



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**İNSAN PROSTAT KARSİNOMA VE OVER
ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNE KARDİYAK
FİBROBLAST HÜCRE KAYNAKLI MİTOKONDİRİ
TRANSPLANTASYONUNUN PAKLİTAKSEL
DUYARLILIĞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aybüke ÇELİK

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN PROSTAT KARSİNOMA VE OVER
ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNE KARDİYAK
FİBROBLAST HÜCRE KAYNAKLI MİTOKONDİRİ
TRANSPLANTASYONUNUN PAKLİTAKSEL
DUYARLILIĞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aybüke ÇELİK

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ**

**ANKARA
2022**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İnsan Prostat Karsinoma ve Over Adenokarsinoma Hücrelerine Kardiyak Fibroblast Hücre Kaynaklı Mitokondri Transplantasyonunun Paklitaksel Duyarlılığına Etkisinin Araştırılması” 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.

Öğrencinin Adı Soyadı: Aybüke ÇELİK

Tarih: 27/12/2022

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında
Aybüke ÇELİK tarafından hazırlanan “İnsan Prostat Karsinoma ve Over
Adenokarsinoma Hücrelerine Kardiyak Fibroblast Hücre Kaynaklı Mitokondri
Transplantasyonunun Paklitaksel Duyarlılığına Etkisinin Araştırılması” adlı tez
çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27.12.2022

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Z. Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanserdeki Mitokondriyal Dinamikler ve Sinyaller	3
1.1.1. Füzyon, Fisyon ve Mitofaji	3
1.1.2. Mitokondriyal Biyoenerjetikler	4
1.1.3. ROS ve Kalsiyum	5
1.2. Mitokondriyal DNA Hasarları	5
1.3. Mitokondri Enzimlerinde Defektler	6
1.4. HIF-1 α Değişimi	7
1.5. Kanserdeki Mitokondri Dinamiklerine Bağlı Kemorezistans	10
1.6. Mitokondri Transplantasyonunun Önemi	11
1.7. Mitokondri Transplantasyonu ve Kemorezistans	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	15
2.1. Kullanılan Cihazlar	15
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
2.3. Hücre Kültürü	16
2.4. Mitokondri İzolasyonu	16
2.5. Mitokondri Miktarının Belirlenmesi	17
2.6. İzole Edilen Mitokondrinin Elektron Mikroskop ile Görüntülenmesi	17
2.7. İzole Mitokondri Canlılığının Ölçülmesi	17
2.7.1. Floresan Mikroskopu ile Mitokondri Canlılığının Ölçülmesi	18
2.7.2. Akım Sitometrisi ve ATP Analizi ile Mitokondri Canlılığının Ölçülmesi	18
2.8. Mitokondriyal İnternalizasyonun Takibi	19
2.8.1. Floresan Mikroskop ile İncelenmesi	19
2.8.2. Mitokondrinin HücreSEL Canlılığının Ölçülmesi	20
2.9. Hücre Göçü Analizi	21
2.10. Paklitaksel İlaç Duyarlılığının Araştırılması	21
2.10.1. Hücre Canlılığının Tayini	21
2.10.2. Live\Dead Deneyi	22
2.10.3. Hücre Döngüsü Analizi	23
2.10.4. Annexin V Bağlanma Analizi	24
2.10.5. Floresan Görüntüleme	24
2.11. İstatistiksel Analiz	25
3. BULGULAR	26
3.1. İzole Edilen Mitokondrinin Canlılığının İncelenmesi	26
3.2. İzole Edilen Mitokondrinin İnternalizasyonunun İncelenmesi	30
3.3. Mitokondri Transplantasyonunun HücreSEL ATP Seviyesine Etkisi	31
3.4. Mitokondri Transplantasyonunun Migrasyona Etkisi	33
3.5. Mitokondri Transplantasyonunun Proliferasyona Etkisi	35

3.6.	Mitokondriyal Transplantasyonun Paklitakselin Duyarlılığına Etkisi	36
3.6.1.	Hücre Döngüsü Analizi Bulguları	39
3.6.2.	Annexin V-FITC/PI Bağlanma Analizi Bulguları	43
3.6.3.	Floresan Görüntüleme Analizi Bulguları	46
4.	TARTIŞMA	49
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	54
	ÖZET	56
	SUMMARY	57
	KAYNAKLAR	58



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında insan prostat karsinoma ve over adenokarsinoma hücrelerine kardiyak fibroblast hücre kaynaklı mitokondri transplantasyonunun hücre döngüsü, proliferasyonu, migrasyonu ve paklitaksel duyarlılığına etkisi araştırılmıştır.

Tez planlaması sırasında desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ' e teşekkürlerimi sunarım.

I want to thank Assoc. Prof. Dr. James D. MCCULLY who opened the doors of Harvard Medical School and Boston Children's Hospital laboratories and did not spare any effort while planning and implementing my research studies.

Her zaman, her koşulda yanımda olan, en büyük yardımcım canım aileme çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
Ca ²⁺	Kalsiyum
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DRP-1	Dinamin aracılı protein,
EGTA	Etilen glikol-bis (2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit
ETC	Elektron taşıma sistemi
FITC	Floresan izotiyosiyanat
HCF	İnsan kardiyak fibroblast
HEPES	4-(2-Hidroksietil)-1-piperazinetan sülfonik asit
HIF-1 α	Hipoksi indüklenebilir faktör-1 alfa
LD ₅₀	Lethal doz 50
Keap1	Kelch-benzeri ECH-ilşkili protein
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromit
NRF2	Nükleer faktör E2 ilişkili faktör-2
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PI	Propidyum iyodür
PS	Fosfatidilserin
ROS	Reaktif oksijen türleri
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
SIRT3	Sirtuin 3
TCA	Trikarboksilik asit
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. ATP deneyi standart eğrisi	19
Şekil 2.2. Hücresel ATP standart eğrisi	21
Şekil 3.1. Mitokondri TEM görüntüleri.	26
Şekil 3.2. Multisizer partikül analizi sonuçları.	27
Şekil 3.3. İzole edilen mitokondrinin canlılık analizine yönelik akım sitometri cihazı plot görüntüsü.	28
Şekil 3.4. İzole edilen mitokondrinin canlılığının floresan mikroskop ile görüntüsü.	29
Şekil 3.5. Mitokondri konsatrasyonlarının ATP seviyeleri.	30
Şekil 3.6. PC3 ve SKOV3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonunun internalizasyonunun incelenmesi.	31
Şekil 3.7. Hücresel ATP değişimlerinin grafiksel gösterimi.	32
Şekil 3.8. Mitokondri transplantasyonunun migrasyona etkisi.	34
Şekil 3.9. Mitokondri transplantasyonu ile değişen % relatif yara alanının grafiksel gösterimi.	35
Şekil 3.10. Mitokondri transplantasyonu ile değişen %hücre proliferasyonunun grafiksel gösterimi.	35
Şekil 3.11. Paklitakselin PC3 ve SKOV3 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.	36
Şekil 3.12. Mitokondri transplantasyonunun paklitaksel duyarlılığına etkisi.	38
Şekil 3.13. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan PC3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası hücre döngüsü analizinin akım sitometri cihazı plot görüntüleri.	41
Şekil 3.14. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan SKOV3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası hücre döngüsü analizinin akım sitometri cihazı plot görüntüleri.	42
Şekil 3.15. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan PC3 hücrelerinde paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/PI bağlanması analizi ile akım sitometri cihazı plot görüntüleri.	44

Şekil 3.16 Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan SKOV3 hücrelerinde paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/PI bağlanması analizi ile akım sitometri cihazı plot görüntüleri. 46

Şekil 3.17. PC3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonu ile paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/PI bağlanması üzerine etkisinin mikroskop görüntüleri. 47

Şekil 3.18. SKOV3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonu ile paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/ PI bağlanması üzerine etkisinin mikroskop görüntüleri. 48



ÇİZELGELER

Çizelge 3.1 Hücresel ATP miktarları.	32
Çizelge 3.2. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan PC3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası hücre döngüsü analiz sonuçları.	39
Çizelge 3.3. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan SKOV3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası hücre döngüsü analiz sonuçları.	41
Çizelge 3.4. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan PC3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası değişen apoptotik popülasyon analizi sonuçları.	43
Çizelge 3.5. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan SKOV3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası değişen apoptotik popülasyon analizi sonuçları.	45

1. GİRİŞ

Prostat ve over kanserleri dünyada en sık teşhis edilen kanserlerden olup erkek ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindendir. Gelişmekte olan ülkelerde her iki kanserin de insidansı giderek artmakta olduğundan morbidite ve mortaliteyi engellemek için erken teşhis ve erken tedavi önem kazanmaktadır (PDQ Adult Treatment Editorial Board 2002; Siegel ve ark., 2020; Sung ve ark., 2021; Wang ve ark., 2022).

Prostat kanserinin progresyonunun androjene bağlı olduğu bilindiğinden, androjen ablasyonu klinikte genel olarak kullanılan yaklaşımlardan biridir. Prostat kanseri için kullanılan tedaviler, anti-androjenler ikincil hormon tedavisi, kemoterapi, radyasyon tedavisi ve cerrahi tedaviyi içermektedir. Prostat kanseri tedavisine benzer şekilde, over kanseri için de birincil tedavi cerrahidir ve kemoterapidir. Kombine tedavi yaklaşımları ile over kanserinin ilerlemesine bağlı olarak sitoredüktif cerrahi ve radyasyon tedavisi de kullanılmaktadır (Arora ve ark., 2022; Trewartha ve Carter., 2013).

Her iki kanserde de genellikle kemoterapötik tedavi için ilaç kombinasyonları kullanılmakta olup, prostat ve over kanserinin tedavisinde en çok kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri paklitakseldir (Kampan ve ark., 2015; Tritschler ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2020). Ancak, prostat kanseri ve over kanseri kemoterapötik tedaviye karşı direnç geliştirebildiğinden, özellikle daha sonraki metastatik evrelerde bu tip kanserleri tedavi etmek çok daha zor olmaktadır (Lengyel 2010; Patrikidou ve ark., 2014). Bu nedenle yukarıda bahsedilen her iki kanser türünde de kullanılan birinci basamak ilaçlara karşı gelişebilecek olası direnç için, tedavide yeni yaklaşımlar araştırılmaktadır. Kanser metabolizmasındaki değişikliklerin yakından incelenmesi, kanser tedavisine yeni çözümler sunmak için önem kazanmıştır.

Mitokondri, enerji üretimindeki rolünün yanı sıra, aynı zamanda enerji metabolizması, kalsiyum homeostazı, redoks ve apoptoz regülasyonuna dayalı olarak

kansere açılan yolu da kontrol eden dinamik bir organeldir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, genel olarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artması, adenosin trifosfat (ATP) üretiminin ve mitokondri membran potansiyelinin azalması, son olarak değişmiş mitokondri morfolojisi ile karakterizedir. Bahsedilen değişiklikler birden fazla hücresel sinyal yolağının kontrolü altındadır (Berridge ve Neuzil 2017).

Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak düşük pH ve oksijen şartlarında hızlı büyüyecek şekilde uyum sağlamışlardır. Kanserli hücrelerde, mitokondrinin yapısında, mitokondriyal DNA (mtDNA) sayısında, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) kompleksinde ve dolayısıyla solunum zinciri aktivitesinde değişikliklerin olduğu gösterilmiştir (Rossignol ve ark., 2004). Mitokondri aynı zamanda, biyosentetik ve biyoenerjetik metabolizmasında ve apoptoz ile ilişkili birçok sinyal mekanizmasında rol oynayarak hücrenin stres durumunda çevreye adaptasyonunda ve hücre ölümünde önemli görevler üstlenmektedir (McCully ve ark., 2016; Vyas ve ark., 2016). Normal hücrelerde glukoz, hücrenin enerji gereksinimi için elektron taşıma zinciri (ETC) ve oksijen gerektiren bir süreç olan OXPHOS yolu ile adenosin trifosfata (ATP) dönüştürülür. Mitokondrinin kanserdeki işlevi ve mitokondrinin kanser hücrelerindeki metabolik değişimi “Warburg etkisi” ile tanımlanmıştır. Otto Warburg'un yaptığı çalışmalarda, kanser hücrelerine çevresindeki sağlıklı hücrelerden çok daha yüksek miktarda glukoz alındığı ve hücre içine alınan glukozun oksijenli bir ortamda dahi oksidatif solunum kullanılmadan laktata fermente edildiği gösterilmiştir. Bu fenomen kanser hücrelerine özgüdür ve “aerobik glikoliz” veya “Warburg etkisi” olarak adlandırılmıştır (Warburg 1925; Warburg 1956). Warburg'un teorisine göre, kanserde hücresel solunumda meydana gelen bozukluklar hücre metabolizmasında değişikliklere yol açarak tümörögenezi başlatmaktadır (Warburg ve ark., 1926). Sonrasında yapılan araştırmalar da bu görüşü destekler niteliktedir (Chiu ve ark., 2020; Luo ve ark., 2020; Whitehall ve Greaves 2020; Zeng ve ark., 2020). Dolayısıyla mitokondride meydana gelebilecek herhangi bir fonksiyon bozukluğu kanser başlangıcına ya da progresyonuna işaret edebilmektedir. Bu sebepten ötürü mitokondri metabolizması ve mitokondriyal dinamiklerin incelenmesi, yeni kanser terapilerinin araştırılması için önem kazanmaktadır.

Mitokondriyal dinamikler, farklı hücre tiplerinde çeşitlilik göstermekle beraber işlevleri, fizyolojik strese uyum sağlamak için değişmektedir (Chang ve ark., 2019). Normal hücrelerde hücrel homeostazı sağlayan mitokondriyal dinamiklerde meydana gelen fonksiyon bozuklukları, çeşitli hastalıkların gelişmesine sebep olabilmektedir. Kanserde ise, araştırmalar kanser hücrelerinin mitokondriyal içerik, aktivite, yapı ve fonksiyon olarak değişiklikler gösterdiğini kanıtlamıştır. Ayrıca mitokondriyal dinamiklerin, tümör hücrelerinin tümör mikro-çevresi aracılığı ile immün aracılı hücrel yıkım mekanizmasından kaçışının azaltılmasında rol oynadığı da belirtilmiştir (Carew ve Huang 2002; Cuezva ve ark., 2002; Rossignol ve ark., 2004; Simula ve ark., 2017). Mitokondri çeşitli stres faktörleri altında kanser hücrelerinin metabolizmasını modüle ederek metabolik anlamda esnekliği sağlamakta ve mitokondriyal dinamikler tümör oluşumu, gelişimi ve metastazı için gerekli birçok süreçte önemli rol oynamaktadır (Cluntun ve ark., 2017; Gentric ve ark., 2017; Lukey ve ark., 2017).

1.1. Kanserdeki Mitokondriyal Dinamikler ve Sinyaller

1.1.1. Füzyon, Fisyon ve Mitofaji

Mitokondriyal füzyon iki farklı mitokondrinin birleşerek bir mitokondri oluşturmaları ve böylece hücrel stresin azaltılması için gerekli iken (Quintana-Cabrera ve ark., 2018), mitokondri fisyonu bir mitokondrinin ikiye bölünmesi ile mitofaji için hasarlı mitokondrinin ayrılması, mtDNA replikasyonu ve hücre bölünmesinde mitokondrinin yeniden dağılımı için gerekmektedir (van der Bliek ve ark., 2013). Mitokondriyal fisyon, proliferasyon ve apoptozda önemli rol oynamakta ve bu yollardaki mutasyon veya inaktivasyon mitokondriyal dinamikleri etkileyerek fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (Horbay ve Bilyy 2016). Fizyolojik koşullar altında mitokondrinin dinamik morfolojisini koruyan ve sürekli devam eden füzyon ve fisyon döngüleri, kanserde fisyonla doğru kayarak tümör oluşumuna ve metastaza neden olabilmektedir (Maycotte ve ark., 2017; Srinivasan ve ark., 2017).

Mitokondriyal füzyon ve fisyon mitokondrinin dış ve iç membranında bulunan guanozin trifosfat tarafından devam ettirilirken, hücre bölünürken veya oksidatif, hipoksik stres gibi çeşitli stres koşulları altında mitokondriyal fisyon, dinamin aracılı protein 1 (DRP-1) tarafından indüklenmektedir. Yapılan çalışmalarda prostat ve over kanseri hücrelerinde DRP-1 ekspresyonunun, dolayısıyla fisyonun arttığı gösterilmiştir (Chen ve Chan 2017; Civenni ve ark., 2019; Tsuyoshi ve ark., 2020). Bununla birlikte DRP-1'in inhibisyonu, tümör oluşumunu ve tümör proliferasyonunu azaltırken, aynı zamanda metastazı da azaltmaktadır (Zhao ve ark., 2013; Xu ve ark., 2017). Sonuç olarak kanser hücrelerinde değişen fisyon ve füzyon dengesi parçalanmış mitokondriyal ağa neden olmakla beraber, birçok çalışmada mitokondriyal dinamiklerdeki dengesizliğin çeşitli kanser türlerinde etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (Rehman ve ark., 2012; Zhao ve ark., 2013; Wieder ve ark., 2015; Anderson ve ark., 2018; Porporato ve ark., 2018).

Artan fisyon, depolarize ve hiperpolarize mitokondri oluşturarak, mitokondri degradasyonunun spesifik olarak hedeflendiği mitofajiye destekler. Mitofaji, kanser türüne ve evresine bağlı olarak kanserin prognozu sırasında hücreleri apoptozdan koruyarak tümör hücrelerinin stres altında hayatta kalmasını desteklemek için up regüle edilirken, diğer taraftan, azalmış mitofaji hasarlı mitokondrinin birikimine, artmış ROS indüklü mtDNA mutasyonlarına neden olarak malign dönüşümü desteklemektedir (Drake ve ark., 2017; Maes ve ark., 2013).

1.1.2. Mitokondriyal Biyoenerjetikler

Mitokondrinin kanserli hücrelerdeki etkisi araştırılırken ilk olarak, OXPHOS'un kanser hücrelerinde hasarlı olduğu düşünülmüş iken (Warburg ve ark., 1926) daha sonra yapılan çalışmalar ile OXPHOS sisteminin kanserde çoğunlukla hasarsız olduğu, tümörlerin farklı mikro çevresel koşullar altında programlı olarak OXPHOS ve glikoliz arasında geçiş yaptığı ortaya çıkarılmıştır (Kroemer ve Pouyssegur 2008; Herst ve Berridge 2017). Spesifik olarak, OXPHOS ve glikoliz arasındaki bu geçiş kanser hücrelerine, besin yoksunluğu altında seçici avantaj ve bağımsızlık

sağlamaktadır. Bunun yanı sıra bazı kanser hücreleri, proliferasyonu ve metastazı yönlendirmek ve daha fazla ATP üretebilmek için OXPHOS'u tercih etmektedir (Ashton ve ark., 2018). Yapılan araştırmalar OXPHOS'un kemoterapi sonrasında up regüle olduğunu ve artmış hücre içi ATP seviyelerinin prostat ve over kanserlerinde kemorezistans ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir (Chen ve ark., 2021; Wu ve ark., 2022). Böylece up regüle OXPHOS'un, çoklu ilaç taşıyıcıları yolu ile ilaçların uzaklaştırılması için yeterli ATP üreterek, kemorezistansı destekleyebileceği ve OXPHOS'un inhibisyonunun kanser tedavisinde önemli olabileceği düşünülmüştür (Zhou ve ark., 2012).

1.1.3. ROS ve Kalsiyum

Hücrel ROS oksidatif metabolizmanın genel bir ürünü olmakla birlikte ROS'un yaklaşık %80'i mitokondriden kaynaklıdır. OXPHOS'un yanı sıra mitokondriyal kalsiyum (Ca^{2+}) trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün yakıtı olduğundan ve α -ketoglutarat dehidrogenaz ve gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz gibi enzimleri aktive ettiğinden ROS oluşumunda doğrudan ya da dolaylı olarak etkilidir (Feno ve ark., 2019). Mitokondriyal ROS ve Ca^{2+} arasındaki ilişki kanserde belirgin olmakla birlikte genel olarak kanser hücreleri, yüksek mitokondriyal ROS seviyeleri sergilemekte ve ROS seviyeleri değişen regülasyona bağlı olarak hem pro- hem de anti-tümör etkilere sahip olabilmektedir. Özellikle artan Ca^{2+} ve ROS miktarının, prostat ve over kanserinin prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ding ve ark., 2021; Khandrika ve ark., 2009).

1.2. Mitokondriyal DNA Hasarları

mtDNA'nın transisyon ve transversiyon mutasyonları kanser gelişiminde önemli rol oynamakla birlikte mutasyonların çoğu genellikle önemli mtDNA kodlu genlerde bulunmakta olup bazen de nükleer gen ekspresyonunu etkilemektedir (Jandova ve ark., 2012). Patojenik nokta mutasyonları, delesyonlar ve kopya sayısındaki değişiklikler

dahil olmak üzere mtDNA’da meydana gelen herhangi bir değişimin, çeşitli tümör tiplerinde gelişmiş bir fenotipte kanser ilerlemesini indüklediği gösterilmiştir. Örneğin, prostat ve over kanserlerindeki mtDNA mutasyonları, kanserin daha agresif bir fenotipe ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Philley ve ark., 2016; Shukla ve Singh 2021).

1.3. Mitokondri Enzimlerinde Defektler

Somatik mtDNA değişikliklerine ek olarak, kanser hücrelerindeki TCA döngüsü ve hücresel enerjideki düzensizlik, mitokondriyal enzimlerdeki kusurlardan kaynaklanabilir. Bu enzimlere örnek olarak süksinat dehidrogenaz, fumarat hidrataz, izositrat dehidrogenaz, mitokondriyal deasetilaz Sirtuin 3 (SIRT3) verilebilir. Mitokondriyal enzim kompleksi olan ve TCA’da görev alan süksinat dehidrogenazı kodlayan genlerdeki mutasyon veya değişiklik, süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesi ve ekspresyonunun azalmasına sebep olurken bu değişiklikler gastrointestinal, kolorektal, gastrik, meme, over, prostat ve renal kanserlerde görölmüş olup süksinat dehidrogenaz alt birim genleri tümör supresör genler olarak kabul edilmiştir (Anja ve ark., 2018; Doyle ve ark., 2012; Kim ve ark., 2013; Pantaleo ve ark., 2014; Xia ve ark., 2021; Williamson ve ark., 2015). Bunun yanı sıra renal kanser hastalarında, yine TCA’da görev alan fumarat hidratazın da aktivitesinin azalması veya mutasyonu sonucu, fumarat birikimi, düşük solunum hızı ve glukoz artışına bağlı olarak artmış laktat üretimi görölmüştür (Castro-Vega ve ark., 2014; Yang ve ark., 2010). Biriken fumarat aynı zamanda Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1’deki (Keap1) sistin rezidülerine bağlanarak Keap1 aracılı nükleer faktör E2 ilişkili faktör-2 (NRF2)’nin degradasyonunu azaltarak, aktivasyonunu arttırır. Artan NRF2, tümör oluşumuna neden olabilmektedir (Adam ve ark., 2011). Ayrıca Tyrakis ve ark. (2017) biriken fumaratın, bir anti-metastatik mikroRNA ailesi olan MIR200’ün epigenetik baskılanmasına ve epitel mezenkimal geçişi desteklenmesine neden olarak metastaza yol açtığını göstermişlerdir. Ayrıca prostat, kolon, osteosarkom gibi kanserlerde TCA da görev alan mutant izositrat dehidrogenaz izozimleri görölmüştür (Kang ve ark., 2009; Liu ve ark., 2013; Sjoblom ve ark., 2006; Sonogo ve Baldassarre 2020).

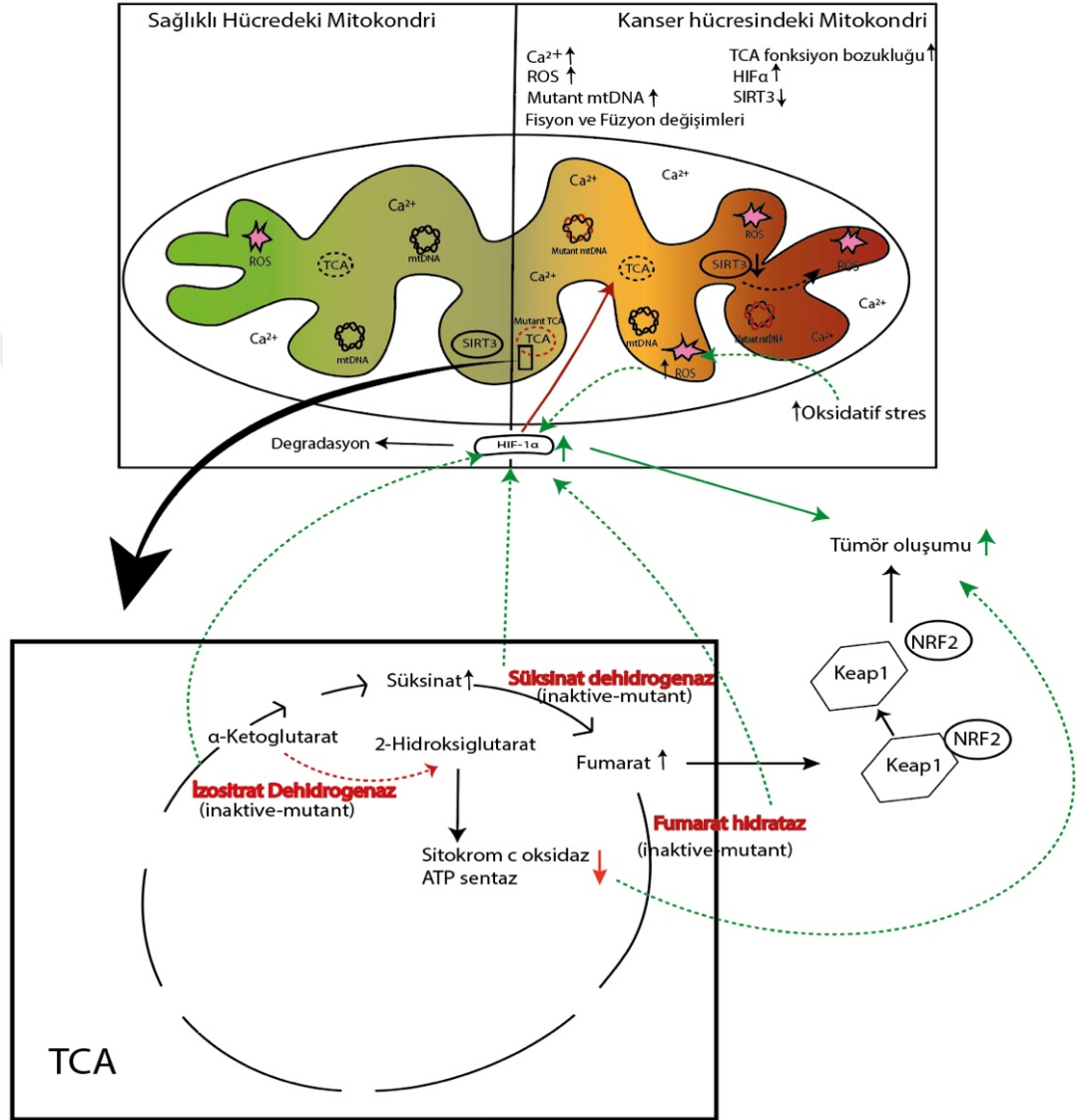
Kanserdeki mutant izositrat dehidrogenaz, α -ketoglutaratı 2-hidroksiglutaratın R enansiyomerine çevirmekte olup, oluşan R-2-hidroksiglutarat, ETC'deki sitokrom c oksidaz ve ATP sentazın enzimatik aktivitesini inhibe ederek kanser hücrelerindeki enerji metabolizmasını değiştirmektedir (Hsu ve ark., 2016). Böylece 2-hidroksiglutarat, izositrat dehidrogenaz mutasyonlarının onkojenik aktivitesine katkıda bulunarak tümör oluşumunu destekleyen bir "onko-metabolit" olarak tanımlanabilir.

Son olarak, yukarıda bahsedilen enzimlerden biri olan SIRT3, yağ asidi oksidasyonu, üre döngüsü, antioksidan cevap sistemi ve OXPHOS, gibi mitokondriyal yollarda görev almakta olup, SIRT3'ün aktivitesinin azalması ROS seviyelerini arttırarak tümörögenizde etkili olmaktadır. Bu enzimin hepatoselüler, gastrik ve akciğer kanseri gibi birçok kanserde de tümör süpresör rol oynayabileceği düşünülmüştür (Finley ve ark., 2011; Hallows ve ark., 2011; Yu ve ark., 2012; Zhang ve Zhou 2012; Xiao ve ark., 2013; Huang ve ark., 2014).

1.4. HIF-1 α Değişimi

Apoptoz, mitokondriyal solunum ve hücre metabolizmasında önemli rol oynayan ve hipoksik koşullarda hücre sel cevabı regüle eden transkripsiyon faktörü hipoksi indüklenebilir faktör-1 alfa (HIF-1 α), normoksik koşullarda tümör baskılayıcı protein aracılığı ile degrade olur (Vaupel ve Mayer 2007; Yeung ve ark., 2008). Tümör hücrelerinde degradasyonu bozulan HIF-1 α 'nın artışı ağız, akciğer, beyin, deri, göğüs, kolon, karaciğer, lösemi, mesane, mide, pankreas, prostat, rahim ve over kanseri dahil birçok tümör tipinde malignite ile ilişkili olmakla beraber proliferasyon, anjiyogenez, invazyon ve metaztazda vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi pro-anjiyogenik faktörlerle etkileşerek önemli rol oynamaktadır (Huang ve ark., 2018; Mucaj ve ark., 2012; Qin ve ark., 2017; Semenza 2010). Aynı zamanda yukarıda bahsedilen süksinat dehidrogenaz, fumarat hidrataz, izositrat dehidrogenaz gibi enzimlerin fonksiyon bozuklukları da normoksik koşullarda HIF-1 α ekspresyonunun aktivasyonuna sebep olmaktadır. Tümör hücrelerinde HIF-1 α aktivasyonu glikolize, oksidatif

fosforilasyona ve TCA'daki enzimlere etki ederek enerji metabolizmasında değişimlere sebep olur. Bahsedilen sebeplerden ötürü HIF-1 α 'in tümörögenizde ve hücrel metabolizmada önemli rol oynadığı düşünölmektedir (Yeung ve ark., 2008; Semenza 2012) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Mitokondriyal disfonksiyonun kanserdeki hücrel etkileri.

Şekil 1.1'de sağlıklı ve kanser hücrelerinde meydana gelen mitokondriyal değişiklikler belirtilmiştir. Kanser hücreleri ile sağlıklı hücrelerdeki mitokondriler kıyaslandığında, kanserli hücrelerin mitokondrisinde Ca^{2+} , ROS ve mutant mtDNA miktarı daha fazla olmakla birlikte artmış fisyon ve azalmış füzyon görölmektedir. Hücrel metabolizma için önemli olan SIRT3 enziminin aktivitesinin azalması ROS

seviyelerini arttırarak tümörögenезде etkili olmaktadır. Kanseri hücrelerinde görülen TCA mutasyonlarına daha yakından bakılacak olursa izositrat dehidrogenazdaki inaktivasyon veya mutasyon α -ketoglutaratı, 2-hidroksiglutaratın R enansiyomerine çevirir. Oluşan 2-R-hidroksiglutarat, ETC'deki sitokrom c oksidaz ve ATP sentazın enzimatik aktivitesini inhibe etmekte olup kanser hücrelerindeki enerji metabolizmasını değiştirerek tümör oluşumunu desteklemektedir. Fumarat hidratazın inaktivasyonu veya mutasyonu sonucu biriken fumarat, Keap1 aracılı NRF2 degradasyonunu durdurarak NRF2'nin artmasına ve tümör oluşumuna neden olabilmektedir. Aynı zamanda süksinat dehidrogenaz, fumarat hidrataz ve izositrat dehidrogenazdaki defektler ve bu defekler sonucu artan süksinat ve fumarat normoksik koşullarda HIF-1 α 'nın aktivasyonuna neden olarak tümör oluşumuna neden olmaktadır. Bunun yanı sıra oksidatif stres sonucu artan ROS da HIF-1 α stabilizasyonunu arttırır. Normal koşullarda HIF-1 α tümör baskılayıcı protein aracılığı ile degradasyona uğrarken, kanserli hücrelerde degradasyonu bozulan HIF-1 α tümör oluşumuna katkıda bulunur ve aynı zamanda TCA'daki enzimlere etki ederek enerji metabolizmasında değişimlere sebep olur.

Sonuç olarak tümör mikroçevresinde sitokinler, metabolitler ve oksijen mevcudiyeti birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Mitokondrinin yapısal ve fonksiyonel değişimi kanser hücrelerinde oldukça yaygın olmakla birlikte bu durum spesifik kemoterapötik yaklaşımların belirlenmesinde kullanılabilir. (Elliott ve Barnett 2011) Kişiselleştirilmiş tıp kapsamında, kanser tedavisindeki belirli farmakolojik terapiler mitokondriyal dinamiklerin regülasyonunda rol oynamakta olup, bu terapilerin mitokondri üzerindeki etkisi incelenebilmektedir. Çeşitli kanserlerde ve hatta aynı kanserin farklı aşamalarında, özellikle apoptozu indükleyen ilaçlara verilen yanıtlar mitokondriyal ağın farklı bileşeninden köken alabilmektedir. Simula ve ark. (2017)'na göre mitokondriyal dinamikleri etkileyen tek bir terapi tüm kanserlerin tedavisinde başarılı olmamaktadır. Bu sebeple en iyi tedavi stratejisini tanımlayabilmek için farklı kanserli hastalarda spesifik mitokondriyal değişikliklerin belirlenmesi önemlidir (Simula ve ark., 2017). Bu çalışmalar ışığında, kanserdeki mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun tümör metabolizması ile ilişkili olabileceği,

ve bu nedenden ötürü tedavi rejiminde mitokondriyal hedeflemenin kullanılabileceğı düşünölmektedir.

1.5. Kanserdeki Mitokondri Dinamiklerine Bağı Kemorezistans

Kanser hücreleri hızlı proliferasyon ve hücre ölüme direnç ile karakterizedir (Hanahan ve Weinberg 2011). Sağlıklı hücrelerde olduğı gibi kanser hücrelerinde de mitokondriyal dinamiklerin birçok hücresel cevapta önemli rolü bulunmaktadır. Özellikle mitokondriyal fisyonun hücresel strese karşı hücre koruyucu etkisi olduğı düşünölmüştür. Çeşitli araştırmalar kanser hücrelerinde mitokondriyal fisyonun artışının, anti-kanser ajanlara karşı duyarlılığı arttırdığını göstermiştir (Suen ve ark., 2008; Anvekar ve ark., 2012; Fan ve ark., 2015). Aynı zamanda fisyon proteini olan DRP-1'in inhibisyonunun ya da ekspresyonunun baskılanmasının, meme kanseri hücrelerinin sisplatine karşı duyarlılığını azalttığı belirtilmiştir (Han ve ark., 2015). Sonuç olarak, tümör mikroçevresinde bulunan hipoksi, ROS ve inflamatuvar sinyallerin mitokondriyal dinamikleri modüle ettiğı, hücresel heterojenite ve kemorezistans ile ilişkili olduğı gösterilmiştir. Bu nedenle kanser hücrelerinde mitokondriyal dinamiklerin incelenmesi ve hedeflenmesi kemorezistans konusunda büyük önem arz etmektedir.

Tümör hücreleri, malignant değışime yol açan bir dizi ayırıcı özelliğın çok aşamalı edinimi ile karakterizedir (Ott ve ark., 2015). Bunların arasında en çok belirtilen özellikler hücre ölüme karşı direnç, bunun sonucunda kontrolsüz hücre proliferasyonu, artan invazivlik, metastaz, kontrol edilemeyen hücre metabolizması, ROS üretimi, mitofaji aracılığı ile mitokondri kalite kontrolü ve doku vaskülarizasyonudur. Tüm bu süreçlerde ve fizyolojik şartlarda, mitokondriyal dinamiklerin önemli işlevi bulunmaktadır. Kanser prognozunda mitokondriyal dinamiklerin rolü, kanser hücrelerinin maruz kaldığı hipoksi, oksidatif stres, besin yetersizliğı, inflamasyon gibi mikroçevresel apoptotik uyarılara bağı olarak hala karmaşıklığını sürdürmektedir (Han ve ark., 2018). Bununla birlikte, mitokondriyal dinamikler dış uyarılara ve kanserdeki hücresel streslere yanıt olarak düzenlenir. Bu

nedenle mitokondriyal dinamikleri hedeflemek potansiyel anti-kanser stratejileri arasındadır (Pasquier ve ark., 2013). Mitokondriyal dinamiklerin incelenmesi ve sağlıklı hücrelerle kanser hücrelerinin mitokondriyal anlamda fonksiyon ve dinamiklerinin karşılaştırılması için, kanser hücrelerini çevreleyen ortam ile hücre etkileşimini taklit etmek amacı ile mitokondri transferi yapılması önemli bir tedavi yaklaşımı olabilir.

1.6. Mitokondri Transplantasyonunun Önemi

Geçmiş yıllarda yapılan birçok çalışmada mitokondrinin anneden miras alınmasının yanı sıra hücreler arasında transfer edilebildiği ve transfer edilen mitokondrinin ve mtDNA'nın alıcı hücrede, biyoenerjetik profili değiştirerek mitokondriyal fonksiyonlarda değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (Ali Pour ve ark., 2020; Cselenyak ve ark., 2010; Chang ve ark., 2013; Dong ve ark., 2017; Islam ve ark., 2012; Kitani ve ark., 2014; Masuzawa ve ark., 2013; Pacak ve ark., 2015; Spees ve ark., 2006).

Mitokondri transplantasyonu, kanser dahil olmak üzere mitokondriyal değişikliğin ya da bozukluğun gözlemlendiği birçok patolojik durumda terapötik olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda araştırmacılar birçok patolojik koşulda sağlıklı hücre kaynaklı kaynaklı mitokondri transplantasyonu yaparak doku veya hücre anlamda olumlu terapötik etki sağlamışlardır (McCully ve ark., 2009; Shin ve ark., 2017; Han ve ark., 2020; Hsu ve ark., 2020; Jiang ve ark., 2020; Tseng ve ark., 2020).

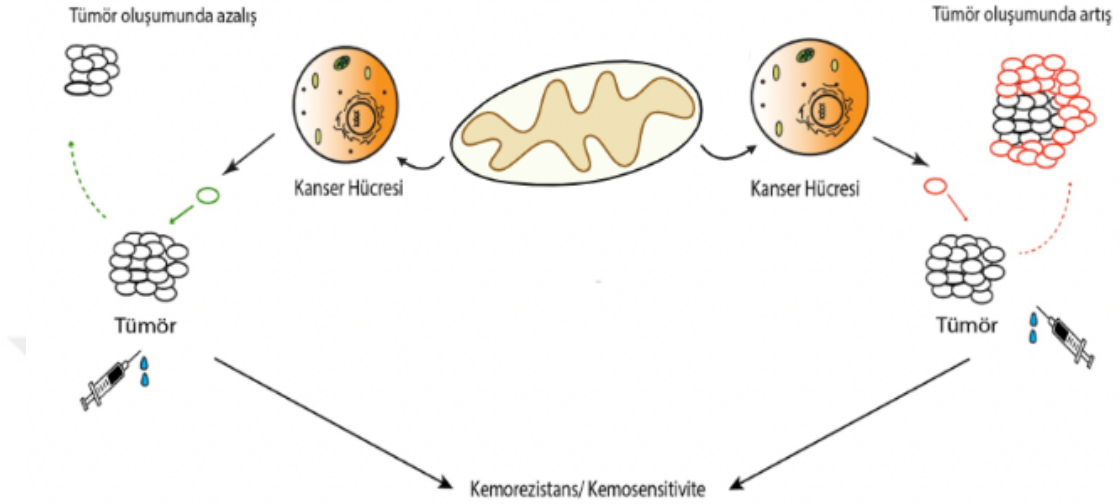
Dolayısıyla sağlıklı hücreler mitokondri ya da mtDNA'larını yaşlanmış veya hasar görmüş mitokondriye sahip hücrelere aktarabilmekte ve alıcı hücrenin biyolojik uygunluğunu geri yükleyebilmektedir (Mohammadalipour A ve PL 2020). Bu bağlamda, kardiyak fibroblastlar, mitokondriyal yükün transferi yolu ile yaşlanan ya da fonksiyon bozukluğu olan hücreler üzerinde güçlü rejeneratif etkiler uygulayabilir.

1.7. Mitokondri Transplantasyonu ve Kemorezistans

Kanser hücrelerinin tedavide genel olarak kullanılan kemoterapötiklere karşı zamanla direnç kazanabildiği prostat, over, meme, pankreas ve kolorektal kanseri gibi birçok kanser türünde gösterilmiştir (Chen ve Wang 2019; Dey ve ark., 2019; Ercan ve ark., 2017; Li ve ark., 2018; Paldino ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2015). Bunun yanı sıra çoğu kemoterapötik bileşiğin mitokondriyi hedeflediği ya da mitokondriyal yolaklar aracılığı ile etkisini gösterdiği de bilinmektedir. Fakat, aynı tümör dokusundaki hücreler mitokondriyal işlevsellik ya da metabolizma yönünden farklılıklar gösterdiğinden; tümörün mikroçevresine ve hücrelerin direnç kapasitesine adaptasyonunda değişiklikler de meydana gelebilir (Garcia-Heredia ve Carnero 2020). Aynı zamanda mtDNA anormalliklerinden kaynaklanan mitokondriyal disfonksiyon, hücre metabolizma, stres yanıtları, tümör progresyonu, yaşam süresi ve kemoresistivite de dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde yer alan genlerin ekspresyonunu düzenleyen mitokondri retrograd sinyal yollarını etkileyebilmektedir (Erol 2005). Yapılan çalışmalar mtDNA eksikliği/yetersizliği ve mitokondriyal disfonksiyonun, farklı kanser hücre hatlarında anti-kanser ilaçlara karşı kemoresistansı arttırdığını göstermiştir (Lee ve ark., 2008; Mizutani ve ark., 2009; Ma ve ark., 2015).

Çalışmalar ile elde edilen kanıtlar mitokondri ya da mitokondri komponentlerinin transferinin alıcı hücrede var olan mitokondriyal hasarı onardığını göstermiştir. Elliott ve ark. (2012), sağlıklı mitokondrinin kanser hücrelerine transplantasyonunun mitokondriyal fonksiyonu onararak, kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe etmesini ve ilaç sensitivitesini arttırmasını hedefleyerek, meme epitel hücrelerinden elde edilen mitokondrinin, meme kanseri hücrelerine transplantasyonu sonucu meme kanseri hücrelerinde proliferasyonun azaldığı ve kemoterapiye karşı hassasiyetin arttığını göstermişlerdir. Chang ve ark. (2019), homeoplazmik 143B osteosarkoma hibrit hücre hattından MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine mitokondri transferinin anti-tümör aktivite göstererek kemoresistansı azalttığını bildirmişlerdir. Wang ve ark. (2018), ise mitokondri transferinin alıcı

hücrede bozulan biyoenerjetik metabolizmasını ve solunum sistemini düzelttiğini ancak uygulanan kemoterapiye direnç oluşturduğunu göstermiştir.



Şekil 1.2. Mitokondri transplantasyonunun kanser tedavisi üzerindeki olası etkileri.

Şekil 1.2’de mitokondrilerin kanser hücrelerine transplantasyonu sonrası meydana gelebilecek iki olasılık gösterilmiştir. Bu olasılıklara göre, mitokondri transplantasyonu kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu azaltarak hücre apoptozunu artırabilirken, aynı mitokondri transplantasyonu hücrelerde proliferasyonu artırarak tümör oluşumunda artışa neden olabilir. Her iki durumda da anti-kanser ajan uygulanması sonrası kemorezistans ya da kemosensitivite gelişebilme ihtimali bulunmaktadır.

Sonuç olarak, kanserde mitokondriyal düzensizliğin mevcut olduğu, mitokondriyal oksidatif stresin aktif olarak tümör progresyonunu desteklediğini ve kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini arttırdığı, aynı zamanda kemoterapiye duyarlılığı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Guaragnella ve ark., 2014; Chang ve ark., 2019; Chiu ve ark., 2020). Bahsedilen veriler, mitokondriyi hedeflemenin, anti-kanser tedavinin geliştirilmesi için umut verici bir strateji sağlayabileceğini ve mitokondriyal fonksiyonun optimal seviyelere geri getirilmesinin, agresif tümörlerin tedavisi için anti-kanser ajanlara olan duyarlılığı artırabileceğini göstermektedir.

Bu doktora tezi kapsamında insan kardiyak fibroblast (HCF) hücrelerinden PC3 insan prostat karsinoma ve SKOV3 insan over adenokarsinoma hücrelerine mitokondri transplantasyonu yapılması, mitokondri transplantasyonu ile hücrelerin invazyon üzerinde etkisi ve paklitaksel ajanına karşı olan duyarlılıklarındaki değişimin incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan paklitakselin seçilen prostat ve over kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkinliğinin olası değişiminin araştırılması da amaçlanmıştır. Böylece kanser hücrelerine sağlıklı mitokondri transplantasyonu ile mitokondrinin ilaç duyarlılığına olan etkisinin anlaşılması, bunun yanı sıra mitokondrinin invazyon üzerindeki rolünün aydınlatılması düşünülmektedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

Laminar Flow Kabini (AirClean), Su banyosu (Thermo Scientific), Santrifüj cihazı (Sigma), Vortex cihazı (Thermo Scientific), Otomatik pipet (Eppendorf), Elektronik terazi (Fisherbrand), Mikroplak okuyucu spektrofotometre Synergy H4 plate reader (BioTek Instruments), Multisizer 4e Coulter Partikül Sayacı (Beckman Coulter) +4 buzdolabı (Esko) -80 dondurucu (Thermo Scientific), Floresan mikroskobu (Keyence), Işık mikroskobu (Leica), Transmisyon elektron mikroskobu (JEOL)

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Paklitaksel (Sigma), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma), Süktroz (Sigma), 4-(2-Hidroksietil)-1-piperazinetan sülfonik asit (HEPES) (Sigma), Etilen glikol-bis(2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit (EGTA) (Sigma), Tripsin/EDTA (Gibco), Subtilisin (Sigma), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) (Sigma), MitoTracker red CMXRos (Thermo Scientific), MitoTracker green FM (Thermo Scientific), Hoest 33342 (Thermo Scientific), LIVE/DEAD® Canlılık/Sitotoksosite kiti (Thermo Scientific), Fosfat tampon solüsyonu (PBS) (Thermo Scientific), Bikinkoninik asit protein kiti (Thermo Scientific-Pierce), ATPlite luminesan ATP deteksiyon deney sistemi (Perkin Elmer) Annexin V-floresan izotiyosiyanat (FITC)/Propidyum iyodür (PI) apoptoz kiti (Abcam), Hücre döngüsü kiti (Abcam)

2.3. Hücre Kültürü

Kullanılan HCF hücreleri ScienCell (Research Laboratories), PC3 insan prostat karsinoma hücreleri ve SKOV3 insan over adenokarsinoma hücreleri Amerikan tip kültür koleksiyonu (ATCC)'den temin edildi. HCF hücreleri 25 mL fetal bovine serum (Gibco), içeren fibroblast medium-2 (ScienCell, Research Laboratories), besi yerinde kültüre edildi. Takviye olarak 5 mL büyüme faktörü içeren fibroblast suplementi (ScienCell, Research Laboratories) ve 5 mL penicillin/streptomisin (Gibco) eklendi, PC3 ve SKOV3 hücreleri için ise, %10 fetal bovin serum %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) kullanıldı. Üç hücre hattı da 37 °C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi (Celik ve Bakar-Ates 2021). Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlandı.

2.4. Mitokondri İzolasyonu

HCF hücrelerinden mitokondri izolasyonu işlemi Preble ve ark. (2014)'nın geliştirdiği protokol takip edilerek yapıldı. Bu yöntem için öncelikle homojenizasyon tamponu hazırlandı. 250 mmol/L sakaroz, 20 mmol/L K⁺-HEPES, 0.5 mmol/L K⁺-EGTA kalsiyum disodyum tuzu, pH 8 olacak şekilde hazırlandı ve mitokondri izolasyonu için +4°C'ye getirildi.

Sonrasında 2x10⁶ HCF, besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, 37°C PBS ile yıkandı ve ardından tripsin/EDTA çözeltisi ile hücreler plaktan kaldırıldı. Hücre süspansiyonu toplanıp bir Miltenyi C tüpüne aktarıldı. Tüp 5 dakika 1000xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp, hücreler 200 µL 4°C PBS ile yıkandı. Hücreler daha sonra yukarıda belirtilen 5 mL homojenizasyon tamponu ile süspande edilip homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler 2 mg/mL Subtilisin A ile 10 dakika inkübe edildikten sonra, diferansiyel filtrasyon yapılarak önce por çapı 40 µm olan filtre ile 2 kez, sonrasında por çapı 10 µm olan filtre ile bir kez filtrelendi. Mitokondri transplantasyonunun etkisi mitokondrinin fonksiyonel ve canlı olarak izolasyonuna bağlı olduğundan (McCully ve ark., 2009), mitokondri bütünlüğünün

bozulmaması için işlemler +4 °C’de uygulandı (Katrangi ve ark., 2007; Gollihue ve ark., 2017). Mitokondri izolasyonundan hemen sonra transfer işlemi gerçekleştirildi.

2.5. Mitokondri Miktarının Belirlenmesi

Toplam mitokondri miktarının belirlenmesi için mitokondri izolasyonu yapıldıktan sonra Multisizer 4e Coulter partikül sayacı ile izole edilen mitokondrilerin sayısı ve boyutu belirlendi. Bunun için izole edilen mitokondri homojenizasyon tamponu ile süspande edildikten sonra bu süspansiyondan 10 µL alınıp Multisizer 4e Coulter partikül sayacının viyal adaptörüne aktarılarak mitokondri sayımı ve boyut analizi yapıldı.

2.6. İzole Edilen Mitokondrinin Elektron Mikroskop ile Görüntülenmesi

Elektron mikroskobu ile görüntülenme yapılabilmesi için öncelikle izole edilen mitokondri, pH 7,4 olacak şekilde %2,5 formaldehit, %5 glutaraldehit ve %0,06 pikrik asit içeren 0,2 molar sodyum kakodilat tamponu içinde 16 saat fikse edildi. Fikse edilen mitokondri, 3 kez kakodilat tamponu içinde yıkanıp, %1 osmiyum tetroksit, %1,5 potasyum ferrosiyanür ve %1 uranil asetat ile boyandı. Sonrasında 3 kez distile su ile yıkanarak, etanol ve propilen oksit ile dehidre edildi. Sonrasında epon propilen oksit ile gömülerek fırında 60°C’de 2 gün boyunca polimerize edildi. Ultracut-S ultramikrotom ile kesilerek ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile 4000X ve 10000X büyütme oranında görüntülendi (80 kV).

2.7. İzole Mitokondri Canlılığının Ölçülmesi

İzole edilmiş mitokondrinin canlılığı, floresan mikroskobu, akım sitometrisi, ve ATP analizi ile gösterildi.

2.7.1. Floresan Mikroskobu ile Mitokondri Canlılığının Ölçülmesi

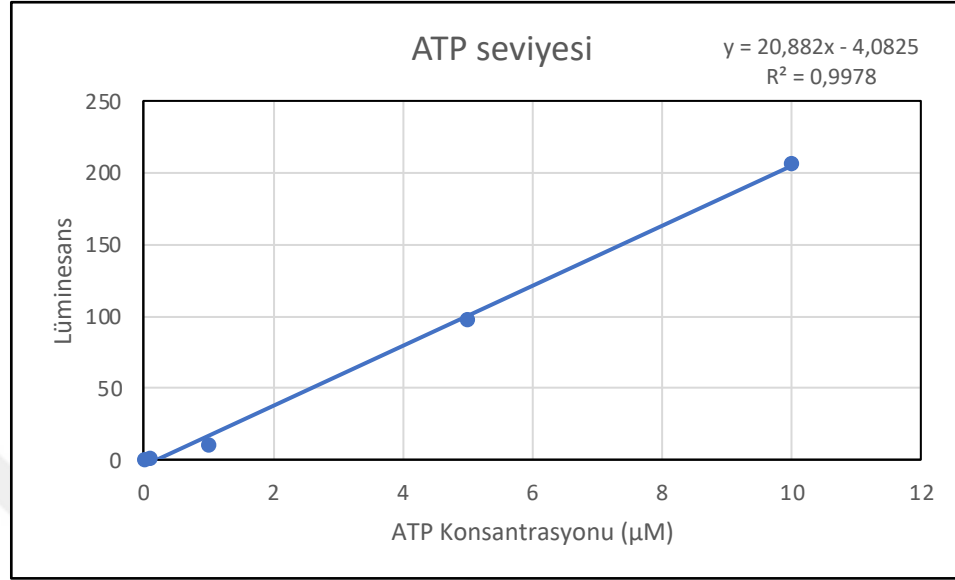
Mitokondri izole edildikten sonra, izole edilmiş mitokondri dört kısma alikotlanarak bir kısmı 1 μ L MitoTracker red CMXRos ile 5 dakika boyunca boyandı. Boyanan mitokondri, homojenizasyon tamponu ile dört kez yıkandıktan sonra 500 μ L homojenizasyon tamponu ile süspande edildi. Sonrasında 10 μ L mitokondri süspansiyonu temiz bir lam üzerine konulup lamel ile kapatılarak floresan mikroskop ile 100X büyütme oranında görüntülendi.

2.7.2. Akım Sitometrisi ve ATP Analizi ile Mitokondri Canlılığının Ölçülmesi

İzole edilen mitokondrinin alikotlanan diğer kısmı mitokondri popülasyonunun belirlenmesi için MitoTracker red CMXRos boyalı mitokondri popülasyonu ile LSR Fortessa (BD Biosciences) ile analiz edildi.

İzole edilen mitokondrinin işlevselliğinin kontrol edilmesi ve izole edilen mitokondrinin etkili konsantrasyonunun tayin edilebilmesi için mitokondrinin alikotlanan üçüncü kısmı 1×10^5 , 1×10^6 ve 1×10^7 mitokondri konsantrasyonlarında hazırlanarak ATPlite lüminesan ATP deteksiyon deney sistemi ile hazırlanan mitokondri konsantrasyonlarının ATP seviyeleri ölçüldü. ATP standartları pozitif kontrol olarak kullanılırken, 1×10^7 ölü mitokondri negatif kontrol olarak kullanıldı. ATP deneyi, kitin protokolüne uygun olarak yapıldı. Örnek kuyucuklarına 100 μ L izole edilen 1×10^5 , 1×10^6 ve 1×10^7 mitokondri konsantrasyonları ve negatif kontrol olarak ise 1×10^7 ölü mitokondri eklendi. 10 mM ATP Stok solüsyonundan 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M konsantrasyonlarında ATP standartları hazırlandı. Standart kuyucuklara 100 μ L homojenizasyon tamponu ve 10 μ L hazırlanan ATP standartlarından konuldu. Her kuyucuğa 50 μ L hücre lizis solüsyonu konulup 5 dakika çalkalamalı inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 μ L substrat solüsyonu konulup 5 dakika sonra lüminesans şiddeti Synergy H4 plaka

okuyucusu (BioTek Instruments) ile ölçüldü. Standart eğrinin korelasyon katsayısı $R^2=0,9978$ 'dir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. ATP deneyi standart eğrisi

2.8. Mitokondriyal İnternalizasyonun Takibi

2.8.1. Floresan Mikroskop ile İncelenmesi

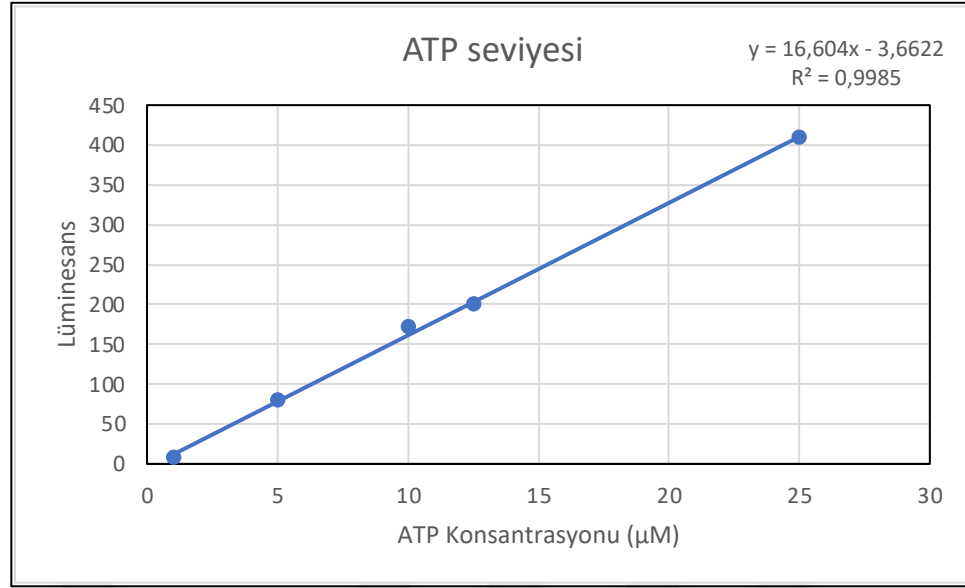
Hücrel mitokondri internalizasyonunun takibi için, mitokondri alıcı hücreler olan PC3 ve SKOV3 kanser hücreleri üreticinin protokolüne göre mitokondri spesifik yeşil boya olan MitoTracker green FM ile, ön boyama işlemine maruz bırakıldı. Bunun için, PC3 ve SKOV3 hücreleri son konsantrasyonu 200 nM olacak şekilde MitoTracker green FM ile 30 dakika 37 °C de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyonu takiben hücreler 3 kez 37 °C PBS ile yıkandı. İzole edilen mitokondri kırmızı renkli MitoTracker red CMXRos ile 2.7.1 de belirtilen şekilde boyanmış olup MitoTracker Green FM ile boyanan PC3 ve SKOV3 hücreleri ile 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler 37 °C PBS ile 3 kez yıkandı. Bunu takiben hücrelerin çekirdekleri 1 µg/ml Hoest 33342 ile 5 dakika boyunca boyandı.

Mitokondriyal internalizasyon 40X ve 100 X büyütme oranlarında floresan mikroskop ile izlendi.

2.8.2. Mitokondrinin Hücresel Canlılığının Ölçülmesi

Transplante edilen mitokondrinin hücresel işlevi üzerindeki etkisinin ölçülebilmesi için PC3 ve SKOV3 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 1×10^4 /kuyucuk olacak şekilde ekildikten sonra 14 saat inkübe edildi. Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler, 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 mitokondri içeren 50 μ L besiyeri ile inkübe edildi. Negatif kontrol olarak sadece 50 μ L besiyeri ve 1×10^7 ölü mitokondri ile 4 saat boyunca inkübe edilen kuyucuklar kullanıldı. İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklar PBS ile 2 kez yıkandı. ATP deneyi kitin protokolüne uygun olarak bölüm 2.7.2' deki gibi yapıldı. ATP standartları, 10 mM ATP stok solüsyonundan, 25 μ M, 12,5 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M konsantrasyonlarında hazırlandı.

Örnek ve standart kuyucuklarına 100 μ L homojenizasyon tamponu ve standart kuyucuklara 10 μ L hazırlanan ATP dilüsyonundan konuldu. Sonrasında her kuyucuğa 50 μ L hücre lizis solüsyonu konulup 5 dakika çalkalamalı inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 μ L substrat solüsyonu konulup 5 dakika sonra lüminesans şiddeti Synergy H4 plaka okuyucusu (BioTek Instruments) ile ölçüldü. Standart eğrinin korelasyon katsayısı $R^2=0,9985$ 'tir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hücresel ATP standart eğrisi

2.9. Hücre Göçü Analizi

Hücre göçü deneyi için PC3 ve SKOV3 kanser hücreleri 24 kuyucuklu plaklara 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip 14 saat inkübe edildi. Hücrelerin tamamen plağa yapıştığına emin olduktan sonra kuyucuklar 250 µL 1×10^7 mitokondri ve kontrol olarak sadece besiyeri ile 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak 20–200 µL mikro pipet ucu ile ~1mm'lik bir yara oluşturuldu. Sonrasında 72 saat boyunca 24 saatte bir kez inverted mikroskop ile görüntüleme yapıldı.

2.10. Paklitaksel İlaç Duyarlılığının Araştırılması

2.10.1. Hücre Canlılığının Tayini

Mitokondri transplantasyonu yapılmadan önce paklitakselin hücre canlılığına etkisinin tayini için MTT deneyi uygulandı. Bunun için PC3 ve SKOV3 hücreleri, 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve daha önceki

Çalışmalardan paklitakselin seçilen hücre hatlarına etki ettiği konsantrasyonlar olan 20, 10, 5, 2,5, 1, ve 0,5 nM palitaksel uygulaması yapıldı ve hücreler 24, 48, ve 72 saat inkübe edildi (Danesi ve ark., 1995; Xu ve ark., 2009; Sobue ve ark., 2016; Yuan ve ark., 2018). Sonrasında her kuyucuğa 20 μ L MTT ajanı eklenerek 3 saat 37°C de inkübe edildikten sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp oluşan formazan kristalleri 100 μ L DMSO ile çözülerek absorbans 540 nm dalga boyunda Synergy H4 plaka okuyucusu (BioTek Instruments) ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre 24. saatte etkili paklitakselin en düşük dozu ($p<0,05$) ve letal doz 50 (LD_{50}) (%95 güven aralığı) mitokondrinin olası etkisinin ölçülmesi için kullanıldı.

2.10.2. Live\Dead Deneyi

Mitokondriyal metabolizmadan bağımsız olduğundan mitokondriyal transplantasyonun proliferasyon ve kemosenitivite üzerindeki etkisini ölçmek için Live/Dead deneyi yapıldı. Araştırma grubunu hücrelerin tek başına paklitakselin ayrı ayrı en düşük etkili dozu ($p<0,05$) ve LD_{50} ile tedavisi ve hücrelerin mitokondrinin 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , ve 1×10^7 l mitokondri konsantrasyonlarının transplantasyonunu takiben ayrı ayrı paklitakselin en düşük etkili dozu ve LD_{50} ile tedavisi olmak üzere iki grup oluşturdu.

Live/Dead deneyi için PC3 ve SKOV3 hücreleri, 96 kuyucuklu plaklara 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 14 saat inkübe edildi. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan hücrelerde aynı koşulları sağlamak amacı ile, mitokondri transplantasyonu yapılacak hücreler ayrı ayrı sırası ile 1×10^5 , 1×10^6 ve 1×10^7 , taze izole edilmiş mitokondri ve 1×10^7 l mitokondri içeren 50 μ L besiyeri ile, mitokondri transplantasyonu yapılmayacak hücreler ise sadece 50 μ L besiyeri ile 4 saat inkübe edildi. Inkbasyonun ardından plaktaki tüm besiyerleri ortamdan uzaklaştırılarak kuyucuklar 37°C PBS ile yıkandı. Sadece paklitaksel ile tedavi edilecek hücreler kuyucuktaki son konsantrasyon paklitakselin en düşük etkili dozu ve LD_{50} olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat tedavi edildi. Benzer şekilde sadece mitokondri transplantasyonu yapılan hücrelere 200 μ L taze besiyeri

eklendi ve 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Son olarak mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan paklitaksel ile tedavi edilecek hücreler de kuyucuktaki son konsantrasyon paklitakselin en düşük etkili dozu ve LD₅₀ olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat tedavi edildi. Kontrol olarak sadece besiyeri ile inkübe edilen hücreler kullanıldı.

Live/Dead deneyi kit prosedürüne göre gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından besiyeri tüm örneklerden uzaklaştırıldı. 2 µM/10 mL kalsein AM içeren çalışma solüsyonu hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µL PBS ve 100 µL çalışma solüsyonundan eklenip 30 dakika etüvde inkübe edildi. Eksitasyon ve emisyon 485 nm/530nm olacak şekilde floresan şiddeti Synergy H4 plaka okuyucusu (BioTek Instruments) ile okundu.

2.10.3. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizi, hücre döngüsü deney kiti (Abcam) ile gerçekleştirildi. PC3 ve SKOV3 hücreleri 6 kuyucuklu plaklara 2x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 14 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından mitokondri transplante edilecek hücreler 1x10⁷ mitokondri içeren 1 mL besiyeri ile, sadece paklitaksel ile tedavi edilecek hücreler ise 1 mL besiyeri ile 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben mitokondri transplantasyonu yapılmış ve mitokondri transplantasyonu yapılmamış PC3 ve SKOV3 hücreleri paklitakselin en düşük dozu ve LD₅₀ değeri ile 24 saat boyunca tedavi edildi. Tedavinin ardından ortamdaki besiyeri uzaklaştırılarak tüm hücreler 37°C PBS ile yıkandı. Örnekler tripsin/EDTA solüsyonu ile ependorf tüplerinde toplanarak bir kez daha 37°C PBS ile yıkandı ve her örnek 1ml %70'lik etanol ile süspande edilip bir gün boyunca +4°C'de fiks edildi. Fiksasyon işleminden sonra hücreler oda sıcaklığına getirilerek 1 kez PBS ile yıkandı. Kitin protokolüne göre 9,45 mL PBS, 500 µL (1mg/mL) propidyum iyodür ve 50 µL (110,000U/mL) RNAaz ile çalışma solüsyonu hazırlandı. Her örnek 200 µL çalışma solüsyonu ile süspande edilip karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında G₀/G₁, S ve G₂/M fazlarındaki hücre popülasyonları Fortessa LSR ile ölçüldü.

2.10.4. Annexin V Bağlanma Analizi

Annexin V bağlanma deneyi, Annexin V-FITC/PI kiti (Abcam) ile gerçekleştirildi. PC3 ve SKOV3 hücrelerine paklitakselin etkili en düşük dozu ve LD₅₀ dozu uygulanarak mitokondri transplantasyonunun bahsedilen hücre hatlarında paklitakselin hücrelerdeki apoptotik etkinliğine olan etkisi ölçüldü. Bunun için PC3 ve SKOV3 hücreleri 6 kuyucuklu plaklara 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücreler 2.10.3’de belirtildiği gibi paklitakselin en düşük etkili dozu ve LD₅₀ değeri ve 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben paklitakselin en düşük etkili dozu ve LD₅₀ ile tedavi edildi. Tedavi edilen hücreler 24 saat inkübasyonun ardından 37°C PBS ile yıkanarak tripsin/EDTA solüsyonu ile ependorf tüplerinde toplandı. Toplanan örnekler 37°C PBS ile bir kez daha yıkandıktan sonra Annexin V-FITC/Propidyum iyodür kitinin prosedürü uygulandı. Kitin protokolüne göre her örnek için 500 µL Annexin bağlayıcı tamponda 5 µL Annexin V-FITC ve PI olacak şekilde çalışma solüsyonu hazırlandı. Örnekler 500 µL çalışma solüsyonu ile süspande edilip 5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra eksitasyon ve emisyon 488 nm/530nm olacak şekilde FITC filtresi ile flow sitometride (Fortessa LRS) okunarak apoptotik popülasyon belirlendi.

2.10.5. Floresan Görüntüleme

Mitokondri bağımlı ve bağımsız apoptozu görselleştirmek için hücreler Annexin V-FITC/Propidyum iyodür ve Hoest 33342 ile boyandı. Bunun için Annexin V-FITC/Propidyum iyodür kitinin prosedürü kullanıldı PC3 ve SKOV3 hücreleri 24 kuyucuklu plaklara kuyucuk başı 5×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Mitokondri transplantasyonu yapılmış veya yapılmamış PC3 ve SKOV3 hücreleri 2.10.3’de belirtildiği üzere paklitakselin seçilen dozları ile 24 saat tedavi edildi. Sonrasında kuyucuklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak hücreler 37°C PBS ile yıkandı. Her kuyucuğa 500 µL Annexin bağlayıcı tampon 5 µL Annexin V-FITC/PI ve 1 µg/mL Hoest 33342 konulduktan sonra 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. Plak inkübasyonu takiben floresan mikroskop ile görüntülendi (Kubina ve ark., 2015; Yeh ve ark., 2017).

2.11. İstatistiksel Analiz

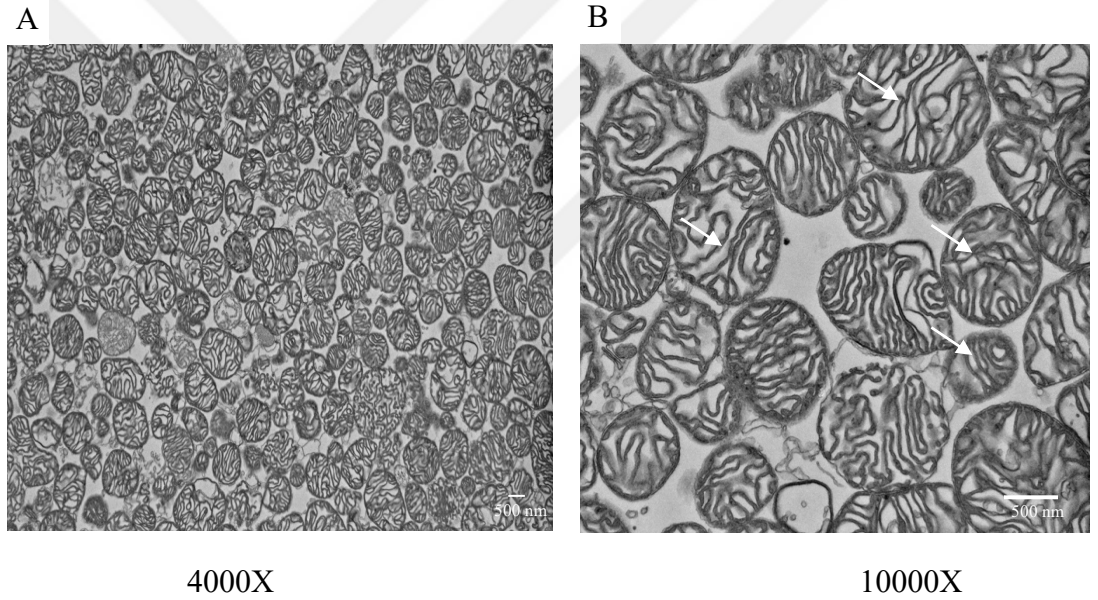
Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeler, Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) için GraphPad Prism istatistik program ile analiz edildi. Sonuçlar, tüm değişkenler için ortalama $\pm$ ortalamaların standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arası, ölçüm verilerinin karşılaştırılması Student t-testi ile ve çoklu numunelerin ortalamaları arasındaki farkları ölçmek için tek yönlü bir varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Bir rnek için zaman bağımlı çoklu ölçümlerde, istatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için karma model varyans analizi (MM-ANOVA) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.



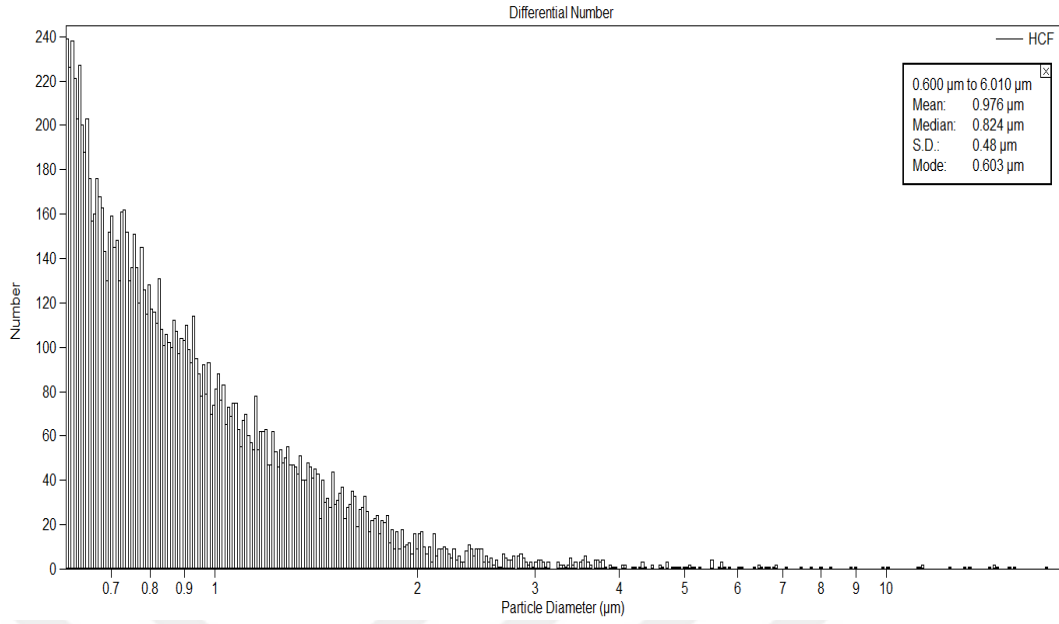
3. BULGULAR

3.1. İzole Edilen Mitokondrinin Canlılığının İncelenmesi

HCF hücrelerinden izole edilen mitokondrinin TEM görüntüsü Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Şekil 3.1'deki beyaz oklarla gösterildiği üzere izole edilen mitokondrinin membran bütünlüğü ve krista yapısı korunmakta iken, boyutları 0,5 ve 1 μm olmak üzere değişiklik göstermektedir. Multisizer partikül sayacı ile yapılan analiz, TEM sonuçlarını desteklemektedir (Şekil 3.2).

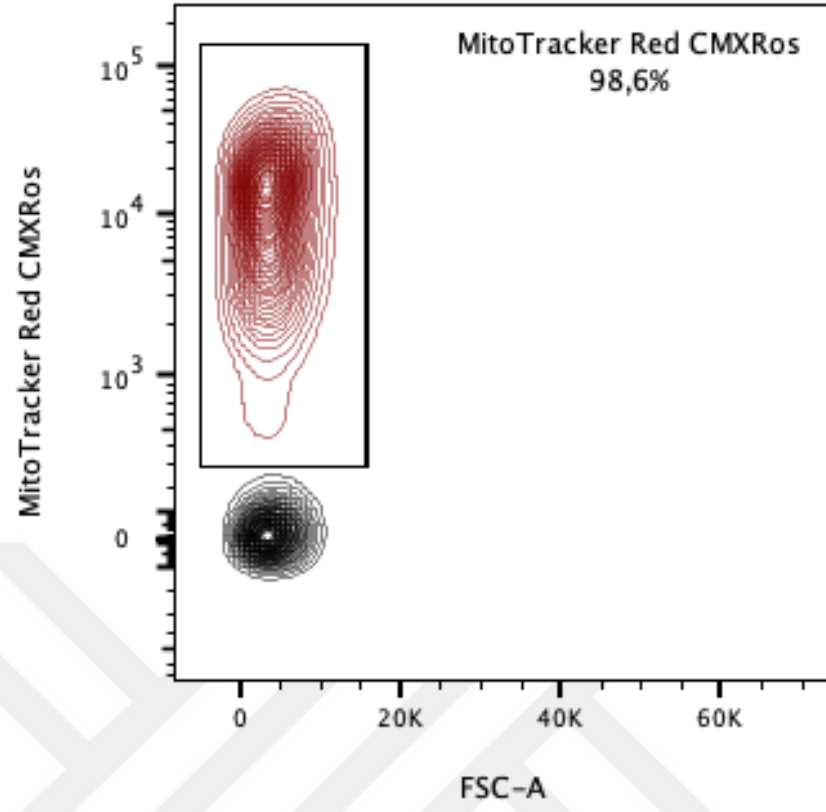


Şekil 3.1. Mitokondri TEM görüntüleri. A-4000X objektif ile ölçülmüştür. B-10000X ile ölçülmüştür.



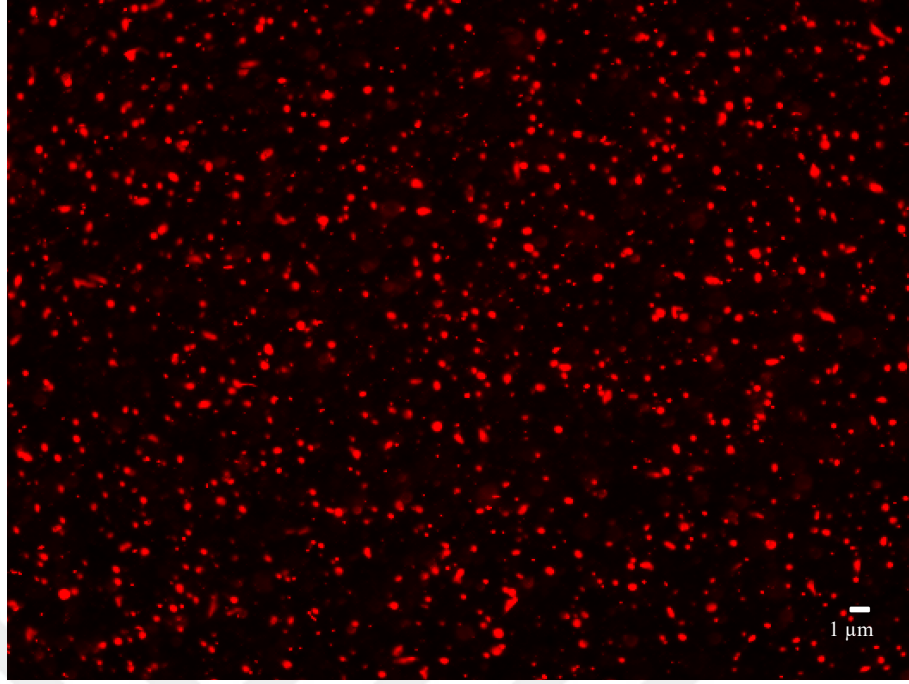
Şekil 3.2. Multisizer partikül analizi sonuçları.

İzole edilen mitokondrinin sonraki deneylerde işlevselliğini devam ettirebilmesi için canlı izole edilmesi şarttır. Bu sebepten ötürü mitokondri canlılığı hem akım sitometrisi hem de floresan mikroskobu ile ölçülmüştür. Akım sitometri cihazı ölçüm sonuçlarına göre izole edilen mitokondrinin $98,6 \pm 0,35$ oranında canlı olduğu bulunmuştur (Şekil 3.3).



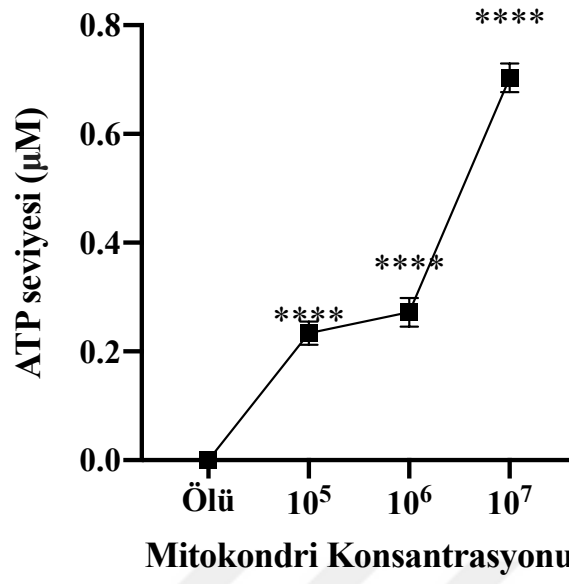
Şekil 3.3. İzole edilen mitokondrinin canlılık analizine yönelik akım sitometri cihazı plot görüntüsü.

Aynı zamanda izole edilen mitokondri MitoTracker red CMXRos ile boyanarak floresan mikroskop ile incelenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İzole edilen mitokondrinin canlılığının floresan mikroskop ile görüntüsü (100X).

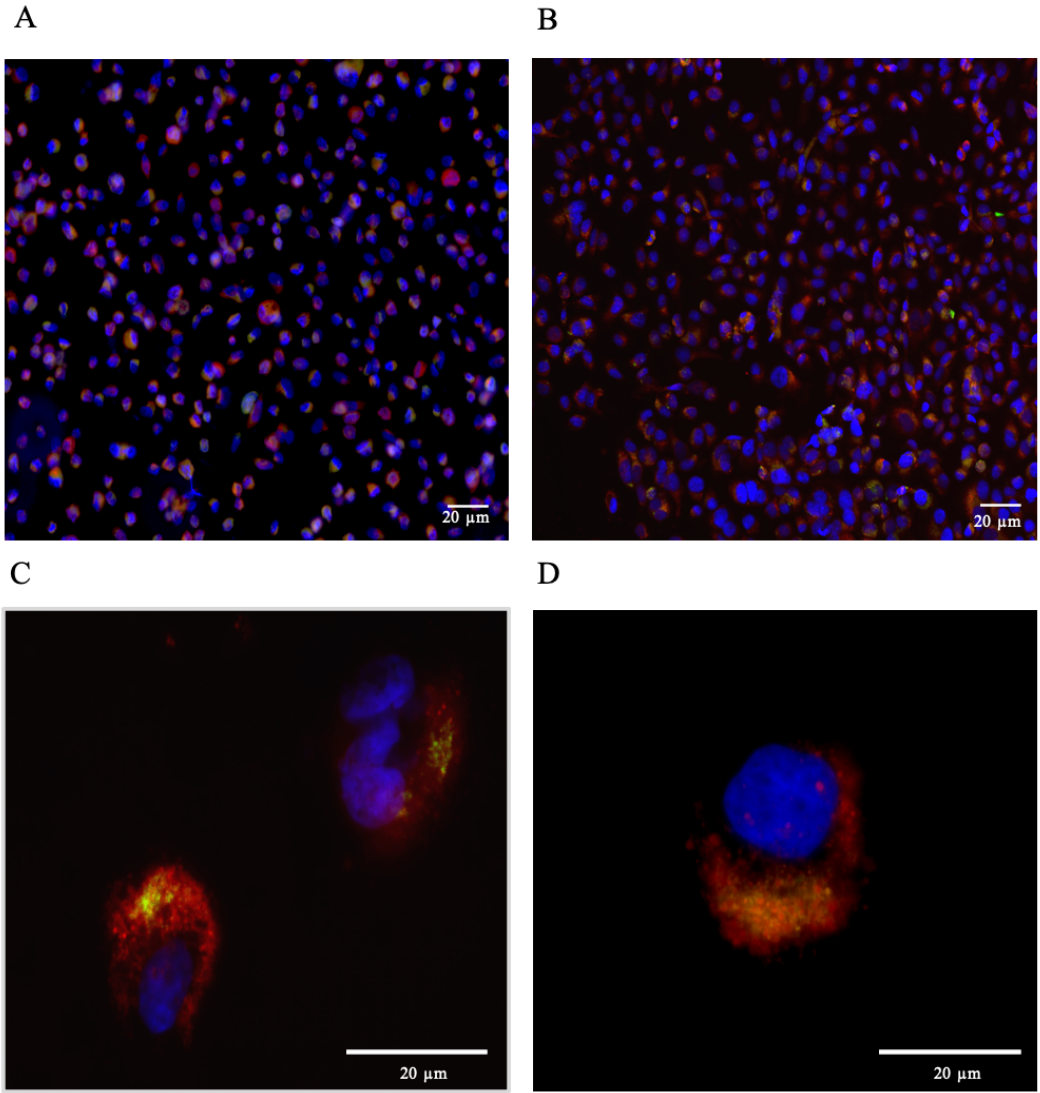
Mitokondrinin farklı konsantrasyonlarına göre ATP seviyeleri ölçülmüş olup 1×10^5 , 1×10^6 ve 1×10^7 konsantrasyonlarındaki ATP seviyeleri sırası ile $0,23 \pm 0,02$, $0,27 \pm 0,03$, ve $0,70 \pm 0,03$ μM bulunmuştur. Bununla birlikte 1×10^7 ölü mitokondrinin ATP seviyesi 0 μM olarak bulunmuştur. Taze izole edilen 1×10^5 , 1×10^6 ve 1×10^7 mitokondrinin ATP seviyeleri ölü mitokondriye göre anlamlı olarak artış göstermiştir ($p < 0,0001$) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mitokondri konsantrasyonlarının ATP seviyeleri. (****p<0,0001 ölü mitokondriye göre anlamlılık).

3.2. İzole Edilen Mitokondrinin İnternalizasyonunun İncelenmesi

Mitokondri transplantasyonunda kullanılacak mitokondrinin canlılığı kadar doğru transplante edilmesi de önem taşımaktadır. Şekil 3.6'da PC3 ve SKOV3 hücrelerine transplante edilen mitokondrinin internalizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.6. PC3 ve SKOV3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonunun internalizasyonunun incelenmesi. Yeşil, host mitokondri, Kırmızı, transplante edilen mitokondri, Mavi, çekirdeği temsil etmektedir. **A.** PC3 hücrelerine mitokondri transplantasyonu (40X objektif) **B.** SKOV3 hücrelerine mitokondri transplantasyonu (40X objektif) **C.** PC3 hücrelerine mitokondri transplantasyonu (100X objektif) **D.** SKOV3 hücrelerine mitokondri transplantasyonu (100X objektif).

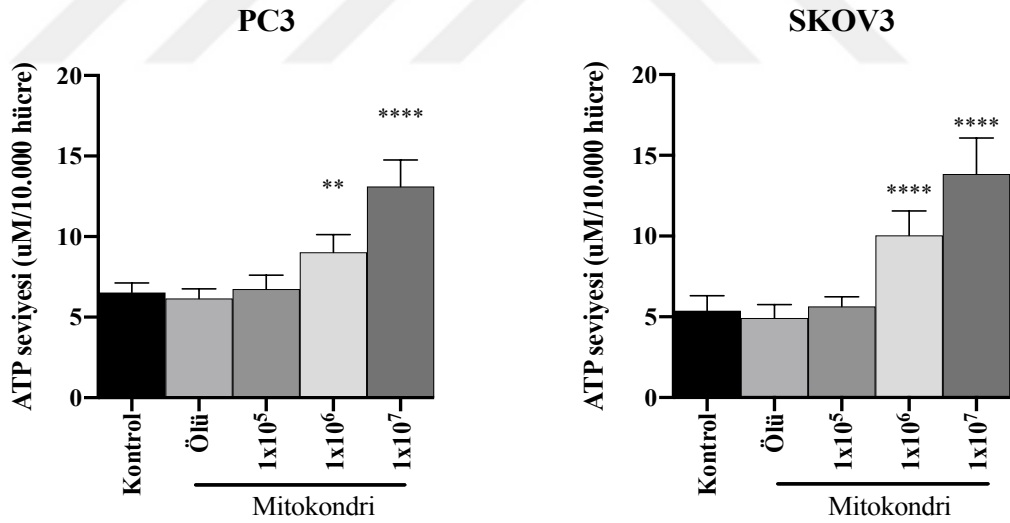
3.3. Mitokondri Transplantasyonunun Hücresel ATP Seviyesine Etkisi

Transplante edilen mitokondrinin hücresel aktivitesinin değerlendirilmesi için mitokondri transplantasyonu sonrası hücresel ATP seviyeleri ölçülmüştür. PC3 ve SKOV3 hücreleri için ölçülen ATP miktarları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Sonuçlara göre transplante edilen ölü ve 1×10^5 mitokondri hücresel anlamda ATP seviyesini

etkilemezken 1×10^6 ve 1×10^7 mitokondri transplantasyonu hücresel ATP miktarını anlamlı şekilde arttırmıştır ($p < 0,01$, $p < 0,0001$). Bununla birlikte, bu artış her iki hücre hattında da en çok 1×10^7 mitokondri konsantrasyonunda gözlenmiştir ($p < 0,0001$) (Şekil 3.7).

Çizelge 3.1 Hücresel ATP miktarları (μM).

	PC3 (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)	SKOV3 (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)
Kontrol	$6,51 \pm 0,60$	$5,36 \pm 0,93$
Ölü Mitokondri (1×10^7)	$6,16 \pm 0,59$	$4,92 \pm 0,84$
1×10^5	$6,74 \pm 0,86$	$5,64 \pm 0,60$
1×10^6	$9,026 \pm 1,092$	$10,05 \pm 1,52$
1×10^7	$13,11 \pm 1,64$	$13,84 \pm 2,24$

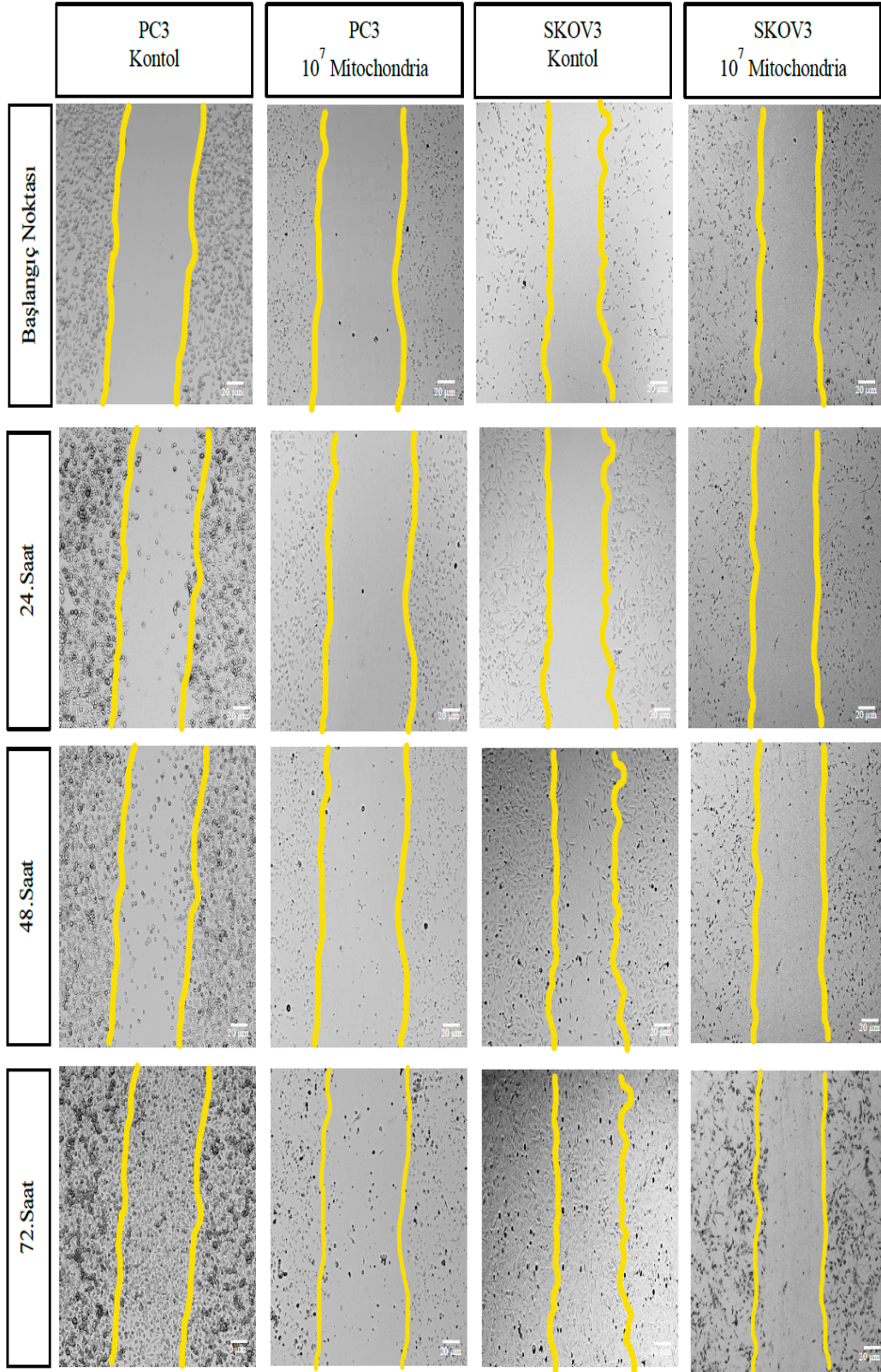


Şekil 3.7. Hücresel ATP değişimlerinin grafiksel gösterimi. (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ kontrole göre anlamlılık).

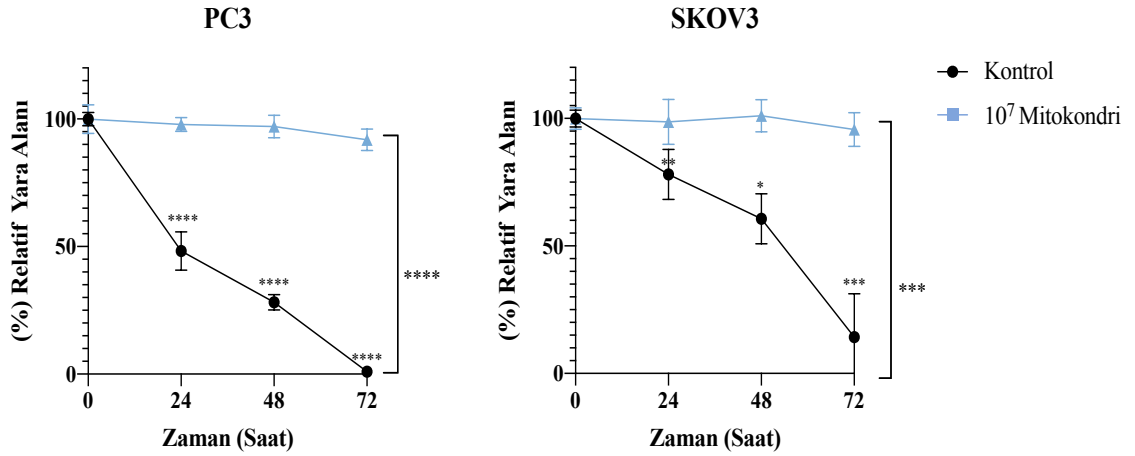
3.4. Mitokondri Transplantasyonun Migrasyona Etkisi

Yukarıdaki deneyler doğrultusunda ATP seviyesinin en çok artışına neden olan 1×10^7 mitokondrinin migrasyona etkisi mikroskop görüntüleri (Şekil 3.8) ve grafik ile gösterilmiştir (Şekil 3.9). Bu sonuçlara göre PC3 ve SKOV3 hücrelerinde sırası ile 24, 48 ve 72 saat aralığında migrasyonun kontrol hücrelerinde anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p < 0,0001$, $p < 0,001$, $p < 0,01$ $p < 0,05$). Bu sonuçlara göre PC3 ve SKOV3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonunun migrasyonu 24-72 saat aralığında azalttığı bulunmuştur.





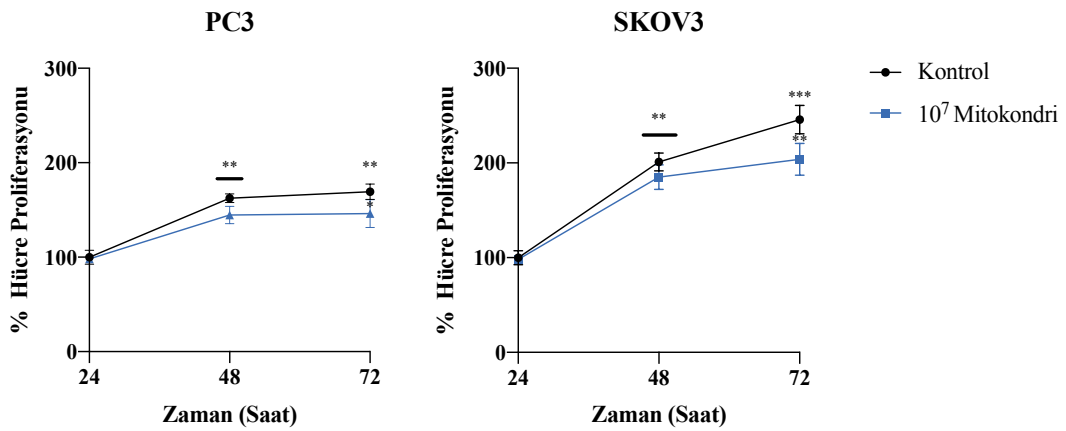
Şekil 3.8. Mitokondri transplantasyonunun migrasyona etkisi. (Sarı ile çizilen alan yaranın oluşturulduğu alanı temsil etmektedir.)



Şekil 3.9. Mitokondri transplantasyonu ile değişen % relatif yara alanının grafiksel gösterimi. (*p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001).

3.5. Mitokondri Transplantasyonunun Proliferasyona Etkisi

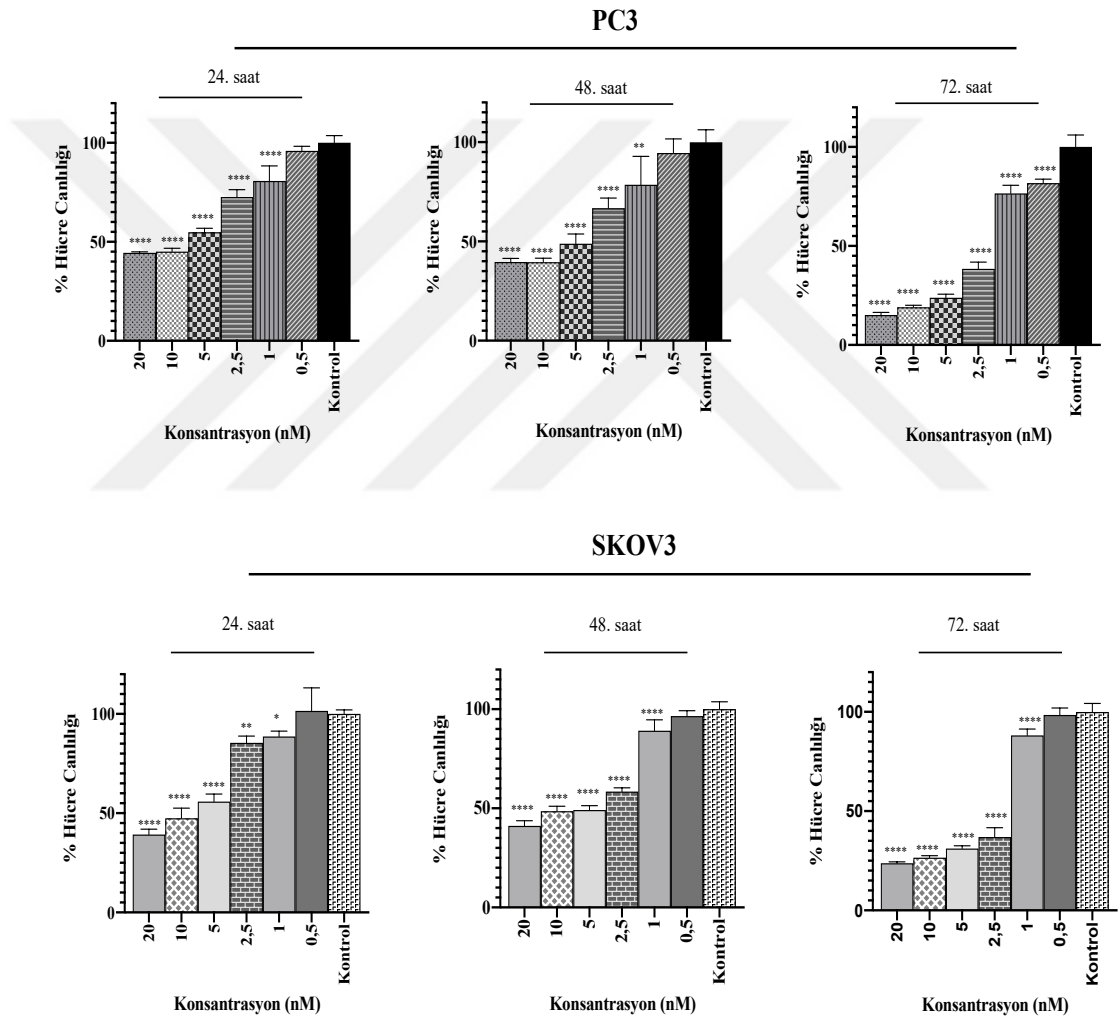
ATP seviyesinde en çok artışa neden olan 1×10^7 mitokondrinin hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre PC3 ve SKOV3 hücrelerinin 24-72 saat aralığındaki proliferasyonunun hem kontrol hücrelerinde hem de mitokondri transplantasyonu yapılan hücrelerde anlamlı olarak arttığı ($p<0,001$, $p<0,01$), fakat, mitokondri transplantasyonunun her iki hücre hattında da kontrole kıyasla proliferasyonu arttırmadığı gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Mitokondri transplantasyonu ile değişen %hücre proliferasyonunun grafiksel gösterimi (*p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001).

3.6. Mitokondriyal Transplantasyonun Paklitakselin Duyarlılığına Etkisi

Paklitakselin PC3 ve SKOV3 hücrelerindeki canlılığa etkisi 24, 48 ve 72 saat boyunca incelenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda paklitakselin 24. saatte hücreler üzerindeki en düşük etkili dozu ve LD₅₀ dozu bulunmuştur. Sonuçlara göre bu dozlar her iki hücre hattı için sırası ile 1 nM ($p<0,0001$, $p<0,05$) ve 5 nM'dir ($p<0,0001$) (Şekil 3.11).



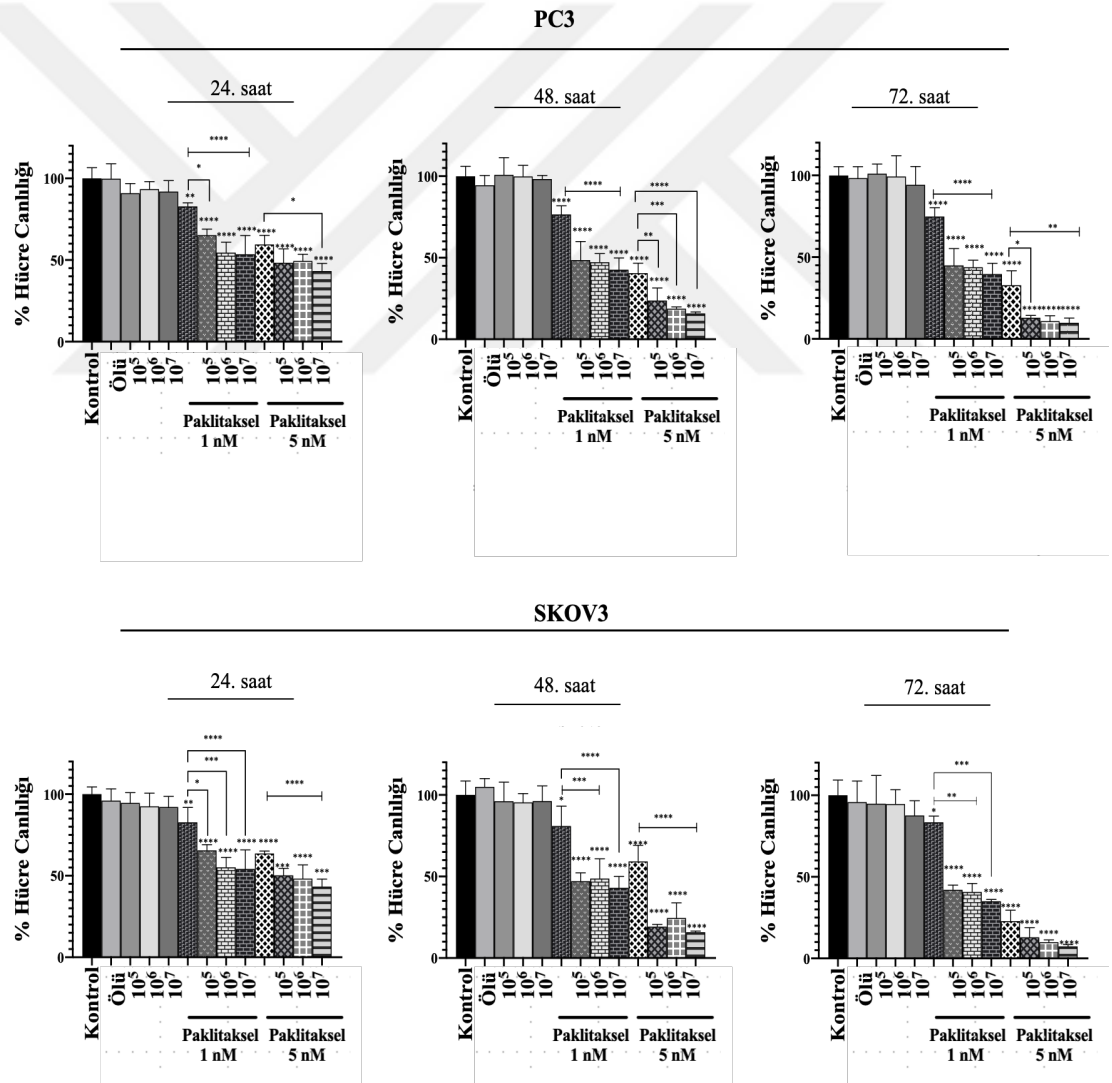
Şekil 3.11. Paklitakselin PC3 ve SKOV3 hücre canlılığı üzerindeki etkisi. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,0001$)

Mitokondri transplantasyonun hücrel kemosenitiviteye etkisinin araştırılması için hücreler sadece 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , ve 1×10^7 ölü mitokondri ile, sadece 1 nM ve 5 nM paklitaksel ile, son olarak 1×10^5 , 1×10^6 ve 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben 1 nM ve 5 nM paklitaksel ile tedavi edilmiştir. Sonuçlara göre sadece mitokondri transplantasyonu ölü veya canlı uygulanan tüm konsantrasyonlarda her iki hücre hattında da hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etki göstermezken, 1×10^7 mitokondri paklitakselin her iki dozunda da hücre canlılığını en çok azaltan mitokondri dozu olarak bulunmuştur ($p < 0,0001$) (Şekil 3.12).

Bununla birlikte 24. saatte sadece 1 nM paklitaksel ile tedavi edilen PC3 hücrelerinin canlılığı $82,84 \pm 2,24$ iken, 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben 1 nM paklitaksel ile tedavi edildiğinde hücre canlılığı $53,50 \pm 11,53$ 'dür. Benzer olarak 24. saatte sadece 5 nM ile tedavi edilen PC3 hücrelerindeki canlılık $59,57 \pm 5,58$ iken 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben 5 nM paklitaksel ile tedavi edildiğinde hücre canlılığı $43,29 \pm 4,67$ 'dir. Aynı zamanda 48. ve 72. saatlerde sadece 1 nM paklitaksel ile tedavi edildiğinde hücre canlılığı $76,58 \pm 5,29$ ve $74,90 \pm 5,39$ iken 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan 1 nM paklitaksel tedavisinin hücre canlılığına etkisi sırası ile $42,64 \pm 7,22$ ve $39,66 \pm 6,62$ 'dir. PC3 hücreleri 48. ve 72. saatlerde sadece 5 nM paklitaksel ile tedavi edildiğinde hücre canlılığı sırası ile $40,51 \pm 6,11$ ve $32,87 \pm 8,76$ iken 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben 5 nM paklitaksel tedavisinin hücre canlılığına etkisi sırası ile $15,81 \pm 0,89$ ve $9,88 \pm 2,86$ 'dir.

Benzer şekilde 24. saatte sadece 1 nM paklitaksel ile tedavi edilen SKOV3 hücrelerinin canlılığı $82,77 \pm 9,05$ iken, 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben 1 nM ile tedavi edilen SKOV3 hücrelerindeki canlılık $49,12 \pm 8,62$ 'dir. Aynı zamanda 48. ve 72. saatlerde sadece 1 nM ile tedavi edilen SKOV3 hücrelerinin canlılığı $80,91 \pm 12,21$ ve $81,86 \pm 3,83$ iken 1×10^7 mitokondri transplantasyonu ile 1 nM paklitaksel ile tedavi edilen SKOV3 hücrelerinin canlılığı sırası ile $43,09 \pm 6,97$ ve $35,08 \pm 1,03$ 'dir. Benzer olarak 24. Saatte sadece 5 nM paklitaksel ile tedavi edilen SKOV3 hücrelerinin canlılığı, $63,65 \pm 1,51$ iken, 1×10^7 mitokondri

transplantasyonunu takiben uygulanan 5 nM paklitaksel ile tedavi edilen SKOV3 hücrelerindeki canlılık $43,34 \pm 4,57$ 'dir. Aynı zamanda 48. ve 72. saatlerde sadece 5 nM paklitaksel ile tedavi edilen SKOV3 hücrelerinin canlılığı sırası ile $59,24 \pm 9,94$ ve $22,83 \pm 6,70$ iken, 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben 5 nM paklitaksel ile tedavi edilen SKOV3 hücrelerinin canlılığı sırası ile $15,85 \pm 0,73$ ve $7,37 \pm 1,13$ 'tür. Sonuç olarak her iki hücre hattında da 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben 1 nM paklitaksel tedavisinin hücre canlılığı üzerine etkisi ile 5 nM paklitakselin hücre canlılığına etkisi kıyaslandığında her iki tedavinin sitotoksitesi arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Mitokondri transplantasyonunun paklitaksel duyarlılığına etkisi. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$)

3.6.1. Hücre Döngüsü Analizi Bulguları

PC3 ve SKOV3 hücrelerinde, sadece paklitaksel tedavisi ve mitokondri transplantasyonu ile birlikte uygulanan paklitaksel tedavisinin hücre döngüsü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlara göre sadece mitokondri transplantasyonu, PC3 ve SKOV3 hücrelerinin bölünmesini G_0/G_1 fazında anlamlı olarak durdururken ($p<0,0001$) S fazını da anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0,001$, $p<0,0001$).

Aynı zamanda her iki hücre hattında paklitakselin uygulanan konsantrasyona bağlı olarak hücre döngüsünü değiştirdiği görülmüştür. PC3 hücrelerinde paklitakselin 1 nM dozu hücre döngüsünü anlamlı olarak S fazında ($p<0,05$) ve G_2/M fazında ($p<0,001$) durdurmuş ve G_0/G_1 fazında ($p<0,0001$) azaltmıştır. PC3 hücreleri sadece 5 nM paklitaksel ile tedavi edildiğinde ise hücre döngüsünü anlamlı olarak G_2/M fazında ($p<0,0001$) durdurmuş ve G_0/G_1 fazında azaltmıştır ($p<0,0001$) (Çizelge 3.2).

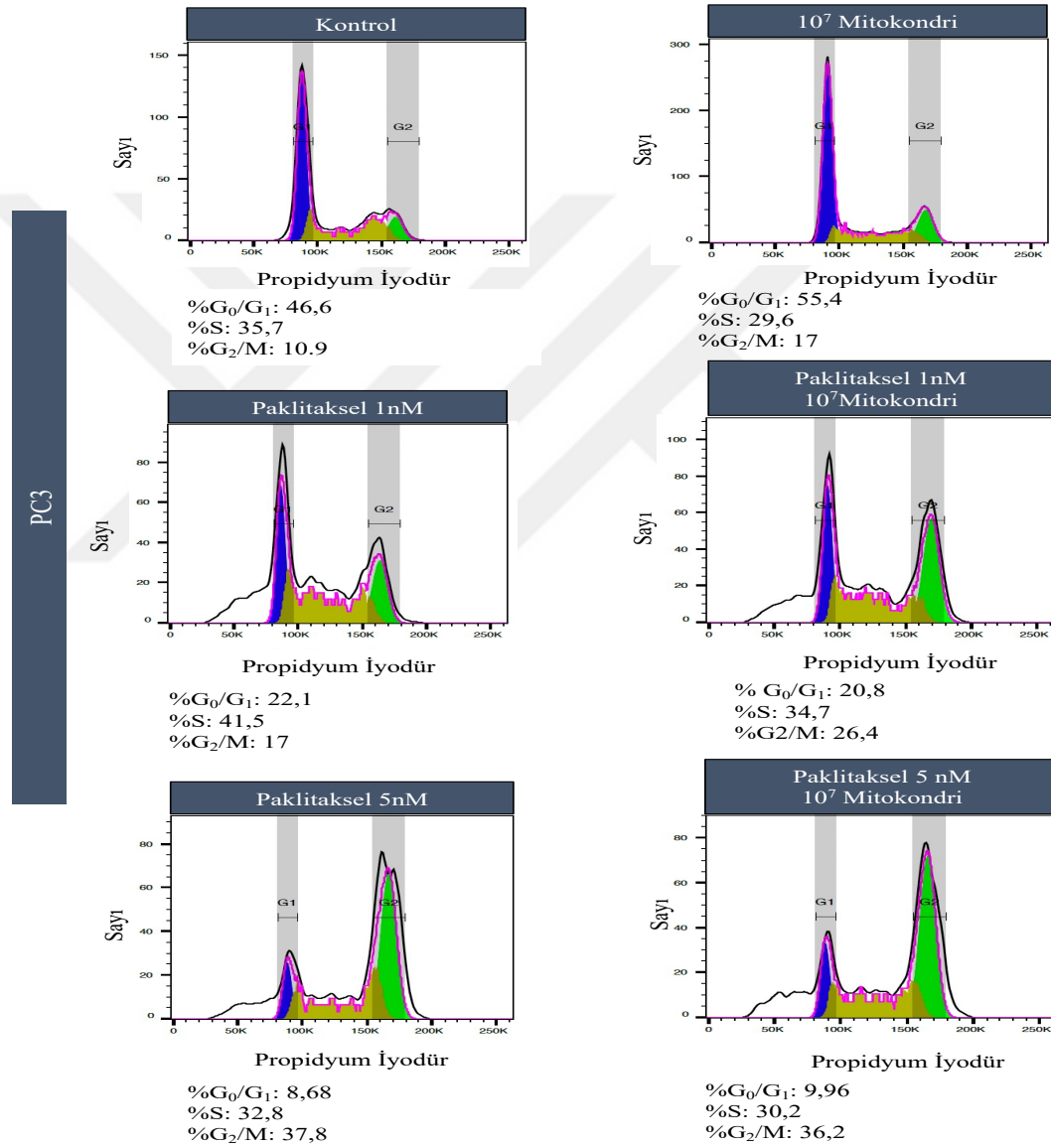
Çizelge 3.2. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan PC3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası hücre döngüsü analiz sonuçları.(Hücre döngüsü fazlarının değerleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.)

PC3

	Kontrol	Paklitaksel 1 nM	Paklitaksel 5 nM	10 ⁷ Mitokondri		
				Kontrol	Paklitaksel 1 nM	Paklitaksel 5 nM
G_0/G_1	46,75 $\pm$ 0,21	21,25 $\pm$ 1,20	9,30 $\pm$ 0,88	55,45 $\pm$ 0,07	20,55 $\pm$ 0,35	9,22 $\pm$ 1,04
S	35,90 $\pm$ 0,28	42,50 $\pm$ 1,41	31,90 $\pm$ 1,27	28,70 $\pm$ 1,27	35,20 $\pm$ 0,70	32,05 $\pm$ 2,62
G_2/M	11,65 $\pm$ 1,06	16,40 $\pm$ 0,85	38,45 $\pm$ 0,92	17,10 $\pm$ 0,14	26,50 $\pm$ 0,14	36,00 $\pm$ 0,28

Mitokondri transplantasyonu ile uygulanan paklitakselin 1 nM ve 5 nM konsantrasyonu PC3 hücre döngüsünü anlamlı olarak G_2/M fazında durdururken ($p<0,0001$) G_0/G_1 fazında azaltmıştır ($p<0,0001$). PC3 hücrelerinde, sadece paklitaksel ile tedavi edilen grup ile, mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan paklitaksel ile tedavi edilen grubun hücre döngüsü üzerindeki etkileri kıyaslanmıştır.

Sonuçlara göre mitokondri transplantasyonu ile birlikte uygulanan 1 nM paklitaksel tedavisinin, sadece 1 nM paklitaksel ile tedavisine göre hücre döngüsünü anlamlı olarak G₂/M fazında arttırdığı (p<0,0001) ve S fazında azalttığı (p<0,01) görülmüştür. Fakat, mitokondri transplantasyonu ile uygulanan 5 nM paklitaksel tedavisi ve sadece 5 nM paklitaksel tedavisinin hücre döngüsüne etkisi arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır (Çizelge 3.2) (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan PC3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası hücre döngüsü analizinin akım sitometri cihazı plot görüntüleri. (Eğrinin altında kalan mor ile işaretli alan %G₀/G₁ fazını gösterirken, sarı ile işaretli alan %S fazını, yeşil ile işaretli alan %G₂/M fazını belirtmektedir.)

Benzer şekilde SKOV3 hücreleri 1 nM paklitaksel ile tedavi edildiğinde hücre döngüsü anlamlı olarak sadece G₂/M fazında durdurulurken (p<0,01) 5 nM paklitaksel tedavisinin hücre döngüsü üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır.

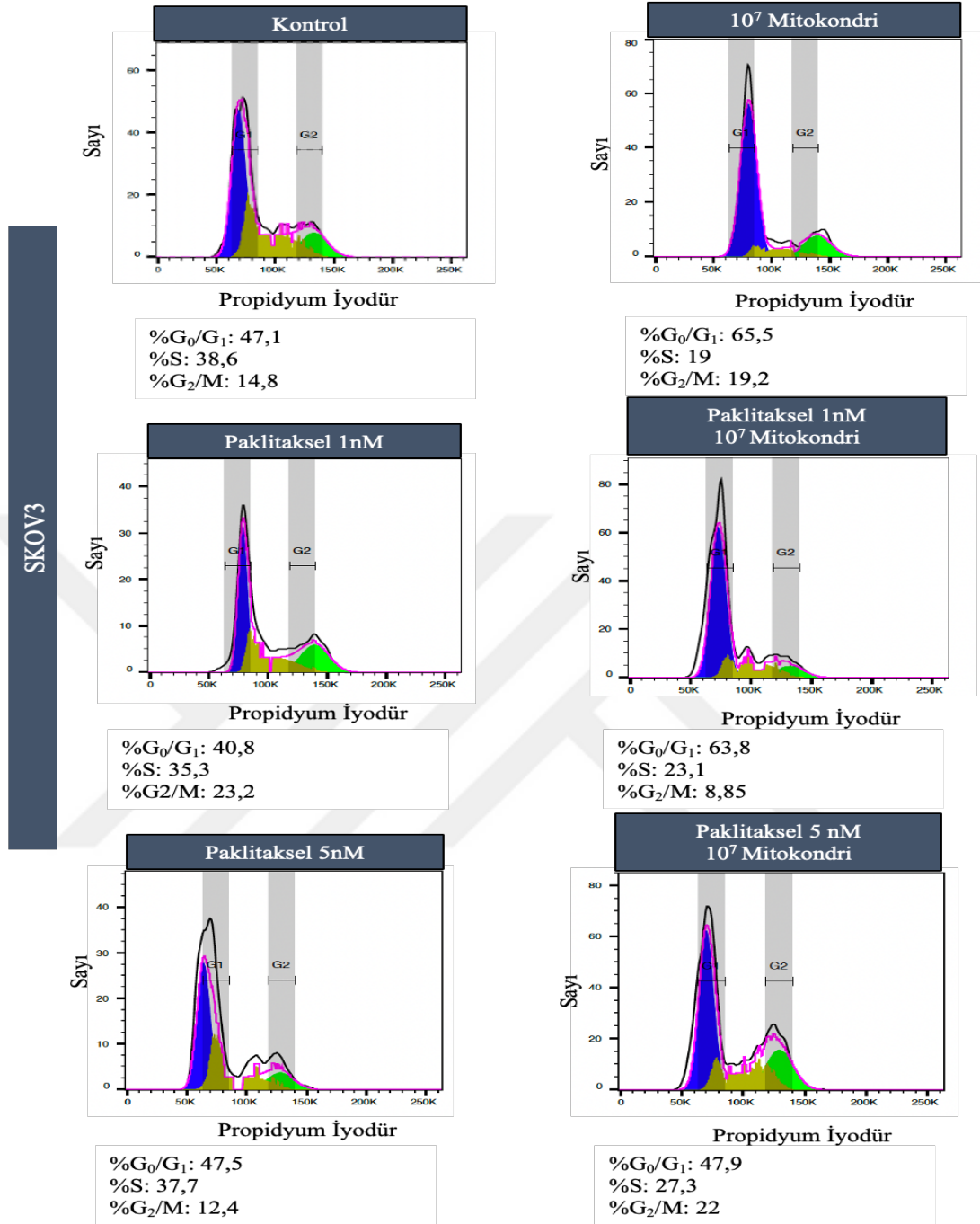
Bununla beraber mitokondri transplantasyonu ile uygulanan 1 nM paklitaksel hücre döngüsünü anlamlı olarak G₀/G₁ fazında durdururken (p<0,05) hücreler 5 nM ile tedavi edildiğinde yine hücre döngüsünde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 3.3).

SKOV3 hücrelerinde, sadece paklitaksel ile tedavi edilen grup ile, mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan paklitaksel ile tedavi edilen grubun hücre döngüsü üzerindeki etkileri kıyaslanmıştır.

Mitokondri transplantasyonu ile birlikte uygulanan 1 nM paklitaksel tedavisinin, sadece 1 nM paklitaksel tedavisine göre hücre döngüsünü anlamlı olarak G₀/G₁ fazında arttırdığı (p<0,001), ve G₂/M fazında azalttığı (p<0,01) görülmüştür. Fakat, mitokondri transplantasyonu ile birlikte uygulanan 5 nM paklitaksel tedavisi ve sadece 5 nM paklitaksel tedavisinin hücre döngüsüne etkisi arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır (Çizelge 3.3) (Şekil 3.14).

Çizelge 3.3. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan SKOV3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası hücre döngüsü analiz sonuçları. (Hücre döngüsü fazlarının değerleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.)

SKOV3						
	Kontrol	Paklitaksel 1 nM	Paklitaksel 5 nM	10 ⁷ Mitokondri		
				Kontrol	Paklitaksel 1 nM	Paklitaksel 5 nM
G ₀ /G ₁	47,00 $\pm$ 0,14	37,80 $\pm$ 3,39	44,30 $\pm$ 4,53	67,35 $\pm$ 2,62	60,55 $\pm$ 4,60	46,15 $\pm$ 2,47
S	39,60 $\pm$ 1,41	25,75 $\pm$ 2,19	40,95 $\pm$ 4,60	19,95 $\pm$ 1,34	26,30 $\pm$ 4,52	27,80 $\pm$ 0,71
G ₂ /M	12,65 $\pm$ 3,04	27,80 $\pm$ 2,69	11,90 $\pm$ 0,71	15,35 $\pm$ 5,44	9,25 $\pm$ 0,57	23,40 $\pm$ 1,98



Şekil 3.14. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan SKOV3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası hücre döngüsü analizinin akım sitometri cihazı plot görüntüleri.(Eğrinin altında kalan mor ile işaretli alan %G₀/G₁ fazını gösterirken, sarı ile işaretli alan %S fazını, yeşil ile işaretli alan %G₂/M fazını belirtmektedir.)

3.6.2. Annexin V-FITC/PI Bağlanma Analizi Bulguları

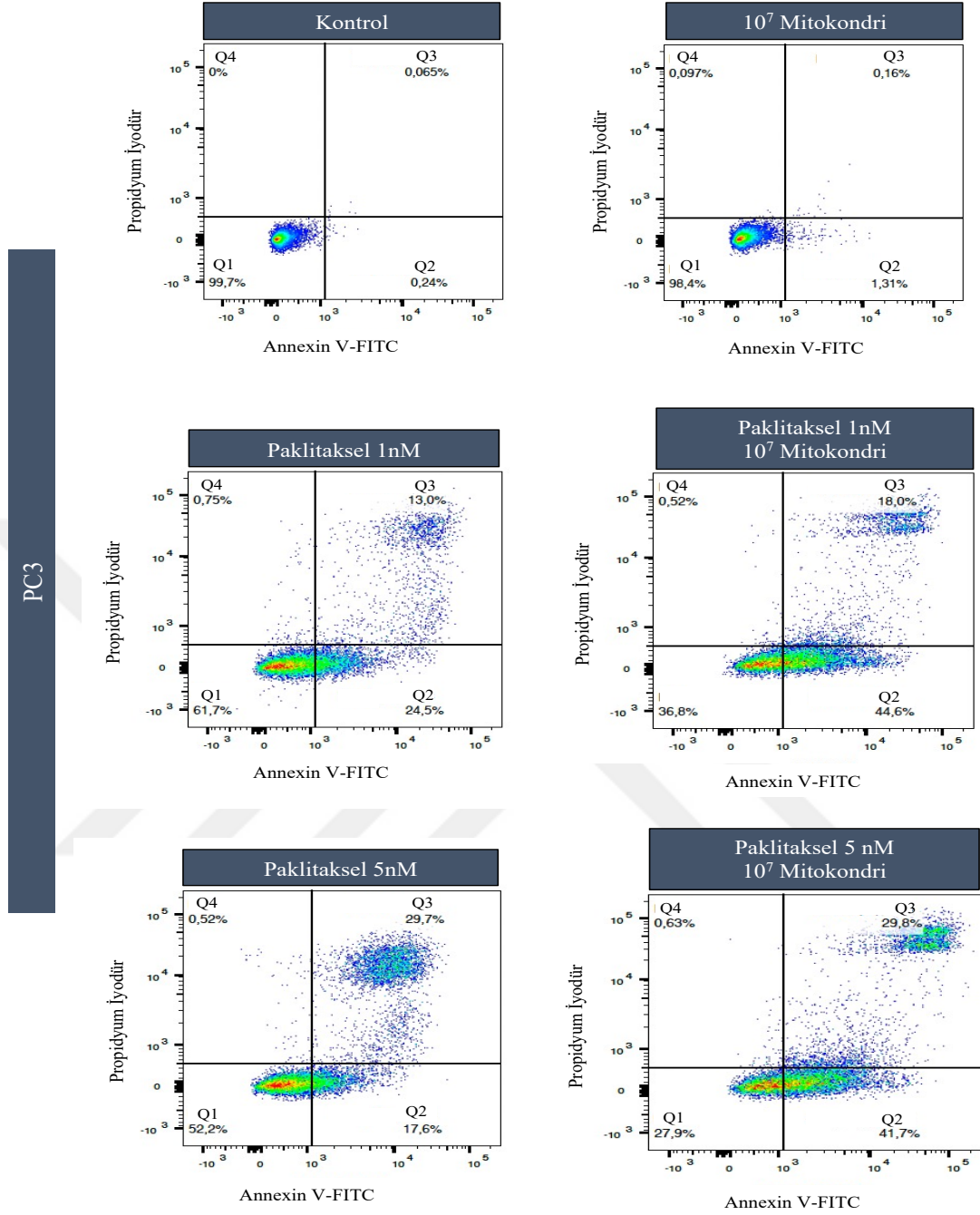
PC3 ve SKOV3 hücrelerinde, mitokondri transplantasyonunun paklitaksel ile uygulandığında Annexin V-FITC/PI bağlanması üzerine etkisi akım sitometri yöntemi ile incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde PC3 ve SKOV3 hücrelerinde sadece mitokondri transplantasyonu apoptotik hücre popülasyonunda anlamlı bir değişim göstermezken mitokondri transplantasyonu ile uygulanan paklitakselin her konsantrasyonu sadece paklitaksel uygulanmasına göre apoptotik popülasyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p<0,0001$) (Çizelge 3.4, Çizelge 3.5).

PC3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonunu takiben, paklitakselin sırasıyla 1 nM ve 5 nM dozundaki tedavisinin, paklitakselin sadece 1 nM ve 5 nM dozuna göre erken apoptotik popülasyon seviyelerini anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur ($p<0,01$, $p<0,001$). PC3 hücrelerinin mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan paklitaksel tedavisi ile sadece paklitaksel tedavisine ait Annexin V-FITC/PI bağlanmasının akım sitometri plot grafikleri Şekil 3.15 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan PC3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası değişen apoptotik popülasyon analizi sonuçları. (Q1 canlı hücre popülasyonunu, Q2 erken apoptotik popülasyonu, Q3 geç apoptotik popülasyonu belirtmektedir.) Apoptotik fazlarının değerleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

PC3

				10 ⁷ Mitokondri		
	Kontrol	Paklitaksel	Paklitaksel	Kontrol	Paklitaksel	Paklitaksel
		1 nM	5 nM		1 nM	5 nM
Q1	98,53 $\pm$ 1,49	59,70 $\pm$ 2,83	51,60 $\pm$ 0,85	98,88 $\pm$ 0,80	37,40 $\pm$ 0,85	28,10 $\pm$ 0,28
Q2	0,88 $\pm$ 0,70	26,50 $\pm$ 2,83	19,45 $\pm$ 2,62	0,88 $\pm$ 0,66	44,55 $\pm$ 0,07	41,40 $\pm$ 0,42
Q3	0,13 $\pm$ 0,08	12,95 $\pm$ 0,07	28,10 $\pm$ 2,26	0,12 $\pm$ 0,05	17,45 $\pm$ 0,78	29,85 $\pm$ 0,07



Şekil 3.15. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan PC3 hücrelerinde paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/PI bağlanması analizi ile akım sitometri cihazı plot görüntüleri. (Q1 canlı hücre popülasyonunu, Q2 erken apoptotik popülasyonu, Q3 geç apoptotik popülasyonu, Q4 ise ölü popülasyonu belirtmektedir.)

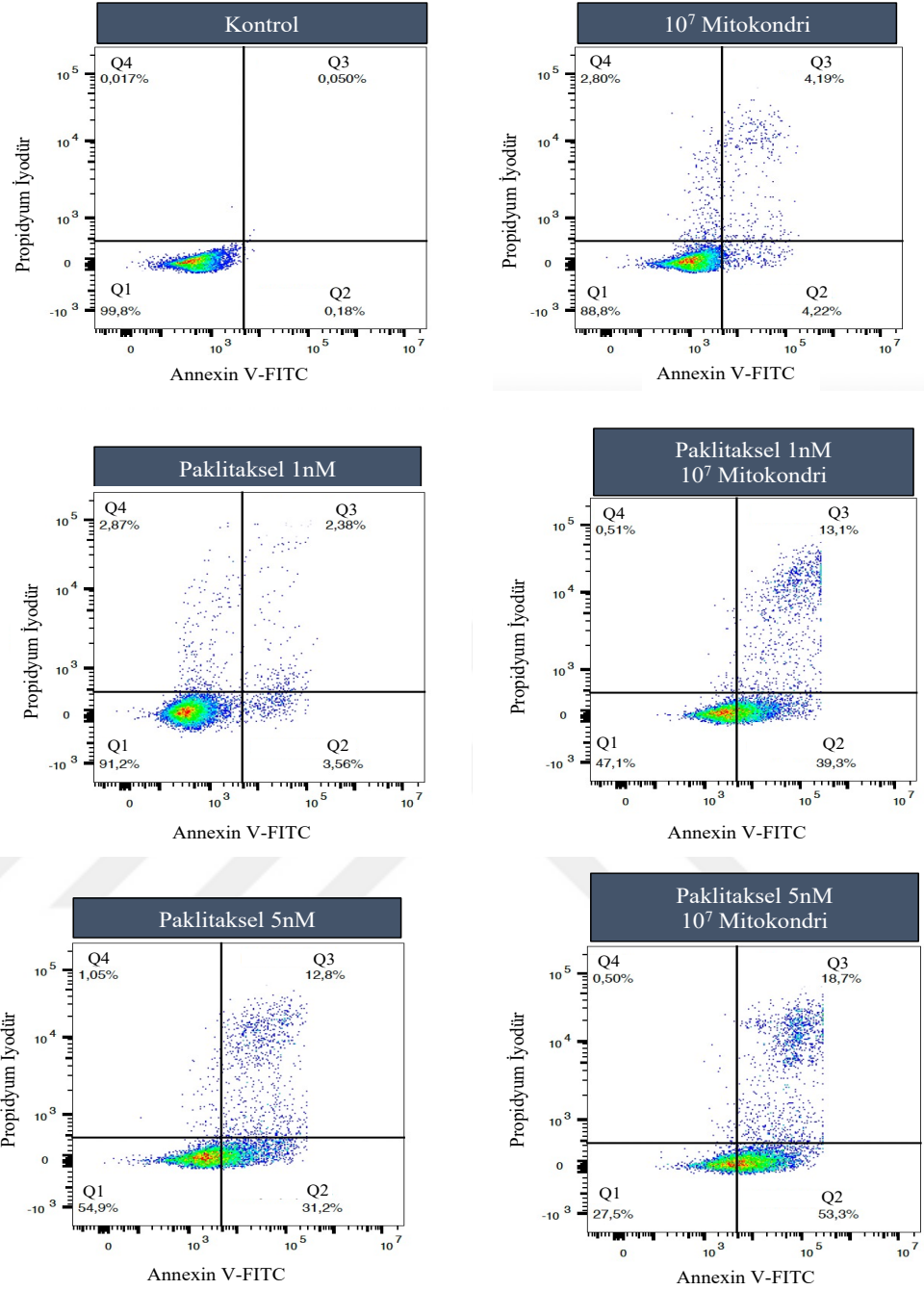
SKOV3 hücrelerinde mitokondri ile tedavi edilen hücrelere paklitakselin 1 nM ve 5 nM dozu ayrı ayrı uygulandığında, sadece paklitakselin 1 nM ve 5 nM dozuna göre erken ve geç apoptotik popülasyonu anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur ($p < 0,0001$, $p < 0,001$, $p < 0,05$). SKOV3 hücrelerinin mitokondri transplantasyonu,

sadece paklitaksel ile tedavisi ve mitokondri transplantasyonu ile birlikte paklitaksel tedavisine ait Annexin V-FITC/PI bağlanmasının akım sitometri plot grafikleri Şekil 3.16 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan SKOV3 hücrelerinde paklitaksel tedavisi sonrası değişen apoptotik popülasyon analizi sonuçları. (Q1 canlı hücre popülasyonunu, Q2 erken apoptotik popülasyonu, Q3 geç apoptotik popülasyonu belirtmektedir.) Apoptotik fazlarının değerleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

SKOV3

				10 ⁷ Mitokondri		
	Kontrol	Paklitaksel	Paklitaksel	Kontrol	Paklitaksel	Paklitaksel
		1 nM	5 nM		1 nM	5 nM
Q1	99,80 $\pm$ 0,00	93,65 $\pm$ 3,46	55,15 $\pm$ 0,25	89,50 $\pm$ 0,99	48,85 $\pm$ 2,47	27,55 $\pm$ 0,07
Q2	0,14 $\pm$ 0,06	2,86 $\pm$ 0,98	31,35 $\pm$ 0,21	3,98 $\pm$ 0,33	37,95 $\pm$ 1,91	52,95 $\pm$ 0,49
Q3	0,06 $\pm$ 0,02	1,51 $\pm$ 1,23	12,15 $\pm$ 0,92	4,00 $\pm$ 0,23	12,75 $\pm$ 0,49	19,00 $\pm$ 0,42

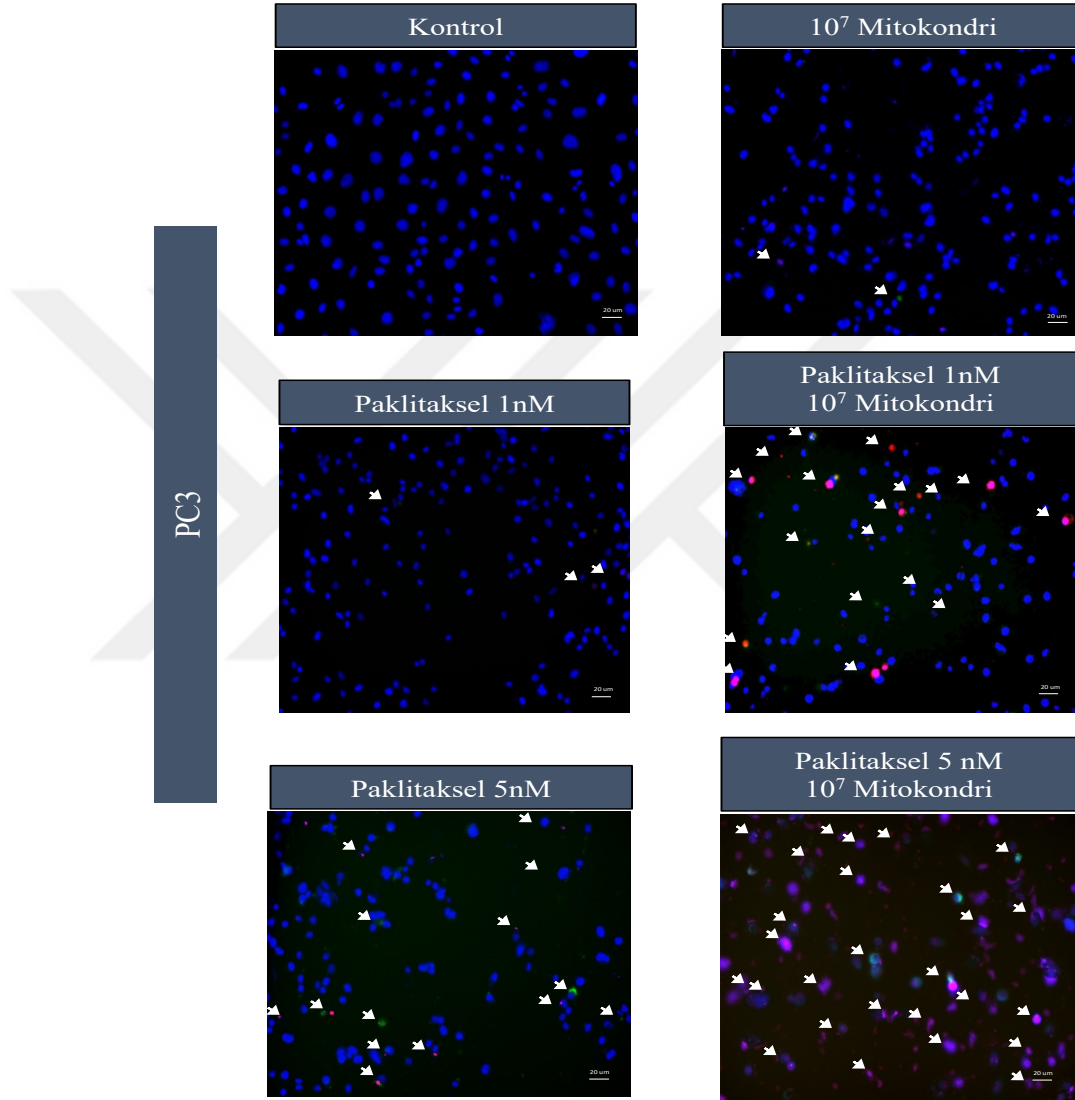


Şekil 3.16 Mitokondri transplantasyonu yapılan ve mitokondri transplantasyonu yapılmayan SKOV3 hücrelerinde paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/PI bağlanması analizi ile akım sitometri cihazı plot görüntüleri. (Q1 canlı hücre popülasyonunu, Q2 erken apoptotik popülasyonu, Q3 geç apoptotik popülasyonu, Q4 ise ölü popülasyonu belirtmektedir.)

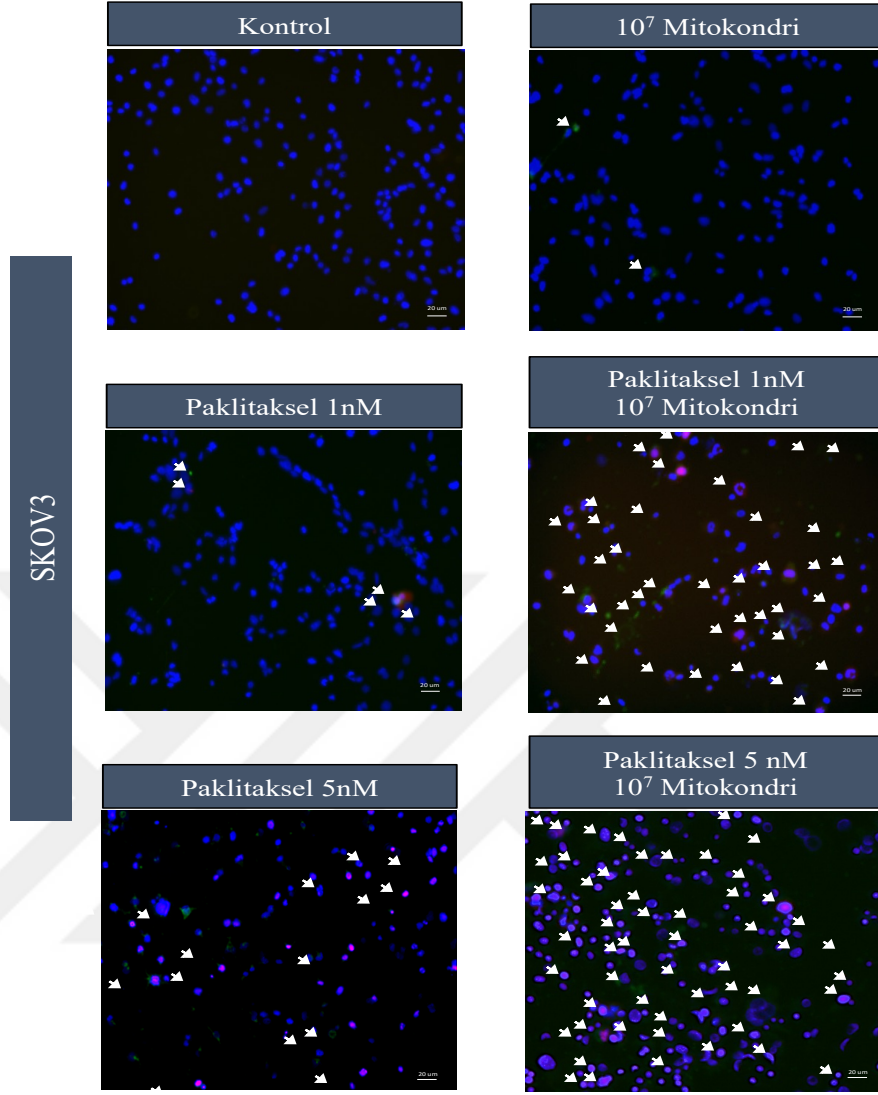
3.6.3. Floresan Görüntüleme Analizi Bulguları

PC3 ve SKOV3 hücrelerinde, mitokondri transplantasyonunu uygulanan paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/PI bağlanması üzerine etkisi floresan

mikroskopi yöntemi ile incelenmiştir. Mikroskop görüntüleri incelendiğinde PC3 ve SKOV3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan 1 nM ve 5 nM paklitaksel tedavisinin sadece paklitaksel tedavisine göre apoptotik popülasyon üzerindeki değişimi gösterilmiştir.



Şekil 3.17. PC3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonu ile paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/PI bağlanması üzerine etkisinin mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.18. SKOV3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonu ile paklitaksel tedavisinin Annexin V-FITC/ PI bağlanması üzerine etkisinin mikroskop görüntüleri.

4. TARTIŞMA

Patojenik nokta mutasyonları, çeşitli delesyonlar ve kopya sayısındaki değişiklikler de dahil olmak üzere mitokondride meydana gelen fonksiyon bozukluğunun çeşitli tümör tiplerinde kanserin progresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Cook ve Higuchi 2012). Bu nedenle, kanser tedavisinde, enerji metabolizması, hücre döngüsü, apoptotik hücre ölümü ve yaşamsal yollar üzerinde etkili olan mitokondrinin hedeflenmesi hayati önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında insan prostat ve over kanseri hücrelerine mitokondri transplantasyonun paklitaksel sensitivitesine etkisi araştırılmıştır.

Bulgularımıza göre mitokondri transplantasyonun başarılı olabilmesi ve transplante edilen hücrede etki gösterebilmesi için izole edilen mitokondrinin hala canlı, intakt ve solunum işlevlerini yerine getirebilmesi gerekmektedir. Çalışmada elde edilen TEM görüntüleri, izole edilen mitokondrinin membran bütünlüğünü koruduğunu, akım sitometri ve ATP analizi sonuçları ise izole edilen mitokondrinin canlılığını koruduğunu göstermiştir. Ayrıca, transmisyon elektron mikroskobu görüntülerine ve multisizer partikül sayacına göre HCF hücrelerinden izole edilen mitokondrinin boyutunun 0,5-1 μm arasında olduğu gösterilmiştir. Bulgularımız HCF hücreleri ile yapılan mitokondri izolasyon çalışmaları ile benzerlik göstermektedir (Cowan ve ark., 2017).

Çalışmamızda izole edilen mitokondrinin konsantrasyonundaki artışın ATP seviyesini ölü mitokondriye göre logaritmik bir şekilde anlamlı olarak arttırdığı ve en yüksek ATP seviyesine sahip olan mitokondri konsantrasyonun 1×10^7 olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda mitokondri transplantasyonu doz bağımlı olarak hücrel ATP seviyelerini arttırmış olup, 1×10^7 mitokondri miktarının en etkili doz olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde literatürde yer alan çalışmalar, izole edilen mitokondrinin farklı dozlarına göre ATP seviyelerini arttığını göstermiştir (Preble ve ark., 2014; Cowan ve ark., 2017). Çalışmamızda mitokondrinin başarılı olarak izole edildiği, izole edilen mitokondrinin, intakt, canlı ve solunum işlevselliğini koruduğu aynı zamanda

mitokondrinin canlılığının transplantasyondaki öneminin araştırılması için oluşturulan ölü mitokondri modelinin başarı ile meydana getirildiği gösterilmiştir.

Mitokondri izolasyonu gibi mitokondri transplantasyonunun doğru ve etkili yapılması da önem taşımaktadır. Çalışmamızda floresan mikroskop görüntüleri ile izole edilen mitokondrinin hücreler tarafından direkt ko-inkübasyon ile homojen olarak alındığı gösterilmiştir. Mitokondri transplantasyonu yapıldıktan sonra PC3 ve SKOV3 hücrelerinde, hücresel ATP seviyelerinin yine transplante edilen mitokondri dozuna bağımlı olarak artış gösterdiği ve en etkili dozun 1×10^7 olduğu bulunmuştur ($p < 0,0001$). Eliott ve ark. (2012), meme kanseri hücrelerine Cowan ve ark. (2017), ve Pacak ve ark. (2015), kardiyomiyositlere, Li ve ark. (2019), nöronlara direkt ko-inkübasyon ile mitokondri transplantasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalar, alıcı hücrelere aktarılan mitokondrilerin aktivitesini koruduğunu ve hala fonksiyonunu devam ettirdiğini ortaya koymaktadır.

Hücre proliferasyonu DNA'nın kopyalanarak aynı genetik yapıda iki yeni hücre meydana getirmesi olayı olarak tanımlanmaktadır (Matson ve Cook 2017). Bulgularımıza göre, mitokondrinin en etkili konsantrasyonu olan 1×10^7 mitokondri transplantasyonu prostat ve over kanseri hücrelerinde 72. saatte migrasyonu anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p < 0,0001$, $p < 0,001$). Fakat mitokondri transplantasyonu yapılan prostat ve over kanserlerinde proliferasyonda kontrole göre anlamlı fark bulunmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda Zhou ve ark. (2022), hepatoselüler karsinomada, Yu ve ark. (2022), melanomada, Chang ve ark. (2020), ortotopik meme kanseri primer tümör modelinde yaptıkları çalışmalarda mitokondri transplantasyonunun kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını gösterirken, Caicedo ve ark. (2015), meme kanseri hücrelerine mitokondri transplantasyonunun proliferasyonu ve invazyonu arttırdığını göstermişlerdir. Fakat, hücre proliferasyonunu daha açık araştırabilmek için hücre döngüsünün bilinmesi gerekmektedir.

Hücre döngüsü, ökaryotik hücrelerdeki en önemli ve temel süreçlerden birini temsil etmekte olup, hücreler döngüye bağlı olarak büyür ve bölünürler. Hücre

döngüsünün regülasyonu hücrenin hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Aynı zamanda hücre döngüsünün düzenlenmesinde oluşabilecek bozukluklar ve hücre döngüsünü kontrol etmede yer alan genlerdeki mutasyonlar tümör hücrelerinde sıklıkla görülmektedir. Hücre döngüsü analizi, anti-kanser bileşiklerinin etkisinin anlaşılmasında ya da hücre bölünme mekanizmalarının incelenmesinde önem arz etmektedir (Williams ve Stoeber 2012; Otto ve Sicinski 2017). Hücre döngüsü DNA ve gerekli proteinlerin sentezinin yapıldığı S fazı ve hücrenin bölünmesinin sağlandığı M fazı olmak üzere iki önemli faz ve bu fazlar arasında hücrenin bu evreleri tamamlayabilmesine zaman tanımak için boşluk fazları olan G₁ ve G₂ fazları olmak üzere 4 fazdan oluşmaktadır. Hücreler G₁ fazındayken eğer şartlar bölünmek için uygun değilse hücreler dinlenme fazı olan G₀ fazına girerek bu fazda günlerce kalabilmektedir (Alberts B 2002; Stallaert ve ark., 2021). Çalışmamıza göre, PC3 ve SKOV3 hücrelerindeki mitokondri transplantasyonu hücre döngüsünü G₀/G₁ fazında durdururken ($p<0,0001$) S fazında azalttığı ($p<0,001$, $p<0,0001$) gösterilmiştir. Zhou ve ark. (2022), kanser hücrelerindeki mitokondri transplantasyonunun hücre döngüsünü G₀/G₁ fazında durdurduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, Zong ve ark. (2016), kanser hücrelerindeki mitokondri disfonksiyonunun epitelial-mezenkimal geçişi hızlandırarak kanser hücrelerinde metastaza, invazyona ve kemoresistansa yol açtığını göstermişlerdir. Dolayısıyla mitokondri transplantasyonunun prostat ve over kanseri hücrelerinin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkisinin çalışmamızda belirtilen mitokondri transplantasyonu ile migrasyonda meydana gelen azalmanın olası nedeni olabileceği düşünülmüştür.

Apoptoz, normal gelişim sırasında, doku homeostazında ve bazı hastalık süreçlerinde önemli bir düzenleyici mekanizma olarak işlev gören temel bir hücre ölümüdür. Normal canlı hücrelerde fosfatidilserin (PS), hücre zarının sitoplazmik yüzeyi üzerinde bulunur. Apoptozun indüklenmesi ile, çoğu hücre tipinde fosfolipitlerin organizasyonunda hızlı değişiklikler meydana gelir, bu da PS'nin hücre yüzeyine translokasyonuna yol açar. PS'nin hücre yüzeyine translokasyonu, nükleer bozulma, DNA fragmentasyonu ve apoptoz ile ilişkilidir. Bu sebeple, apoptotik hücrelerin dış yüzeyi üzerindeki PS'ye bağlanan Annexin V-FITC kullanılarak apoptoz aşamaları belirlenebilmektedir (Steensma ve ark., 2003; Steensma ve ark.,

2003; Crowley ve ark., 2016). Çalışmamızda PC3 ve SKOV3 hücrelerine sadece mitokondri transplantasyonunun uygulamasının hücre canlılığına anlamlı şekilde etkisinin bulunmadığı ve tek başına mitokondri transplantasyonunun Annexin V-FITC/PI bağlanması ile apoptoz üzerinde anlamlı olarak etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Sun ve ark. (2019), yaptığı çalışmada mitokondri transplantasyonunun tek başına glial hücrelerde apoptoz üzerinde dramatik artış göstermediğini ortaya koymuştur. Fakat Yu ve ark. (2021), kadın ve erkek farelerden izole edilen mitokondrinin melanoma hücrelerinde apoptozu arttırdığını, Chang ve ark. (2019), meme kanseri tedavisinde mitokondri transplantasyonunun PI bağlanmasını arttırdığını ve böylece apoptozu arttırdığını göstermiştir. Çalışmamızda 1×10^7 mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan paklitakselin 1 nM ve 5 nM konsantrasyonlarının prostat ve over kanseri hücrelerinde total apoptotik popülasyonun sadece paklitaksel uygulanmasına göre anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. PC3 hücrelerinde mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan 1 nM ve 5 nM paklitakselin apoptoz üzerindeki etkisi sadece 1 nM ve 5 nM paklitaksel tedavisine göre ayrı ayrı karşılaştırıldığında, sadece erken apoptozda artış saptanmışken ($p < 0,01$, $p < 0,001$), SKOV3 hücrelerinde ise hem erken ($p < 0,0001$), hem de geç apoptotik hücre popülasyonunda artış görülmüştür ($p < 0,001$, $p < 0,05$).

Yapılan çalışmalar mtDNA transplantasyonu yapılan farelerde transplantasyonun immun sistemi etkileyerek doğal öldürücü hücreleri aktive ettiği ve rejeksiyona neden olduğunu (Ishikawa ve ark., 2010) ayrıca akut lenfoblastik lösemide mezenkimal kök hücrelerden adhezyon yolu ile mitokondri transferinin kemoresistansı arttırdığını ve bu hücreler arası mitokondri transferinin azaltılmasının kemosenitiviteyi artırarak akut lenfoblastik lösemnin tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (Wang ve ark., 2018). Benzer olarak Pasquier ve ark. (2013), mezenkimal kök hücreler ile kanser hücreleri arasındaki mitokondri transferinin kemoresistansı arttırdığını belirtmişlerdir. Fakat, bu tez çalışmasında mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan 1 nM paklitaksel tedavisinin sadece 5 nM paklitaksel tedavisine göre, uygulanan mitokondri konsantrasyonuna bağlı olarak prostat ve over kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı veya iki tedavi grubunun hücre canlılığına etkisinin arasında anlamlı bir

değişim bulunmadığı gösterilmiştir. Bu bulgulara göre mitokondri transplantasyonun prostat ve over kanseri hücrelerinde kemosensitiviteyi arttırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Chang ve ark. (2019), ile Elliott ve ark. (2012), mitokondri transplantasyonunun meme kanseri hücrelerinin paklitaksel, doksurobisine ve ve karboplatine olan sensitivitesini arttırdığını, Sun ve ark. (2019), insan astrosit hücrelerinden glial tümör hücrelerine mitokondri transferinin protein ekspresyonunu arttırarak, mitokondri bağımlı apoptotik yolları aktive ettiğini, glial tümör hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ve radyosensitiviteyi arttırdığını in vivo ve in vitro olarak yaptıkları çalışmalarda gösterilmişlerdir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Prostat ve over kanserleri erkek ve kadınlarda ürogenital sistemi etkileyen önemli kanser türlerinden olup prostat ve over kanseri tedavisinde erken teşhis ve tedavi hayati önem taşımaktadır. Tedavi edilecek kanser metastatik aşamada ise tedaviden etkili yanıt alınamayabilir. Ayrıca zamanla gelişebilecek olan olası kemoresistans kanser tedavisinin etkisini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu sebeple kanser tedavisinde kullanılan paklitakselin dozu önem kazanmakta olup mevcut kemoterapötik maddenin dozunu arttırmadan kanser metabolizmasına yönelik tedaviler hala araştırılmaktadır.

Kanserde, mitokondri metabolizmasında değişiklikler görülmektedir. Mitokondri transplantasyonu, alıcı hücrede biyoenerjetik profili değiştirerek mitokondriyal disfonksiyonun gözlemlendiği birçok patolojik durumda terapötik olarak kullanılmıştır. Çalışmamızın sonuçları, mitokondri transplantasyonunda uygulanacak olan mitokondrinin dozu ve canlılığının mitokondri transplantasyonunun etkisi için önemli olduğunu göstermiştir. Mitokondri transplantasyonu, 72. saatte PC3 ve SKOV3 kanser hücrelerinin hücresel migrasyonunu azaltmıştır. Mitokondri transplantasyonunun prostat ve over kanseri hücrelerinde migrasyona etkisinin nedeninin hücre döngüsünü G_0/G_1 ve S fazlarında etkilemesi olduğu düşünülmektedir. Tek başına mitokondri transplantasyonunun hücre canlılığı ve apoptoz üzerine anlamlı etkisi görülme de mitokondri transplantasyonu prostat ve over kanseri hücrelerinin paklitaksele karşı kemosensitivitesini arttırmıştır. Ayrıca her iki hücre hattında da mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan 1 nM paklitaksel tedavisi ile sadece 5 nM paklitaksel tedavisi arasında 72 saat boyunca hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan 1 nM paklitaksel tedavisinin total apoptozu sadece 5 nM paklitaksel tedavisine kıyasla anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında kanser tedavisinde, sağlıklı hücrelere toksik etki göstermediği önceki çalışmalarla kanıtlanan mitokondri transplantasyonunun

kullanılmasının prostat ve over kanseri hücrelerinde paklitaksel duyarlılığını arttırdığı gösterilmiş olup mitokondri transplantasyonunu takiben düşük doz paklitaksel tedavisinin yüksek doz paklitaksel tedavisine oranla hemen hemen aynı etkiyi gösterdiği kanıtlanmıştır. Aynı zamanda mitokondri transplantasyonunun migrasyona olan etkisinin prostat ve over kanserinin tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Transplante edilecek mitokondrinin canlılığı, alıcı hücrelerdeki mitokondrinin olası etkilerinin görülebilmesi için önem taşımaktadır. Mitokondriyal transplantasyon, mitokondri metabolizmasına bağlı hastalık türleri için umut verici bir terapötik strateji olabilir. Çalışmamızın kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik maddelerin kullanımının azaltılması ya da olası yan etki ve toksisitenin azaltılmasını destekleyerek kansere maruz kalan hastaların yaşam kalitesinin artırılmasına yardımcı olabileceğine dair ileride yapılacak çalışmalara yol göstereceği düşünülmektedir.

ÖZET

İnsan Prostat Karsinoma ve Over Adenokarsinoma Hücrelerine Kardiyak Fibroblast Hücre Kaynaklı Mitokondri Transplantasyonunun Paklitaksel Duyarlılığına Etkisinin Araştırılması

Prostat ve over kanserleri gelişmekte olan ülkelerde erkek ve kadın ürogenital sistemini etkileyen önemli kanserlerden olup, erken teşhis ve tedavi bu tür kanserlerde hayati önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar ile, kanserde görülen mitokondriyal disfonksiyonun, kanser prognozunu ve olası kemoresistansı etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında, prostat ve over kanser hücrelerine, sağlıklı mitokondri transplantasyonunun hücre döngüsüne, proliferasyona, migrasyona ve paklitaksel kemosenitivitesi üzerine etkisinin ilk kez aydınlatılması amaçlanmıştır.

Çalışmamız ana hatları ile kontrol ve mitokondri transplantasyonu yapılan hücre grubu olmak üzere ikiye ayrılmış olup, mitokondri transplantasyonun prostat ve over kanseri hücrelerinin hücre bölünme döngüsü, proliferasyonu, ve canlılığı üzerindeki olası etkileri incelenmiştir. Mitokondri transplantasyonunun prostat ve over kanseri hücrelerindeki paklitaksel sensitivitesi üzerine etkisinin bulunabilmesi için, ayrı ayrı paklitakselin etkili en düşük doz ve letal doz 50 (LD₅₀) tedavisinin hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkisi ile mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan paklitakselin hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkisi kıyaslanmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında izole edilen mitokondrinin canlı ve işlevini koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca, mitokondriyal transplantasyonun prostat ve over kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etki göstermediği; fakat, migrasyonu anlamlı bir şekilde azalttığı ve hücre döngüsünü değiştirdiği gösterilmiştir. Sonuçlarımız mitokondriyal transplantasyonun prostat ve over kanseri hücrelerinin paklitaksele olan kemoterapötik duyarlılığını önemli ölçüde artırdığını ve mitokondri transplantasyonunu takiben uygulanan düşük doz kemoterapi ile elde edilen hücre canlılığının, sadece yüksek doz kemoterapi ile elde edilen hücre canlılığı ile benzer seviyeler gösterdiğini saptamıştır. Tez çalışmamızdan elde edilen bulgular, mitokondriyal transplantasyonun, mitokondri metabolizmasına bağlı hastalık türleri için umut verici bir terapötik strateji olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: İnsan Kardiyak Fibroblast, Mitokondriyal Transplantasyon, Paklitaksel, PC3, SKOV3

SUMMARY

Investigation of the Effect of Human Cardiac Fibroblast Derived Mitochondria Transplantation on Paclitaxel Sensitivity in Human Prostate and Ovarian Carcinoma Cells

Prostate and ovarian cancers affect the male and female reproductive organs and are among the most common cancers in developing countries. Early diagnosis and treatment can be crucial in these cancers. Previous studies have suggested that mitochondrial dysfunction seen in cancer may affect cancer prognosis and possible chemoresistance. This thesis aimed to elucidate for the first time the effect of transplantation of mitochondria into cancer cells on cell cycle, proliferation, migration, and paclitaxel chemosensitivity in prostate and ovarian cancer cells.

This study was divided into two groups as control and mitochondria transplanted cells. The possible effects of mitochondria transplantation on the cell division cycle, proliferation, and viability of prostate and ovarian cancer cells were investigated. To determine the effect of mitochondria transplantation on paclitaxel sensitivity in prostate and ovarian cancer cells, the effect of the lowest and lethal dose 50 (LD₅₀) of paclitaxel treatment on cell viability and apoptosis, and the effect of paclitaxel administration following mitochondria transplantation on cell viability and apoptosis, were compared.

In conclusion, our study showed that the isolated mitochondria are still viable and respiration competent. In addition, it has been demonstrated that mitochondrial transplantation has no effect on cell proliferation but significantly alters the cell cycle and reduces migration in prostate and ovarian cancer cells. Our results further establish that mitochondrial transplantation significantly increases the chemotherapeutic sensitivity of paclitaxel and provides similar apoptotic levels with low-dose chemotherapy that achieved with high-dose chemotherapy. Based on these results, mitochondrial transplantation may be a promising therapeutic strategy for mitochondrial metabolism-dependent diseases.

Keywords: Human Cardiac Fibroblast, Mitochondrial Transplantation, Paclitaxel, PC3, SKOV3

KAYNAKLAR

- ADAM J, HATİPOĞLU E, O'FLAHERTY L, TERNETTE N, SAHGAL N, LOCKSTONE H, BABAN D, NYE E, STAMP GW, WOLHUTER K, STEVENS M, FISCHER R, CARMELIET P, MAXWELL PH, PUGH CW, FRIZZELL N, SOGA T, KESSLER BM, EL-BAHRAWY M, RATCLIFFE PJ, POLLARD J (2011). Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* **20**(4): 524-537.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2002). *Molecular Biology of the Cell. An Overview of the Cell Cycle*. New York, Garland Science.
- ALI POUR P, KENNEYA MC, KHERADVARI A (2020). Bioenergetics Consequences of Mitochondrial Transplantation in Cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc* **9**(7): e014501.
- ANDERSON RG, GHIRALDELIT LP, PARDEE S (2018). Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1870**(1): 96-102.
- ANVEKAR RA, ASCIOLLA JJ, LOPEZ-RIVERA E, FLOROS KV, IZADMEHR S, ELKHOLI R, BELBIN G, SIKORAJ AG, CHIPUK E (2012). Sensitization to the mitochondrial pathway of apoptosis augments melanoma tumor cell responses to conventional chemotherapeutic regimens." *Cell Death Dis* **3**: e420.
- ARORA T, MULLANGI S, LEKKALA MR (2022). Ovarian Cancer. Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567760/>, Güncellenme Tarihi: 4 Ocak 2022]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls; Yayınlanma Tarihi Ocak 2022.
- ASHTON TM, MCKENNA WG, KUNZ-SCHUGHART GLA, HIGGINS S (2018). Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* **24**(11): 2482-2490.
- BERRIDGE M, NEUZIL VJ (2017). The mobility of mitochondria: Intercellular trafficking in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **44 Suppl 1**: 15-20.
- CAICEDO A, FRITZ V, BRONDELLO JM, AYALA M, DENNEMONT I, ABDELLAOUI N, DE FRAIPONT F, MOISAN A, ANGEBAULT PROUTEAU C, BOUKHADDAOUI H, JORGENSEN C, VIGNAIS M (2015). MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Sci Rep* **5**, 9073
- CAREW JS, HUANG P (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* **1**: 9.
- CASTRO-VEGA LJ, BUFFET A, DE CUBAS AA, CASCON A, MENARA M, KHALIFA E, AMAR L, AZRIEL S, BOURDEAU I, CHABRE O, CURRAS-FREIXES M,

- FRANCO-VIDAL V, GUILLAUD-BATAILLE M, SIMIAN C, MORIN A, LETON R, GOMEZ-GRANA A, POLLARD PJ, RUSTIN P, ROBLEDO M, FAVIERA J, GIMENEZ-ROQUEPLO P (2014). Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum Mol Genet* **23**(9): 2440-2446.
- CELIK, A. BAKAR-ATES F (2021). "The confounding effect of interleukin-6 on apoptosis of MCF-7 cells through down-regulation of MMP-2/-9 mRNA expression." *Turkish Journal of Biochemistry* **46**(5): 549-555.
- CHANG JC, CHANG HS, WU YC, CHENG WL, LIN TT, CHANG HJ, KUO SJ, CHEN ST, LIU SL (2019). Mitochondrial transplantation regulates antitumour activity, chemoresistance and mitochondrial dynamics in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **38**(1): 1-16.
- CHANG JC, CHANG HS, WU YC, CHENG WL, LIN TT, CHANG HJ, CHEN ST, LIU S (2020). Antitumor Actions of Intratumoral Delivery of Membrane-Fused Mitochondria in a Mouse Model of Triple-Negative Breast Cancers. *Onco Targets Ther* **13**: 5241-5255.
- CHANG JC, LIU KH, LI YC, KOU SJ, WEI YH, CHUANG CS, HSIEHC M, LIU S (2013). Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. *Neurosignals* **21**(3-4): 160-173.
- CHEN DC, WANG Y (2019). Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. *Precis Clin Med* **2**(3): 152-165.
- CHEN HD, CHAN C (2017). Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. *Cell Metab* **26**(1): 39-48.
- CHEN L, LIN Y, KUNG J (2021). Targeting Mitochondrial OXPHOS and Their Regulatory Signals in Prostate Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(24).
- CHIU HY, TAY EXY, ONG DST, TANEJA R (2020). Mitochondrial Dysfunction at the Center of Cancer Therapy. *Antioxid Redox Signal* **32**(5): 309-330.
- CIVENNI G, CARBONE GM, CATAPANO CV (2019). Mitochondrial fission promotes self-renewal and tumorigenic potential in prostate cancer. *Mol Cell Oncol* **6**(5): e1644598.
- CLUNTUN AA, LUKEY MJ, CERIONE R A, LOCASALE JW (2017). Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer* **3**(3): 169-180.
- COOK C, HIGUCHI CM (2012). The awakening of an advanced malignant cancer: an insult to the mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta* **1820**(5): 652-662.

- COWAN DB, YAO R, THEDSANAMOORTHY JK, ZURAKOWSKI D, DEL NIDO PJ, MCCULLY JD (2017). Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells. *Scientific Reports* **7**(1): 17450.
- CROWLEY LC, MARFELL BJ, SCOTTN AP, WATERHOUSE J (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry." *Cold Spring Harb Protoc* **2016**(11).
- CSELENYAK A, PANKOTAI E, HORVATH EM, KISS L, LACZA Z (2010). Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol* **11**: 29.
- CUEZVA JM, KRAJEWSKA M, DE HEREDIA ML, KRAJEWSKI S, SANTAMARIA G, KIM H, ZAPATA JM, MARUSAWA H, CHAMORROJ M, REED C (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* **62**(22): 6674-6681.
- DANESI R, FIGG WD, REED E, MYERS CE (1995). Paclitaxel (taxol) inhibits protein isoprenylation and induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Mol Pharmacol* **47**(6): 1106-1111.
- DEY P, RATHOD M, DE A (2019). Targeting stem cells in the realm of drug-resistant breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)* **11**: 115-135.
- DING N, XIE Z, SHEN Y, LI J, GUO Y, FU Y, LIU Y, HAN J (2021). Insights into the Role of Oxidative Stress in Ovarian Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*
- DONG LF, KOVAROVA J, BAJZIKOVA M, BEZAWORK-GELETA A, SVEC D, ENDAYA B, SACHAPHIBULKIJ K, COELHO AR, SEBKOV A, RUZICKOVA A, TAN AS, KLUCKOVA K, JUDASOVA K, ZAMECNIKOVA K, RYCHTARCIKOVA Z, GOPALAN V, ANDERA L, SOBOL M, YAN B, PATTNAIK B, BHATRAJU N, TRUKSA J, STOPKA P, HOZAK P, LAM AK, SEDLACEK R, OLIVEIRA PJ, KUBISTA M, AGRAWAL A, DVORAKOVA-HORTOVA K, ROHLENA J, BERRIDGE MV, NEUZIL J (2017). Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *Elife* **6**.
- DOYLE LA, NELSON D, HEINRICH MC, CORLESS CL, HORNICK JL (2012). Loss of succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) expression is limited to a distinctive subset of gastric wild-type gastrointestinal stromal tumours: a comprehensive genotype-phenotype correlation study. *Histopathology* **61**(5): 801-809.
- DRAKE LE, SPRINGER MZ, POOLE LP, KIM CJ, MACLEOD KF (2017). Expanding perspectives on the significance of mitophagy in cancer. *Semin Cancer Biol* **47**: 110-124.
- ELLIOTT R, BARNETT B (2011). Ultrastructural Observation of Mitochondria in Human Breast Carcinoma Cells. *Microscopy and Microanalysis* **17**(S2): 194-195.

- ELLIOTT RL, JIANG XP, HEAD JF (2012). Mitochondria organelle transplantation: introduction of normal epithelial mitochondria into human cancer cells inhibits proliferation and increases drug sensitivity. *Breast Cancer Res Treat* **136**(2): 347-354.
- ERCAN G, KARLITEPE A, OZPOLAT B (2017). Pancreatic cancer stem cells and therapeutic approaches. *Anticancer research* **37**(6): 2761-2775.
- EROL A (2005). Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis. *Med Hypotheses* **65**(3): 525-529.
- FAN Z, YU H, CUI N, KONG X, LIU X, CHANG Y, WU Y, SUN L, WANG G (2015). ABT737 enhances cholangiocarcinoma sensitivity to cisplatin through regulation of mitochondrial dynamics. *Exp Cell Res* **335**(1): 68-81.
- FENO S, BUTERA G, VECCELLIO REANE D, RIZZUTO R, RAFFAELLO A (2019). Crosstalk between Calcium and ROS in Pathophysiological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* **2019**: 9324018.
- FINLEY LW, CARRACEDO A, LEE J, SOUZA A, EGIA A, ZHANG J, TERUYA-FELDSTEIN J, MOREIRA PI, CARDOSO SM, CLISH CB, PANDOLFI PP, HAIGIS MC (2011). SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell* **19**(3): 416-428.
- GARCIA-HEREDIA JM, CARNERO A (2020). Role of Mitochondria in Cancer Stem Cell Resistance. *Cells* **9**(7).
- GENTRIC G, MIEULET V, MECHTA-GRIGORIOU F (2017). Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. *Antioxid Redox Signal* **26**(9): 462-485.
- GOLLIHUE JL, PATEL SP, MASHBURN C, ELDAHAN KC, SULLIVAN PG, RABCHEVSKY AG (2017). Optimization of mitochondrial isolation techniques for intraspinal transplantation procedures. *J Neurosci Methods* **287**: 1-12.
- GUARAGNELLA N, GIANNATTASIO S, MORO L (2014). Mitochondrial dysfunction in cancer chemoresistance. *Biochemical pharmacology* **92**(1): 62-72.
- HALLOWS WC, YU W, SMITH BC, DEVRIES MK, ELLINGER JJ, SOMEYA S, SHORTREED MR, PROLLA T, MARKLEY JL, SMITH LM, ZHAO S, GUAN KL, DENU JM (2011). Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Mol Cell* **41**(2): 139-149.
- HAN D, ZHENG X, WANG X, JIN T, CUI L, CHEN Z (2020). Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Mediated Mitochondrial Transfer and the Therapeutic Potential in Treatment of Neurological Diseases. *Stem Cells Int* **2020**: 8838046.
- HAN XJ, YANG ZJ, JIANG LP, WEI YF, LIAO MF, QIAN Y, LI Y, HUANG X, WANG JB, XINHB, WAN YY (2015). Mitochondrial dynamics regulates hypoxia-induced

- migration and antineoplastic activity of cisplatin in breast cancer cells. *Int J Oncol* **46**(2): 691-700.
- HAN Y, CHO U, KIM S, PARK IS, CHO JH, DHANASEKARAN DN, SONG SY (2018). Tumour microenvironment on mitochondrial dynamics and chemoresistance in cancer. *Free Radic Res* **52**(11-12): 1271-1287.
- HANAHAN DR, WEINBERG A (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
- HERST PM, BERRIDG MV (2007) Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 170-177
- HORBAY R, BILYY R (2016). Mitochondrial dynamics during cell cycling. *Apoptosis* **21**(12): 1327-1335.
- HSU CC, TSENG LM, LEE HC (2016). Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression." *Exp Biol Med (Maywood)* **241**(12): 1281-1295.
- HSU MJ, KARKOSSA I, SCHAFER I, CHRIST M, KUHNE H, SCHUBERT K, ROLLE-KAMPCZYK UE, KALKHOF S, NICKEL S, SEIBEL P, VON BERGEN M, CHRIST B (2020). Mitochondrial Transfer by Human Mesenchymal Stromal Cells Ameliorates Hepatocyte Lipid Load in a Mouse Model of NASH. *Biomedicines* **8**(9).
- HUANG KH, HSU CC, FANG WL, CHI CW, SUNG MT, KAO HL, LI AF, YIN PH, YANGH M H, LEE C (2014). SIRT3 expression as a biomarker for better prognosis in gastric cancer. *World J Surg* **38**(4): 910-917.
- HUANG M, DU H, ZHANG L, CHE H, LIANG C (2018). The association of HIF-1 α expression with clinicopathological significance in prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Management and Research*, **10**, 2809-2816.
- ISHIKAWA K, TOYAMA-SORIMACHI N, NAKADA K, MORIMOTO M, IMANISHI H, YOSHIZAKI M, SASAWATARI S, NIIKURA M, TAKENAGA K, YONEKAWA H, HAYASHI J (2010). The innate immune system in host mice targets cells with allogenic mitochondrial DNA. *J Exp Med* **207**(11): 2297-2305.
- ISLAM MN, DAS SR, EMIN MT, WEI M, SUN L, WESTPHALEN K, ROWLANDS DJ, QUADRI SK, BHATTACHARYA S, BHATTACHARYA J (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med* **18**(5): 759-765.
- JANDOVA J, JANDA J, SLIGH JE. (2012). Changes in mitochondrial DNA alter expression of nuclear encoded genes associated with tumorigenesis. *Exp Cell Res* **318**(17): 2215-2225.

- JIANG D, CHEN FX, ZHOU H, LU YY, TAN H, YU SJ, YUAN J, LIU H, MENG W, JIN ZB. (2020). Bioenergetic Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and various Ocular Cells through the intercellular trafficking of Mitochondria. *Theranostics* **10**(16): 7260-7272.
- KAMPAN NC, MADONDO MT, MCNALLY OM, QUINN M, PLEBANSKI M (2015). Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int* **2015**: 413076.
- KANG MR, KIM MS, OH JE, KIM YR, SONG SY, SEO SI, LEE JY, YOO NJ, LEE SH (2009). Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer* **125**(2): 353-355.
- KATRANGI E, D'SOUZA G, BODDAPATI SV, KULAWIEC M, SINGH KK, BIGGER B, WEISSIG V (2007). Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human rho0 cells can improve respiratory function. *Rejuvenation Res* **10**(4): 561-570.
- KHANDRIKA L, KUMAR B, KOUL S, MARONI P, KOUL H K (2009). Role of Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Cancer letters*, **282**(2), 125.
- KIM S, KIM DH, JUNG WH, KOO JS (2013). Succinate dehydrogenase expression in breast cancer. *Springerplus* **2**(1): 299.
- KITANI T, KAMI D, KAWASAKI T, NAKATA M, MATOBA S, GOJO S (2014). Direct human mitochondrial transfer: a novel concept based on the endosymbiotic theory. *Transplant Proc* **46**(4): 1233-1236.
- KROEMER G, POUYSSEGUR J (2008) Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* **13**: 472-482.
- KUBINA R, KABALA-DZIK A, DZIEDZIC A, BIELEC B, WOJTYCZKA RD, BULDAK RJ, WYSZYNSKA M, STAWIARSKA-PIETA B, SZAFLARSKA-STOJKO E (2015). The Ethanol Extract of Polish Propolis Exhibits Anti-Proliferative and/or Pro-Apoptotic Effect on HCT 116 Colon Cancer and Me45 Malignant Melanoma Cells In Vitro Conditions. *Adv Clin Exp Med* **24**(2): 203-212.
- LEE W, CHOI HI, KIM MJ, PARK SY (2008). Depletion of mitochondrial DNA up-regulates the expression of MDR1 gene via an increase in mRNA stability. *Exp Mol Med* **40**(1): 109-117.
- LENGYEL E (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* **177**(3): 1053-1064.
- LI H, WANG C, HE T, ZHAO T, CHEN YY, SHEN YL, ZHANG X, WANG LL (2019). "Mitochondrial Transfer from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Motor Neurons in Spinal Cord Injury Rats via Gap Junction." *Theranostics* **9**(7): 2017-2035.

- LI S, MA J, WONG ST (2018). Chemoresistance in ovarian cancer: exploiting cancer stem cell metabolism. *Journal of Gynecologic Oncology*, **29**(2).
- LIU X, KATO Y, KANEKO MK, SUGAWARA M, OGASAWARA S, TSUJIMOTO Y, NAGANUMA Y, YAMAKAWA M, TSUCHIYA T, TAKAGI M (2013). Isocitrate dehydrogenase 2 mutation is a frequent event in osteosarcoma detected by a multi-specific monoclonal antibody MsMab-1. *Cancer Med* **2**(6): 803-814.
- LUKEY MJ, KATT WP, CERIONE RA (2017). Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov Today* **22**(5): 796-804.
- LUO Y, MA J, LU W (2020). The Significance of Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Int J Mol Sci* **21**(16).
- MA L, WANG R, DUAN H, NAN Y, WANG Q, JIN F (2015). Mitochondrial dysfunction rather than mtDNA sequence mutation is responsible for the multi-drug resistance of small cell lung cancer. *Oncol Rep* **34**(6): 3238-3246.
- MAES H, RUBIO N, GARG AD, AGOSTINIS P (2013). Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* **19**:428–46.
- MASUZAWA A, BLACK KM, PACAK CA, ERICSSON M, BARNETT RJ, DRUMM C, SETH P, BLOCH DB, LEVITSKY S, COWAN DB, MCCULLY JD (2013). Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**(7): H966-982.
- MATSON JP, COOK JG (2017). Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. *FEBS J* **284**(3): 362-375.
- MAYCOTTE P, MARIN-HERNANDEZ A, GOYRI-AGUIRRE M, ANAYA-RUIZ M, REYES-LEYVA J, CORTES-HERNANDEZ P (2017). "Mitochondrial dynamics and cancer." *Tumour Biol* **39**(5): 1010428317698391.
- MCCULLY JD, COWAN DB, PACAK CA, TOUMPOULIS IK, DAYALAN H, LEVITSKY S (2009). Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**(1): H94-H105.
- MCCULLY JD, LEVITSKY S, DEL NIDO PJ, COWAN DB (2016). Mitochondrial transplantation for therapeutic use. *Clin Transl Med* **5**(1): 16.
- MIZUTANI S, MIYATO Y, SHIDARA Y, ASOH S, TOKUNAGA A, TAJIRI T, OHTA S (2009). Mutations in the mitochondrial genome confer resistance of cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Sci* **100**(9): 1680-1687.
- MOHAMMADALIPOUR A, DUMBALI SP, WENZEL PL (2020). Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**:603292.

- MUCAJ V, SHAY JES, SIMON MC (2012). Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism. *Int J Hematol* **95**(5): 464-470.
- OTT C, DORSCH E, FRAUNHOLZ M, STRAUB S, KOZJAK-PAVLOVIC V (2015). Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits. *PLoS One* **10**(3): e0120213.
- OTTO T, SICINSKI P (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **17**(2): 93-115.
- PACAK CA, PREBLE JM, KONDO H, SEIBEL P, LEVITSKY S, DEL NIDO PJ, COWAN DB, MCCULLY JD (2015). Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. *Biol Open* **4**(5): 622-626.
- PALDINO E, TESORI V, CASALBORE P, GASBARRINI A, PUGLISI MA (2014). Tumor initiating cells and chemoresistance: which is the best strategy to target colon cancer stem cells? *Biomed Res Int* **2014**: 859871.
- PANTALEO MA, ASTOLFI A, URBINI M, NANNINI M, PATERINI P, INDIO V, SAPONARA M, FORMICA S, CECCARELLI C, CASADIO R, ROSSI G, BERTOLINI F, SANTINI D, PIRINI MG, FIORENTINO M, BASSO U, BIASCO G, GROUP GS (2014). Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFRα wild-type GIST. *Eur J Hum Genet* **22**(1): 32-39.
- PASQUIER J, GUERROUAHEN BS, AL THAWADI H, GHIABI P, MALEKI M, ABU-KAOUN N, JACOB A, MIRSHAHI M, GALAS L, RAFII S, LE FOLL F, RAFII A (2013). Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med* **11**: 94.
- PATRIKIDOU A, LORIOT Y, EYMARD JC, ALBIGES L, MASSARD C, ILEANA E, DI PALMA M, ESCUDIER B, FIZAZI K (2014). Who dies from prostate cancer? *Prostate Cancer Prostatic Dis* **17**(4): 348-352.
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD), National Cancer Institute (US).
- PHILLEY JV, KANNAN A, QIN W, SAUTER ER, M. IKEBE, K. L. HERTWECK, D. A. TROYER, O. J. SEMMESS. DASGUPTA (2016). "Complex-I Alteration and Enhanced Mitochondrial Fusion Are Associated With Prostate Cancer Progression." *J Cell Physiol* **231**(6): 1364-1374.
- PORPORATO PE, FILIGHEDDU N, PEDRO JMB, G. KROEMERL. GALLUZZI (2018). "Mitochondrial metabolism and cancer." *Cell Res* **28**(3): 265-280.

- PREBLE JM, PACAK CA, KONDO H, MACKAY AA, COWAN DB, MCCULLY JD (2014). Rapid isolation and purification of mitochondria for transplantation by tissue dissociation and differential filtration. *J Vis Exp*(91): e51682.
- QUINTANA-CABRERA R, QUIRIN C, GLYTSOU C, CORRADO M, URBANI A, PELLATTIERO A, CALVO E, VAZQUEZ J, ENRIQUEZ JA, GERLE C, SORIANO M E, BERNARDI P, SCORRANO L (2018). The cristae modulator Optic atrophy 1 requires mitochondrial ATP synthase oligomers to safeguard mitochondrial function. *Nat Commun* **9**(1): 3399.
- REHMAN J, ZHANG HJ, TOTH PT, ZHANG Y, MARSBOOM G, HONG Z, SALGIA R, HUSAIN AN, WIETHOLT C, ARCHER SL (2012). Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* **26**(5): 2175-2186.
- ROSSIGNOL R, GILKERSON R, AGGELER R, YAMAGATA K, REMINGTON SJ, CAPALDI RA (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* **64**(3): 985-993.
- SEMENZA GL (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**(5): 625-634.
- SEMENZA GL (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* **33**(4): 207-214.
- SHIN B, COWAN DB, EMANI SM, DEL NIDO PJ, MCCULLY JD (2017). Mitochondrial Transplantation in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol* **982**: 595-619.
- SHUKLA P, SINGH KK (2021). The mitochondrial landscape of ovarian cancer: emerging insights. *Carcinogenesis*, **42**(5), 663-671.
- SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A (2020). Cancer statistics, 2020." *CA Cancer J Clin* **70**(1): 7-30.
- SIMULA L, NAZIO F, CAMPELLO S (2017). The mitochondrial dynamics in cancer and immune-surveillance. *Semin Cancer Biol* **47**: 29-42.
- SJOBLOM T, JONES S, WOOD LD, PARSONS DW, LIN J, BARBER TD, MANDELKER D, LEARY RJ, PTAK J, SILLIMAN N, SZABO S, BUCKHAULTS P, FARRELL C, MEEH P, MARKOWITZ SD, WILLIS J, DAWSON D, WILLSON JK, GAZDAR AF, HARTIGAN J, WU L, LIU C, PARMIGIANI G, PARK BH, BACHMAN KE, PAPADOPOULOS N, VOGELSTEIN B., KINZLER KW, VELCULESCU VE (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **314**(5797): 268-274.
- SOBUE S, MIZUTANI N, AOYAMA Y, KAWAMOTO Y, SUZUKI M, NOZAWA Y, ICHIHARA M, MURATE T (2016). Mechanism of paclitaxel resistance in a human

- prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. *Biochem Biophys Res Commun* **479**(4): 808-813.
- SONEGO M, BALDASSARRE G (2020). A new role for IDH1 in the control of ovarian cancer cells metabolism and senescence. *Annals of Translational Medicine*, **8**(12).
- SPEES JL, OLSON SD, WHITNEY MJ, PROCKOP DJ (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1283-1288.
- SRINIVASAN S, GUHA M, KASHINA A, AVADHANI NG. (2017). Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1858**(8): 602-614.
- STALLAERT W, KEDZIORA KM, TAYLOR CD, ZIKRY TM, SOBON HK, TAYLOR SR, YOUNG CL, LIMAS JC, COOK J. G, PURVIS JE (2021). The structure of the human cell cycle. *bioRxiv*: 2021.2002.2011.430845.
- STEENSMA DP, TIMMM, WITZIG TE. (2003). Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. *Methods Mol Med* **85**: 323-332.
- STEENSMA DP, TIMM M, WITZIG TE (2003). Flow Cytometric Methods for Detection and Quantification of Apoptosis. Novel Anticancer Drug Protocols. J. K. Buolamwini ve A. A. Adjei. Totowa, NJ, Humana Press: 323-332.
- SUEN DF, NORRIS KL, YOULE RJ. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* **22**(12): 1577-1590.
- SUN C, LIU X, WANG B, WANG Z, LIU Y, DI C, SI J, LI H, WU Q, XUD, LI J, LI G, WANG Y, WANG F, ZHANG H (2019). Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: Transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. *Theranostics* **9**(12): 3595-3607.
- SUNG H, FERLAY J., SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**(3): 209-249.
- TREWARTHA D, CARTER K Advances in prostate cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 823–824 (2013).
- TRITSCHLER S, ERDELKAMP R, STIEF C, HENTRICH M (2017). Neuroendokrines Prostatakarzinom. *Der Urologe* **56**(11): 1475-1484.
- TSENG N, LAMBIE SC, HUYNH CQ, SANFORD B, PATEL M, HERSON PS, ORMOND DR (2020). "Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells improves neuronal metabolism after oxidant injury in vitro: The role of Miro1. *J Cereb Blood Flow Metab*: 271678X20928147.

- TSUYOSHI H, ORISAKA M, FUJITA Y, ASARE-WEREHENE M, TSANG BK, YOSHIDA Y(2020). Prognostic impact of Dynamin related protein 1 (Drp1) in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* **20**, 467.
- TYRAKIS PA, YURKOVICH ME, SCIACOVELLI M, PAPACHRISTOU EK, BRIDGES HR, GAUDE E, SCHREINER A, D'SANTOS C, HIRST J, HERNANDEZ-FERNAUD J, SPRINGETT R, GRIFFITHS JR, FREZZA C (2017). Fumarate Hydratase Loss Causes Combined Respiratory Chain Defects. *Cell Rep* **21**(4): 1036-1047.
- VAN DER BLIEK AM, SHEN Q, KAWAJIRI S (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(6).
- VAUPEL P, MAYER A (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* **26**(2): 225-239.
- VYAS S, ZAGANJOR E, HAIGIS MC (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, **166**(3), 555.
- WANG J, LIU X, QIU Y, SHI Y, CAI J, WANG B, WEI X, KE Q, SUI X, WANG Y, HUANG Y, LI H, WANG T, LIN R, LIU Q. XIANG AP. (2018). Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Hematol Oncol* **11**(1): 11.
- WANG L, LU B, HE M, WANG Y, WANG Z, DU L (2022). Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019. *Front Public Health* **10**: 811044.
- WARBURG, O. (1925). "The Metabolism of Carcinoma Cells1." *The Journal of Cancer Research* **9**(1): 148-163.
- WARBURG O. (1956). On the origin of cancer cells." *Science* **123**(3191): 309-314.
- WARBURG O, WIND F, NEGELEIN E (1926). Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klinische Wochenschrift* **5**(19): 829-832.
- WEBER A, KLOCKER H, OBERACHER H, GNAIGER E, NEUWIRT H, SAMPSON N., & EDER, I. E. (2018). Succinate Accumulation Is Associated with a Shift of Mitochondrial Respiratory Control and HIF-1 α Upregulation in PTEN Negative Prostate Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(7).
- WHITEHALL JC, GREAVES LC (2020). Aberrant mitochondrial function in ageing and cancer. *Biogerontology* **21**(4): 445-459.
- WIEDER SY, SERASINGHE MN, SUNG JC, CHOI DC, BIRGE MB, YAO JL, BERNSTEIN E, CELEBI JT, CHIPUK JE (2015). Activation of the Mitochondrial Fragmentation Protein DRP1 Correlates with BRAF(V600E) Melanoma. *J Invest Dermatol* **135**(10): 2544-2547.

- WILLIAMS GH, STOEGER K (2012). The cell cycle and cancer. *J Pathol* **226**(2): 352-364.
- WILLIAMSON SR, EBLE JN, AMIN MB, GUPTA NS, SMITH SC, SHOLL LM, MONTIRONI, HIRSCH RMS, HORNICK JL (2015). Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: detailed characterization of 11 tumors defining a unique subtype of renal cell carcinoma. *Mod Pathol* **28**(1): 80-94.
- WU Y, ZHANG X, WANG Z, ZHENG W, CAO H, SHEN W (2022). Targeting oxidative phosphorylation as an approach for the treatment of ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, **12**.
- XIA L, ZHANG H, WANG X, ZHANG X, NIE K (2021). The Role of Succinic Acid Metabolism in Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, **11**
- XIAO K, JIANG J, WANG W, CAO S, ZHU L, ZENG H, OUYANG R, ZHOU R, CHEN P (2013). Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* **30**(3): 1323-1328.
- XU K, CHEN G, LI X, WU X, CHANG Z, XU J, ZHU Y, YIN P, LIANG X, DONG L (2017). MFN2 suppresses cancer progression through inhibition of mTORC2/Akt signaling. *Sci Rep* **7**: 41718.
- XU R, SATO N, YANAI K, AKIYOSHI T, NAGAI S, WADA J, KOGA K, MIBU R, NAKAMURA M, KATANO M (2009). Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer Res* **29**(1): 261-270.
- YANG Y, VALERA VA, PADILLA-NASH HM, SOURBIER C, VOCKE CD, VIRA MA, ABU-ASAB MS, BRATSLAVSKY G, TSOKOS M, MERINO MJ, PINTO PA, SRINIVASAN R, RIED T, NECKERS L, LINEHAN WM (2010). UOK 262 cell line, fumarate hydratase deficient (FH-/FH-) hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma: in vitro and in vivo model of an aberrant energy metabolic pathway in human cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **196**(1): 45-55.
- YEH, SHH., KONG FL, LIN MH (2017). Visualization of Apoptosis: Annexin V Imaging. Personalized Pathway-Activated Systems Imaging in Oncology: Principal and Instrumentation. T. Inoue, D. Yang ve G. Huang. Singapore, Springer Singapore: 233-243.
- YEUNG SJ, PAN J, LEE MH (2008). Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* **65**(24): 3981-3999.
- YU W, DITTENHAFFER-REED KE, DENU JM (2012). SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status. *J Biol Chem* **287**(17): 14078-14086.
- YU Z, HOU Y, ZHOU W, ZHAO Z, LIU Z, FU A (2021). The effect of mitochondrial transplantation therapy from different gender on inhibiting cell proliferation of malignant melanoma. *Int J Biol Sci* **17**(8): 2021-2033.

- YUAN LL, LI L, LIU JN, MEI J, LEI CJ (2018). Down-regulation of miR-29a facilitates apoptosis of colorectal carcinoma cell SW480 and suppresses its Paclitaxel resistance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **22**(17): 5499-5507.
- ZENG X, HUANG Q, LONG SL, ZHONG Q, MO Z (2020). *DNA Cell Biol* **39**(8): 1401-1409.
- ZHANG YY, ZHOU LM (2012). Sirt3 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through reducing Mdm2-mediated p53 degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **423**(1): 26-31.
- ZHANG W, MENG Y, LIU N, WEN F, YANG T (2015). Insights into Chemoresistance of Prostate Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, **11**(10), 1160-1170.
- ZHAO J, ZHANG J, YU M, XIE Y, HUANG Y, WOLFF DW, ABEL PW, TU Y (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* **32**(40): 4814-4824.
- ZHOU W, ZHAO Z, YU Z, HOU Y, KEERTHIGA R, FU A (2022). Mitochondrial transplantation therapy inhibits the proliferation of malignant hepatocellular carcinoma and its mechanism. *Mitochondrion* **65**: 11-22.
- ZHOU Y, TOZZI F, CHEN J, FAN F, XIA L, WANG J, GAO G, ZHANG A, XIA X, BRASHER H, WIDGER W, ELLIS M, WEIHUA Z (2012). Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. *Cancer Res* **72**(1): 304-314.
- ZHU SS, ZHANG FY, XUE S, SUN XQ (2020). [Paclitaxel liposome for the treatment of castration-resistant prostate cancer]. *Zhonghua Nan Ke Xue* **26**(9): 788-792.
- ZONG W X, RABINOWITZ JD, WHITE E (2016). Mitochondria and Cancer. *Mol Cell* **61**(5): 667-676.