyagramı analizi ise farklı karşılaştırmalarda farklı ifade edilen gen setleri arasındaki örtüşmeleri göstermektedir. Özellikle 6979 genin dört karşılaştırmada da ortak olarak regüle edilmesi, bu genlerin CD133 durumu ve TMZ tedavisinden bağımsız olarak tümör tranksirptomik profilinde merkezi roller üstlendiğine işaret etmektedir. Ayrıca, yalnızca Terapi vs Kontrol (CD133) grubuna özgü olan 3099 genin varlığı, CD133⁺ hücrelerin TMZ tedavisine verdiği özgün moleküler yanıtların altını çizmektedir. Benzer şekilde, sadece WT

ya da sadece tedavi koşuluna özel regüle olan gen kümeleri, farklı biyolojik mekanizmaların aktive edildiğini düşündürmektedir (Şekil 3.27).



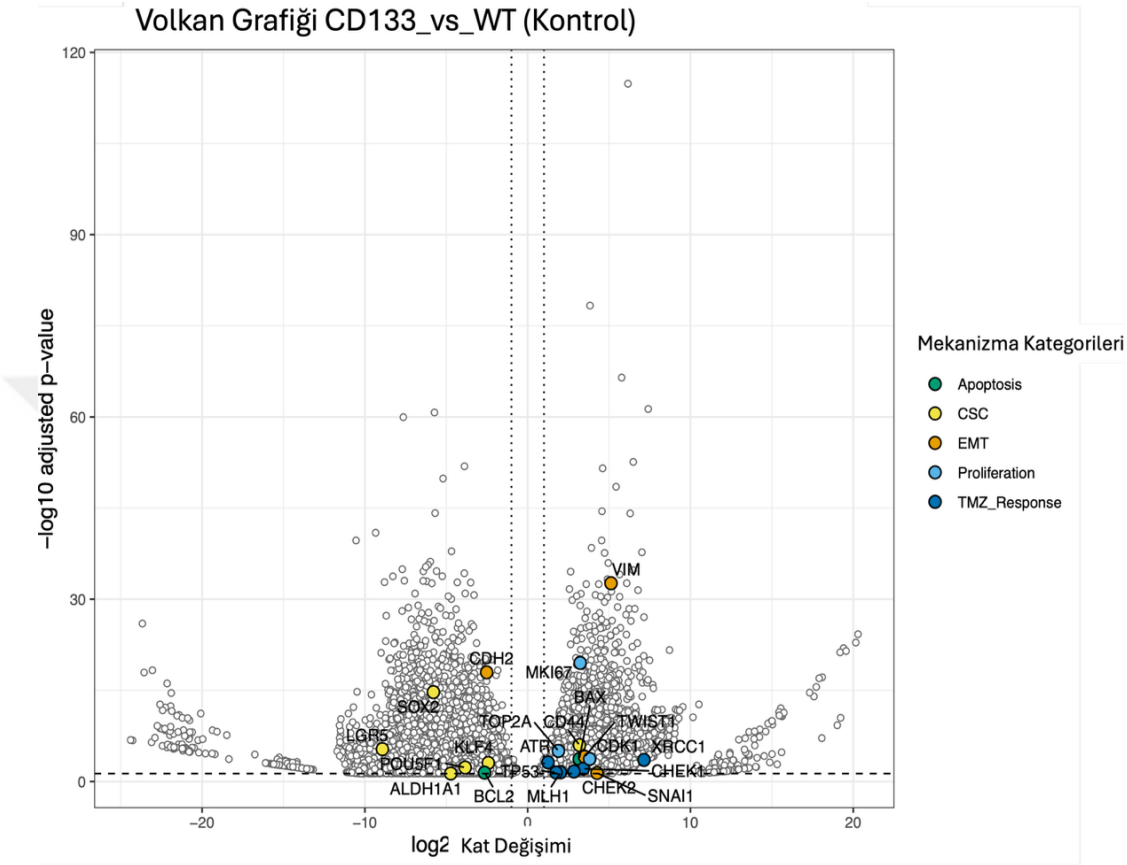
Şekil 3.27. Tümör örneklerinde dört temel karşılaştırmaya göre farklı ifade edilen genlere ait venn diagramı

Genel olarak bu veriler, insan glioblastoma tümör modelinde CD133⁺ hücrelerin transkriptomik yanıtlarının hem genotipe hem de tedaviye özgü belirgin farklılıklar içerdiğini ve bu farklılıkların, tedavi direnci, bağışıklık regülasyonu ve tümör progresyonu gibi süreçlerle ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, CD133⁺ hücrelerin hedeflenmesi, daha etkili ve özgül tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritik önemdedir.

3.5.3.1. CD133⁺ vs WT Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

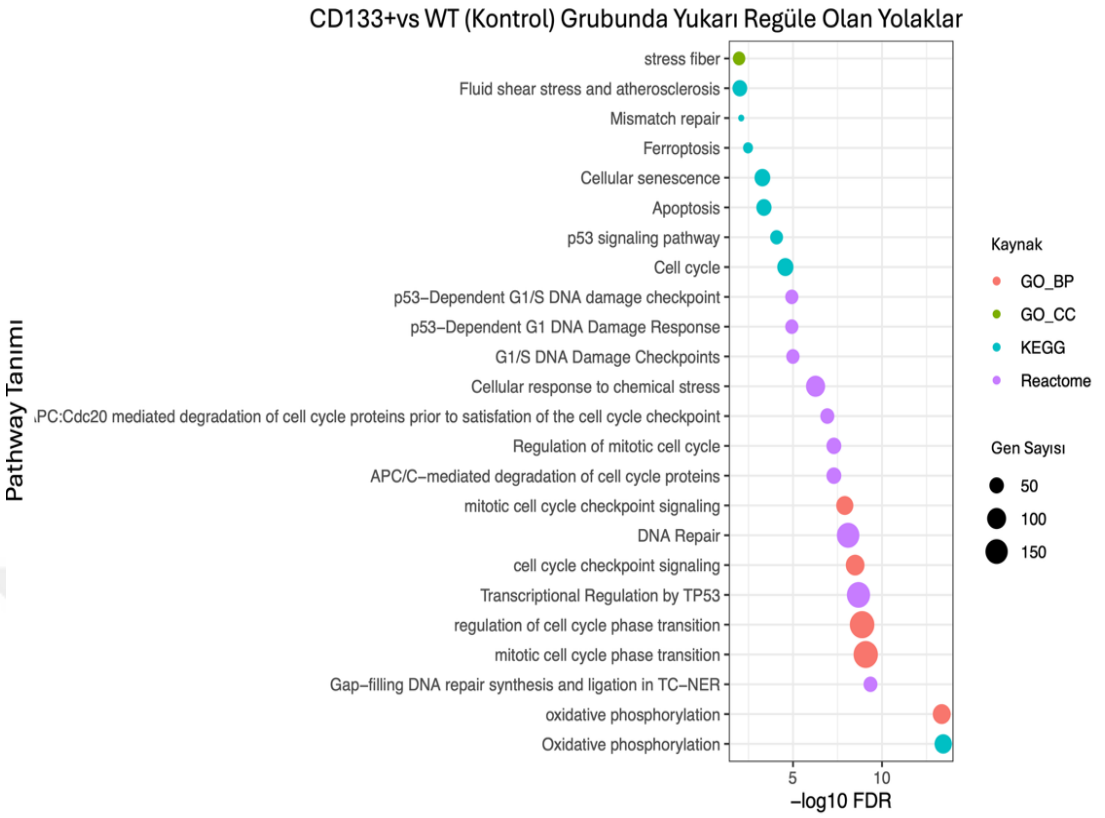
İnsan kaynaklı hücre hatlarından elde edilen tümör örneklerinde CD133+ ve WT grupları kontrol koşullarında karşılaştırıldığında, anlamlı diferansiyel olarak ifade edilen genlerin paternine göre belirgin biyolojik farklılıklar ortaya çıkmıştır. Volkanoplot analizinde (Şekil 3.28), özellikle p53 yolakları, hücre döngüsü regülasyonu, DNA onarımı ve apoptozla ilişkili genlerin yukarı regüle olduğu görülmektedir. TP53, CHEK1, CHEK2, BCL2, MSH6,

MLH1 ve CDK1 gibi genler yüksek anlamlılıkla farklılaşmış olup, CD133+ grupta proliferasyon ve DNA hasar yanıtı mekanizmalarının daha aktif hale geldiğini düşündürmektedir.



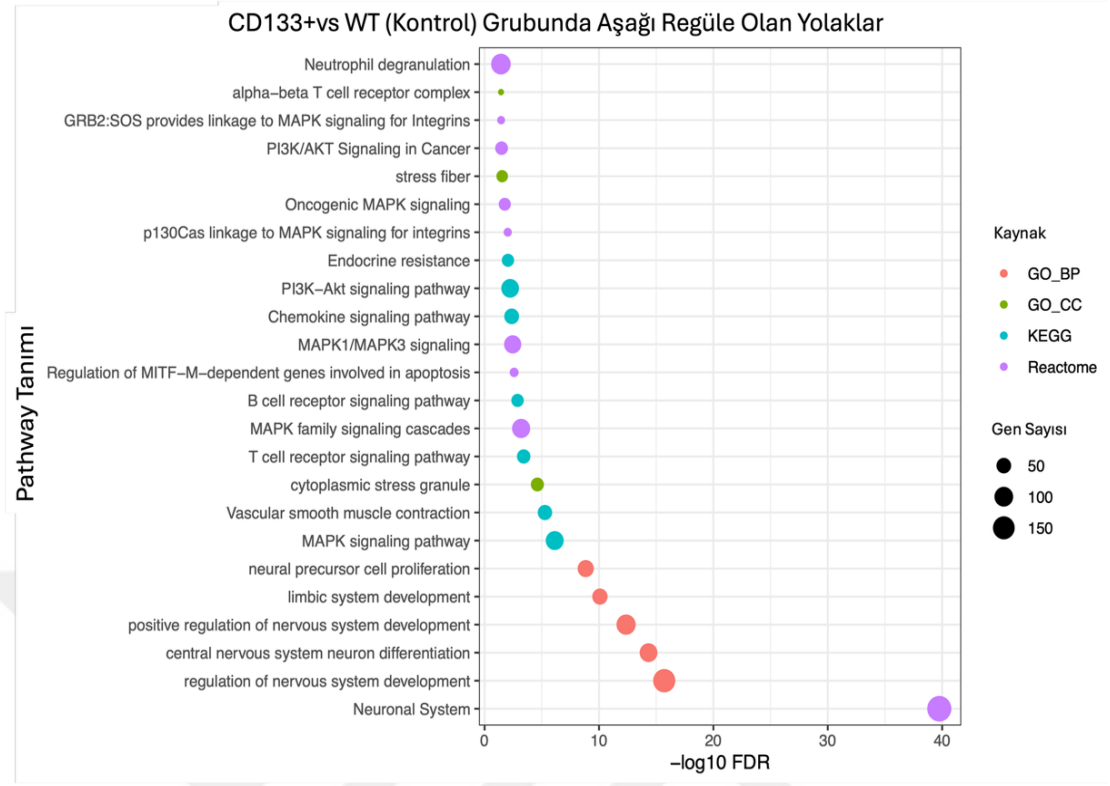
Şekil 3.28. CD133+ vs WT ile tümör genotiplerinde kontrol gruplarının belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi

Yukarı regüle edilen yolaklar (Şekil 3.29) arasında p53 sinyal yolağı, G1/S kontrol noktası, mitotik geçişler, hücre döngüsü kontrolü, oksidatif fosforilasyon ve kemoterapiye yanıtla ilişkili checkpoint sistemleri öne çıkmaktadır. Bu süreçler, tümör hücrelerinin artan proliferatif kapasitesini ve genetik stabiliteyi sağlama eğilimlerini yansıtır.



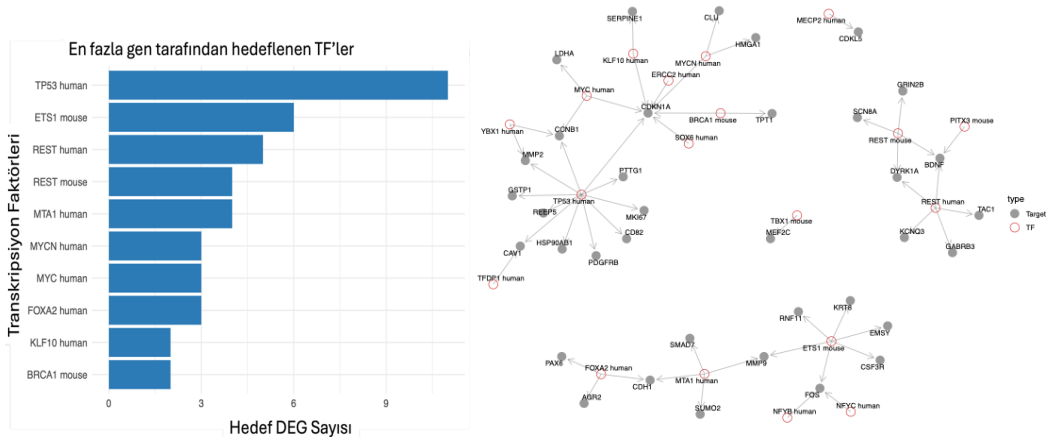
Şekil 3.29. Tümör örneklerinde CD133+ vs WT kontrol grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

Aynı karşılaştırmada aşağı regüle edilen yolaklara bakıldığında (Şekil 3.30), MAPK ve PI3K–AKT sinyalleme, T hücre reseptör sinyal iletimi, B hücresi reseptörü ile ilişkili yolaklar ve nöronal gelişim süreçlerinin baskılandığı saptanmıştır. CD133⁺ glioblastoma hücrelerinde nöronal sistem ve sinir gelişimiyle ilişkili gen setlerinin anlamlı biçimde aşağı regüle olması, bu alt popülasyonun daha az farklılaşmış ve kök hücre-benzeri bir fenotip sergilediğini düşündürmektedir. Bu durum, CD133⁺ hücrelerin nöronal olgunlaşma programlarını baskılayarak tümörün plastikliğini ve direnç kapasitesini artırdığına işaret etmektedir.



Şekil 3.30. Tümör örneklerinde CD133+ vs WT kontrol grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

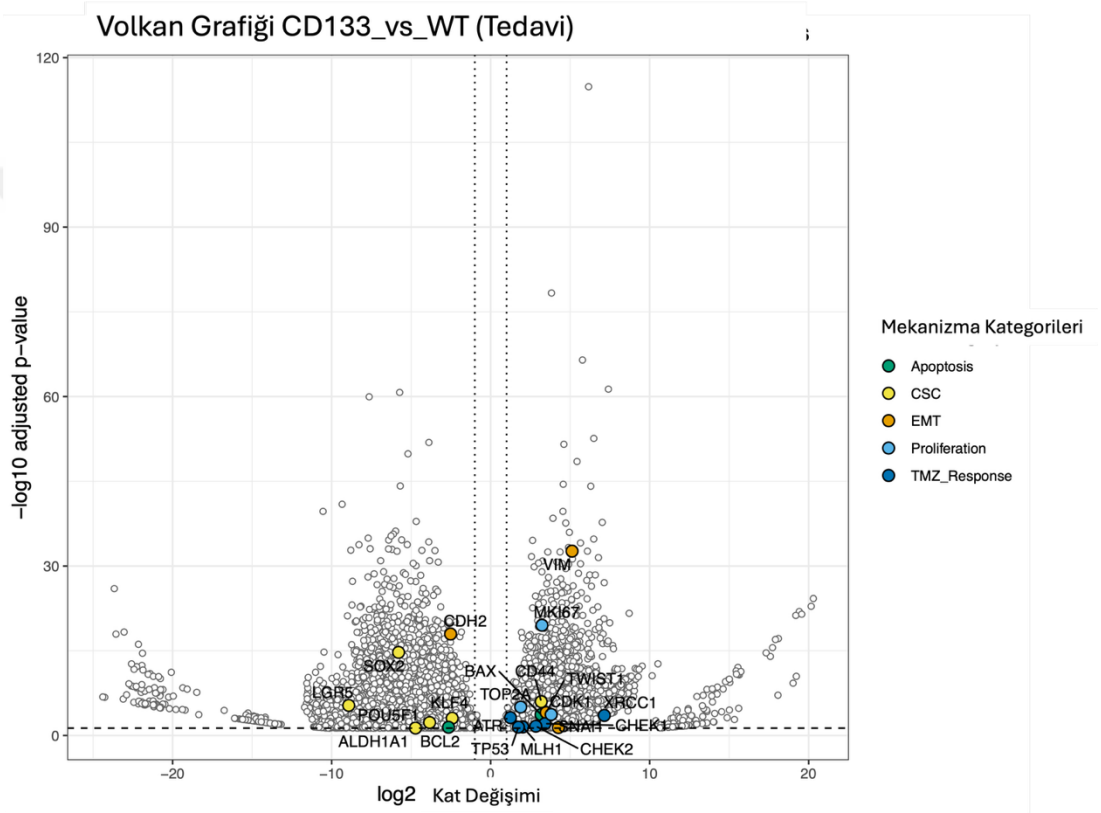
Transkripsiyon faktörü analizi sonucunda en fazla hedeflenen TF'ler arasında TP53, ETS1, REST, MYCN, FOXA2 ve MTA1 gibi tümör biyolojisiyle yakından ilişkili faktörler öne çıkmıştır (Şekil 3.31). Bu TF'lerin hedeflediği DEG'ler arasındaki bağlantılar TF-hedef gen etkileşim ağında gösterilmiştir. Özellikle TP53 merkezli geniş bir regülasyon ağı, CD133+ tümör hücrelerinin transkripsiyonel programının farklılaştığını göstermektedir.



Şekil 3.31. CD133+ vs WT (kontrol) karşılaştırılmasında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi

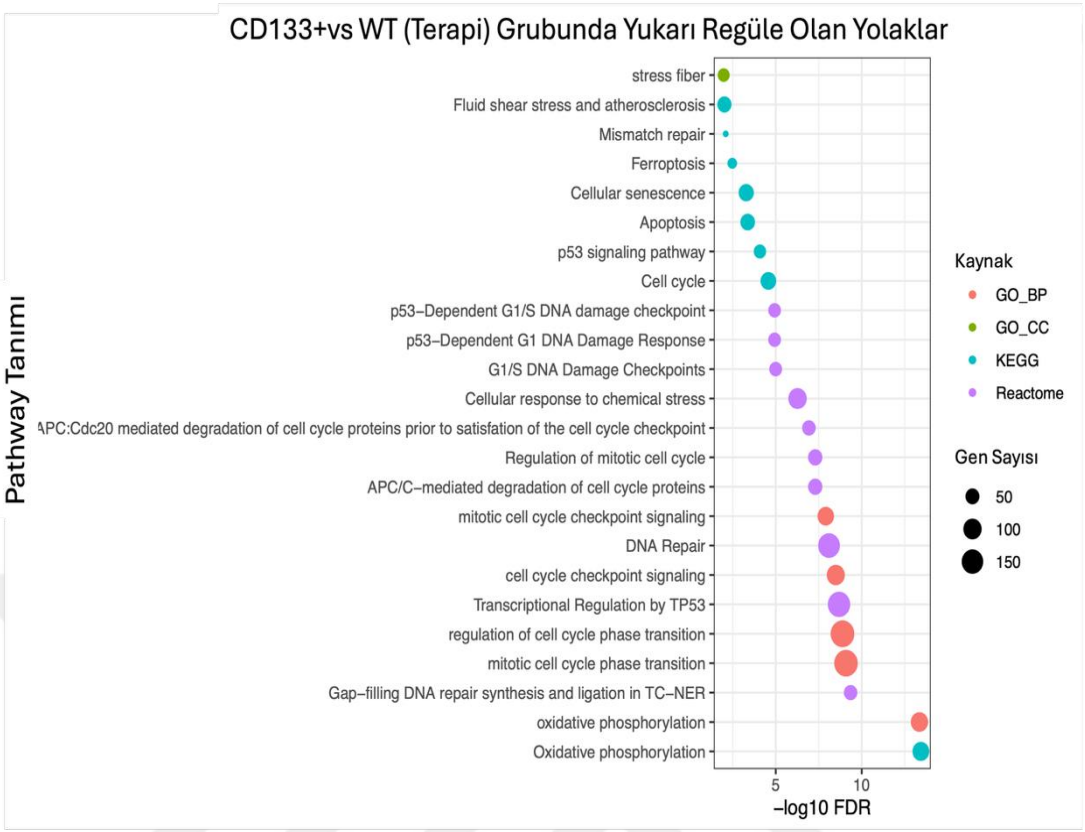
3.5.3.2. CD133⁺ vs WT Terapi Gruplarının Karşılaştırılması

Diferansiyel gen ekspresyonu analizi sonucunda elde edilen genlerin log2 kat değişimi ve anlamlılık düzeylerine göre oluşturulan volkan grafiği, farklı mekanizmalara ait biyolojik olarak önemli genleri göstermektedir. Bu grafikte, özellikle hücre ölümü, kanser kök hücreliği, epitel-mezenkimal geçiş, hücre proliferasyonu ve temozolomid yanıtı ile ilişkili genlerde belirgin değişimler gözlenmiştir (Şekil 3.32).



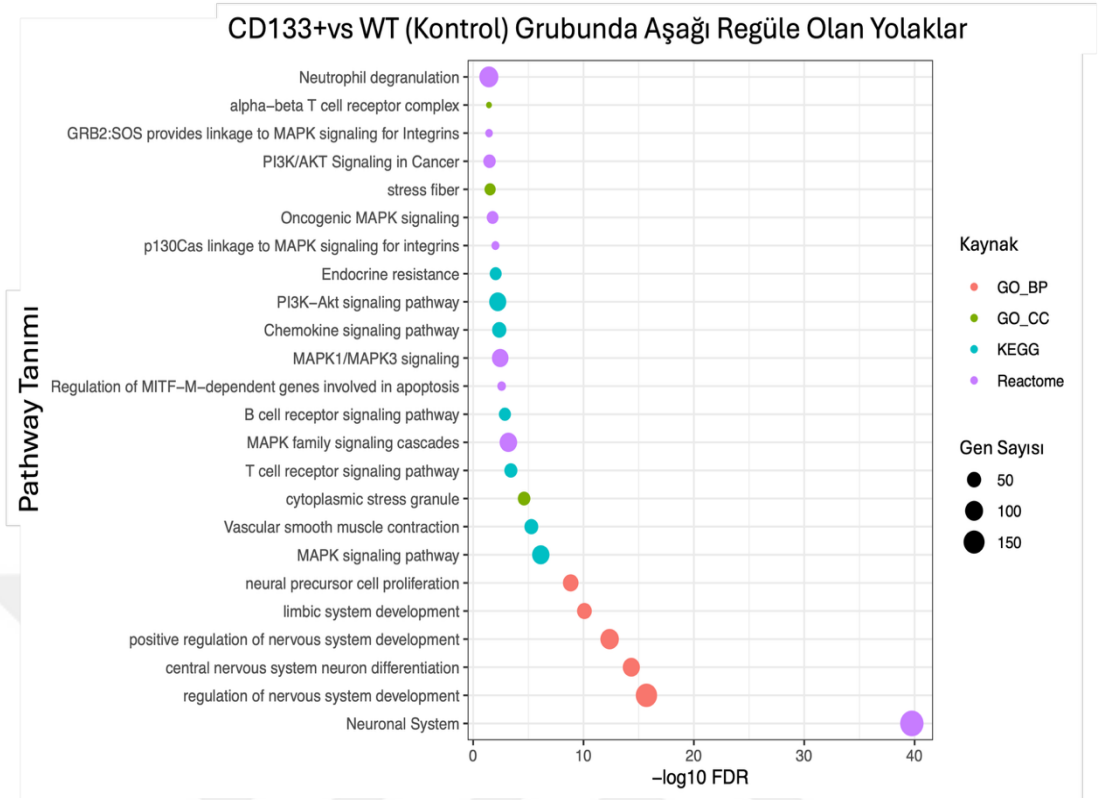
Şekil 3.32. CD133+ vs WT ile genotiplerinde terapi gruplarının tümör dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi

Yukarı regüle edilen genlerin fonksiyonel anotasyon analizi sonucunda; DNA hasar yanıtı, hücre döngüsü kontrolü, p53 yolakları, oksidatif fosforilasyon ve hücre yaşlanması gibi yolların anlamlı olarak zenginleştiği tespit edilmiştir (Şekil 3.33). CD133⁺ glioblastoma hücrelerinde tedavi sonrası DNA onarımı, p53-aracılı hücre döngüsü kontrolü ve oksidatif fosforilasyon yolaklarının anlamlı düzeyde yukarı regüle olması, bu alt popülasyonun kemoterapiye karşı adaptif bir yanıt geliştirdiğini göstermektedir. Bu durum, CD133⁺ hücrelerin DNA hasarına karşı onarım temelli direnç mekanizmaları ve metabolik esneklik yoluyla tedaviye tolerans kazandığını düşündürmektedir.



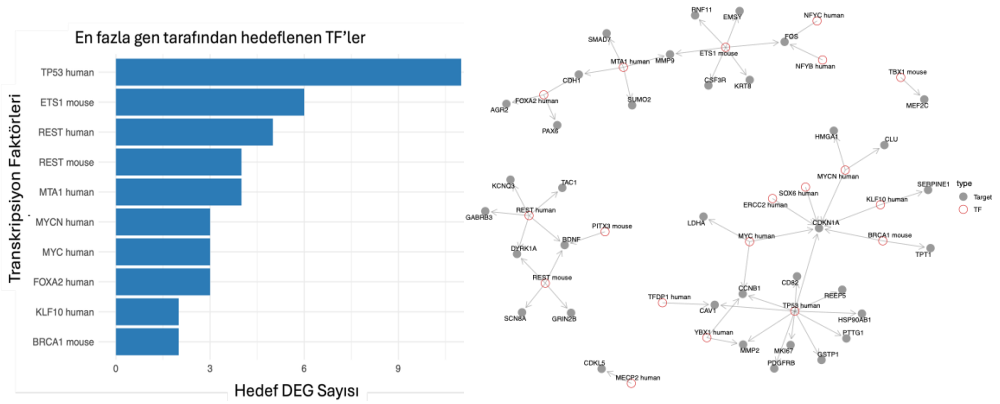
Şekil 3.33. Tümör örneklerinde CD133+ vs WT terapi grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

Aşağı regüle edilen genler için yapılan zenginleştirme analizleri, MAPK ve PI3K-AKT sinyal yolağı, B hücre ve T hücre reseptör sinyalizasyonu, kemokin sinyallemesi ve sinir sistemi gelişimi gibi immün ve sinirsel yanıtlarla ilişkili yolların baskılandığını ortaya koymuştur (Şekil 3.34).



Şekil 3.34. Tümör örneklerinde CD133+ vs WT kontrol grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik

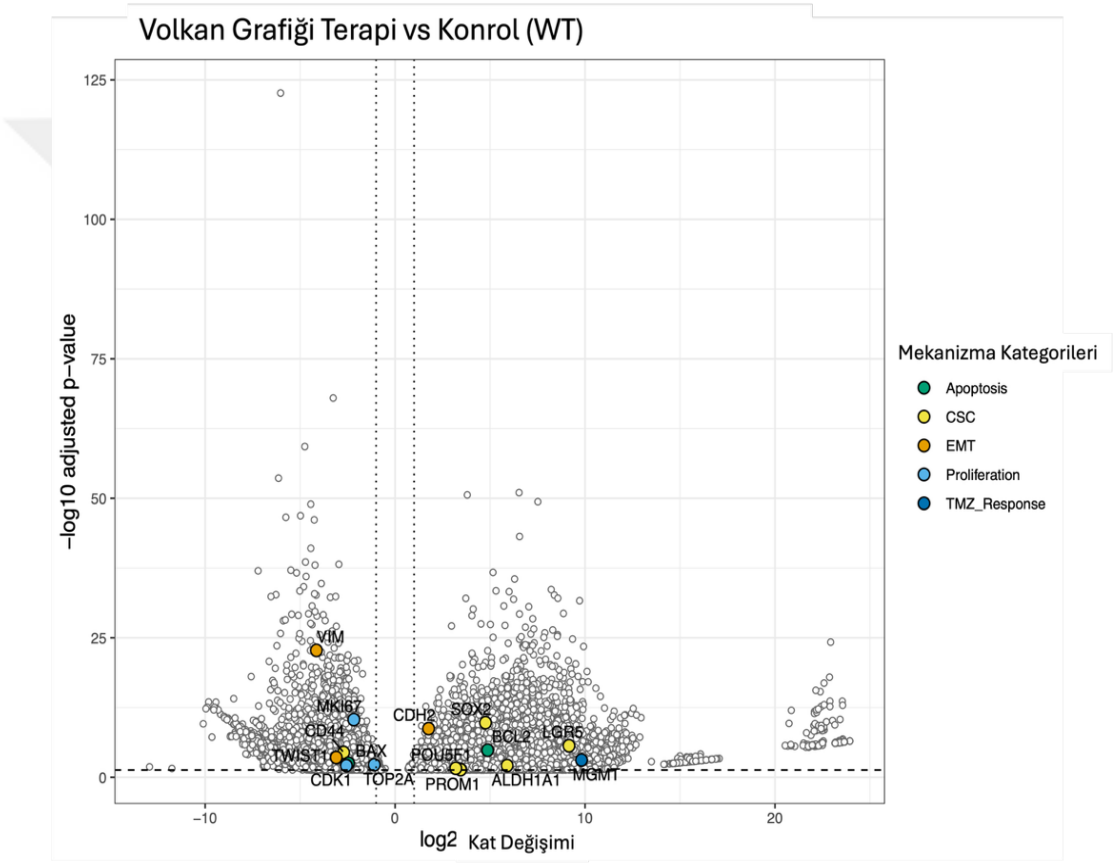
Transkripsiyon faktörü hedef analizi sonucunda en fazla hedeflenen TF'ler arasında TP53, ETS1, REST, MYC, MTA1, MYCN ve FOXA2 gibi kanserde kritik rol oynayan düzenleyici elemanlar öne çıkmıştır (Şekil 3.35). Bu TF'ler tarafından regüle edilen genlerin oluşturduğu etkileşim ağı, ilgili transkripsiyonel modüller arasındaki bağlantıları görselleştirmiştir.



Şekil 3.35. CD133+ vs WT (terapi) karşılaştırılmasında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi

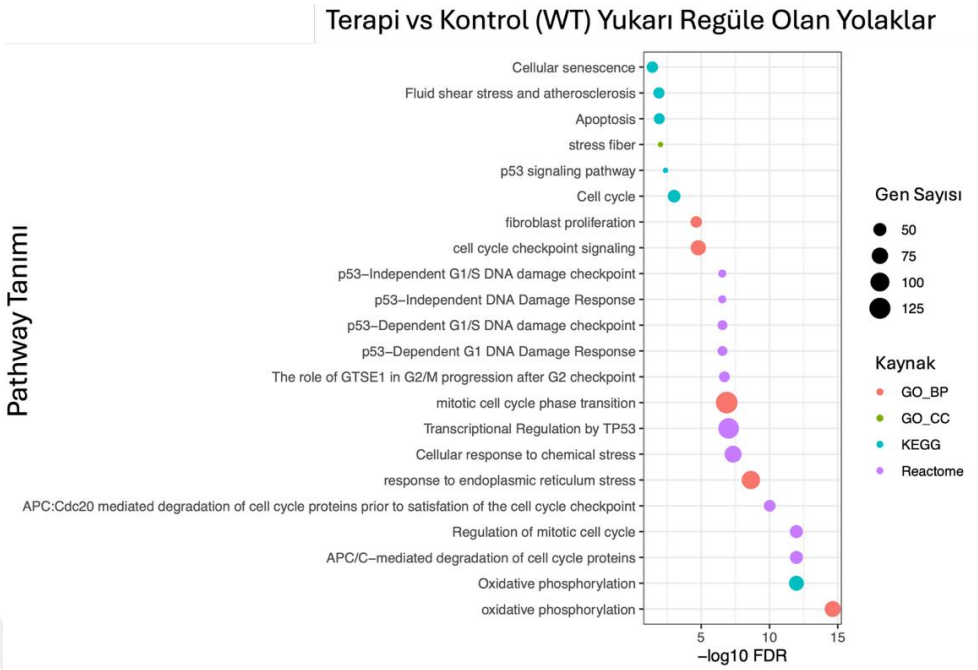
3.5.3.3. WT Tümör Mikroçevresinde Tedaviye Yanıt

WT tümörlerinde CD+TMZ terapisine bağlı transkriptomik değişimlerin değerlendirilmesi sonucunda, diferansiyel gen ekspresyon analizine göre pek çok genin anlamlı şekilde regülasyona uğradığı belirlendi (Şekil 3.36). Özellikle hücre döngüsü (CDK1, TOP2A), kök hücre ilişkili markerlar (PROM1, ALDH1A1), apoptoz ve proliferasyonla ilişkili genler (BCL2, MKI67, VIM) tedavi sonrası yukarı veya aşağı yönde anlamlı değişim göstermiştir.



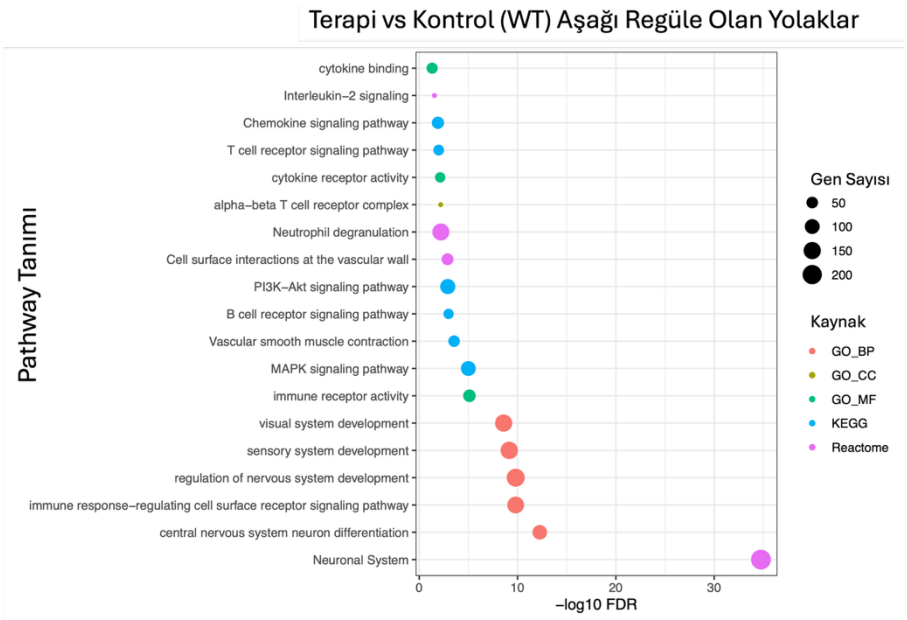
Şekil 3.36. CD + TMZ ile tedavi edilen WT tümör dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi

Yolak analizi sonuçlarına göre, tedavi uygulanan WT grubunda yukarı regüle olan biyolojik süreçler arasında p53 sinyal yolu, apoptoz, hücre döngüsü kontrol noktaları, fibroblast proliferasyonu, oksidatif fosforilasyon ve kimyasal strese hücresel yanıt gibi mekanizmalar ön plana çıkmıştır (Şekil 3.37).



Şekil 3.37. Tümör örneklerinden terapi vs kontrol (WT) grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

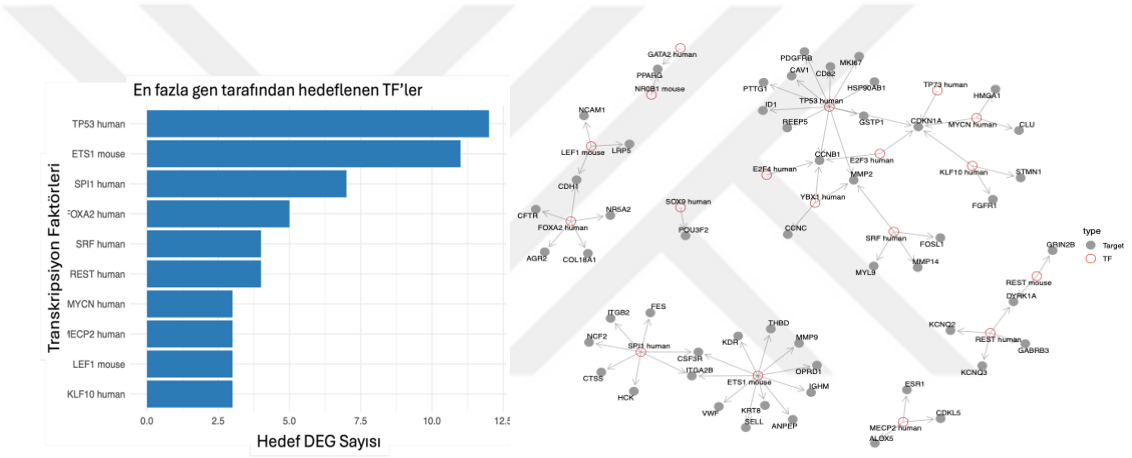
Buna karşılık, tedavi sonrası WT grubunda baskılanan yolaklar arasında ise bağışıklık sistemine ait birçok yolak yer almıştır. Özellikle T hücre reseptörü sinyal iletimi, kemokin sinyallemesi, PI3K-Akt, MAPK sinyal yolları, immün reseptör aktivitesi ve nöronal gelişimle ilişkili süreçler anlamlı şekilde aşağı regülasyona uğramıştır (Şekil 3.38).



Şekil 3.38. Tümör örneklerinden terapi vs kontrol (WT) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik

Transkripsiyon faktörü analizi ise tedavi sonrası değişen genlerin, bazı TF'ler tarafından yoğun şekilde hedeflendiğini göstermiştir. Özellikle TP53, ETS1, SPI1, FOXA2, SRF ve REST gibi TF'lerin çok sayıda farklı genin ekspresyonunu düzenlediği belirlenmiştir. TF-hedef gen ağı incelendiğinde, bu faktörlerin merkezi bir düzenleyici rol üstlendiği görülmektedir (Şekil 3.39).

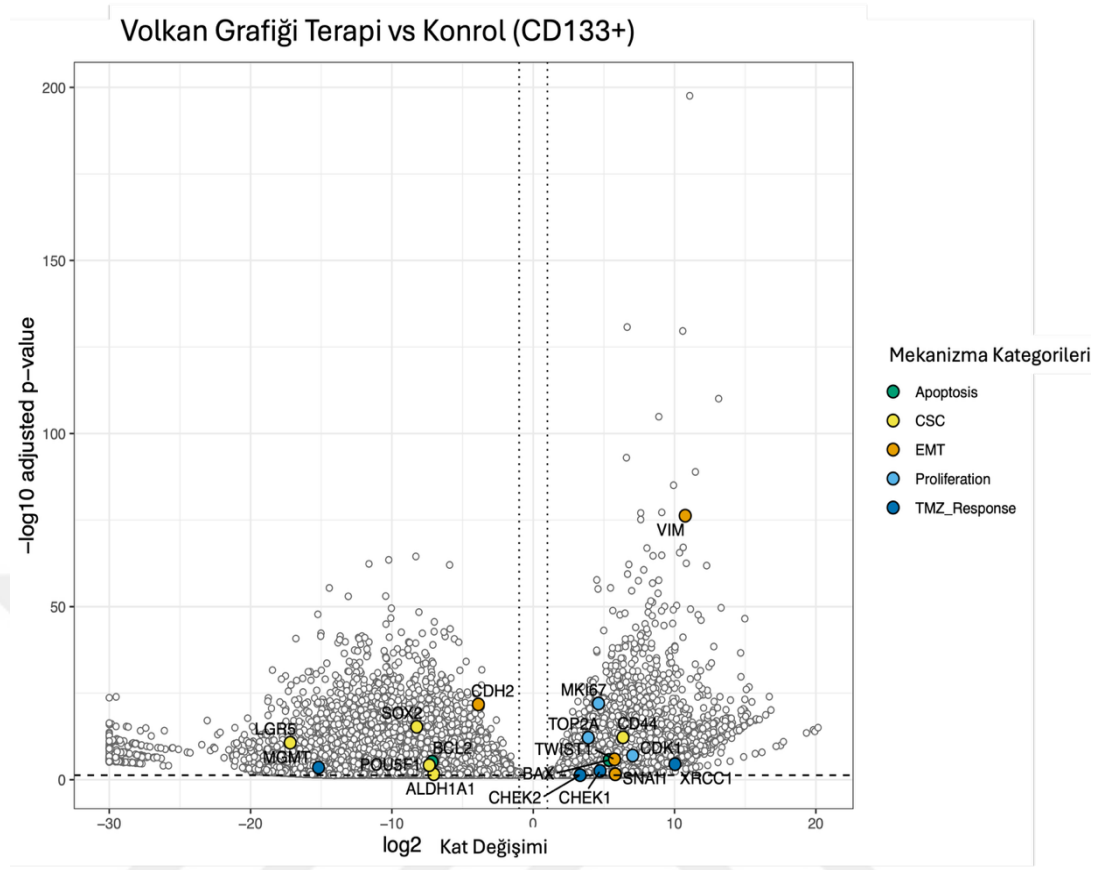
Bu veriler, tedaviye yanıt olarak WT tümörlerde hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz mekanizmalarının aktive olduğunu, buna karşın bağışıklık yanıtı ile ilişkili yolakların baskılandığını ortaya koymaktadır. Bu durum, tedavinin WT genotipindeki tümörlerde immün baskılanma ve proliferatif kontrolün yeniden düzenlenmesi şeklinde etki gösterdiğini düşündürmektedir.



Şekil 3.39. Terapi alan WT tümör sonuçlarında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi

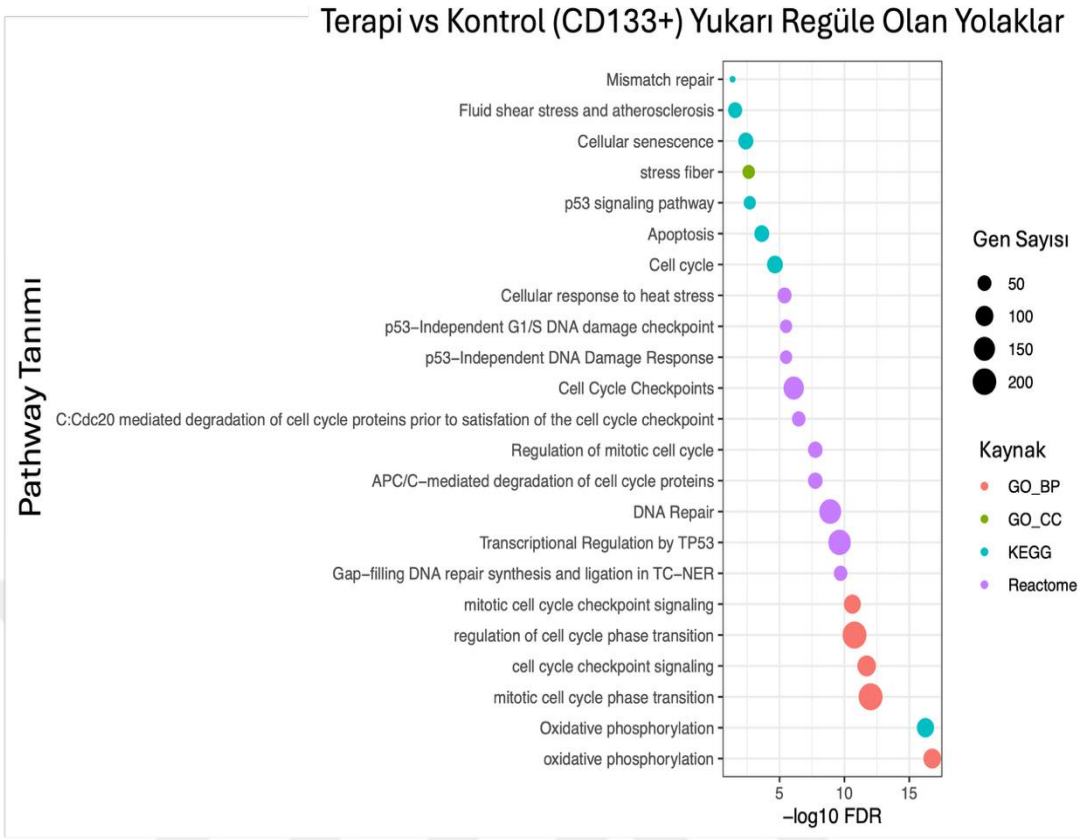
3.5.3.4. CD133+ Tümör Dokusundaki Tedaviye Yanıt

Terapi uygulanan CD133+ tümör örnekleri ile kontrol grubu arasındaki karşılaştırmada anlamlı farklılık gösteren genler belirlenmiştir. Volkan diyagramı üzerinden değerlendirildiğinde, birçok önemli biyolojik mekanizmaya ait genlerde istatistiksel olarak anlamlı yukarı ve aşağı regülasyon tespit edilmiştir (Şekil 3.40). Özellikle kanser kök hücresi ile ilişkili SOX2, POU5F1 ve ALDH1A1 genlerinde anlamlı düzeyde farklılaşma gözlenmiştir. Bununla birlikte, BAX, TP53, CDK1, MKI67, SNAI1, CHEK1, XRCC1 gibi apoptoz, hücre döngüsü, proliferasyon ve DNA hasar onarımıyla ilişkili genlerde de belirgin değişiklikler saptanmıştır.



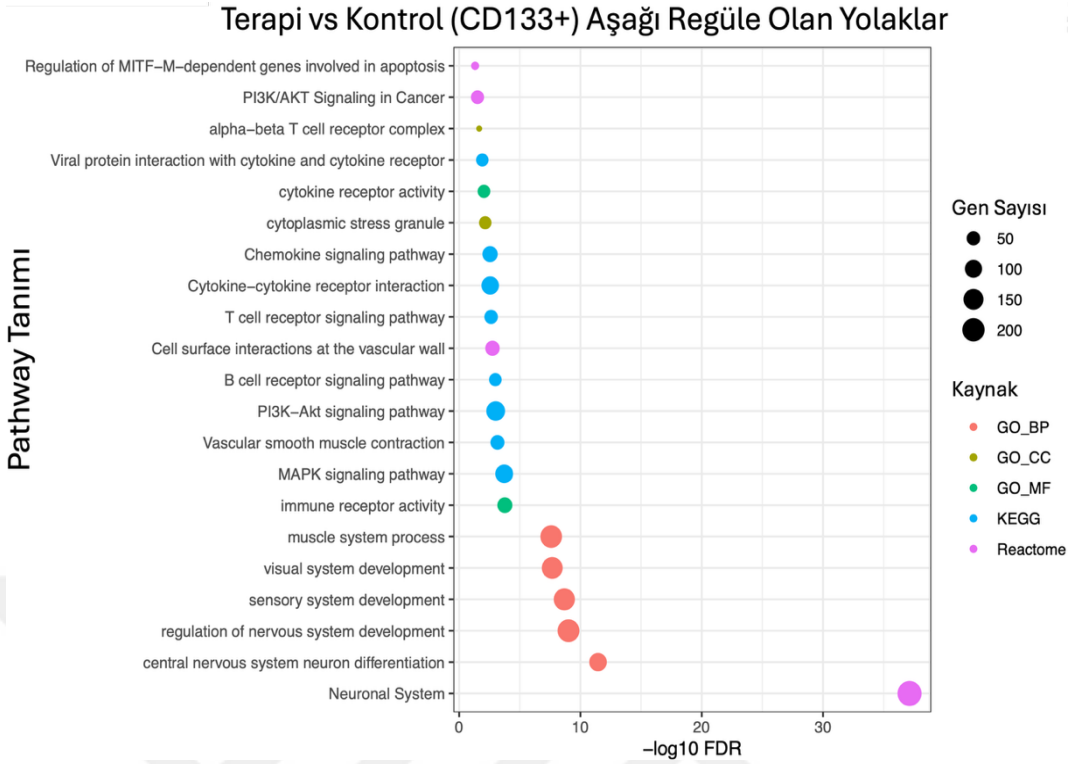
Şekil 3.40. CD + TMZ ile tedavi edilen CD133+ tümör dokularındaki belli başlı mekanizmalarla ilişkili genlerin volkan grafiğinde gösterimi

Yukarı regüle edilen yolaklar arasında, özellikle DNA hasar yanıtı, hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, p53 sinyal yolakları ve oksidatif fosforilasyon dikkat çekmiştir (Şekil 3.41). Bu sonuçlar, tedavi uygulanan CD133+ tümörlerde hücresel stres ve DNA hasarına karşı artmış bir savunma yanıtını yansıtmaktadır. Ayrıca “Mismatch repair”, “Fluid shear stress” ve “Cellular senescence” gibi yolakların aktivasyonu, tedaviye yanıtın moleküler düzeydeki yansımalarını ortaya koymaktadır.



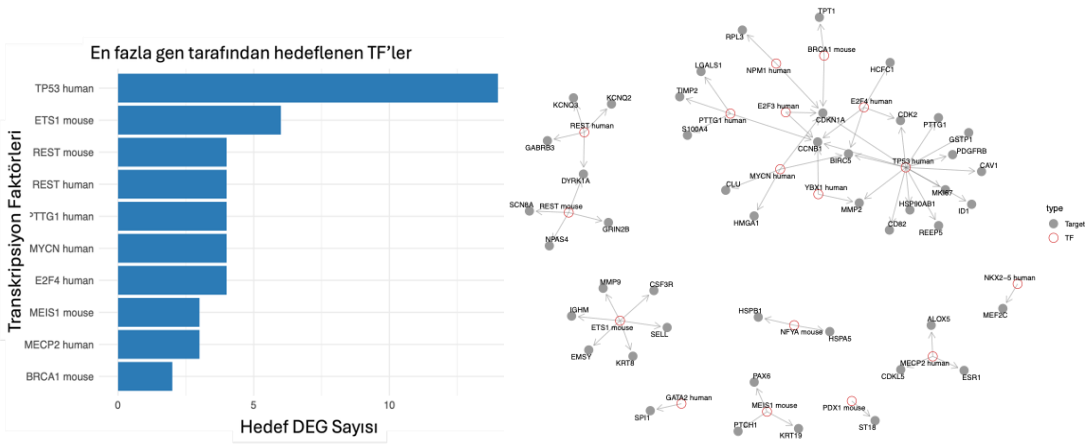
Şekil 3.41. Tümör örneklerinden terapi vs kontrol (CD133+) grubunda yukarı regüle olan yolakları gösteren grafik

Buna karşılık, aşağı regüle edilen yolakların bağışıklık sistemi ve sinyal iletimiyle ilişkili olduğu görülmektedir. Özellikle PI3K-AKT sinyal yolu, T hücre reseptör sinyallemesi, kemokin sinyallemesi, MAPK yolu, B hücresi reseptör yolu ve nöronal sistem gelişimi gibi yolakların anlamlı şekilde inhibe olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.42). Bu durum, tedavi sonrası tümör mikrosisteminde bağışıklık baskılanması ve hücresel iletişimde azalma olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3.42. Tümör örneklerinden terapi vs kontrol (CD133+) grubunda aşağı regüle olan yolakları gösteren grafik

Transkripsiyon faktörü analizleri sonucunda, en fazla hedeflenen faktörün TP53 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ETS1, REST, MYCN, E2F4, MEIS1 ve BRCA1 gibi tümör biyolojisi açısından kritik TF'ler de farklılaşan genler tarafından hedef alınmıştır. TF–hedef gen etkileşim ağı analizi, TP53'ün geniş bir genetik düğüm merkezi oluşturduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3.43).



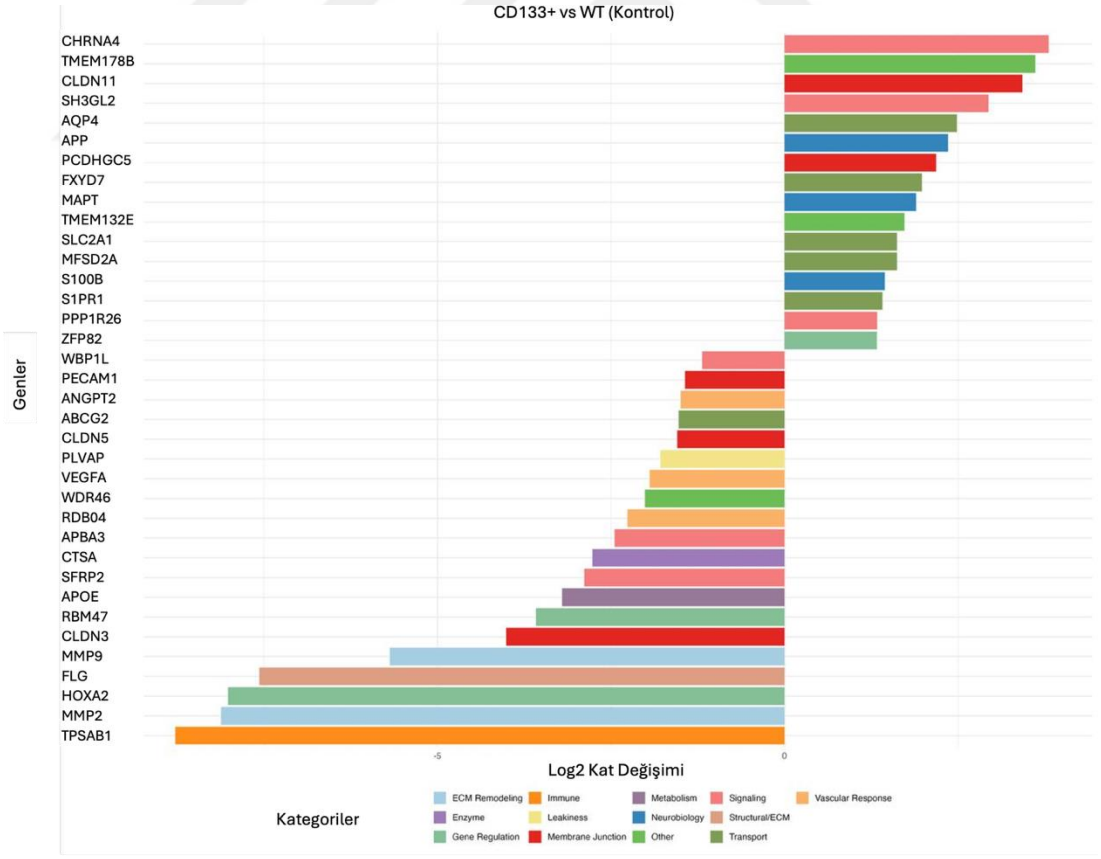
Şekil 3.43. Terapi alan CD133+ tümör sonuçlarında öne çıkan TF'ler ve ilişkili genlerini gösteren bağlantı analizi

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, tedavi sonrası CD133+ tümör hücrelerinde DNA hasarı ve hücre döngüsü regülasyonuna dair savunma mekanizmalarının aktive olduğu, buna karşın immün yanıt ve sinyal iletiminin baskılandığı görülmektedir. Bu sonuçlar, CD133+ glioblastoma alt popülasyonlarının tedaviye karşı özgün transkriptomik adaptasyonlar geliştirdiğini ortaya koymaktadır.

3.6. Kan-Beyin Bariyeri ile İlişkili Bulgular

3.6.1. CD133+ GBM'nin BBB Geçirgenlik Genleri Üzerindeki Etkisi

CD133^{+} glioblastoma modelinin kan–beyin bariyerine olan etkisini daha detaylı irdelemek amacıyla literatür destekli olarak oluşturulan, EnrichR ve topplot tabanlı bir BBB ilişkili Çizelge 2.2'de belirtilen gen paneli kullanılarak diferansiyel gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, CD133^{+} GBM ile WT GBM kontrolü arasındaki karşılaştırmaya dayanmaktadır (Şekil 3.44).



Şekil 3.44. EnrichR ve Topplot tabanlı databankaları baz alınarak BBB ilişkili gen paneline göre CD133^{+} tümörlerin WT tümörleri ile karşılaştırılması

Analiz sonuçlarına göre, CD133$^+$ tümörlerin BBB'nin moleküler bileşenlerini önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir. Özellikle aşağıdaki bulgular dikkat çekicidir.

Vasküler geçirgenlik ve matris yeniden yapılanması ile ilişkili olan Mmp2, Mmp9, Clnd3, ApoE, Hoxa2 ve TPSAB1 genlerinin anlamlı düzeyde downregüle olduğu görülmştür. Bu durum, CD133$^+$ tümörlerin BBB yapısını bozarak damar geçirgenliğini artırabilecek bir mikroçevre oluşturduğunu düşündürmektedir. Endotel–endotel hücre bağlantıları (tight junctions) açısından önemli olan Cldn5, Esam, Pecam1 ve Plvap gibi genlerde de aşağı yönlü regülasyon gözlemlenmiştir. Bu bulgu, CD133$^+$ GBM modelinde sıkı bağlantı komplekslerinin zayıflatılmış olduğunu ve dolayısıyla BBB bütünlüğünün daha kolay bozulabileceğini göstermektedir.

Taşıyıcı proteinleri temsil eden Abcg2, Slc2a1, Mfsd2a ve S1pr1 gibi genlerin ekspresyon düzeylerinde de düşüş tespit edilmiştir. Bu genlerin downregülasyonu, metabolit ve ilaç geçişini düzenleyen mekanizmaların CD133$^+$ GBM'de aksayabileceğini ve terapötik yanıtı zorlaştırabileceğini göstermektedir.

Nörobiyolojik fonksiyonlar ve sinyal iletimi açısından önem taşıyan App, MapT, Fxyd7, Sh3gl2 ve Chrna4 gibi genlerdeki ekspresyon değişiklikleri, CD133$^+$ tümör mikroçevresinin yalnızca geçirgenlik değil, aynı zamanda nöronal–vasküler etkileşimleri de etkileyebileceğini göstermektedir.

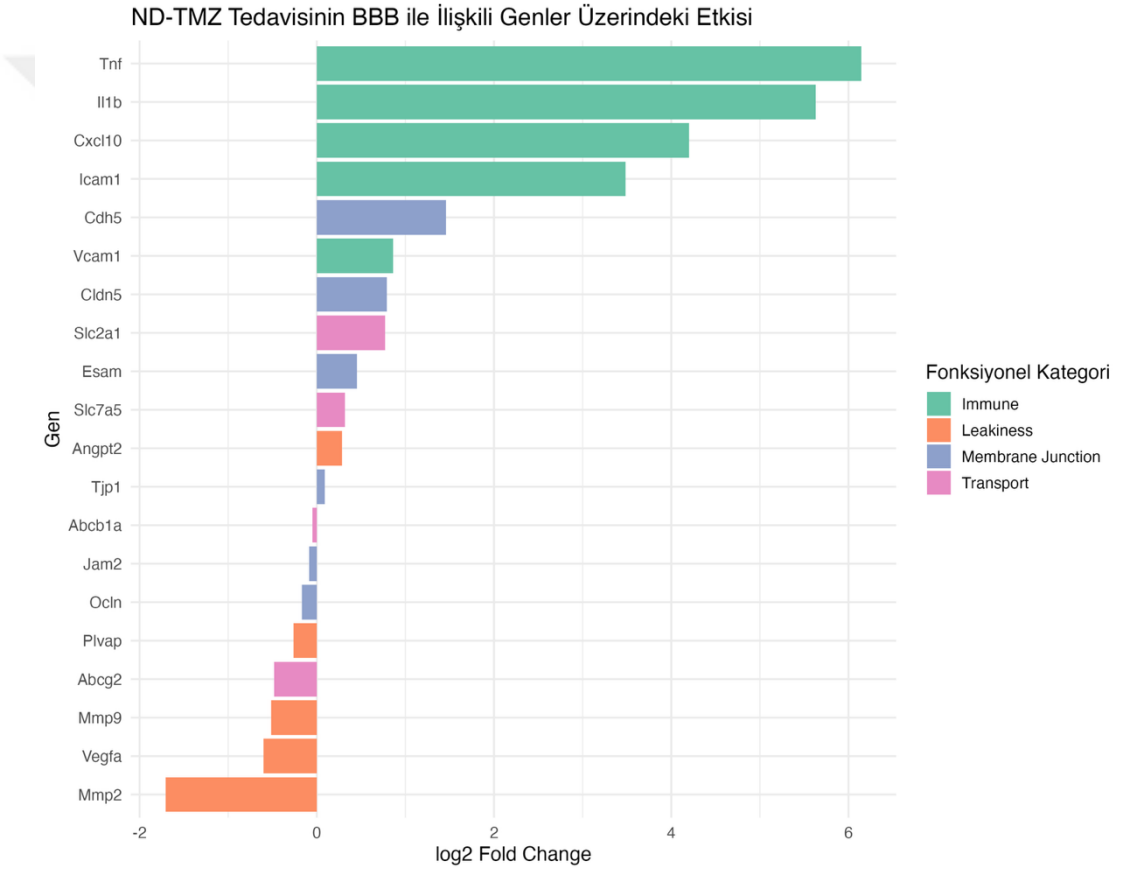
Ek olarak, bazı proinflamatuar ve endotel aktivasyonunu destekleyen genlerde (ör. Il1b, Tnf, Angpt2, Cxcl10) ekspresyon düzeylerinin değişmiş olması, CD133$^+$ GBM modelinin immün hücre infiltrasyonunu modüle edebilen bir tümör mikroçevresi oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Genel olarak, bu analiz sonuçları CD133$^+$ glioblastoma hücrelerinin, BBB'nin yapısal bütünlüğünü bozan, geçirgenliği artıran ve ilaç taşıma potansiyelini düşüren bir genetik imza sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu moleküler bozulmalar, CD133$^+$ GBM'nin terapötik direncine katkıda bulunan önemli faktörlerden biri olabilir. Dolayısıyla BBB geçirgenlik ve taşıyıcı genler üzerindeki bu baskılayıcı etki, CD133$^+$ tümör hücrelerinin kötü prognozla ilişkili agresif fenotipini destekler niteliktedir.

3.6.2. ND-TMZ'nin BBB Geçirgenlik Genleri Üzerindeki Etkisi

ND-TMZ'nin WT GBM Modelinde BBB Yapı ve Geçirgenlikle İlişkili Genler Üzerindeki Etkisi:

WT glioblastoma modelinde, ND-TMZ tedavisinin kan–beyin bariyerine etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan gen ekspresyon analizinde, geçirgenlik, bağışıklık ve taşıyıcı sistemlerle ilişkili pek çok genin anlamlı düzeyde regülasyona uğradığı saptanmıştır (Şekil 3.45).



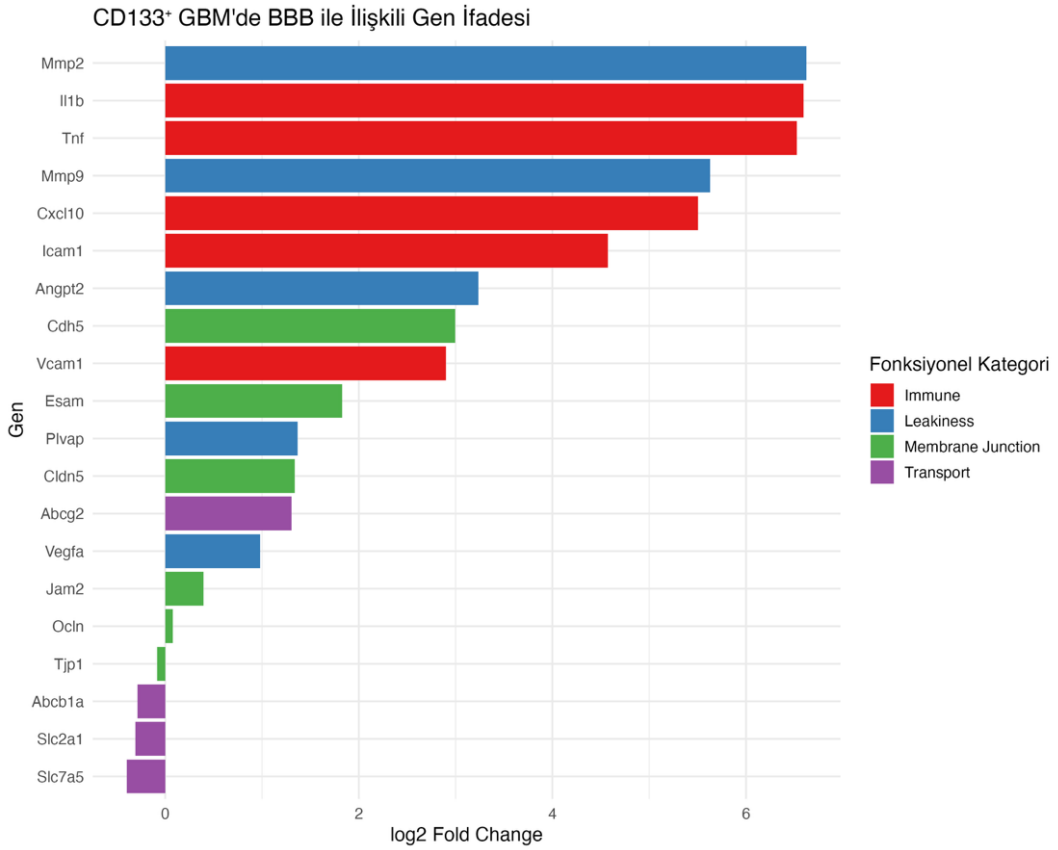
Şekil 3.45. ND-TMZ'nin WT GBM modelinde BBB yapı ve geçirgenlikle ilişkili genler

Tnf, Il1b, Cxcl10, Icam1 ve Vcam1 gibi proinflamatuar ve immün hücre geçişini kolaylaştıran genlerin ekspresyonu artmıştır. Bu durum, tedavinin bağışıklık hücrelerinin tümör bölgesine erişimini kolaylaştıracak bir enflamatuar mikroçevre oluşturduğunu düşündürmektedir.

Bununla birlikte Mmp2, Mmp9 ve Vegfa gibi damar geçirgenliğini artıran ve matriks yeniden modellemesinde görevli genlerin anlamlı şekilde aşağı regüle olması, ND-TMZ tedavisinin BBB yapısal bütünlüğünü kısmen koruyucu bir etki oluşturabileceğini göstermektedir. Claudin-3 ve 5, Esam, Ocln, Tjp1 gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ise hafif arttığı görülmüştür.

CD133⁺ GBM Modelinde BBB Yapı ve Geçirgenlikle İlişkili Gen İfadesi:

CD133⁺ glioblastoma modelinde, WT model ile karşılaştırıldığında BBB ile ilişkili birçok gende anlamlı upregülasyon gözlemlenmiştir. Özellikle Mmp2, Mmp9, Il1b, Tnf ve Cxcl10 genlerinin yüksek düzeyde ifade edilmesi, CD133⁺ tümör mikroçevresinin daha invaziv, inflamatuar ve geçirgen bir fenotip sergilediğine işaret etmektedir (Şekil 3.46).



Şekil 3.46. CD133⁺ GBM modelinde BBB yapı ve geçirgenlikle ilişkili genler

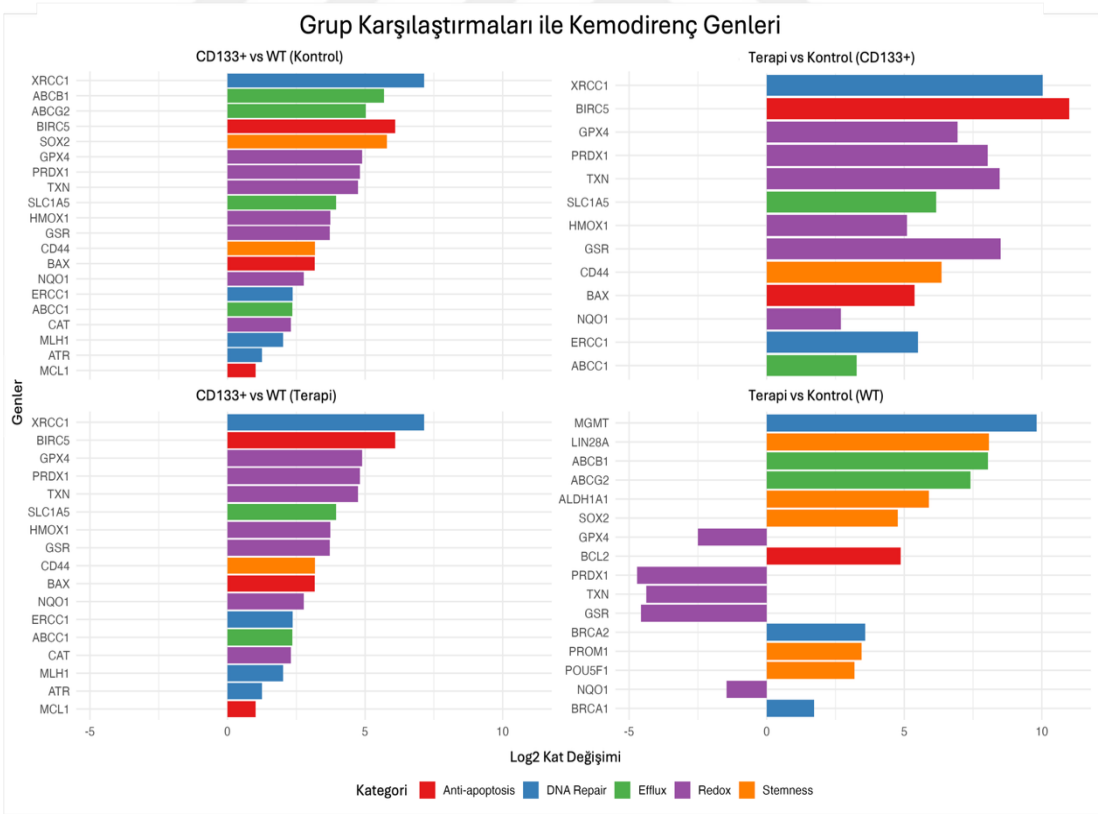
Ayrıca Angpt2, Icam1, Vcam1, Plvap gibi endotel geçirgenlik ve immün hücre adezyonunu etkileyen genlerin de ekspresyonunun artmış olması, BBB yapısının CD133⁺ hücreler tarafından belirgin şekilde zayıflatıldığını göstermektedir.

Abcg2, Slc2a1, Slc7a5 gibi taşıyıcı sistemle ilişkili genlerdeki artış, bu modelde metabolit ve ilaç taşınımının artabileceğini düşündürmektedir.

Bu genel ifade profili, $CD133^{+}$ GBM'nin tedaviye dirençli yapısının temelinde kan–beyin bariyerinin işlevsel zayıflaması ve immün kaçışa elverişli bir mikroçevre oluşumu olduğunu göstermektedir.

3.7. Kemoterapik Direnç ile İlişkili Bulgular ve Genel Değerlendirme

Kemoterapötik direnç, glioblastoma tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri olup, tümör hücrelerinin apoptozdan kaçınması, DNA hasarlarını onarması, ilaçları hücre dışına atması ve kök hücre benzeri fenotipler kazanması gibi çok katmanlı biyolojik mekanizmalarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, literatürde kemoterapi direnciyle ilişkili olduğu gösterilen 30'dan fazla geni içeren özel bir panel oluşturularak dört ayrı grup karşılaştırmasında değerlendirme yapılmıştır (Şekil 3.47).



Şekil 3.47. Kemoterapik direnç ile ilişkili mekanizmalarda rol alan genler ile oluşturulmuş direnç paneline ait grafik

3.7.1. CD133$^+$ vs WT (Kontrol)

CD133$^+$ tümör hücrelerinin, tedavi uygulanmamış WT U87 tümör hücrelerine kıyasla sahip olduğu doğal kemorezistans profili bu karşılaştırma ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, CD133$^+$ hücrelerde DNA tamir mekanizmalarının (özellikle XRCC1, ERCC1, ATR ve MLH1) anlamlı şekilde yukarı regüle olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ilaçları hücre dışına atan effluks pompa genleri (ABCB1, ABCG2) ile redoks dengesini sağlayan oksidatif stres regülatörleri (GPX4, PRDX1, TXN, GSR, HMOX1, NQO1) de bu hücrelerde belirgin şekilde artış göstermektedir. SOX2 ve CD44 gibi kök hücre belirteçlerinin de yüksek ekspresyonu, CD133$^+$ alt popülasyonun hem kemoterapiye dirençli hem de kök hücre benzeri bir fenotipe sahip olduğunu güçlü biçimde desteklemektedir.

3.7.2. CD133$^+$ vs WT (Tedavi Altında)

ND-TMZ tedavisi uygulanmış CD133$^+$ ve WT tümörlerin karşılaştırıldığı bu analizde, CD133$^+$ hücrelerin tedavi sonrası da direnç fenotiplerini koruduğu ve bazı direnç genlerini daha da yüksek düzeyde ekspresse ettiği gözlemlenmiştir. XRCC1 ve BIRC5 başta olmak üzere DNA tamiri ve apoptoz inhibisyonuna yönelik genlerin tedavi koşullarında CD133$^+$ tümörlerde baskın şekilde ifade edilmesi, bu alt tipin terapötik strese karşı gelişmiş bir savunma sistemine sahip olduğunu göstermektedir. Redoks regülatörleri de yine yüksek düzeyde kalmaya devam etmiştir. Bu durum, tedaviye rağmen hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan direnç yollarının CD133$^+$ tümörlerde persistan şekilde çalıştığını ortaya koymaktadır.

3.7.3. Terapi vs Kontrol (CD133$^+$)

CD133$^+$ hücre hattında, ND-TMZ tedavisinin doğrudan etkilerinin değerlendirildiği bu karşılaştırmada, kemoterapiye yanıt olarak özellikle anti-apoptotik genler (BIRC5), DNA tamir genleri (XRCC1) ve oksidatif stres savunma genleri (GPX4, PRDX1, TXN) anlamlı şekilde indüklenmiştir. Bu bulgular, tedavinin tümör hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü tetiklemek yerine, aksine hayatta kalma mekanizmalarını aktive ettiği yönünde yorumlanabilir. Bu yönüyle CD133$^+$ hücrelerin, tedavi sonrası bile direnç durumunu koruyabildiği ve bu durumun genetik olarak izlenebilir olduğu gösterilmiştir. Özellikle bu grupta çoklu direnç mekanizmalarının eşzamanlı aktivasyonu, hedeflenebilir direnç ağlarının birlikte değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır.

3.7.4. Terapi vs Kontrol (WT)

WT hücre hattı baz alınarak yapılan tedavi yanıt analizinde ise, tedavi sonrası farklı bir direnç paterni gözlemlenmiştir. Özellikle MGMT ve LIN28A gibi temozolomid direnciyle doğrudan ilişkili genlerin yukarı regülasyonu dikkat çekicidir. Bununla birlikte, *ABCB1* ve *ABCG2* gibi efflux pompa genleri ile BCL2 gibi apoptoz baskılayıcı genlerde de anlamlı artış saptanmıştır. Ayrıca SOX2, PROM1 gibi kök hücre benzeri özellik kazandırabilecek genlerdeki ekspresyon artışı, WT hücrelerin de tedavi sonrası plastik bir direnç profili geliştirebildiğini göstermektedir. Ancak, bu artışların $CD133^+$ hücrelerle kıyaslandığında daha sınırlı ve seçici olduğu gözlemlenmiştir.

Toplu olarak değerlendirildiğinde, $CD133^+$ tümör hücreleri, WT U87 hücrelerine kıyasla hem bazal düzeyde hem de tedavi sonrası çok katmanlı bir direnç mekanizması sergilemektedir. Bu direnç, aynı anda birden fazla yolağı hedef alarak (örneğin. DNA tamiri, redoks dengesi, apoptoz inhibisyonu, ilaç dışa atımı ve kök hücre özelliği) etkili olmaktadır. WT hücrelerde ise bu mekanizmaların daha sınırlı aktivasyonu dikkat çekmektedir. Bulgular, glioblastomada $CD133^+$ alt popülasyonun tedaviye en dirençli hücre grubu olduğunu ve bu hücrelerin hedeflenmesinin klinik yanıtı artırmak açısından kritik önem taşıdığını ortaya koymaktadır.

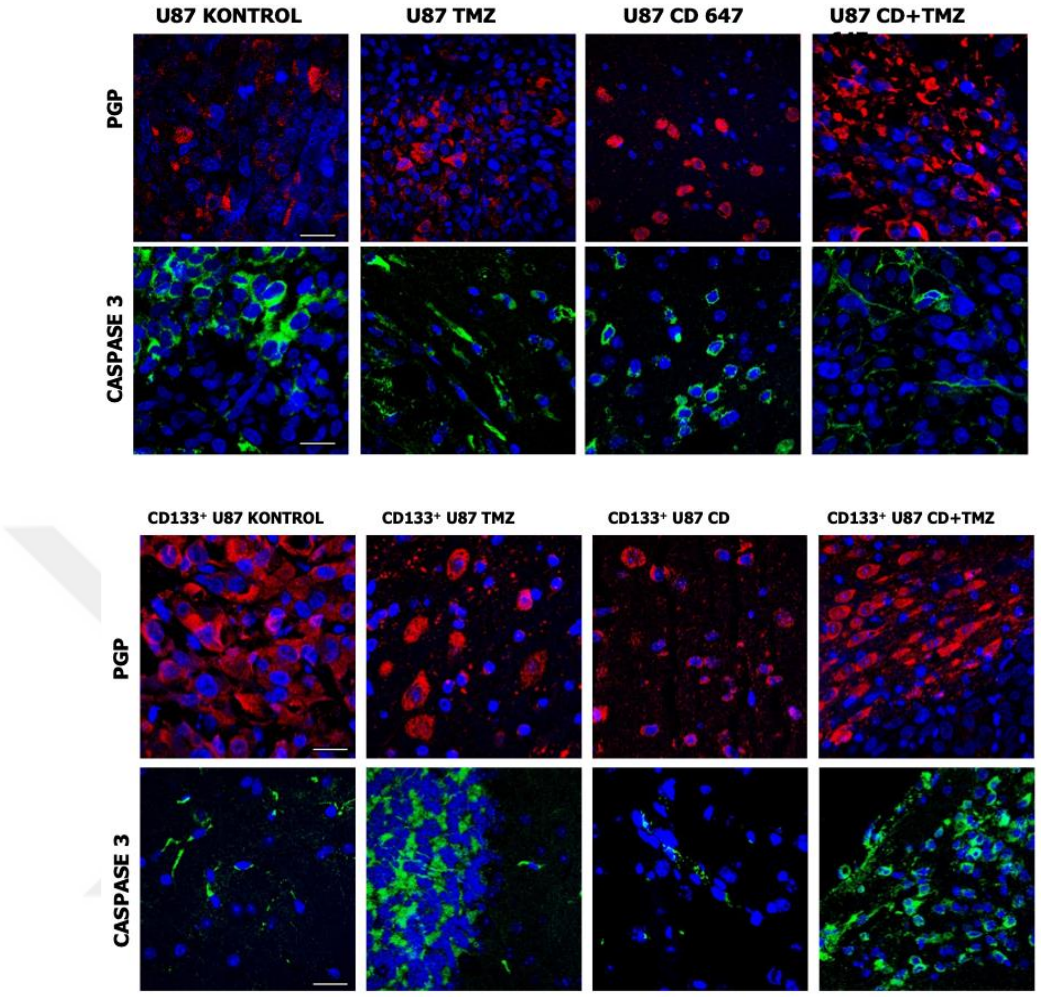
3.8. İmmunohistokimya Analiz Sonucu

PGP ekspresyonu, U87 kontrol grubunda orta düzeyde seyretmesine rağmen TMZ uygulaması sonrasında hafif artış gösterdi ve hücre içi ilaç taşıma kapasitesinin arttığı izlendi. CD uygulanan tümörlerde PGP düzeyinin kontrole göre arttığı gözlendi, buna ek olarak CD+TMZ kombinasyonunda bu artışın kısmen kırılarak daha homojen bir dağılıma dönüştüğü saptandı. Caspase-3 boyaması, U87 hücre hattında kontrol ve yalnızca TMZ uygulanan gruplarda sınırlı düzeyde pozitiflik göstermiştir. Buna karşın, CD+TMZ kombinasyonu belirgin bir apoptoz artışı ile sonuçlanmış, apoptotik hücre dağılımı tümör alanına yayılan yoğun ve keskin bir sinyal olarak izlenmiştir. Bu bulgu, kombinasyon tedavisinin TMZ'nin apoptotik etkinliğini anlamlı düzeyde güçlendirdiğini ve karbon noktalarının ilacın sitotoksik etkisini artıran bir taşıyıcı rolü üstlenebileceğini göstermektedir (Şekil 3.48).

CD133^{+} tümör modelinde PGP ekspresyon paterni, kontrol ve TMZ gruplarında yüksek ve yaygın bir sinyal göstermiş; bu durum CD133^{+} hücrelerin bilinen çoklu ilaç direnci fenotipini doğrulamaktadır. CD tedavisi sonrası PGP düzeyinin görece korunmuş olması, kök hücre benzeri popülasyonlarda ilaç taşınım sistemlerinin karbon noktalara karşı daha dirençli olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak CD+TMZ uygulaması, WT modele kıyasla daha sınırlı olmakla birlikte PGP sinyalinde bir kırılma yaratmış ve PGP pozitif hücre yoğunluğunu kısmen azaltmıştır.

Caspase-3 aktivasyonu CD133^{+} modelde, WT'ye göre anlamlı derecede düşük seyretmiş; özellikle TMZ tek başına uygulandığında apoptotik yanıt minimal düzeyde kalmıştır. Buna rağmen CD+TMZ kombinasyonu, CD133^{+} tümörlerde de belirgin bir artış sağlamış ve apoptoza dirençli alt popülasyonların dahi tedaviye kısmen duyarlı hale geldiğini göstermiştir. Yine de apoptotik yanıtın WT kadar güçlü olmaması, CD133^{+} hücrelerin tedavi karşısında biyolojik esnekliklerini korumaya devam ettiğini düşündürmektedir.

Genel olarak, IHC bulguları CD+TMZ kombinasyonunun hem WT hem de CD133^{+} glioblastoma modellerinde apoptotik yanıtı anlamlı biçimde artırdığını, fakat ilaç direnci belirteci olan PGP'nin CD133^{+} tümörlerde daha ısrarcı bir şekilde korunduğunu göstermektedir. Bu durum, CD133^{+} alt popülasyonların moleküler düzeyde olduğu gibi histolojik düzeyde de daha dirençli bir fenotipe sahip olduğunu doğrulamakta ve kombinasyon tedavisinin bu direnç bariyerini kısmen kırabildiğini ancak tam olarak aşamadığını göstermektedir.



Şekil 3.48. U87 ve CD133+ U87 tümör dokularında PGP ve Caspase-3 ekspresyonlarının gruplar arasındaki değişiminin değerlendirilmesi

4. TARTIŞMA

Bitki bazlı klorofil türevlerinden elde edilen karbon dotlar, bu çalışmada yalnızca yenilikçi bir ilaç taşıyıcı platform olarak değil, aynı zamanda biyouyumluluk, çevresel sürdürülebilirlik ve multifonksiyonellik açısından dikkat çekici bir nanomateryal sınıfı olarak öne çıkmaktadır. Klorofil gibi doğal pigmentlerin karbonizasyon yoluyla nanoparçacıklara dönüştürülmesi, son yıllarda yeşil nanoteknoloji yaklaşımıyla daha fazla ön plana çıkmakta olup; hem toksisite profilinin düşüklüğü hem de biyolojik hedefleme kapasitesinin artırılması açısından önemli bir avantaj sunmaktadır (Guirguis vd., 2023).

Bu çalışmada kullanılan klorofil CD'ler, klorofilin sodyum bakır türevi üzerinden sentezlenmiş ve bu süreçte "bottom-up" karbonizasyon yöntemi tercih edilmiştir. Bu sentez yöntemi, partikül boyutunun kontrolü, yüzey fonksiyonel grupların stabilize edilmesi ve fotofiziksel özelliklerin korunması bakımından literatürde en yaygın olarak tercih edilen yaklaşımlardandır (Mondal vd., 2025). Ayrıca, sodyum bakır klorofilin kullanımı yalnızca yapısal istikrarı değil, aynı zamanda optik özelliklerin güçlendirilmesini sağlamıştır. Bu yönüyle elde edilen CD'lerin, hem floresan görüntüleme hem de terapötik ajan taşıyıcılığı açısından çok yönlü bir sistem sunduğu görülmektedir.

Mevcut çalışmada kullanılan Chl-CD'ler, daha önce Kirbas Cilingir ve arkadaşları tarafından tanımlanan sentetik protokol referans alınarak sentezlenmiş ve detaylı karakterizasyon analizlerinden geçirilmiştir (Kirbas Cilingir vd., 2024). Bu karakterizasyon süreçlerinde elde edilen partikül boyutu, morfoloji (AFM/TEM), yüzey yükü ve spektroskopik özellikler (UV-VIS, PL) gibi parametreler, sistemin hem kararlılığını hem de fonksiyonel potansiyelini doğrular niteliktedir. Özellikle yüksek zeta potansiyel değerlerinin partikül stabilitesi açısından olumlu sonuçlar doğurduğu bilinmektedir (Guirguis vd., 2023; Mondal vd., 2025).

Klorofil kaynaklı karbon dotların ilaç taşıyıcı olarak kullanımı ise son derece stratejik bir tercihtir. Literatürde, CD'lerin yüzey fonksiyonel grupları sayesinde kemoterapötik ajanlara yüksek bağlanma afinitesi gösterebildiği ve bu ajanların kontrollü salınımını mümkün kılabildiği gösterilmiştir (Qu vd., 2014). Bu bağlamda, Chl-CD'lerin TMZ gibi alkilleyici ajanlarla konjuge edilerek taşıyıcı sistemlere dönüştürülmesi, glioblastoma gibi agresif tümörlerde hedefli tedavi potansiyelini ciddi ölçüde artırabilecek bir stratejidir.

Ayrıca, elde edilen Chl-CD'lerin kırmızı bölgeye yakın (NIR) emisyon profili taşıması, *in vivo* uygulamalarda derin doku penetrasyonu ve düşük otofloresan sinyali ile yüksek kontrastlı görüntüleme gibi avantajlar sunmaktadır (L.P. Li vd., 2021). Bu durum, özellikle gerçek zamanlı tümör takibi, ilaç dağılımının izlenmesi ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Özetle, bu tez kapsamında kullanılan Chl-CD sistemleri, sadece taşıyıcı değil aynı zamanda tanı ve tedaviyi birleştiren theranostik yaklaşımlar için de uygun temeller sunmaktadır.

Çalışmada elde edilen LDH sitotoksisite analizleri, hem klasik U87 glioblastoma hücre hattında hem de $CD133^+$ alt popülasyonunda, CD ve TMZ'nin özellikle kombinasyon halinde uygulandığında belirgin bir toksik etki yarattığını ortaya koymuştur. Doz-bağımlı canlılık kayıpları, nanoparçacık bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin yalnızca kendilerinin değil, taşıdıkları kemoterapötik ajanların biyoyararlanımını da artırabileceğini düşündürmektedir. Özellikle CD+TMZ grubunda gözlenen canlılık azalması, TMZ'nin CD'ler aracılığıyla hücre içine daha etkili taşındığını ve bu sayede hücre içi alım ve etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bu sinerjistik etkinin, TMZ'nin doğrudan uygulandığı sistemlerle kıyaslandığında daha belirgin olduğu önceki literatürle de uyumludur (Shamsipour vd., 2019).

TMZ, alkilleyici bir ajan olarak, DNA metilasyonu yoluyla hücre döngüsünü durdurur ve özellikle p53 yolakları üzerinden apoptoz indükleyici etkiler gösterir. Ancak bu etkinin, glioblastoma gibi yüksek dirençli tümörlerde sınırlı kaldığı ve özellikle MGMT aktivitesi gibi hücre içi DNA onarım mekanizmaları nedeniyle etkinliğinin baskılandığı bilinmektedir (S.Y. Lee, 2016). Bu bağlamda, karbon dotların TMZ ile kombinasyonu, TMZ'nin hücre içi stabilitesini ve hedefe yönelmesini artırarak bu sınırlılığı aşmak adına önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır.

İn vivo görüntüleme sistemlerinin tümör biyolojisi çalışmalarında kullanımı, preklinik düzeyde hem tümör oluşumu hem de tedaviye yanıt süreçlerinin non-invaziv ve zamana bağlı şekilde izlenebilmesine olanak tanımaktadır. Bu tez kapsamında, hem U87 hem de U87-$CD133^+$ hücrelerinden elde edilen ortotopik tümör modelleri, sırasıyla lusiferase ve GFP ekspresyonu yoluyla etiketlenerek, farklı sinyal yaklaşımları ile başarıyla izlenmiştir. U87 hücreleriyle oluşturulan modelde elde edilen lüminesans sinyali, enjeksiyon sonrası kafa bölgesinde güçlü ve lokalize bir ışık emisyonu oluşturmuş, bu da tümör implantasyonunun etkinliğini ve sistemin duyarlılığını doğrulamıştır. Benzer şekilde, GFP ile işaretli $CD133^+$ hücreler, floresan sinyal aracılığıyla tümöral dokunun hedef bölgede oluştuğunu göstermiştir.

Her iki yöntem de invivo görüntüleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmakta ve tümörün canlı modelde progresyonunu izlemek adına önemli avantajlar sağlamaktadır (Szentirmai vd., 2006).

Lusiferaz tabanlı biyolüminesans görüntüleme, özellikle yüksek sinyal/gürültü oranı nedeniyle hassasiyet açısından floresan tabanlı sistemlerin önünde yer almaktadır. Bu yöntemle, yalnızca tümör hacmi değil, aynı zamanda tümör hücrelerinin canlılığı da ölçülebilmektedir (Mizuta vd., 2024; Rodgers vd., 2024). Bu çalışmada kullanılan BLI yaklaşımı, literatürde glioblastoma modellerinde yaygın olarak kullanılan D-lusiferin/lusiferaz sistemine dayanmaktadır ve U87 hücrelerinin beyin bölgesine başarılı şekilde tutunduğunu göstermiştir. Öte yandan, GFP bazlı floresan görüntüleme ise daha çok yüzeyel ve orta derinlikteki tümörlerde tercih edilmekte olup, $CD133^+$ hücrelerin oluşturduğu tümörlerde bu metodun etkili şekilde kullanılabildiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, zenograft yöntemle farede elde edilen GBM modelinde, hem kök hücre zengin glioblastoma alt tipi olan $CD133^+$ hücrelerin, hem de normal U87 hücrelerinin, BLI ve GFP görüntüleme yaklaşımı *in vivo* ortamda yüksek doğrulukla izlenebildiğini ortaya koymaktadır. Bu tür görüntüleme sistemlerinin, deneysel tümör terapilerinin zaman içindeki etkinliğini değerlendirmek ve tedaviye yanıtı hassas şekilde takip etmek açısından da kritik bir öneme sahip olduğu açıktır.

Histopatolojik analizler, glioblastoma modellerinin biyolojik davranışlarını anlamada önemlli araçlardan biridir. Bu çalışmada, H&E boyamaları ile değerlendirilen tümör dokuları, U87 ve U87-$CD133^+$ hücrelerinin oluşturduğu kitlelerin yapısal farklılıklarını görebilmek amaçlardan biridir. $CD133^+$ hücrelerle oluşturulan gruplarda daha kompakt, hiperselüler ve sınırları belirgin tümör yapılarının gözlemlenmesi, glioblastoma kök hücrelerinin *in vivo* ortamda yüksek tümör başlatıcı ve proliferatif kapasitesine sahip olduğunu bir kez daha doğrulamaktadır. Bu bulgu, Singh ve arkadaşlarının GSC'lerin klasik U87 hücrelerine kıyasla daha agresif fenotipler sergilediğini gösteren öncü çalışmasıyla da örtüşmektedir (S.K. Singh vd., 2004).

Peritümoral bölgelerde görülen gliotik değişiklikler, ödem, damar proliferasyonu ve mikrovasküler bozulmalar; glioblastomanın tipik mikroskopik özellikleri arasında yer almakta olup, özellikle tümörün invaziv sınırlarını ve çevre dokuyla olan etkileşimini göstermesi açısından önemlidir. CD+TMZ kombinasyon grubunda tümör hacminin azalması ve invaziv

sınırların daha az belirgin hale gelmesi, bu kombinasyonun sadece sitotoksik değil aynı zamanda invazyonu baskılayıcı etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu durum, son yıllarda karbon bazlı nanomalzemelerin antiinvaziv potansiyellerini ortaya koyan çalışmalarla da paralellik göstermektedir (Jing vd., 2025).

Tümör çevresinde izlenen mikrokanama odakları ve nöronal mimarinin bozulması, glioblastomanın nörovasküler nişi hedef alan yıkıcı etkilerini göstermesi açısından çarpıcıdır. Bu tip histopatolojik değişiklikler, glioma ile ilişkili vasküler yeniden yapılanma ve tümörle ilişkili hipoksi süreçlerinin *in vivo* ortamdaki sonuçlarıdır (Hardee ve Zagzag, 2012). Öte yandan kontrol grubunda beyin dokusunun normal yapısal bütünlüğünü koruyor olması, uygulanan tümör hücrelerinin spesifik olarak tümör oluşumuna neden olduğunu ve modelin doğruluğunu desteklemektedir.

Histopatolojik değerlendirmenin bu çalışmadaki en önemli kullanım amacı mikrodiseksiyon için tümör çevresinin belirlenmesidir. Tez çalışmasında zenograft tümör modeli kullanıldığı için insan kaynaklı tümör hücre hatları ile tümör mikroçevresini meydana getiren fare dokusunun ayrı ayrı alınarak RNA izolasyonu aşamasına geçilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda hücrelerin hem GFP ifade etmesi özelliği sebebiyle GFP sinyallerinden yararlanılmış hem de histopatolojik olarak tümör sınırları belirlenmiştir. Buna benzer zenograft çalışmalarında tümör ve çevre dokunun ayrılarak devam eden analizlere tabi tutulduğu çalışmalar mevcuttur. RNAseq analizi özelinde bu yöntemler daha çok biyoinormatik ya da hücresel barkodlama/etiketleme yöntemiyle sekans sonrası ayrım yoluna gidilerek yapılmuştır (Bradford vd., 2016; Y. Liu vd., 2019; Sheng vd., 2025). Örneğin Rajarm vd.'nin 2019 yılında yaptığı bir çalışmada ortotopik tümör modelleri üzerinden bölgesel transkriptom profillemesine odaklanmıştır. Çalışmada, medulloblastoma hücreleri kullanılarak ortotopik fare modelleri oluşturulmuş ve tümörün farklı anatomik bölgelerinden örnekler toplanarak spatial benzeri bir transkriptomik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşıma benzer özelleşmiş amaçlar doğrultusunda başka çalışmalar da mevcuttur (Göcz vd., 2025; Nichterwitz vd., 2018). Mevcut tez çalışması ise, bu alandaki mevcut bilgi birikimine birkaç özgün boyut ekleyerek literatüre katkı sağlamaktadır. Rajaram ve arkadaşlarının çalışmasında tümör içerisinden anatomik farklılıklara dayalı örnekleme yapılırken, bu tez çalışmasında fare beyin dokusundan hem tümör merkezi hem de çevresi sistematik olarak mikrodiseksiyon yöntemiyle ayrılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, spatial transkriptomi tam olarak karşılamasa da, bulk RNA-seq verileri üzerinden mekânsal biyolojiyi taklit eden "spatial-like" analizler yapılmasına olanak tanımıştır. Bu sayede, yalnızca tümör hücresinin

değil, çevresindeki stromal, vasküler ve bağışıklık bileşenlerinin de transkriptomik düzeyde ayrıştırılması mümkün olmuştur. Ancak tez çalışmasında gerçeleştirilen bu yaklaşım düşük de olsa mümkün olabilecek TME'deki tümör invazyonu ve aynı şekilde tümör içerisindeki immun hücre invazyonundan gelebilecek RNA okumları göz ardı edilmiştir.

Biyoinformatik analziler sonrasında CD+TMZ tedavisi sonrası WT tümör mikroçevresine ait transkriptomik veriler, özellikle bağışıklık yanıtı ve tümör baskılanması açısından çarpıcı bir yeniden programlanmayı işaret etmektedir. Diferansiyel gen ekspresyonu analizinde Tnf, Ccl2, Il1b, Il12b ve Cxcl10 gibi sitokin ve kemokinlerin anlamlı düzeyde yukarı regülasyonu, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin belirgin biçimde aktive edildiğini göstermektedir. TNF-α ve IL-1β gibi pro-inflamatuvar faktörlerin ifadelerinin artması, tümör mikroçevresinde inflamatuvar yanıtın baskınlaştığını ve bu yanıtın tümör baskılanmasına katkı sunduğunu göstermektedir. Nitekim TNF-α'nın, glioblastoma dahil olmak üzere birçok solid tümörde anti-tümöral sitotoksik etkiler oluşturduğu, ancak aynı zamanda tümörle ilişkili inflamasyonun kronikleşmesi durumunda invazyonu da tetikleyebileceği bildirilmiştir (W. Zhao vd., 2025).

IL12b ve Cxcl10'un artışı, CD+TMZ tedavisinin adaptif bağışıklık sistemini de mobilize ettiğini göstermektedir. IL-12 aracılığıyla Th1 hücre yanıtının desteklenmesi ve Cxcl10 üzerinden $CD8^+$ T hücrelerinin tümör bölgesine kemotaksisi, glioblastoma gibi "soğuk tümör" sınıfına giren yapılarda immünoaktivasyonun önemli göstergelerindendir (W. Zhang vd., 2025). Bu bulgular, TMZ'nin yalnız başına immün baskılayıcı etkiler oluşturabileceğini bildiren önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında, CD ile yapılan bu formülasyonun bağışıklık sistemine yönelik dengeleyici ve tetikleyici bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir (Berghoff vd., 2015).

Buna karşın, Sox2, Cd44, Epas1 ve Cd274 (PD-L1) gibi genlerin aşağı regülasyonu, tümörün kök hücre özelliklerinde ve immün kaçış mekanizmalarında zayıflama meydana geldiğine işaret etmektedir. WT glioblastoma U87 hücre hatlarında bile çok düşük oranda da olsa glioma kök hücre belirteçlerini ifade eden heterojen hücre popülasyonları olduğu düşünüldüğünde bu ifade değişimlerinin önemli olabileceği göz önüne alınmaktadır. Glioma kök hücrelerini tanımlayan CD44 ve SOX2, tümör yenilenebilirliği, tedavi direnci ve heterojenitenin temel belirleyicilerindendir (Lathia vd., 2015). Bu genlerin ekspresyon düzeyinin baskılanması, tedavinin yalnızca hücresel ölüm üzerinden değil, aynı zamanda tümörün kök hücre benzeri fenotipini hedefleyen yeniden programlama etkisi gösterdiğini

düşündürmektedir. Ayrıca, PD-L1'in aşağı regülasyonu, tümörün bağışıklık sisteminden kaçış kapasitesinin azalabileceğini göstermektedir. Berghoff ve arkadaşlarının glioblastoma hastalarında PD-L1 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışması, bu gözlemi desteklemektedir (Berghoff vd., 2015). Ancak "soğuk tümör" olarak adlandırılan GBM'lerin hem T hem de B hücrelerince sınırlı olması ve ayrıca zenograft modelimizin atimik nude hücreler olduğu göz önüne alındıığında bu PD-L1 aşağı regülasyonunun tümör ve myeloid hücrelerin PD-L1/IDO1/TGF-β/STAT1-IRF1 eksenlerini sürerek T-hücresi-yönelimli düzenleyici ağları aktif tutmasını yansıttığı şeklinde yorumlanabilir.

Yolak zenginleştirme analizleri de bu moleküler değişikliklerin biyolojik bağlamını daha açık biçimde sunmuştur. Kemokin ve sitokin sinyalleme, TNF ve IL-6 aracılı inflamatuvar yolaklar ile T hücresi farklılaşması gibi başlıklarda artış gözlenmesi, CD+TMZ kombinasyonunun tümör mikroçevresini immünoinflamatuvar yönde dönüştürdüğünü ortaya koymaktadır. Özellikle PD-1/PD-L1 yolaklarının eş zamanlı aktivasyonu, bağışıklık sistemi içinde dengeleyici mekanizmaların da devreye girdiğine işaret etmektedir. Bu ikili durum, yani sitotoksik inflamasyon ve immün baskılayıcı checkpoint aktivasyonu, daha önce TMZ tedavisinin kısa vadede bağışıklığı aktive etmesine rağmen uzun dönemde T hücre tükenmesi (exhaustion) ve Treg hücre artışı ile immün kaçağa zemin hazırladığına dair yapılan gözlemlerle paralellik taşımaktadır (Woroniecka vd., 2018; Yasinjan vd., 2023).

Daha dikkat çekici olan, tedavi sonrası aşağı regüle edilen yolakların hücre döngüsü, DNA replikasyonu ve ekstraselüler matriks organizasyonu ile ilişkili olmasıdır. Özellikle "extracellular matrix structural constituent" yolaklarındaki baskılanma, tümör hücrelerinin çevresel destek sistemlerinden mahrum kaldığını ve stromal invazyon potansiyelinin zayıflatıldığını düşündürmektedir. ECM ile ilişkili genlerin susturulması, invaziv fenotipin kırılmasına ve mikrovasküler invazyonun engellenmesine katkı sağlayabilir (P. Lu vd., 2011; Marino vd., 2023).

Transkripsiyon faktörü analizleri, tedavi sonrası moleküler yeniden yapılanmanın arkasındaki düzenleyici şemayı anlamada oldukça önemliveriler sunmuştur. Fos, Hdac1, Atf3 ve Stat2 gibi TF'lerin merkezi regülatörler olarak öne çıkması, CD+TMZ'nin tümör mikroçevresinde farklılaşmayı ve inflamasyonu yönlendiren epigenetik ve transkripsiyonel programları aktive ettiğini göstermektedir. Özellikle Fos'un TLR sinyallemesi ve inflamasyon regülasyonundaki rolü ve Hdac1'in immün hücre farklılaşmasını etkileyen epigenetik

modülatör olarak etkisi, bu TF'leri terapötik hedef olarak öne çıkarmaktadır (Khedri vd., 2024; Setiadi vd., 2008).

$CD133^+$ hücreleri içeren glioblastoma modelleri, klasik U87 hücrelerine kıyasla daha invaziv, terapötik ajanlara daha dirençli ve kök hücre benzeri fenotip açısından daha zengin bir tümör mikroçevresi sunmaktadır (Abad vd., 2020; Lathia vd., 2015). Bu bağlamda, CD+TMZ tedavisinin bu tür bir tümör modelinde oluşturduğu transkriptomik yeniden yapılanma, WT modele göre farklı biyolojik eğilimler göstermiştir.

Diferansiyel gen ekspresyonu analizleri, $CD133^+$ mikroçevresinde özellikle proliferasyon, kök hücre benzeri özellikler ve immün inflamatuvar yanıtlar arasında karmaşık bir etkileşim olduğunu ortaya koymuştur. CD44, MKi67, Twist1 ve Epas1 gibi proliferatif ve EMT ile ilişkili genlerin yukarı regülasyonu, CD+TMZ tedavisinin bu modelde tümör baskılamasına eksik bir yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu durum WT modelden farklıdır; zira WT mikroçevresinde aynı genler aşağı regülasyona uğramış ve bu da kök hücre fenotipinin baskılandığı yönünde yorumlanmıştır. Özellikle CD44 ve SOX2 gibi genler glioblastoma kök hücre alt popülasyonlarını belirleyen moleküllerdir ve bu genlerin $CD133^+$ modelde korunması ya da artışı, klasik TMZ tedavisinin bu tür fenotiplere karşı yetersiz kalabileceğini işaret etmektedir (Bao vd., 2006).

Bağışıklık açısından, her iki modelde de TNF, IL1b, CCL2, CXCL10 gibi sitokin ve kemokinlerin yukarı regülasyonu tedaviye karşı bir inflamatuvar yanıtın geliştiğini göstermiştir. Ancak $CD133^+$ modelde, bu yanıtın eş zamanlı olarak PD-L1, B7-H3, Vegfa gibi immün baskılayıcı ve anjiyogenik moleküllerin de artışıyla dengelendiği gözlenmiştir. Bu, bağışıklık sisteminin aktifleşmesine rağmen, tümörün immün kaçış mekanizmalarını sürdürebildiğine işaret eder. Zenginleştirme analizleri de bu ikili biyolojik tepkiyi desteklemiştir. $CD133^+$ TME'de yukarı regüle edilen yolaklar, sadece doğuştan gelen bağışıklık sinyallerini (TNF, IL-6, NOD-like receptor) değil, aynı zamanda PD-1/PD-L1 checkpointleri, MHC sınıf I sunumu ve B hücre reseptör aktivasyonu gibi kazanılmış immün yanıt bileşenlerini de kapsamaktadır. Her ne kadar atimik fare modelinde pluripotent seviyede T hcüresi bulunsada, T hücreden bağımsız seyreden moleküler etkilişime bağımlı genlerle hala bu immun yolakların ön plana çıkmasını sağlamaktadır. Bu durum, tümör mikroçevresinde bağışıklık sisteminin sadece aktive değil, aynı zamanda yeniden şekillenmekte olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, WT modelden farklı olarak, sinir sistemi gelişimi, TRP kanal düzenlemesi ve nöronal diferansiyasyon ile ilişkili yolakların da baskılandığı görülmüş, bu da

CD133$^+$ mikroçevrede nöroinflamasyonun ve gliotik yeniden yapılanmanın daha belirgin olduğunu düşündürmüştür (Sofroniew, 2009).

Transkripsiyon faktörü analizleri, CD133$^+$ TME'de tedavi sonrası düzenleyici şemanın da farklı olduğunu ortaya koymuştur. Nrf2 ve Cebpb gibi TF'lerin baskınlaşması, WT modele kıyasla daha belirgin bir oksidatif stres yanıtı ve immün yeniden programlama ile uyumludur. Nrf2'nin TMZ'ye karşı hücresel savunmayı artırdığı ve kemoterapötik direnci desteklediği birçok çalışmada gösterilmiştir (Shelton ve Jaiswal, 2013). Bu nedenle CD133$^+$ mikroçevrede Nrf2 aktivasyonu, tedaviye karşı daha güçlü bir adaptif yanıtın işareti olabilir. Buna karşın WT modelde, Fos ve Hdac1 gibi TF'ler daha baskın olup, inflamasyon ve hücre farklılaşması üzerine etkili olmuşlardır.

Sonuç olarak, CD+TMZ tedavisi WT mikroçevrede daha belirgin bir tümör baskılaması ve immün aktivasyon sağlarken, CD133$^+$ ortamda bağışıklık sistemi tetiklenmekle birlikte tümör proliferasyonu, kök hücre özellikleri ve immün kaçış programları tam olarak baskılanamamıştır. Bu durum, CD133$^+$ GBM'nin tedaviye karşı daha dirençli olduğunu ve kombinasyonel tedavilerde farklılaştırılmış stratejiler gerektirdiğini göstermektedir. Özellikle Nrf2 inhibitörleri, anti-PD-L1 gibi hedefe yönelik yaklaşımlar bu fenotipe özgü olarak değerlendirilmelidir.

CD133$^+$ kök hücre benzeri hücre popülasyonu taşıyan GBM modelleri ile klasik U87 türevli WT tümör mikroçevresi arasında, TMZ temelli tedavi uygulaması sonrasında gözlemlenen transkriptomik farklılıklar, glioblastomada terapötik başarısızlığın temel biyolojik nedenlerini anlamada önemli ipuçları sunmaktadır. Yapılan analizler, özellikle bağışıklık yanıtı, hücre siklusu, hipoksi adaptasyonu ve ekstraselüler matriks yeniden düzenlenmesi gibi temel biyolojik süreçlerde CD133$^+$ grubunun WT'ye göre önemli ölçüde farklılaştığını göstermektedir.

Volcano plot analizinde WT grubuna kıyasla CD133$^+$ hücrelerin Il10, Foxp3, Tox, Vegfa gibi immün regülatörleri daha fazla eksprese etmesi, immün baskılayıcı mikroçevreye yönelimi göstermektedir. CD133$^+$ tümörlerin "soğuk tümör" olarak sınıflandırılmasının temelinde bu baskılayıcı ortamın yattığı ve bu durumun tedaviye yanıtı sınırladığı daha önce rapor edilmiştir (Friebel vd., 2020). Özellikle Foxp3$^+$ Treg hücrelerine işaret eden sinyallerin güçlenmesi, bu ortamda immün kaçışın daha kalıcı olabileceğini düşündürmektedir.

Yolak zenginleştirme analizleri de bu farklılıkları destekler niteliktedir. $CD133^+$ grubunda baskılanmış yolaklar arasında "sitokin reseptör etkileşimi", "lenfosit proliferasyonu", "kemokin bağlanması" gibi immün aktivasyona yönelik süreçlerin yer alması, tedavi sonrası lenfosit aracılı hücresel bağışıklığın etkin şekilde devreye giremediğini göstermektedir. Bu durum, immunoterapilere karşı düşük yanıtlılığı ve T hücre anergisini açıklayabilir (Q. Zhang vd., 2019).

TF-DEG bağlantı analizinde $CD133^+$ gruba özgü olarak öne çıkan Zbtb16, Nr4a1 ve Sp7 gibi transkripsiyon faktörleri, bağışıklık toleransı ve proliferasyon gibi iki zıt süreci aynı anda kontrol eder niteliktedir. Özellikle Nr4a1'in T lenfosit hücre tükenmesi ve toleransında rolü olduğu bilinmekte olup, bu TF'nin upregülasyonu T hücre anergisine katkı sağlayan önemli bir mekanizma olabilir (Mohankumar vd., 2023). Zbtb16 (PLZF) ise lenfoid progenitör hücrelerin kontrolünde görev almakta ve immün farklılaşmanın yeniden yönlendirilmesinde önemli bir düzenleyici olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak, bu karşılaştırmalı analiz $CD133^+$ alt tipinin, TMZ gibi klasik tedavilere karşı daha dirençli, immün baskılayıcı ve proliferatif avantaj taşıyan bir fenotipe sahip olduğunu ortaya koymaktadır. $CD133^+$ hücrelerin yalnızca tedaviye dirençli değil, aynı zamanda bağışıklık sisteminin etkinliğini azaltan mekanizmaları aktif olarak kullandığı gösterilmiştir. Bu nedenle $CD133^+$ hücrelerin immün sistemle etkileşimleri, checkpoint ekspresyon profili ve transkripsiyonel düzenleyicileri, hedeflenebilir terapötik yaklaşımlar açısından öncelikli olarak değerlendirilmelidir. Diğer hücresel sonuçların yanında T hücre bağımlı yolaklar ve ilişkili genlerle ilgili yorum yapılırken atimik TME olduğunu ve diğer ilişkili hücresel yolakların yine de bu T hücre (preogenitör seviyedeki) bağımlı yolakları önümüze çıkardığını göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Bu bağlamda kök hücre hedefli tedaviler, noktasal kontrol inhibitörleri ile kombinasyonel stratejilerin $CD133^+$ GBM modellerinde daha etkin sonuçlar doğurabileceği düşündürmektedir.

$CD133^+$ glioblastoma hücrelerinden elde edilen tümör dokuları, kontrol koşullarında WT U87 türevleriyle karşılaştırıldığında, özellikle hücre döngüsü kontrolü, DNA onarımı ve apoptoz mekanizmaları açısından belirgin farklılıklar göstermektedir. Volkanoplot analizinde anlamlı düzeyde yukarı regüle olan genler arasında TP53, CHEK1, CHEK2, BCL2, MSH6, MLH1 ve CDK1 gibi tümör progresyonunda merkezi rol oynayan elementler öne çıkmaktadır. Bu genlerin ekspresyonu, $CD133^+$ hücrelerin artan proliferatif potansiyelini ve DNA hasarına karşı duyarlılıklarını telafi etmeye yönelik bir adaptif yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir.

Nitekim, CD133$^+$ hücrelerin daha yüksek mitotik aktiviteye ve genetik kararsızlığa sahip olduğu; bu nedenle DNA onarım yolaklarını daha aktif kullandıkları, çeşitli deneysel modellerle ortaya konmuştur (Abad vd., 2020; Dean vd., 2005).

Yukarı regüle edilen yolakların p53, G1/S kontrol noktası, oksidatif fosforilasyon ve kemoterapiye yanıtla ilişkili noktasal konrtol mekanizmaları etrafında kümelenmiş olması, CD133$^+$ hücrelerin metabolik ve hücresel stres altında bile proliferatif yetilerini sürdürebildiğini göstermektedir. TP53 ve ilişkili kontrol noktalarının artışı, bu alt popülasyonun klasik hücre döngüsü inhibisyon yollarına daha dirençli olduğunu düşündürmektedir (Bao vd., 2006; Z. Li vd., 2009).

Buna karşın, *MAPK* ve *PI3K–AKT* sinyal iletimi, T ve B hücre reseptör yolları gibi hücresel farklılaşma ve immün etkileşim süreçlerine ait yolakların baskılandığı görülmüştür. Bu durum, CD133$^+$ hücrelerin immün mikroçevre ile iletişiminde zayıflık ve farklılaşma yerine kök hücre özelliklerinin korunmasına öncelik verdiğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda CD133$^+$ hücrelerin daha "plastik" fakat daha az farklılaşmış bir fenotip taşıdığı, önceki deneysel kanıtlarla da örtüşmektedir (Beier vd., 2007; Lathia vd., 2011; Z. Li vd., 2009).

Transkripsiyon faktörü analizleri de bu farklılaşmış transkriptomik manzarayı düzenleyen regülatörleri ortaya koymaktadır. Özellikle TP53, ETS1, REST, MYCN, FOXA2 ve MTA1 gibi TF'lerin CD133$^+$ grupta merkezi rol oynadığı görülmüştür. REST ve FOXA2, nöronal farklılaşmanın baskılanmasında; MYCN ve MTA1 ise hücre döngüsü aktivasyonu ve epigenetik yeniden programlamada rol oynayan faktörler olarak bilinmektedir (Suvà vd., 2014). Bu TF'lerin ağ nalizlerindeki merkezi olarak yerleşimi, CD133$^+$ tümör alt grubunun transkripsiyonel olarak özgün bir program izlediğine işaret eder.

Temozolomid tedavisi sonrası elde edilen tümör örneklerinde, CD133$^+$ ve WT gruplarının karşılaştırılması, tedaviye verilen yanıtın hem moleküler hem de fonksiyonel düzeyde bazı farklılıklar taşıdığını ortaya koymuştur. CD133$^+$ grubunda yukarı regüle edilen genlerin yolak analizi, özellikle DNA hasar yanıtı, p53 sinyallemesi, hücre döngüsü kontrolü ve mitotik geçiş süreçlerinde anlamlı artış olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, TMZ tedavisine rağmen WT tümörlere kıyasla CD133$^+$ hücrelerin proliferatif döngülerini koruyabildiğini ve DNA onarım yollarını aktive ederek hücresel ölümden kaçabildiğini düşündürmektedir (Abad vd., 2020; Sturm vd., 2012).

Özellikle p53 stabilizasyonu ve oksidatif stres yanıtı gibi yolakların aktive olması, TMZ'nin indüklediği hasarın $CD133^+$ hücrelerce karşılandığını ve bu hücrelerin hayatta kalma programlarını devreye soktuğunu göstermektedir. BCL2 ailesi gibi anti-apoptotik genlerin regülasyonu da bu direnci destekleyen moleküler göstergelerdir (Zehnle vd., 2022).

Aşağı regüle edilen yolaklar incelendiğinde; MAPK ve PI3K–AKT gibi proliferasyon sinyallerine ek olarak, kemokin sinyallemesi, immün reseptör etkileşimleri ve nöronal farklılaşma süreçlerinde baskılanma olduğu saptanmıştır. Bu, $CD133^+$ hücrelerin bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmalarını daha aktif kullanabildiğini ve farklılaşma sinyallerinden ziyade proliferatif ve invazif bir program sürdürdüğünü düşündürmektedir (Beier vd., 2007; Eyler vd., 2011).

Transkripsiyon faktör düzeyinde ise TP53, ETS1, REST, MYC, MYCN, FOXA2 gibi TF'lerin daha fazla sayıda hedef geni regüle ettiği görülmüştür. Bu TF'ler, hücre döngüsü, onkogenik stres yanıtı ve farklılaşma kontrolü gibi temel süreçlerde görev almaktadır. MYCN ve MTA1 gibi TF'lerin artışı, $CD133^+$ hücrelerde TMZ sonrası bile hücre proliferasyonunun sürdürüldüğüne ve dirençli bir fenotipin devam ettiğine işaret etmektedir (Luo vd., 2015).

$CD133^+$ yoğunluklü tümörlerde, kontrol koşullarında bile WT grubuna kıyasla proliferasyon, DNA onarımı ve kök hücre programlarına ait yolaklar daha aktifken; immün modülasyon ve farklılaşma ile ilişkili yolaklar baskılanmış görünmektedir. TMZ tedavisi sonrası bu farklar daha da derinleşmekte; $CD133^+$ hücreler, WT'ye göre DNA hasarına karşı daha dirençli, immün baskılayıcı ve proliferatif kalmaktadır. Bu durum, $CD133^+$ tümör alt popülasyonlarının yalnızca bir tedavi direnci kaynağı olmadığını, aynı zamanda immün mikroçevreyi yeniden şekillendirme potansiyeli taşıyan pro-tümörojenik etmenler olduğunu ortaya koymaktadır.

$CD133^+$ grubu, tedavi sonrası hücre döngüsü düzenleyicisi CDK1, DNA replikasyon kontrol faktörü CHEK1, hasar algılama sensörü TP53 ve proliferasyon göstergesi MKI67 gibi genlerin yukarı regülasyonu göstermektedir. Bu durum, bu popülasyonca zengin tümör hücrelerinn TMZ tedavisine rağmen proliferatif döngüyü sürdürebilme kabiliyetine sahip olduğunu düşündürmektedir. Önceki çalışmalarda $CD133^+$ glioma hücrelerinin, genetik stres karşısında DNA onarım yollarını aktive ederek apoptozdan kaçınabildiği gösterilmiştir (Bao vd., 2006). p53 aracılı hasar yanıtının aktive olması, tedavi baskısı altında $CD133^+$ hücrelerin genomik stabiliteyi korumak için savunma mekanizmalarını tetiklediğini göstermektedir. WT

grubu da benzer yolakları aktive etse de bu yanıt, CD133^{+} hücrelerde daha farklı bir şekilde gerçekleşmektedir.

CD133^{+} grubunda sinirsel gelişim ve nörojenik farklılaşma ile ilişkili genlerin ve yolakların (örneğin. dendritik omurga oluşumu, nörotransmitter salınımı) baskılanması, bu hücrelerin daha az farklılaşmış bir fenotipe sahip olduğunu düşündürmektedir. Literatürde, glioma kök hücrelerinin nöronal yönelimi baskılayarak tümöral plastisiteyi ve direnç gelişimini artırdığı gösterilmiştir (Bhaduri vd., 2020; Lathia vd., 2011).

WT tümörlerde terapiye bağlı olarak daha dengeli bir proliferasyon–immün yanıt adaptasyonu gözlenirken, CD133^{+} tümörler daha agresif bir yeniden programlama göstermektedir. Özellikle hücre döngüsünü devam ettirme, DNA hasar toleransı, immün kaçış ve sinyal yolaklarının modülasyonu gibi yönlerde farklılıklar belirginleşmiştir (Gimple vd., 2019). Bu durum, CD133^{+} alt tiplerin klasik kemoterapilere karşı daha dirençli ancak hedefe yönelik veya kombinasyonel tedavilere daha açık yapılar olduğunu göstermektedir.

GBM, yalnızca hızlı proliferasyon ve infiltratif büyüme özellikleriyle değil, aynı zamanda merkezi sinir sistemine özgü anatomik bariyerlerden biri olan BBB etkisiyle de tanımlanır. CD133^{+} alt popülasyonunun BBB üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yürütülen transkriptomik analizler, bu alt grubun BBB'nin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğunu ortaya koymuştur. Özellikle Mmp2, Mmp9, ApoE ve Plvap gibi genlerin ekspresyonundaki düşüş, BBB'yi oluşturan ekstraselüler matriks ve endotel bariyer bileşenlerinin zayıfladığını göstermektedir. Bu bulgu, daha önce glioma kaynaklı MMP-2/9 salınımının endotel bütünlüğünü bozarak mikrovasküler geçirgenliği artırdığı yönündeki çalışmalarla uyumludur (Deeken ve Löscher, 2007; Lv vd., 2023; Roomi vd., 2017).

Tight junction proteinlerinden Cldn3, Clnd5, Esam ve Pecam1'in ekspresyon seviyelerindeki azalma, CD133^{+} hücrelerin BBB'nin fiziksel bariyer fonksiyonunu zayıflattığını desteklemektedir. Bu proteinlerin aşağı regülasyonu daha önce glioma progresyonu ve periferal immün hücre infiltrasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Z. Zhao vd., 2015). Ayrıca taşıyıcı sistem genleri olan Abcg2, Slc2a1 ve Mfsd2a'nın baskılanması, bu alt tipin ilaç penetrasyonunu düzenleyen mekanizmaları da bozduğunu düşündürmektedir. Mfsd2a'nın özellikle lipid taşınımı ve endositozu önleme fonksiyonu dikkate alındığında, bu bozulmanın terapötik sürçlere etki eddebileceği öngörülmektedir (Ben-Zvi vd., 2014).

Bunlara ek olarak, inflamasyonla ilişkili Il1b, Tnf ve Cxcl10 gibi genlerdeki değişimlerle birlikte artan Angpt2 ve Icam1 ekspresyonu, $CD133^+$ hücrelerin aynı zamanda vasküler inflamasyonu destekleyen bir mikroçevre oluşturduğunu göstermektedir. Bu bulgular, $CD133^+$ hücrelerin yalnızca proliferatif ve kök hücre benzeri özellikleriyle değil, aynı zamanda BBB'yi bozarak tümörün immün kaçışına ve sistemik terapi direncine katkı sunduğunu göstermektedir (Abbott vd., 2010; Arvanitis vd., 2019)

CD-TMZ tedavisi uygulanan WT tümör modellerinde yapılan analizler, terapinin BBB bütünlüğü açısından görece daha koruyucu bir profil sergilediğini ortaya koymuştur. Mmp2/9 ve Vegfa gibi geçirgenlik artırıcı genlerin baskılanması, CD+TMZ'nin glioma kaynaklı mikrovasküler bozulmayı hafifletebileceği fikrini desteklemektedir (P. Lu vd., 2012). Aynı zamanda Claudin-5 ve Occludin gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda gözlenen artış, endotel–endotel bağlantılarının güçlendiğine ve bu yolla BBB bütünlüğünün desteklendiğine işaret etmektedir.

Ancak bu CD+TMZ bağlı inflamatuvar profil de göz ardı edilmemelidir. Tnf, Il1b, Cxcl10 ve Icam1 gibi proinflamatuar genlerdeki artış, periferal immün hücrelerin tümör bölgesine erişimini kolaylaştırabilecek bir ortam yaratabilir. Bu durum, bazı çalışmalarda TMZ tedavisinin geçici bağışıklık aktivasyonu oluşturduğu ancak uzun vadede T hücre tükenmesi yada ilişikili öncün moleküler değişimlerin neden olduğu yönündeki bulgularla tutarlıdır (M. Lim vd., 2018; Woroniecka vd., 2018).

Bu çalışmada kullanılan kemorezistans gen paneli, DNA hasar onarımı, efflux pompa aktivitesi, anti-apoptoz ve redoks dengesi gibi mekanizmaları kapsamaktadır. $CD133^+$ hücrelerin WT'ye kıyasla hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası bu genleri daha güçlü şekilde ekspresse ettiği belirlenmiştir. Özellikle XRCC1, MLH1 ve ATR gibi DNA tamir genlerinin artışı, bu hücrelerin genetik stabiliteyi koruma kapasitesinin daha yüksek olduğunu düşündürmektedir. Bu durum, literatürde glioma kök hücrelerinde MGMT ve diğer tamir enzimlerinin ekspresyonuyla ilişkilendirilmiştir (Bao vd., 2006; Hegi vd., 2005).

Benzer şekilde, ABCB1 ve ABCG2 gibi efflux pompa genlerinin $CD133^+$ tümörlerde belirgin düzeyde artması, kemoterapötik ajanların hücre dışına atılmasını kolaylaştırarak etkinliğini azaltmaktadır. Bu bulgu, CSC alt tiplerinde özellikle ABC taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonunun tedavi direnciyle doğrudan ilişkili olduğunu gösteren çalışmalarla örtüşmektedir (Bleau vd., 2009; Dean vd., 2005).

Kök hücre belirteçlerinden SOX2, PROM1 ve CD44'ün yüksek mRNA ifadesi, bu hücrelerin yalnızca terapötik strese değil, aynı zamanda mikroçevre değişikliklerine karşı da daha dayanıklı bir fenotip geliştirdiğini göstermektedir. SOX2'nin özellikle TMZ direnci ve tümör yeniden oluşumuyla ilişkili olduğu birçok çalışmada rapor (Alonso vd., 2011).

WT hücrelerde ND+TMZ sonrası MGMT, LIN28A ve BCL2 gibi genlerdeki artış, klasik TMZ direnci mekanizmalarının aktive olduğunu göstermektedir. MGMT'nin, temozolomid kaynaklı O6-metilguanin ile tamirinden sorumlu olduğu ve yüksek ekspresyonunun klinik yanıtı azalttığı çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Hegi vd., 2005; J. Zhang vd., 2012).

WT hücrelerde direnç genlerinin indüksiyonu $CD133^+$ hücrelerdeki kadar yaygın olmamakla birlikte, SOX2 ve PROM1'deki ekspresyon artışı, plastik fenotip kazanımı yönünde bir eğilimi göstermektedir. Bu durum, tümör içi heterojenliğin tedavi sonrası daha agresif klonların seçilmesine yol açabileceğini düşündürmektedir (Beier vd., 2007; Lathia vd., 2015).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Glioblastoma multiforme, tümör heterojenitesi, yaygın invazyon potansiyeli ve tedaviye karşı direnç gibi zorluklarıyla günümüzde halen en ölümcül beyin tümörleri arasında yer almaktadır. Özellikle tümör içinde bulunan kanser kök hücreleri, bu dirençte merkezi bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, $CD133^+$ glioblastoma alt popülasyonlarının, tümör biyolojisi, immün mikroçevre, kan–beyin bariyeri geçirgenliği ve kemoterapötik yanıta etkileri hem insan hem de fare modellerinde çok katmanlı bir yaklaşımla değerlendirilmiştir.

Toplamda tümör ve tümör mikroçevresi ayrı ayrı olmak üzere dört temel karşılaştırma grubunda ($CD133^+$ vs WT, – tedavi ve kontrol; tedavi vs kontrol – $CD133^+$ ve WT) elde edilen bulgular, $CD133^+$ hücre alt grubunun yalnızca klasik U87 hücre hattından moleküler olarak farklı olmadığını, aynı zamanda tedaviye direnç, immün kaçış ve mikrovasküler yeniden şekillenme gibi özelliklerde daha agresif bir fenotip sergilediğini göstermektedir.

Kontrol koşullarındaki $CD133^+$ ve WT tümörlerin karşılaştırılmasında, hücre döngüsü regülasyonu, DNA onarımı (XRCC1, CHEK1, MLH1), apoptoz (TP53, BCL2), proliferasyon (CDK1, MKI67) ve oksidatif stres regülasyonuna dair genlerin anlamlı şekilde yukarı regüle olduğu görülmüştür. Buna karşılık, immün hücre sinyal iletimi (PI3K-AKT, MAPK, TCR-BCR yolakları) ve farklılaşmaya yönelik yollar baskılanmıştır. Bu profil, $CD133^+$ hücrelerin proliferatif, genetik olarak stabil, immün baskılayıcı ve pluripotent özelliklerini yansıtmaktadır.

ND+TMZ tedavisi sonrası $CD133^+$ hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla DNA hasar yanıtı, kontrol noktası kontrolü ve hücre döngüsü yeniden düzenleme mekanizmalarının daha da kuvvetlendiği görülmüştür. Özellikle BIRC5, XRCC1, PRDX1, TXN gibi genlerdeki anlamlı artışlar, bu hücrelerin tedavi sonrası bile direnç mekanizmalarını sürdürdüğünü göstermektedir.

Buna karşın, bağışıklık sistemiyle ilişkili CXCL10, TCR sinyallemesi, BCR gibi yolakalrdaki gen ifadelerinin baskılanması, tedaviye bağlı immün baskılanmanın varlığına işaret etmektedir. Bu, immün kontrol noktası blokajı ile kombine terapötik stratejilerin $CD133^+$ alt popülasyon barındıran tümörler için daha uygun olabileceğini düşündürmektedir.

WT hücre hattında, ND+TMZ tedavisi sonrası açık bir şekilde apoptoz ve p53 aktivasyonu, oksidatif stres yanıtı, DNA hasar onarımı ve fibroblast proliferasyonu gibi süreçler aktive olmuştur. Ancak aynı zamanda SOX2, PROM1, ABCB1, MGMT, BCL2 gibi direnç genlerinin de ifadelerinde artış gözlenmiştir.

Bu durum, WT hücrelerin tedaviye yanıt olarak esnekliğe sahip dirençli klonlar oluşturabileceğini ve kök hücre benzeri fenotipe evrilebileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bu dönüşüm $CD133^+$ hücrelerdeki kadar yaygın ve eş zamanlı değildir. Bu nedenle, erken dönemde WT alt tiplerin baskılanması, olası $CD133^+$ benzeri dirençli alt popülasyonların önlenmesi açısından stratejik olarak öneme sahiptir.

Bu çalışmanın önemli çıktılarından biri de $CD133^+$ tümörlerin BBB yapısı üzerindeki etkilerini göstermesidir. Mmp2, Mmp9, ApoE, Cldn5, Cldn3, Esam, Pecam1 gibi genlerin ifadelerinin baskılanması, BBB'nin geçirgenliğini artıran, sıkı bağlantıları zayıflatan ve vasküler inflamasyonu tetikleyen bir mikroçevre yarattığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, $CD133^+$ hücrelerin yalnızca tümör direnci değil, aynı zamanda ilaçların beyne penetrasyonunu zorlaştıran bir ortam yarattığını düşündürmektedir. Aynı zamanda S1pr1, Abcb1, Abcg2, Mfsd2a gibi taşıyıcı genlerdeki ekspresyon değişimleri, hem farmakokinetik etki hem de terapötik ulaşılabilirlik açısından dikkate değerdir.

WT modelinde ND-TMZ tedavisi sonrası gözlenen Cldi-5, Cldn3 , Ocln gibi BBB sıkı bağlantı genlerinde artış ve Mmp2/9 baskılanması, bu ajanla kombine tedavilerin BBB koruyucu etki potansiyeline sahip olabileceğini ortaya koymaktadır.

$CD133^+$ alt tiplerde hem kontrol hem de tedavi koşullarında, literatür destekli 30'dan fazla genin yer aldığı direnç paneli ile yapılan analizler, çok katmanlı bir direnç mekanizmasının eş zamanlı olarak aktive olduğunu göstermiştir:

- DNA Tamiri: XRCC1, MLH1, ERCC1, ATR
- Efflux Pompaları: ABCB1, ABCG2
- Redoks Regülasyonu: PRDX1, GPX4, SOD1, NQO1, GSR
- Apoptoz Baskısı: BCL2, BIRC5
- Kök Hücre Fenotipi: SOX2, PROM1, CD44

WT tümörlerde bu genler daha sınırlı ve seçici düzeyde regüle olmuştur. Bu farklılık, tedaviye karşı temel direncin $CD133^+$ hücrelerde genetik olarak önceden yapılandırılmış olduğunu desteklemektedir.

Öneriler ve Gelecekte Yapılabilecekler:

Bu tez çalışmasının çıktıları doğrultusunda aşağıdaki öneriler sunulmaktadır:

1. $CD133^+$ hücrelerin hedeflenmesi: Tedavi stratejileri, özellikle $CD133^+$ alt popülasyonun eliminasyonunu hedeflemeli; bu alt grubun redoks dengesi, DNA tamiri ve effluks pompa mekanizmaları ayrı ayrı ya da komibine hedeflenerek müdahaleler tasarlanabilir.

2. BBB yapısındaki değişimlere yönelik kombine Terapiler: BBB'yi geçebilen, aynı zamanda BBB'nin geçirgenliğini bozmadan terapötik etkinlik sağlayabilen ajanlar geliştirilmelidir. Özellikle ND+TMZ gibi moleküller, taşıyıcı sistemleri manipüle ederek daha etkili kullanılabilir.

3. Transkripsiyon Faktörü Temelli Müdahaleler: TF analizleriyle öne çıkan TP53, MYCN, REST, FOXA2, ETS1 gibi faktörler, hedeflenebilir transkripsiyonel düğüm noktaları olarak değerlendirilebilir.

4. İmmün kaçış mekizmalarının blokajı: Özellikle $CD133^+$ tümörlerde immün sinyallemenin baskılanmış olması, checkpoint inhibitörleriyle kombinasyon gerekliliğini ortaya koymaktadır.

5. Tek-Hücreli transkriptomik ve uzamsal analizler: $CD133^+$ hücrelerin heterojenitesini daha iyi tanımlamak için uzamsal omik teknolojiler kullanılmalı; bu sayede tümör mikroçevresinin üç boyutlu yeniden yapılandırılması sağlanabilir.

6. Farklı İn vivo modellerde deneyler: Bu tez kapsamında atimik nude fareler ile yapılan kısa süreli terapi denemeleri sonucunda immun yanıtların Glial, makrofaj, NK hücreleri gibi doğuştan kazanılan bağışlık elamanları ile elde edilmesi T ve B hücrelerce sınırlı olması sebebiyle T ve B hücrelerin de yanıtlarının görülebileceği bir nude olmayan *in vivo* modellerin tasarlanması değerlendirilebilinir.

7. Uzun dönem terapi yanıtı: Bu tezde elde edilen veriler doğrultusunda, CD+TMZ formülasynlu deneylerin 48 saatlik terapi sürecinden daha fazla terapi sürelerinde

denenerek terapinin kanser kök hücresi etkinliğine uzun dönemdeki etkisini incelemenin önemli olduğu düşünülmekteir.

8. Bu çalışma, glioblastoma tedavisinde en dirençli tümör alt popülasyonlarından biri olan $CD133^+$ hücrelerin, yalnızca klasik fenotipten moleküler düzeyde ayrışmadığını, aynı zamanda BBB yapısını bozarak ve çoklu direnç yollarını aktive ederek terapötik başarısızlığa katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, tedaviye $CD133^+$ alt tiplerin dahil edilmemesi, klinik başarısızlıkların temel nedenlerinden biri olabilir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen bütün bu bilgiler ve sonuçların değerlendirilmesiyle ileriki aşamalarda uzun dönem terapi ve daha geniş translasyonel sonuçların görülebileceği ve değerlendirme araçları olarak farklı omik sistemlerin kullanılabileceği bir çalışma planlaması yapılması hedeflenmektedir. Bu tezden elde edilen bilgilerin yeni çalışma alanları ve hedefleri için büyük bir yol gösterici olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abad, E., Graifer, D. & Lyakhovich, A. (2020). DNA damage response and resistance of cancer stem cells. *Cancer Letters*, 474, 106–117. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.01.008

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R. & Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2009.07.030

Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S. & Westermark, B. (2016). Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Science Translational Medicine*, 8(354). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAF6853

Alonso, M.M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Urquiza, L., Jauregi, P., de Munain, A.L., Sampron, N., Aramburu, A., Tejada-Solís, S., Vicente, C., Odero, M.D., Bandrés, E., García-Foncillas, J., Idoate, M.A., Lang, F.F., Fueyo, J. & Gomez-Manzano, C. (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PloS One*, 6(11). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0026740

Arvanitis, C.D., Ferraro, G.B. & Jain, R.K. (2019). The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer 2019 20:1*, 20(1), 26–41. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0205-x

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D. & Rich, J.N. (2006a). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature 2006 444:7120*, 444(7120), 756–760. https://doi.org/10.1038/nature05236

Barenholz, Y. (2012). Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 160(2), 117–134. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.03.020

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U. & Beier, C.P. (2007a). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 67(9), 4010–4015. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4180

Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B.J., Mayshar, Y., Yan, H. & Gu, C. (2014). Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood–brain barrier. *Nature 2014 509:7501*, 509(7501), 507–511. https://doi.org/10.1038/nature13324

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-Oncology*, 17(8), 1064–1075. https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOU307

Bhaduri, A., Di Lullo, E., Jung, D., Müller, S., Crouch, E.E., Espinosa, C.S., Ozawa, T., Alvarado, B., Spatazza, J., Cadwell, C.R., Wilkins, G., Velmeshev, D., Liu, S.J., Malatesta, M., Andrews, M.G., Mostajo-Radji, M.A., Huang, E.J., Nowakowski, T.J., Lim, D.A., … Kriegstein, A.R. (2020). Outer Radial Glia-like Cancer Stem Cells Contribute to Heterogeneity of Glioblastoma. *Cell Stem Cell*, 26(1), 48-63.e6. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2019.11.015

Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology 2015 33:9*, 33(9), 941–951. https://doi.org/10.1038/nbt.3330

Bleau, A.M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W. & Holland, E.C. (2009). PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*, 4(3), 226–235. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2009.01.007

Bradford, J.R., Wappett, M., Beran, G., Logie, A., Delpuech, O., Brown, H., Boros, J., Camp, N.J., McEwen, R., Mazzola, A.M., D'Cruz, C. & Barry, S.T. (2016). Whole transcriptome profiling of patient-derived xenograft models as a tool to identify both tumor and stromal specific biomarkers. *Oncotarget*, 7(15), 20773. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.8014

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., Beroukhim, R., Bernard, B., Wu, C.J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S.A., … McLendon, R. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155(2), 462. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.09.034

Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M. R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N. & Kataoka, K. (2011). Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature Nanotechnology 2011 6:12*, 6(12), 815–823. https://doi.org/10.1038/nnano.2011.166

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I.T., Zakharenko, S.S., Gajjar, A., Davidoff, A. & Gilbertson, R.J. (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 11(1), 69–82. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.11.020

Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K.E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., Combs, S.E., Goidts, V., Helmke, B.M., Eckstein, V., Roth, W., Beckhove, P., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. & Herold-Mende, C. (2010). Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(10), 2715–2728. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1800

Candolfi, M., Curtin, J.F., Nichols, W.S., Muhammad, A.K.M.G., King, G.D., Pluhar, G.E., McNiel, E.A., Ohlfest, J.R., Freese, A.B., Moore, P.F., Lerner, J., Lowenstein, P.R. & Castro, M.G. (2007). Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of Neuro-Oncology*, 85(2), 133–148. https://doi.org/10.1007/S11060-007-9400-9

Capper, D., Jones, D.T.W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D.E., Kratz, A., Wefers, A.K., Huang, K., Pajtler, K.W., Schweizer, L., Stichel, D., Olar, A., Engel, N.W., Lindenberg, K., … Pfister, S.M. (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature 2018 555:7697*, 555(7697), 469–474. https://doi.org/10.1038/nature26000

Cecyn, M.N. and Abrahao, K.P. (2023). Where do you measure the Bregma for rodent stereotaxic surgery? *IBRO Neuroscience Reports*, 15, 143. https://doi.org/10.1016/J.IBNEUR.2023.07.003

Cetinkaya, A., Kızılelma, B., Farhangzad, N., Dener-Kılıç, E., Ozcelikay-Akyıldız, G., Özkan, T., Unal, M.A., Sunguroglu, A. & Ozkan, S.A. (2025). Ultrasensitive electrochemical immunosensor system for the determination of CD133 biomarker. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 417(20), 4695–4708. https://doi.org/10.1007/S00216-025-05987-W/FIGURES/6

Ceylan, A., Uyar, R., Çelik, D., Rafieerad, A., Çinar, O.O., Summak, G.Y., Gurcan, C., Giro, L., Khoueiry, R., Turktas, M., Unal, M.A., Gogotsi, Y., Delogu, L.G., Dhingra, S. & Yilmazer, A. (2024). Spatial transcriptomics reveals the interplay between cancer and immune cells directed by MXene quantum dots. *Nano Today*, 56, 102285. https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2024.102285

Charbit, H. and Lavon, I. (2024). Investigating Expression Dynamics of miR-21 and miR-10b in Glioblastoma Cells In Vitro: Insights into Responses to Hypoxia and Secretion Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), 7984. https://doi.org/10.3390/IJMS25147984/S1

Charles, N.A., Holland, E.C., Gilbertson, R., Glass, R. & Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia*, 59(8), 1169–1180. https://doi.org/10.1002/GLIA.21136

Che, J., DePalma, T.J., Sivakumar, H., Mezache, L.S., Tallman, M.M., Venere, M., Swindle-Reilly, K., Veeraraghavan, R. & Skardal, A. (2023). αCT1 peptide sensitizes glioma cells to temozolomide in a glioblastoma organoid platform. *Biotechnology and Bioengineering*, 120(4), 1108–1119. https://doi.org/10.1002/BIT.28313

Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G. & Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature 2012 488:7412*, 488(7412), 522–526. https://doi.org/10.1038/nature11287

Chen, Z., Feng, X., Herting, C.J., Garcia, V.A., Nie, K., Pong, W.W., Rasmussen, R., Dwivedi, B., Seby, S., Wolf, S.A., Gutmann, D.H. & Hambardzumyan, D. (2017). Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Research*, 77(9), 2266–2278. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2310

Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A.A., Hilton, M., Abrey, L. & Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 370(8), 709–722. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1308345/SUPPL_FILE/NEJMOA1308345_DISCLOSURES.PDF

Chouaib, S., Messai, Y., Couve, S., Escudier, B., Hasmim, M. & Noman, M.Z. (2012). Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. *Frontiers in Immunology*, 3(FEB). https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00021

Chung, C.Y., Chen, Y.J., Kang, C.H., Lin, H.Y., Huang, C.C., Hsu, P.H. & Lin, H.J. (2021). Toxic or not toxic, that is the carbon quantum dot's question: A comprehensive evaluation with zebrafish embryo, eleutheroembryo, and adult models. *Polymers*, 13(10), 1598. https://doi.org/10.3390/POLYM13101598/S1

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L. & Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, 66(19), 9339–9344. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126/654478/P/CANCER-STEM-CELLS-PERSPECTIVES-ON-CURRENT-STATUS

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szcześniak, M.W., Gaffney, D.J., Elo, L.L., Zhang, X. & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology 2016 17:1*, 17(1), 1–19. https://doi.org/10.1186/S13059-016-0881-8

de Lázaro, I., Sharp, P., Gurcan, C., Ceylan, A., Stylianou, M., Kisby, T., Chen, Y., Vranic, S., Barr, K., Taheri, H., Ozen, A., Bussy, C., Yilmazer, A. & Kostarelos, K. (2021). Deep Tissue Translocation of Graphene Oxide Sheets in Human Glioblastoma 3D Spheroids and an Orthotopic Xenograft Model. *Advanced Therapeutics*, 4(1), 2000109. https://doi.org/10.1002/ADTP.202000109

Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer 2005 5:4*, 5(4), 275–284. https://doi.org/10.1038/nrc1590

Deeken, J.F. and Löscher, W. (2007). The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(6), 1663–1674. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2854

Doktorova, H., Hrabeta, J., Khalil, M.A. & Eckschlager, T. (2015). Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1 INTRODUCTION-HYPOXIA-INDUCED CHEMORESISTANCE. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 159(2), 166–177. https://doi.org/10.5507/bp.2015.025

Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornnell, H.H., Ibrahim-Hashim, A., Bailey, K., Balagurunathan, Y., Rothberg, J.M., Sloane, B. F., Johnson, J., Gatenby, R.A. & Gillies, R. J. (2013). Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Research*, 73(5), 1524–1535. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2796

Eyler, C.E. and Rich, J.N. (2008). Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(17), 2839–2845. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.1829

Eyler, C.E., Wu, Q., Yan, K., MacSwords, J.M., Chandler-Militello, D., Misuraca, K.L., Lathia, J.D., Forrester, M.T., Lee, J., Stamler, J.S., Goldman, S.A., Bredel, M., McLendon, R.E., Sloan, A. E., Hjelmeland, A.B. & Rich, J.N. (2011). Glioma Stem Cell Proliferation and Tumor Growth are Promoted by Nitric Oxide Synthase-2. *Cell*, 146(1), 53. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.06.006

Fan, X., Khaki, L., Zhu, T.S., Soules, M.E., Talsma, C.E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y.M., Maciaczyk, J., Nikkhah, G., DiMeco, F., Piccirillo, S., Vescovi, A.L. & Eberhart, C.G. (2010). NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(1), 5–16. https://doi.org/10.1002/STEM.254

Fang, Q. and Tang, M. (2024). Oxidative stress-induced neurotoxicity of quantum dots and influencing factors. *Nanomedicine*, 19(11), 1013–1028. https://doi.org/10.2217/NNM-2023-0326

Farokhzad, O.C. and Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16–20. https://doi.org/10.1021/NN900002M/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NN-2009-00002M_0003.GIF

Friebel, E., Kapolou, K., Unger, S., Núñez, 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-Invading Leukocytes. *Cell*, 181(7), 1626-1642.e20. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.04.055

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F. & Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*, 64(19), 7011–7021. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1364

Gan, H.K., Kaye, A.H. & Luwor, R.B. (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 16(6), 748–754. https://doi.org/10.1016/J.JOCN.2008.12.005

Gimple, R.C., Bhargava, S., Dixit, D. & Rich, J.N. (2019). Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes & Development*, 33(11–12), 591–609. https://doi.org/10.1101/GAD.324301.119

Göcz, B., Rumpler, É., Szentkirályi-Tóth, S., Skrapits, K., Takács, S., Sárvári, M., Farkas, I., Póliska, S. & Hrabovszky, E. (2025). Laser-capture microdissection for spatial transcriptomics of immunohistochemically detected neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 301(2), 108150. https://doi.org/10.1016/J.JBC.2024.108150

Gueble, S.E., Vasquez, J.C. & Bindra, R.S. (2022). The Role of PARP Inhibitors in Patients with Primary Malignant Central Nervous System Tumors. *Current Treatment Options in Oncology*, 23(11), 1566. https://doi.org/10.1007/S11864-022-01024-5

Guirguis, A., Yang, W., Conlan, X.A., Kong, L., Cahill, D.M., Wang, Y., Guirguis, A., Yang, W., Conlan, X.A., Cahill, D.M., Wang, Y. & Kong, L. (2023). Boosting Plant Photosynthesis with Carbon Dots: A Critical Review of Performance and Prospects. *Small*, 19(43), 2300671. https://doi.org/10.1002/SMLL.202300671

Ha, D., Yang, N. & Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 6(4), 287–296. https://doi.org/10.1016/J.APSB.2016.02.001

Hambardzumyan, D. and Bergers, G. (2015). Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends in Cancer*, 1(4), 252–265. https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2015.10.009

Hambardzumyan, D., Gutmann, D.H. & Kettenmann, H. (2015). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience 2016 19:1*, 19(1), 20–27. https://doi.org/10.1038/nn.4185

Haqqani, A.S., Bélanger, K. & Stanimirovic, D.B. (2024). Receptor-mediated transcytosis for brain delivery of therapeutics: receptor classes and criteria. *Frontiers in Drug Delivery*, 4. https://doi.org/10.3389/FDDEV.2024.1360302

Hardee, M.E. and Zagzag, D. (2012). Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *The American Journal of Pathology*, 181(4), 1126–1141. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2012.06.030

He, C., Lin, X., Mei, Y., Luo, Y., Yang, M., Kuang, Y., Yi, X., Zeng, W., Huang, Q. & Zhong, B. (2022). Recent Advances in Carbon Dots for In Vitro/Vivo Fluorescent Bioimaging: A Mini-Review. *Frontiers in Chemistry*, 10, 905475. https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.905475/BIBTEX

He, H., Yan, M., Ye, K., Shi, R., Tong, L., Zhang, S., Zhu, Y. & Zhan, R. (2025). Predicting Prognosis and Immunotherapy Response in Glioblastoma (GBM) With a 5-Gene CAF-Risk Signature. *Cancer Reports*, 8(4), e70158. https://doi.org/10.1002/CNR2.70158

He, K., Liang, X., Wei, T., Liu, N., Wang, Y., Zou, L., Bai, C., Yao, Y., Wu, T., Kong, L., Zhang, T., Xue, Y. & Tang, M. (2020). A metabolomics study: CdTe/ZnS quantum dots induce polarization in mice microglia. *Chemosphere*, 246, 125629. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125629

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003. https://doi.org/10.1056/NEJMOA043331/SUPPL_FILE/997SA1.PDF

Heldin, C.H., Rubin, K., Pietras, K. & Östman, A. (2004). High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer 2004 4:10*, 4(10), 806–813. https://doi.org/10.1038/nrc1456

Hersh, A.M., Alomari, S. & Tyler, B.M. (2022). Crossing the Blood-Brain Barrier: Advances in Nanoparticle Technology for Drug Delivery in Neuro-Oncology. *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 4153*, 23(8), 4153. https://doi.org/10.3390/IJMS23084153

Huszthy, P.C., Daphu, I., Niclou, S.P., Stieber, D., Nigro, J.M., Sakariassen, P.O., Miletic, H., Thorsen, F. & Bjerkvig, R. (2012). İn vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. *Neuro-Oncology*, 14(8), 979–993. https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOS135

Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T. & Nakahata, T. (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100(9), 3175–3182. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2001-12-0207

Jackson, C.M., Choi, J. & Lim, M. (2019). Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma. *Nature Immunology 2019 20:9*, 20(9), 1100–1109. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0433-y

Jacob, F., Salinas, R.D., Zhang, D.Y., Nguyen, P.T.T., Schnoll, J.G., Wong, S.Z.H., Thokala, R., Sheikh, S., Saxena, D., Prokop, S., Liu, D. ao, Qian, X., Petrov, D., Lucas, T., Chen, H.I., Dorsey, J.F., Christian, K.M., Binder, Z.A., Nasrallah, M., … Song, H. (2020). A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*, 180(1), 188-204.e22. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.11.036

Jing, H.H., Shati, A.A., Alfaifi, M.Y., Elbehairi, S.E.I. & Sasidharan, S. (2025). The future of plant based green carbon dots as cancer Nanomedicine: From current progress to future Perspectives and beyond. *Journal of Advanced Research*, 67, 133–159. https://doi.org/10.1016/J.JARE.2024.01.034

Johannessen, T.C.A. and Bjerkvig, R. (2012). Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(5), 635–642. https://doi.org/10.1586/ERA.12.37

Jovanović, S., Marković, Z., Budimir, M., Prekodravac, J., Zmejkoski, D., Kepić, D., Bonasera, A. & Marković, B.T. (2023). Lights and Dots toward Therapy—Carbon-Based Quantum Dots as New Agents for Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics 2023, Vol. 15, Page 1170*, 15(4), 1170. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15041170

Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J. & Farokhzad, O.C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. *Chemical Reviews*, 116(4), 2602–2663. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.5B00346/ASSET/ACS.CHEMREV.5B00346.FP.PNG_V03

Khedri, A., Guo, S., Ramar, V., Hudson, B.A. & Liu, M. (2024). FOSL1's Oncogene Roles in Glioma/Glioma Stem Cells and Tumorigenesis: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5362. https://doi.org/10.3390/IJMS25105362

Kinaret, P., Marwah, V., Fortino, V., Ilves, M., Wolff, H., Ruokolainen, L., Auvinen, P., Savolainen, K., Alenius, H. & Greco, D. (2017). Network Analysis Reveals Similar Transcriptomic Responses to Intrinsic Properties of Carbon Nanomaterials in Vitro and in vivo. *ACS Nano*, 11(4), 3786–3796. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.6B08650/SUPPL_FILE/NN6B08650_SI_004.XLSX

Kirbas Cilingir, E., Besbinar, O., Giro, L., Bartoli, M., Hueso, J.L., Mintz, K.J., Aydogan, Y., Garber, J.M., Turktas, M., Ekim, O., Ceylan, A., Unal, M.A., Ensoy, M., Arı, F., Ozgenç Çinar, O., Ozturk, B.I., Gokce, C., Cansaran-Duman, D., Braun, M., … Leblanc, R.M. (2024). Small Warriors of Nature: Novel Red Emissive Chlorophyllin Carbon Dots Harnessing Fenton-Fueled Ferroptosis for In Vitro and İn vivo Cancer Treatment. *Small*, 20(18). https://doi.org/10.1002/SMLL.202309283

Krauss, A.C., Gao, X., Li, L., Manning, M.L., Patel, P., Fu, W., Janoria, K.G., Gieser, G., Bateman, D.A., Przepiorka, D., Shen, Y.L., Shord, S.S., Sheth, C.M., Banerjee, A., Liu, J., Goldberg, K.B., Farrell, A.T., Blumenthal, G.M. & Pazdur, R. (2019). FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(9), 2685–2690. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2990

Lacoste, B., Prat, A., Freitas-Andrade, M. & Gu, C. (2025). The Blood-Brain Barrier: Composition, Properties, and Roles in Brain Health. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 17(5). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A041422

Larsen, R., Kucharz, K., Aydin, S., Micael, M.K.B., Choudhury, B., Paulchakrabarti, M., Lønstrup, M., Lin, D.C., Abeln, M., Münster-Kühnel, A., Toledo, A.G., Lauritzen, M., Esko, J.D. & Daneman, R. (2025). Multi-omic analysis reveals the unique glycan landscape of the blood-brain barrier glycocalyx. *BioRxiv*, 2025.04.07.645297. https://doi.org/10.1101/2025.04.07.645297

Lathia, J.D., Heddleston, J.M., Venere, M. & Rich, J.N. (2011). Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell*, 8(5), 482–485. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2011.04.013

Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L.L. & Rich, J.N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*, 29(12), 1203–1217. https://doi.org/10.1101/GAD.261982.115

Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K. & Fine, H.A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391–403. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.03.030

Lee, S.Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198–210. https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2016.04.007

Lefranc, F., Brotchi, J. & Kiss, R. (2005). Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(10), 2411–2422. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.089

Li, H., Kang, Z., Liu, Y. & Lee, S.T. (2012). Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry*, 22(46), 24230–24253. https://doi.org/10.1039/C2JM34690G

Li, H., Wu, Y., Chen, Y., Lv, J., Qu, C., Mei, T., Zheng, Y., Ye, C., Li, F., Ge, S., Yao, A. & Jia, L. (2025). Overcoming temozolomide resistance in glioma: recent advances and mechanistic insights. *Acta Neuropathologica Communications 2025 13:1*, 13(1), 1–38. https://doi.org/10.1186/S40478-025-02046-4

Li, L.P., Ren, X.F., Bai, P.R., Liu, Y., Xu, W.Y., Xie, J. & Zhang, R.P. (2021). Near-infrared emission carbon dots for bio-imaging applications. *New Carbon Materials*, 36(3), 632–638. https://doi.org/10.1016/S1872-5805(21)60041-0

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B. & Rich, J.N. (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*, 15(6), 501–513. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.03.018

Lim, M., Xia, Y., Bettegowda, C. & Weller, M. (2018). Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nature Reviews Clinical Oncology 2018 15:7*, 15(7), 422–442. https://doi.org/10.1038/s41571-018-0003-5

Lim, S.Y., Shen, W. & Gao, Z. (2014). Carbon quantum dots and their applications. *Chemical Society Reviews*, 44(1), 362–381. https://doi.org/10.1039/C4CS00269E

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L. & Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 5. https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-67

Liu, Y., Chanana, P., Davila, J.I., Hou, X., Zanfagnin, V., McGehee, C.D., Goode, E.L., Polley, E.C., Haluska, P., Weroha, S.J. & Wang, C. (2019). Gene expression differences between matched pairs of ovarian cancer patient tumors and patient-derived xenografts. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42680-2

Liu, Y., Hardie, J., Zhang, X. & Rotello, V.M. (2017). Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system. *Seminars in Immunology*, 34, 25. https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2017.09.011

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. (2016a). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. https://doi.org/10.1007/S00401-016-1545-1

Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., Wellen, K.E., Oĝrourke, D.M., Berger, S.L., Chan, T.A., Levine, R.L., Mellinghoff, I.K. & Thompson, C.B. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature 2012 483:7390*, 483(7390), 474–478. https://doi.org/10.1038/nature10860

Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M. & Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A005058

Lu, P., Weaver, V.M. & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 196(4), 395–406. https://doi.org/10.1083/JCB.201102147

Luo, H., Chen, Z., Wang, S., Zhang, R., Qiu, W., Zhao, L., Peng, C., Xu, R., Chen, W., Wang, H.W., Chen, Y., Yang, J., Zhang, X., Zhang, S., Chen, D., Wu, W., Zhao, C., Cheng, G., Jiang, T., … Wang, H. (2015). c-Myc–miR-29c–REV3L signalling pathway drives the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. *Brain*, 138(12), 3654–3672. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWV287

Lv, M., Ma, X., Zhang, K., Zhang, M., Ji, Y., Cheng, L., Shao, X., Guan, Z., Cui, J., Gao, Y., Liu, Y., Yang, Y. & Liu, X. (2023). The disruption of blood-brain barrier induced by long-term arsenic exposure is associated with the increase of MMP-9 and MMP-2: The characteristics are similar to those caused by senescence. *Chemico-Biological Interactions*, 385, 110743. https://doi.org/10.1016/J.CBI.2023.110743

Marino, S., Menna, G., Di Bonaventura, R., Lisi, L., Mattogno, P., Figà, 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*, 15(6), 1879. https://doi.org/10.3390/CANCERS15061879

Marx, V. (2021). Method of the Year: spatially resolved transcriptomics. *Nature Methods*, 18(1), 9–14. https://doi.org/10.1038/S41592-020-01033-Y

McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E.G., Brat, D.J., Mastrogianakis, G.M., Olson, J.J., Mikkelsen, T., Lehman, N., Aldape, K., Yung, W.K.A., Bogler, O., Weinstein, J.N., VandenBerg, S., Berger, M., Prados, M., Muzny, D., Morgan, M., Scherer, S., … Thomson, E. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature 2008 455:7216*, 455(7216), 1061–1068. https://doi.org/10.1038/nature07385

Miele, E., Spinelli, G.P., Miele, E., Tomao, F. & Tomao, S. (2009). Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 4(1), 99. https://doi.org/10.2147/IJN.S3061

Milano, G., Innocenti, F. & Minami, H. (2022). Liposomal irinotecan (Onivyde): Exemplifying the benefits of nanotherapeutic drugs. *Cancer Science*, 113(7), 2224. https://doi.org/10.1111/CAS.15377

Mittal, K.R., Pharasi, N., Sarna, B., Singh, M., Rachana, Haider, S., Singh, S.K., Dua, K., Jha, S.K., Dey, A., Ojha, S., Mani, S. & Jha, N.K. (2022). Nanotechnology-based drug delivery for the treatment of CNS disorders. *Translational Neuroscience*, 13(1), 527. https://doi.org/10.1515/TNSCI-2022-0258

Mizuta, K., Gallagher, S., Wang, A., Chang, N., Morinaga, S., Sato, M., Kang, B.M. & Hoffman, R.M. (2024). Non-Invasive Direct Visualization of Luciferase-Luciferin Emitted Light Producing True Images from an Orthotopic Lung Cancer Xenograft Model in Nude Mice Using an Ultra-sensitive Low-light Camera and Optics. *İn vivo*, 38(5), 2122–2125. https://doi.org/10.21873/INVIVO.13674

Mohankumar, K., Wright, G., Kumaravel, S., Shrestha, R., Zhang, L., Abdelrahim, M., Chapkin, R.S. & Safe, S. (2023). Bis-indole-derived NR4A1 antagonists inhibit colon tumor and splenic growth and T-cell exhaustion. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 72(12), 3985–3999. https://doi.org/10.1007/S00262-023-03530-3/FIGURES/7

Mondal, S., Das, S., Sharma, B., Nayak, R. & Rahman, M. Z. (2025). Recent progress of carbon-based quantum dots and nanotubes for cancer targeting and drug delivery applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 108, 106896. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2025.106896

Monopoli, M.P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F. & Dawson, K. A. (2011). Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 133(8), 2525–2534. https://doi.org/10.1021/JA107583H/SUPPL_FILE/JA107583H_SI_001.PDF

Neal, J.T., Li, X., Zhu, J., Giangarra, V., Grzeskowiak, C.L., Ju, J., Liu, I. H., Chiou, S.H., Salahudeen, A.A., Smith, A.R., Deutsch, B.C., Liao, L., Zemek, A.J., Zhao, F., Karlsson, K., Schultz, L.M., Metzner, T.J., Nadauld, L.D., Tseng, Y.Y., … Kuo, C.J. (2018). Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*, 175(7), 1972-1988.e16. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.11.021

Newlands, E.S., Stevens, M.F.G., Wedge, S.R., Wheelhouse, R.T. & Brock, C. (1997). Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews*, 23(1), 35–61. https://doi.org/10.1016/S0305-7372(97)90019-0

Newman, A.M., Liu, C.L., Green, M.R., Gentles, A.J., Feng, W., Xu, Y., Hoang, C.D., Diehn, M. & Alizadeh, A.A. (2015). Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nature Methods 2015 12:5*, 12(5), 453–457. https://doi.org/10.1038/nmeth.3337

Nichterwitz, S., Benitez, J.A., Hoogstraaten, R., Deng, Q. & Hedlund, E. (2018). LCM-Seq: A Method for Spatial Transcriptomic Profiling Using Laser Capture Microdissection Coupled with PolyA-Based RNA Sequencing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1649, 95–110. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7213-5_6

Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, *19*(12), 1584–1596. https://doi.org/10.1038/NM.3407

Ostermann, S., Csajkag, C., Buclin, T., Leyvraz, S., Lejeune, F., Decosterd, L.A. & Stupp, R. (2004). Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(11), 3728–3736. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0807

Ostrom, Q.T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K.A., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J.S. (2022). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro-Oncology*, 24(Suppl 5), V1–V95. https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAC202

Owens, D.E. and Peppas, N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 93–102. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2005.10.010

Pardridge, W.M. (2020). Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2019.00373

Pombo Antunes, A.R., Scheyltjens, I., Lodi, F., Messiaen, J., Antoranz, A., Duerinck, J., Kancheva, D., Martens, L., De Vlaminck, K., Van Hove, H., Kjølner Hansen, S.S., Bosisio, F.M., Van der Borght, K., De Vleeschouwer, S., Sciot, R., Bouwens, L., Verfaillie, M., Vandamme, N., Vandenbroucke, R.E., … Movahedi, K. (2021). Single-cell profiling of myeloid cells in glioblastoma across species and disease stage reveals macrophage competition and specialization. *Nature Neuroscience*, 24(4), 595–610. https://doi.org/10.1038/S41593-020-00789-Y

Poon, C.C., Sarkar, S., Yong, V.W. & Kelly, J.J.P. (2017). Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. *Brain*, 140(6), 1548–1560. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW355

Pourmadadi, M., Hafezi, A.R., Yaghoobi, R., Rahmaninodeh, A., Hosseini, N., Alibabaie, A., Ajalli, N., Afrouzi, E.B., Shirazi, M. & Ghadami, A. (2025). pH-responsive Gelatin/Agarose/Magnesium-doped carbon quantum dot hydrogel nanocomposite for targeted curcumin delivery in brain cancer therapy. *Reactive and Functional Polymers*, 216, 106403. https://doi.org/10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2025.106403

Pyonteck, S.M., Akkari, L., Schuhmacher, A.J., Bowman, R.L., Sevenich, L., Quail, D.F., Olson, O.C., Quick, M.L., Huse, J.T., Teijeiro, V., Setty, M., Leslie, C.S., Oei, Y., Pedraza, A., Zhang, J., Brennan, C.W., Sutton, J.C., Holland, E.C., Daniel, D. & Joyce, J.A. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature Medicine*, 19(10), 1264–1272. https://doi.org/10.1038/NM.3337

Qu, S., Liu, X., Guo, X., Chu, M., Zhang, L. & Shen, D. (2014). Amplified Spontaneous Green Emission and Lasing Emission From Carbon Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 24(18), 2689–2695. https://doi.org/10.1002/ADFM.201303352

Qu, S., Wang, X., Lu, Q., Liu, X. & Wang, L. (2012). A Biocompatible Fluorescent Ink Based on Water-Soluble Luminescent Carbon Nanodots. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(49), 12215–12218. https://doi.org/10.1002/ANIE.201206791

Quail, D.F. and Joyce, J.A. (2017). The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell*, 31(3), 326–341. https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2017.02.009

Ravi, V.M., Will, P., Kueckelhaus, J., Sun, N., Joseph, K., Salié, H., Vollmer, L., Kuliesiute, U., von Ehr, J., Benotmane, J.K., Neidert, N., Follo, M., Scherer, F., Goeldner, J.M., Behringer, S.P., Franco, P., Khiat, M., Zhang, J., Hofmann, U.G., … Heiland, D.H. (2022). Spatially resolved multi-omics deciphers bidirectional tumor-host interdependence in glioblastoma. *Cancer Cell*, 40(6), 639-655.e13. https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2022.05.009

Reihanian, Z., Abbaspour, E., Zaresharifi, N., Karimzadhagh, S., Mahmoudalinejad, M., Sourati, A., Farzin, M. & EslamiKenarsari, H. (2024). Impact of Age and Gender on Survival of Glioblastoma Multiforme Patients: A Multicenter Retrospective Study. *Cancer Reports*, 7(11), e70050. https://doi.org/10.1002/CNR2.70050

Ren, H., Qi, F., Feng, X., Liu, J. & Zhao, Y. (2024). Facile Synthesis of Fluorescent Carbon Quantum Dots with High Product Yield Using a Solid-Phase Strategy. *Molecules*, 29(22), 5317. https://doi.org/10.3390/MOLECULES29225317/S1

Rodgers, L.T., Schulz Pauly, J.A., Maloney, B.J., Hartz, A.M.S. & Bauer, B. (2024). Optimization, Characterization, and Comparison of Two Luciferase-Expressing Mouse Glioblastoma Models. *Cancers*, 16(11). https://doi.org/10.3390/CANCERS16111997

Roomi, M.W., Kalinovsky, T., Rath, M. & Niedzwiecki, A. (2017). Modulation of MMP-2 and MMP-9 secretion by cytokines, inducers and inhibitors in human glioblastoma T-98G cells. *Oncology Reports*, 37(3), 1907–1913. https://doi.org/10.3892/OR.2017.5391

Safa, A.R., Saadatzadeh, M.R., Cohen-Gadol, A.A., Pollok, K.E. & Bijangi-Vishehsaraei, K. (2015). Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes & Diseases*, 2(2), 152–163. https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2015.02.001

Sanai, N., Polley, M.Y., McDermott, M.W., Parsa, A.T. & Berger, M.S. (2011). An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas: Clinical article. *Journal of Neurosurgery*, 115(1), 3–8. https://doi.org/10.3171/2011.2.JNS10998

Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L. & Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, 235, 34–47. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.05.044

Sarkaria, J.N., Carlson, B.L., Schroeder, M.A., Grogan, P., Brown, P.D., Giannini, C., Ballman, K.V., Kitange, C.J., Guha, A., Pandita, A. & James, C.D. (2006). Use of an orthotopic xenograft model for assessing the effect of epidermal growth factor receptor amplification on

glioblastoma radiation response. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(7 Pt 1), 2264–2271. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2510

Sejda, A., Grajkowska, W., Trubicka, J., Szutowicz, E., Wojdacz, T.K., Kloc, W. & Izycka-Świeszewska, E. (2022). WHO CNS5 2021 classification of gliomas: a practical review and road signs for diagnosing pathologists and proper patho-clinical and neuro-oncological cooperation. *Folia Neuropathologica*, 60(2), 137–152. https://doi.org/10.5114/FN.2022.118183

Setiadi, A.F., Omilusik, K., David, M.D., Seipp, R.P., Hartikainen, J., Gopaul, R., Choi, K.B. & Jefferies, W.A. (2008). Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors. *Cancer Research*, 68(23), 9601–9607. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5270

Seven, E.S., Seven, Y.B., Zhou, Y., Poudel-Sharma, S., Diaz-Rucco, J.J., Kirbas Cilingir, E., Mitchell, G.S., David, J., Dyken, V. & Leblanc, R.M. (2021). Crossing the blood–brain barrier with carbon dots: uptake mechanism and in vivo cargo delivery. *Nanoscale Advances*, 3(13), 3942–3953. https://doi.org/10.1039/D1NA00145K

Shahani, A., Slika, H., Elbeltagy, A., Lee, A., Peters, C., Dotson, T., Raj, D. & Tyler, B. (2025). The epigenetic mechanisms involved in the treatment resistance of glioblastoma. *Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)*, 8. https://doi.org/10.20517/CDR.2024.157

Shamsipour, M., Mansouri, A.M. & Moradipour, P. (2019). Temozolomide Conjugated Carbon Quantum Dots Embedded in Core/Shell Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning as an Implantable Delivery System for Cell Imaging and Sustained Drug Release. *AAPS PharmSciTech*, 20(7). https://doi.org/10.1208/S12249-019-1466-0

Shelton, P. and Jaiswal, A.K. (2013). The transcription factor NF-E2-related Factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *The FASEB Journal*, 27(2), 414. https://doi.org/10.1096/FJ.12-217257

Sheng, Y., Xie, Z., Wang, J., Yang, X., Yao, M., Qian, W., Zhang, L., Chen, X. & Guo, S. (2025). Impact of Subcutaneous Versus Orthotopic Implantations on Patient-Derived Xenograft Transcriptomic Profiles. *Cancer Research Communications*, 5(5), 871–880. https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-25-0008

Singh, N., Miner, A., Hennis, L. & Mittal, S. (2021). Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resistance*, 4(1), 17. https://doi.org/10.20517/CDR.2020.79

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., & Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature 2004 432:7015*, 432(7015), 396–401. https://doi.org/10.1038/nature03128

Sipos, F. and Műzes, G. (2023). Cancer Stem Cell Relationship with Pro-Tumoral Inflammatory Microenvironment. *Biomedicines 2023, Vol. 11, Page 189*, 11(1), 189. https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11010189

Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A.B., Pollack, I.F. & Park, D.M. (2009a). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, 28(45), 3949–3959. https://doi.org/10.1038/ONC.2009.252

Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A.B., Pollack, I.F. & Park, D.M. (2009b). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1α. *Oncogene 2009 28:45*, 28(45), 3949–3959. https://doi.org/10.1038/onc.2009.252

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2009.08.002

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., 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. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. https://doi.org/10.1056/NEJMOA043330

Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D.A., Jones, D.T.W., Konermann, C., Pfaff, E., Tönjes, M., Sill, M., Bender, S., Kool, M., Zapatka, M., Becker, N., Zucknick, M., Hielscher, T., Liu, X.Y., Fontebasso, A.M., Ryzhova, M., Albrecht, S., … Pfister, S.M. (2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*, 22(4), 425–437. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.08.024

Sun, Y.P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K.A.S., Pathak, P., Meziani, M.J., Harruff, B.A., Wang, X., Wang, H., Luo, P.G., Yang, H., Kose, M.E., Chen, B., Veca, L.M. & Xie, S.Y. (2006). Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 128(24), 7756–7757. https://doi.org/10.1021/JA062677D/SUPPL_FILE/JA062677DSI20060417_112943.PDF

Suvà, M.L., Rheinbay, E., Gillespie, S.M., Patel, A.P., Wakimoto, H., Rabkin, S.D., Riggi, N., Chi, A.S., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., Rivera, M.N., Rossetti, N., Kasif, S., Beik, S., Kadri, S., Tirosh, I., Wortman, I., … Bernstein, B.E. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, 157(3), 580–594. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.02.030

Szentirmai, O., Baker, C.H., Lin, N., Szucs, S., Takahashi, M., Kiryu, S., Kung, A.L., Mulligan, R.C. & Carter, B.S. (2006). Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: Correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect. *Neurosurgery*, 58(2), 365–372. https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000195114.24819.4F

Tamura, K., Aoyagi, M., Wakimoto, H., Ando, N., Nariai, T., Yamamoto, M. & Ohno, K. (2010). Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by Gamma Knife surgery plus external beam radiation. *Journal of Neurosurgery*, 113(2), 310–318. https://doi.org/10.3171/2010.2.JNS091607

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. https://doi.org/10.3322/CAAC.21613

Tehrani, G.A., Kubick, R.N., Zarodniuk, M. & Datta, M. (2025). Histone deacetylase inhibitors sensitize glioblastoma models to temozolomide and reprogram immunosuppressive myeloid cells. *Scientific Reports 2025 15:1*, 15(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-025-20749-5

Teraiya, M., Perreault, H. & Chen, V.C. (2023a). An overview of glioblastoma multiforme and temozolomide resistance: can LC-MS-based proteomics reveal the fundamental mechanism of temozolomide resistance? *Frontiers in Oncology*, 13, 1166207. https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1166207/XML

Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C., Ostrom, Q.T., Lightner, D.D., Barnholtz-Sloan, J.S. & Villano, J.L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(10), 1985–1996. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275

Torchilin, V.P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery 2014 13:11*, 13(11), 813–827. https://doi.org/10.1038/nrd4333

Tyumentseva, A., Khilazheva, E., Petrova, V. & Stolyar, S. (2024). Effects of iron oxide nanoparticles on the gene expression profiles of cerebral endotheliocytes and astrocytes. *Toxicology in Vitro*, 98, 105829. https://doi.org/10.1016/J.TIV.2024.105829

Ul Aleí U-Paz, R., Ashour, N., González-Corpas, A. & Ropero, S. (2012). DNA Methylation, Histone Modifications, and Signal Transduction Pathways: A Close Relationship in Malignant Gliomas Pathophysiology. *Journal of Signal Transduction*, 2012(1), 956958. https://doi.org/10.1155/2012/956958

Ulbrich, K., Knobloch, T. & Kreuter, J. (2011). Targeting the insulin receptor: nanoparticles for drug delivery across the blood–brain barrier (BBB). *Journal of Drug Targeting*, 19(2), 125–132. https://doi.org/10.3109/10611861003734001

Vaupel, P. and Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *The Journal of Physiology*, 599(6), 1745–1757. https://doi.org/10.1113/JP278810

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., … Hayes, D.N. (2010). An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.12.020

Vora, P., Venugopal, C., Salim, S.K., Tatari, N., Bakhshinyan, D., Singh, M., Seyfrid, M., Upreti, D., Rentas, S., Wong, N., Williams, R., Qazi, M.A., Chokshi, C., Ding, A., Subapanditha, M., Savage, N., Mahendram, S., Ford, E., Adile, A.A., … Singh, S. (2020). The Rational Development of CD133-Targeting Immunotherapies for Glioblastoma. *Cell Stem Cell*, 26(6), 832-844.e6. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2020.04.008/ATTACHMENT/FAD1DB65-B4CC-4B72-B108-D7A6598F0CC8/MMC2.PDF

Wang, B., Hu, S., Teng, Y., Chen, J., Wang, H., Xu, Y., Wang, K., Xu, J., Cheng, Y. & Gao, X. (2024). Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2024 9:1*, 9(1), 1–65. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01889-y

Wang, K., Sun, J., Zhao, H., Wang, F., Zhang, X., Zhao, X., Li, Z., Zhang, L., Ren, H. & Guo, B. (2025). Advances and Challenges in Nano-Delivery Systems for Glioblastoma Treatment: A Comprehensive Review. *International Journal of Nanomedicine*, 20, 9597–9620. https://doi.org/10.2147/IJN.S531451

Wang, L., Tang, S., Yu, Y., Lv, Y., Wang, A., Yan, X., Li, N., Sha, C., Sun, K. & Li, Y. (2021). Intranasal Delivery of Temozolomide-Conjugated Gold Nanoparticles Functionalized with Anti-EphA3 for Glioblastoma Targeting. *Molecular Pharmaceutics*, 18(3), 915–927. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.0C00911/ASSET/IMAGES/LARGE/MP0C00911_0009.JPEG

Wang, X., Zhou, W., Li, X., Ren, J., Ji, G., Du, J., Tian, W., Liu, Q. & Hao, A. (2020). Graphene oxide suppresses the growth and malignancy of glioblastoma stem cell-like spheroids via epigenetic mechanisms. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/S12967-020-02359-Z/FIGURES/7

Wang, Y., Wu, H., Guo, Y., Li, F. & Zhang, H. (2025). Carbon Dot-Based Nanoparticles: A Promising Therapeutic Approach for Glioblastoma. *International Journal of Nanomedicine*, 20, 7061. https://doi.org/10.2147/IJN.S519733

Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J.R. & Wick, W. (2013). Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? *Neuro-Oncology*, 15(1), 4–27. https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOS273

Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Brandes, A.A., Taal, W., Domont, J., Idbaih, A., Campone, M., Clement, P.M., Stupp, R., Fabbro, M., Le Rhun, E., Dubois, F., Weller, M., von Deimling, A., Golfinopoulos, V., … van den Bent, M.J. (2017). Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 377(20), 1954–1963. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1707358/SUPPL_FILE/NEJMOA1707358_DISCLOSURES.PDF

Wilhelm, S., Tavares, A.J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H.F. & Chan, W.C.W. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials 2016 1:5*, 1(5), 1–12. https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14

Woroniecka, K., Chongsathidkiet, P., Rhodin, K., Kemeny, H., Dechant, C., Harrison Farber, S., Elsamadicy, A.A., Cui, X., Koyama, S., Jackson, C., Hansen, L.J., Johanns, T.M., Sanchez-Perez, L., Chandramohan, V., Yu, Y.R.A., Bigner, D.D., Giles, A., Healy, P., Dranoff, G., … Fecci, P.E. (2018). T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(17), 4175–4186. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1846

Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z. & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2023 8:1*, 8(1), 1–27. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w

Yan, H., Miao, H., Hu, J., Pan, J., Ge, M., Yao, J., Du, Y., Li, X., Li, L., Dong, W.F. & Zhang, L. (2025). Oxidative stress induced paclitaxel-derived carbon dots inhibit glioblastoma proliferation and EMT process. *Journal of Nanobiotechnology*, 23(1), 310. https://doi.org/10.1186/S12951-025-03406-X

Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B. & Bigner, D.D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 360(8), 765–773. https://doi.org/10.1056/NEJMOA0808710

Yang, S.T., Cao, L., Luo, P.G., Lu, F., Wang, X., Wang, H., Meziani, M.J., Liu, Y., Qi, G. & Sun, Y. P. (2009). Carbon dots for optical imaging in vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 131(32), 11308–11309. https://doi.org/10.1021/JA904843X/SUPPL_FILE/JA904843X_SI_001.PDF

Yang, Z., Pan, Y., Chen, T., Li, L., Zou, W., Liu, D., Xue, D., Wang, X. & Lin, G. (2020). Cytotoxicity and Immune Dysfunction of Dendritic Cells Caused by Graphene Oxide. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 527439. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.01206/BIBTEX

Yasinjan, F., Xing, Y., Geng, H., Guo, R., Yang, L., Liu, Z. & Wang, H. (2023). Immunotherapy: a promising approach for glioma treatment. *Frontiers in Immunology*, 14, 1255611. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1255611

Yip, S., Miao, J., Cahill, D.P., Iafrate, A.J., Aldape, K., Nutt, C.L. & Louis, D.N. (2009). MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(14), 4622–4629. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3012

Zehnle, P.M.A., Wu, Y., Pommerening, H. & Erlacher, M. (2022). Stayin' alive: BCL-2 proteins in the hematopoietic system. *Experimental Hematology*, 110, 1–12. https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2022.03.006

Zhang, J., F.G. Stevens, M. & D. Bradshaw, T. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114. https://doi.org/10.2174/1874467211205010102

Zhang, Q., He, Y., Luo, N., Patel, S.J., Han, Y., Gao, R., Modak, M., Carotta, S., Haslinger, C., Kind, D., Peet, G.W., Zhong, G., Lu, S., Zhu, W., Mao, Y., Xiao, M., Bergmann, M., Hu, X., Kerkar, S.P., … Zhang, Z. (2019). Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, 179(4), 829-845.e20. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.10.003

Zhang, W., Sigdel, G., Mintz, K.J., Seven, E.S., Zhou, Y., Wang, C. & Leblanc, R.M. (2021). Carbon Dots: A Future Blood–Brain Barrier Penetrating Nanomedicine and Drug Nanocarrier. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 5003. https://doi.org/10.2147/IJN.S318732

Zhang, W., Zhang, W., Wu, H., & Han, X. (2025). Harnessing innate immunity against glioblastoma microenvironment. *Frontiers in Immunology*, *16*, 1648601. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2025.1648601/XML

Zhang, Y., Yang, H., Yu, Y. & Zhang, Y. (2022). Application of nanomaterials in proteomics-driven precision medicine. *Theranostics*, 12(6), 2674. https://doi.org/10.7150/THNO.64325

Zhao, W., Zhang, Z., Xie, M., Ding, F., Zheng, X., Sun, S. & Du, J. (2025). Exploring tumor-associated macrophages in glioblastoma: from diversity to therapy. *Npj Precision Oncology 2025 9:1*, 9(1), 1–18. https://doi.org/10.1038/s41698-025-00920-x

Zhao, Z., Nelson, A.R., Betsholtz, C. & Zlokovic, B.V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*, 163(5), 1064–1078. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.10.067

Zhu, S., Meng, Q., Wang, L., Zhang, J., Song, Y., Jin, H., Zhang, K., Sun, H., Wang, H., Yang, B., Zhu, S., Meng, Q., Zhang, J., Song, Y., Zhang, K., Yang, B., Wang, L., Wang, H., Jin, H. & Sun, H. (2013). Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(14), 3953–3957. https://doi.org/10.1002/ANIE.201300519

Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J. & Yang, B. (2015). The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano Research 2014 8:2*, 8(2), 355–381. https://doi.org/10.1007/S12274-014-0644-3

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Kararı



Bilkent Üniversitesi

BİLKENT ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 24.10.2024
TOPLANTI NO : 10
DOSYA NO : 17
KARAR NO : 2024/17

Doç.Dr. Açelya Yılmazer Aktuna'nın **30/09/2024 tarihli dilekçe** başvurusunda talep etmiş olduğu, **2023/6** karar numaralı **"Nanopartikül Temelli İlaç Taşıma Sistemlerinin Glioblastoma Anti-Kanser Etkililiğinin Omik Yöntemlerle Değerlendirilmesi"** başlıklı araştırma deney protokolünde değişiklik yapılması konusu Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak onaylanmasına katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

Michelle Adams (Başkan)

Özlen Konu Karakayalı (Üy

Bahar Değirmenci Uzu

Aytekin Akyol (Üye)

Gamze Aykut (Üye)

Necdet Karadoğan (Üy

Bilkent Üniversitesi, 06800 Bilkent, Ankara • bilkent.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Recep UYAR

1. Öğrenim Durumu:

Doktora (Ph.D.) Öğrencisi - *Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı* - Tarih: 09/02/2021 – Devam Ediyor | Yer: Ankara, Türkiye

Yüksek Lisans - *Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı* - Tarih: 14/02/2019 – 24/01/2021 | Yer: Ankara, Türkiye

Veteriner Hekimlik (DVM) - *Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi* | Ankara, Türkiye

2. Unvanları:

2018 - Veteriner Hekim

2021 - Uzman Veteriner Hekim

3. Mesleki Deneyimi:

Araştırma Görevlisi - Ankara Üniversitesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı - 03/11/2023 – Halen

Ziyaretçi Araştırmacı - Augusta University, Immunology Center of Georgia, ABD - 01/01/2025 – 02/07/2025

Ziyaretçi Araştırmacı - Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), Lyon, Fransa - 23/01/2022 – 01/05/2022

Ziyaretçi Araştırmacı - Zürih Üniversitesi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Enstitüsü, İsviçre -29/06/2017 – 30/09/2017

Ziyaretçi Araştırmacı - Kopenhag Üniversitesi, Panum Enstitüsü, Moleküler Farmakoloji Bölümü, Danimarka - 26/07/2018 – 30/09/2018

Ziyaretçi Araştırmacı - Güney Bohemya Üniversitesi, Kompleks Sistemler Enstitüsü, Çekya - 26/06/2018 – 27/07/2018

Ziyaretçi Araştırmacı - Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölümü - 31/05/2021 – 31/08/2021

Küçük Hayvan Hastanesi - Ankara Üniversitesi - Gönüllü stajyer (2013–2017)

4. Yayınlar:

Makaleler

1. Cell-Driven Encapsulation of Chlorophyllin-Based Carbon Dots within Exosomes for Enhanced Photodynamic Therapy: miRNA Profiling Reveals Mechanistic Insights Omur Besbinar, Recep Uyar, Emel Kirbas Cilingir, Ana Martín-Pardillos, Jose L Hueso, Ahmet Ceylan, Ozge Ozgenc, Okan Ekim, Mehmet Altay Unal, Fikret Ari, Roger M Leblanc, Jesus Santamaria, Acelya Yilmazer, 2025, ACS Applied Materials & Interfaces
2. In vitro reproductive toxicity of musk xylene and musk ketone in bulls – B. Otun, M. Kotula-Balak, K. Tekin, R. Uyar, C. Steletta, B. Yurdakök-Dikmen – *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2025.
3. *In vitro/in vivo* evaluation of 3D bioprinted silk fibroin hydrogels for IBD: A dual mesalazine and TNF-α siRNA approach – A. Yıldız, N. B. Mutlu-Ağardan, Ö. Ö. Çınar, A. Ceylan, R. Uyar, B. Y. Dikmen ve ark. – *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2025.
4. The effects of estrogen on cardiac progenitor cell-derived extracellular vesicles in enhancing cardiac protection through promoting tissue repair and regeneration – Z. B. Aksoy, D. Aydos, E. Koçakaya, R. Uyar, B. Turan, C. V. Bitirim – *bioRxiv*, 2025.
5. Unlocking the human blood-brain barrier (BBB) characteristics for the development of nano-delivery strategies for central nervous system therapies – C. Gökçe, B. Altun, E. Kirit, H. Yavuz, R. Uyar, D. Çelik, A. Yılmazer – *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2025.
6. Pretreatment with estrogen enhances the therapeutic efficacy of cardiac progenitor cells and improves cardiac recovery in a failing heart model – D. Aydos, N. Basak, Y. Olgar, K. Genç, R. Uyar, O. Ekim, T. Sych, Z. B. Aksoy ve ark. – *bioRxiv*, 2025.
7. Glioma mikroçevresi ve immünoterapi: Glioma tedavisinde bir devrim mi? – R. Uyar, Ö. Beşbınar, A. Yılmazer – *Türkiye Klinikleri Nöroşirürji Özel Sayısı* 14 (3): 69-75, 2024.
8. Nanoplastics: Immune impact, detection, and internalization after human blood exposure by single-cell mass cytometry – L. G. D. Fusco, A. Gazzi, L. Giro, R. B. Schefer, S. M. D'Almeida, R. Uyar ve ark. – *Advanced Materials*, 2024.
9. Transcriptomic evaluation of metals detected in placenta – O. Kuzukıran, B. Yurdakök-Dikmen, R. Uyar, Y. Turgut-Birer, H. T. Çelik, A. Filazi – *Chemosphere* 363: 142929, 2024.
10. Omic evaluation of nanomaterial-based photodynamic therapy of cancer – Ö. B. Beşbınar, R. Uyar, A. Yılmazer – *Adult Stem Cells: Methods and Protocols*, 277-288, 2024.
11. Spatial transcriptomics reveals the interplay between cancer and immune cells directed by MXene quantum dots – A. Ceylan, R. Uyar, D. Çelik, A. Rafieerad, Ö. Ö. Çınar, G. Y. Summak, C. Gürcan, A. Yılmazer – *Nano Today* 56: 102285, 2024.
12. Effects of DDT and DDE on placental cholinergic receptors – R. Uyar, Y. Turgut, H. T. Çelik, M. A. Ünal, Ö. Kuzukıran, Ö. Özyüncü, A. Ceylan, B. Yurdakök-Dikmen – *Reproductive Toxicology* 126: 108588, 2024.
13. Anti-inflammatory activities of novel chalcone derivatives – E. Yalçın, S. Sevin, R. Uyar, F. Ayaz – *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 50 (2): 432-443, 2024.
14. Biosensors for stem cell-based applications: Current trends and future prospects – T. Arif, S. Bilge, R. Uyar, G. Özçelikay-Akyıldız, G. Y. Summak, M. A. Ünal ve ark. – *Microchemical Journal* 198: 110141, 2024.
15. Electrospun hesperidin nanofibers induce a cytoprotective effect on sodium-fluoride induced oxidative stress in vitro – M. Birer, A. A. Kara, B. Yurdakök-Dikmen, R. Uyar, G. Aralan, Y. T. Birer, A. Filazi, F. Acartürk – *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 92: 105388, 2024.

16. Early cancer detection based on exosome biosensors in biological samples – R. Uyar, G. Özçelikay, S. İ. Kaya, S. B. Nergis, Ö. Beşbınar, M. A. Ünal ve ark. – *Sensors and Actuators B: Chemical* 134886, 2024.

17. Oral fast-dissolving risperidone loaded electrospun nanofiber drug delivery systems for antipsychotic therapy – F. A. Yasin Turanlı, M. Birer, Y. Turgut Birer, R. Uyar, B. Yurdakök Dikmen, F. Acartürk – *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2023.

18. Design, synthesis, and assessment of pharmacological properties of indole-based fluorinated chalcones and their benzenesulfonamide analogs – C. Yamalı, S. Sevin, M. Nenni, M. Tuğrak Sakarya, R. Uyar, A. Aygül, M. Ülger, M. E. Sarı – *Chemical Papers* 77 (12): 7903-7918, 2023.

19. Silk fibroin nanoparticles and β-tricalcium phosphate loaded tissue-engineered gelatin bone scaffolds: A nature-based, low-cost solution – A. Yıldız, M. Birer, Y. Turgut Birer, R. Uyar, B. Yurdakök-Dikmen, F. Acartürk – *Journal of Biomaterials Applications* 38 (5): 646-661, 2023.

20. Apis mellifera anatoliaca venom exerted anti-inflammatory activity on LPS-stimulated mammalian macrophages by reducing the production of inflammatory cytokines – S. Sevin, İ. Kıvrak, H. Tutun, R. Uyar, F. Ayaz – *Applied Biochemistry and Biotechnology* 195 (5): 3194-3205, 2023.

21. Effects of electrospun fiber curcumin on bisphenol A exposed Caco-2 cells – Y. Turgut, B. Yurdakök-Dikmen, R. Uyar, M. Birer, A. Filazi, F. Acartürk – *Drug and Chemical Toxicology* 45 (6): 2613-2625, 2022.

22. Live in same region, respond differently: Canine and human response to pollutants in placental accumulation – B. Yurdakök-Dikmen, Ö. Kuzukıran, R. Uyar, Ü. G. Boztepe, H. T. Çelik, A. Filazi – *Chemosphere*, 2022.

23. Diethylhexyl phthalate and bisphenol A promote vincristine and tamoxifen resistance in vitro – R. Uyar, B. Yurdakök-Dikmen, Y. Turgut, A. Filazi – *Chemical Research in Toxicology* 35 (3): 538-546, 2022.

24. Türkiye ve dünyada yasal mevzuat ve nanomateryallerin sağlık alanında kullanımının geleceği – B. Yurdakök-Dikmen, M. Birer, R. Uyar – *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri – Farmakoloji ve Toksikoloji Özel Sayısı*, 2022.

25. Nanomaterial legislation in Turkey and global and the future applications of nanomaterials in the field of health – R. Uyar, B. Yurdakök-Dikmen, M. Birer – *Farmakoloji ve Toksikolojide Nanoteknoloji*, 78-86, 2022.

26. Çevresel kirleticiler ve plasental transporterlar: PCB ile SLC ve ABCB1 örneği – B. Yurdakök-Dikmen, R. Uyar, Ö. Kuzukıran, M. A. Ünal, T. Çelik, Ü. G. Boztepe – *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 11 (Ek 1): 29-37, 2022.

27. In vitro effects of selected endocrine disruptors (DEHP, PCB118, BPA) on narrow-clawed crayfish (Astacus leptodactylus) primary cells – B. Yurdakök-Dikmen, Y. Turgut, A. Ç. Günal, R. Uyar, Ö. Kuzukıran, A. Filazi, F. Erkoç – *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 56 (9): 783-791, 2020.

28. Sub-lethal toxicities of zinc pyrithione, copper pyrithione alone and in combination to the indicator mussel species Unio crassus Philipsson, 1788 (Bivalvia, Unionidae) – N. Třešňáková, A. Ç. Günal, G. B. Kankılıç, E. Paçal, Ü. N. Tavşanoğlu, R. Uyar, F. Erkoç – *Chemistry and Ecology* 36 (4): 292-308, 2020.

29. Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Canine and Feline (6. Baskı, Türkçe) – Ek ve İlaç Formüleri Bölümü – Y. Turgut, R. Uyar, B. Yurdakök Dikmen – 2020.

30. Kafes kuşlarında endokrin sistem hastalıkları ve tedavisi – B. Yurdakök Dikmen, A. Filazi, R. Uyar – *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri – Farmakoloji ve Toksikoloji Özel Sayısı*, 2020.

Bildiriler

1. EMBL Conference: Spatial Biology – The Melting Pot, Heidelberg, Almanya. Nanotaneciklerden niş yeniden programlamasına: Mekansal transkriptomik ile tedaviye duyarlı mikroçevrelerin ortaya çıkarılması.
2. AWSOM 2025, Atlanta, ABD. CosMx mekansal transkriptomik kesitlerinin entegratif analiziyle doku mimarisi ve immün hücre tiplerinin çözümlemesi.
3. 8. Uluslararası Sağlık Bilişimi ve Biyoinformatik Sempozyumu (HIB 2025), İstanbul, Türkiye. Bölgeye özgü Bulk RNA-seq ve ortolog eşleştirmeyle mekansal benzeri tümör mikroçevresi dekonvolüsyonu.
4. IEEE 14th International Conference on Nanomaterials: Applications & Properties (NAP-2024), Riga, Letonya. MXene kuantum noktalarının tümör mikroçevresi üzerindeki etkisinin mekansal transkriptomik ile değerlendirilmesi.
5. IEEE Nanotechnology Conference, Gijon, İspanya. Spatial Transcriptomic Evaluation of the Effect of MXene Quantum Dots on Tumor Microenvironment.
6. 3rd International MXene Conference, Drexel University, ABD. Mxenelerin mezenkimal kök hücrelerin etiketlenmesi ve izlenmesinde kullanımı.
7. 24th IEEE Nanotechnology Conference, İspanya. Karbon dot yüklenmiş ekzözomlara dayalı fotodinamik terapide miRNA profilinin belirlenmesi.
8. NAP 2024 Conference, Letonya. Cu-doped karbon dotlarla maskelenmiş ekzözomların glioblastoma tedavisindeki teranostik potansiyeli.
9. Eurotox 2021, Kopenhag, Danimarka. Seçili kalıcı organik kirleticilerin insan ve köpek plasental kolinerjik sistemine etkilerinin araştırılması.
10. Eurotox 2019, Helsinki, Finlandiya. Bisfenol A ve DEHP varlığında Vincristin'e karşı MCF7 hücrelerinin yanıtı.
11. Vet PharmaTox 2019, Kayseri, Türkiye. Antibakteriyel tedavide P-glikoproteinin rolü ve biyosensör ile tespiti.
12. Vet PharmaTox 2019, Kayseri, Türkiye. Plasental taşıyıcı proteinler ve çevresel kirleticiler.
13. IVSCA 2018, Ankara, Türkiye. Sitokrom P450 (CYP1) ailesi ve östrojen-hidrokarbon hidroksilaz ilişkisi.
14. IVSCA 2018, Ankara, Türkiye. Mikroplastikler ve biyota üzerine etkileri.
15. FIGON DMD & EUFEPS Annual Meeting 2022, Leiden, Hollanda. Kolon hedefli hidrokortizon yüklü nanoliflerin in vitro ve *in vivo* değerlendirilmesi.
16. 11. Uluslararası Tıp, Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Kongresi, İzmir, Türkiye. Transgenik Salmonella immünotoksinlerinin insan meme tümörleri üzerindeki antikanser etki mekanizmasının araştırılması.
17. Effects of chrysene and benzo-a-pyrene on placental estrogen receptors – Y. Turgut, R. Uyar, B. Y. Dikmen – *Toxicology Letters* 350, S145, 2021.
18. Investigation of selected persistent organic pollutants (POP) on human and dog placental cholinergic system – R. Uyar, Y. Turgut, H. Özdağ, M. A. Ünal, H. T. Çelik, Ö. Özyüncü, Ö. Kuzukıran – *Toxicology Letters* 350, S175, 2021.
19. Effects of PCB28 and PCB153 on antimicrobial resistance in E. coli: A preliminary experiment – T. Bıçakcıoğlu, Y. Turgut, B. Yurdakök-Dikmen, R. Uyar, Ö. Kuzukıran – *Toxicology Letters* 350, S203, 2021.