

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ESTERİFİKASYON REAKSİYONUyla anti-CD24 ANTİKORU KAPLANMIŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNE
YÖNLENDİRİLMESİ**

Gizem TURAÇ KARAKURT

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2024

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ESTERİFİKASYON REAKSİYONUyla anti-CD24 KAPLANMIŞ MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNE YÖNLENDİRİLMESİ**

Gizem TURAÇ KARAKURT

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

TÜSEB Acil Araştırma ve Geliştirme Projelerini Destekleme Programı

Proje No: 28142

Etik Kurul No: GOKAEK-2023/19.24

KOCAELİ

2024

ÖZET

Esterifikasyon Reaksiyonuyla anti-CD24 Kaplanmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Nöroblastoma Hücrelerine Yönlendirilmesi

Amaç: Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kanser hücreleri üzerindeki iki yönlü etkisi yapılan farklı çalışmalarla gösterilmiştir. MKH'ler bu etkilerini özellikle salgıladıkları sitokinler sayesinde parakrin yolla sergilemektedirler. Kök hücre başına düşen kanser hücresi oranının bu etkileşimde belirgin bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Sunulan bu tez çalışmasında MKH'lerin yüzeyine anti-CD24 antikoru bağlanarak yapılan modifikasyonla, MKH'lerinin nöroblastoma hücrelerine yönlendirilmesi, bu yönlendirme sürecinde MKH'lerin ve nöroblastoma hücrelerinin iki yönlü etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada palmitik asitin esterifikasyon reaksiyonu aracılığı ile palmitilenmiş IgG (PPG)'nin, hücrelerle karıştırılarak hücre zarına entegre olması sağlanmıştır. Hücreler üzerindeki toksik etkisi WST-8 testi ile değerlendirilmiştir. İkinci kaplama adımında, uygun antikorlar PPG kaplı hücrelere ilave edilmiş ve CD24 antikoru PPG'ye bağlanmıştır. Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücre (WJ-MKH)'lerin CD24 antikoru ile kaplanması sonrasında oluşturulan anti-CD24+WJ-MKH ile nöroblastoma hattı hücreleri (SH-SY5Y) arasında direkt ko-kültür yöntemi uygulanmıştır. Ko-kültürü takiben morfolojik analizler, WST-8, canlı-ölü boyaması, MDA analizi ve gen ekspresyon profilinin gerçek zamanlı PZR ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler ile direkt ko-kültürdeki kök hücre ve nöroblastoma hücreleri arasındaki etkileşimin canlılık, proliferasyon, ROS (Reaktif Oksijen Türleri) oluşumuna katkısı ve gen ekspresyon profillerine etkisi gibi parametreler incelenmiştir.

Bulgular: Kaplama için PPG'nin %80 canlılığı koruyan kültürdeki dozu 20 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ticari olarak elde edilen anti-CD24 antikoru ve PPG bileşiğinin saflaştırmaları FPLC yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin PPG kaplama verimi IgG-PE (565 nm) boyanmasıyla belirlenmiştir. WJ-MKH'leri anti-CD24 ile kaplama yönteminin hücreler için toksik olmadığı, hücrelerin çoğalma oranlarına etki etmediği ve hücreleri ölüme götürmediği gözlenmiştir. ROS miktarının anti-CD24+WJ-MKH ile yapılan ko-kültür gruplarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Deney grupları ile yapılan gen ekspresyon analizleri ile kök hücre belirteci, hücre çoğalması, apoptoz ve anti-kanser gibi etkiler incelenmiştir. Bu bulgular arasında anti-CD24+WJ-MKH bulunan gruplarda IL-1b, Ki-67,

BMP-2 ve IL-6 gibi genlerin ekspresyonlarında farklı paternler gözlenmiştir.

Sonuç: Hücreleri kaplama için uygun PPG dozu belirlenmiştir. WJ-MKH'leri PPG ile konjuge anti-CD24 antikoru ile kaplama sonrasındaki canlılık, proliferasyon, metabolik aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan analizlerin sonucunda, antikor ile kaplama işleminin hücreler üzerinde toksik bir etkisi olmadığı, antikor aracılı yönlendirme işleminin hücrelere zarar vermeden verimli bir şekilde gerçekleştirildiği görülmektedir. Anti-CD24+WJ-MKH ile nöroblastoma hücrelerinin ko-kültürü yapılan deney gruplarında kaplama yapılmayan gruplarla karşılaştırıldığında ROS miktarında artış gözlenmiştir. Ko-kültür gruplarında gerçekleşen gen ekspresyonu profillerindeki değişimler antikor kaplayarak yönlendirme işleminin hücrelerde bazı yolları değiştirdiğini ve MKH'lerin nöroblastoma (SH-SY5Y) hücreleri üzerinde normalden daha farklı etkilere sahip olmasını sağladığını göstermektedir. Gerçekleştirdiğimiz antikor aracılı yönlendirmenin kanser hücrelerini hedefleyen tedavi yaklaşımlarında potansiyele sahip olduğu öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Wharton Jeli Mezenkimal kök hücre, Nöroblastoma, SH-SY5Y, CD24, palmitasyon

ABSTRACT

Directing Mesenchymal Stem Cells Coated with Anti-CD24 Antibody by Esterification Reaction to Neuroblastoma Cells

Objective: The bidirectional effect of mesenchymal stem cells (MSCs) on cancer cells has been demonstrated in various studies. MSCs exhibit these effects through paracrine signaling, particularly via cytokines they secrete. It has been established that the ratio of tumor cells per stem cell plays a crucial role in this interaction, complicating the analysis due to the heterogeneous distribution of cells in culture. This thesis aims to redirect MSCs to neuroblastoma cells by modifying the surface of MSCs with anti-CD24 antibody and to investigate the mutual effects of MSCs and neuroblastoma cells during this direction process.

Method: In this study, palmitoylated IgG (PPG) was integrated into the cell membrane through an esterification reaction with palmitic acid. The toxic effect on cells was evaluated by WST-8 assay. For coating, appropriate antibodies were added to cells which coated with PPG, and CD24 antibodies were bound to PPG. Direct co-culture was applied between anti-CD24+WJ-MSCs (Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells) and neuroblastoma cells (SH-SY5Y) following the coating of WJ-MSCs with CD24 antibodies. Morphological analyses, WST-8, live-dead staining, MDA analysis, and real-time PCR analysis of gene expression profiles were performed after co-culture. Parameters such as vitality, proliferation, contribution to ROS formation, and effects on gene expression profiles between stem cells and neuroblastoma cells in direct co-culture were examined.

Results: The dosage of PPG that maintained 80% viability in culture was determined to be 20 µg/mL for coating. Commercially obtained purifications of anti-CD24 and PPG (IgG1) antibodies were performed using FPLC. The coating efficiency of cells with PPG-anti-IgG was determined by IgG-PE (565 nm) staining. It was observed that the anti-CD24 coating method on WJ-MSCs did not affect the cells' proliferation rates or lead to cell death. The co-culture groups with anti-CD24+WJ-MSCs exhibited higher levels of ROS. Gene expression analyses with experimental groups examined stem cell markers, cell proliferation, and anti-cancer effects. Among these findings, different pattern in IL-1b, Ki-67, BMP-2 and IL-6, expressions was observed in groups containing anti-CD24+WJ-MSCs.

Conclusion: An appropriate dosage of PPG for cell coating was determined. The vitality, proliferation, and metabolic activities of WJ-MSCs coated with PPG-conjugated anti-CD24 antibodies were examined. The analyses suggest that the antibody coating process did not have a toxic effect on the cells and that the antibody-mediated targeting was efficiently conducted without harming the cells. An increase in ROS levels was observed in co-culture groups with anti-CD24+WJ-MSCs compared to groups without coating. Changes in gene expression profiles in co-culture groups indicate that the antibody-mediated redirection altered certain pathways in cells, resulting in MSCs having different effects on SH-SY5Y cells than usual. It is anticipated that the antibody-mediated targeting we conducted holds potential in therapeutic approaches targeting cancer cells.

Keywords: Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells, Neuroblastoma, SH-SY5Y, CD24, palmitoylation

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin tamamında yanımda olan, bilimsel yaklaşımıyla tez konumda ilerlememi sağlayan, tüm bildiklerini içtenlikle benimle paylaşan, beni her durumda motive eden ve manevi anlamda destekleyen danışman hocam sayın **Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya yol göstericiliği için teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimi boyunca, bilgi ve tecrübeleriyle desteklerini esirgemeyen bölüm başkanım sayın **Prof. Dr. Yusufhan YAZIR**'a katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecinde bilgi ve deneyimlerini içtenlikle paylaşan hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda ÜNAL HALBUTOĞULLARI**'na, **Doç. Dr. Gülçin GACAR**'a, ve **Prof. Dr. Gürler AKPINAR**'a teşekkür ederim. Tez çalışmamın deneysel süreçlerindeki büyük yardımları olan **Hilal ÇAĞLAYAN**'a ve yine laboratuvar süreçlerindeki desteklerinden dolayı **Candan ALTUNTAŞ**, **Ahmet ÖZTÜRK**, **Tülin BURHANOĞLU**'na ve KÖGEM laboratuvarları sayesinde 13 yıl önce hayatıma giren ve hala hayatımda çok önemli yer kaplayan, tez sürecinde her ihtiyacım olduğunda destek olan değerli dostlarım **Dr. Ayşegül AÇIKSARI**, **Gülay ERMAN** ve **Çiğdem İNCİ AYDEMİR**'e, içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bu süreçte yardımlarını esirgemeyen, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim geniş ailemin her bir bireyine özellikle de beni tüm eğitim hayatım boyunca destekleyen annem **Ayla TURAÇ**, babam **Şükrü TURAÇ** ve kardeşim **Ahmetcan TURAÇ**'a sevgi ve şükranlarımı sunarım. Hayatta atmak istediğim her adımda sorgusuzca yanımda olan ve bana olan güvenini, desteğini her zaman hissettiğim yol arkadaşım, sevgili eşim **Arda KARAKURT**'a ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak bana rengarenk hayal gücü, neşesi ve bitmeyen merak duygusuyla ilham olan canım oğlum **Deniz KARAKURT**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam sırasında deneyleri gerçekleştirebilmem için olanak sağlayan Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)'ne ve 28142 numaralı projemizin kabul edilmesiyle maddi destek sağlayan TÜSEB Acil Araştırma ve Geliştirme Projelerini Destekleme Programı'na teşekkür ederim.

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Esterifikasyon Reaksiyonu ile anti-CD24 Kaplanmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Nöroblastoma Hücrelerine Yönlendirilmesi” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

06/02/2024

Gizem TURAÇ KARAKURT

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xx
1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Hücreler	1
1.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)	2
1.1.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Kanseri İlişkisi	4
1.2. Nöroblastoma	7
1.2.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı	7
1.4. CD24 Yüzey Belirtecisi	8
1.4.1. CD24 ve Kanseri İlişkisi	10
1.4.2. CD24 ve Nöroblastoma İlişkisi	11
1.5. MKH'ler Üzerinde Gerçekleştirilen Yüzey Modifikasyonları	12
2. AMAÇ	14
3. YÖNTEM	15

3.1. Deney Planı	15
3.2. WJ-MKH Kùltürü ve Karakterizasyonu	15
3.3. PPG-anti-CD24'ün Hazırlanması ve WJ-MKH'lerin Kaplanması (Palmitasyon Reaksiyonu ve anti-IgG Proteini Bağlanması)	16
3.3.1. PPG- anti-CD24'ün Hazırlanması	17
3.3.2. Saflaştırma	17
3.4. PPG Toksik Dozunun Belirlenmesi	19
3.4.1. Entegre Olan PPG'nin Hücre Membranında Belirlenmesi	20
3.5. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattının Kùltürü ve Karakterizasyonu	20
3.5.1. SH-SY5Y Hücre Hattı Kùltürü	20
3.5.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması	21
3.6. WJ-MKH ve SH-SY5Y Hücrelerinin Ko-Kùltür Çalışmaları	21
3.7. WJ-MKH ve SH-SY5Y Hücreleri Ko-Kùltür Sonrası Analizler	22
3.7.1. WST-8 Analizi	22
3.7.2. Morfolojik Analizler	23
3.7.3. MDA (Malondialdehit) Analizi	23
3.7.4. LDH (Laktat Dehidrogenaz) Analizi	24
3.7.5. Ko-Kùltür Sonrası Gen Ekspresyon Profilinin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi	24
3.7.6. DCFDA Boyaması- ROS (Reaktif Oksijen Türleri) Miktar Tayini	25
3.7.7. Apoptoz Tayini	25
3.7.8. CFSE Proliferasyon Analizi	26

3.8. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	27
4.1. WJ-MKH Kültürü ve Karakterizasyonu	27
4.2. PPG'nin Toksik Dozunun Belirlenmesi	28
4.3. FPLC Yöntemi ile PPG-anti-IgG Konjuge Molekül Saflaştırması	29
4.4. PPG Kaplama Veriminin Belirlenmesi	30
4.5. FPLC Yöntemi ile anti-CD24 Antikoru Saflaştırması	31
4.6. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Kültürü	32
4.7. Ko-Kültür Çalışmaları	33
4.6.1. Deney Grupları Arasında Direkt Ko-Kültür Sonrası Morfolojik Analizler	34
4.6.3. Canlı-Ölü (Live-Dead) Analizi	39
4.6.4. MDA ve LDH Analizi	42
4.6.5. ROS Analizi	43
4.6.6. Ko-Kültür Sonrası Gen Ekspresyon Profilinin Gerçek Zamanlı PZR ile Değerlendirilmesi	44
4.6.7. Apoptoz Tayini	49
4.6.8. CFSE Proliferasyon Analizi	50
5. TARTIŞMA	52
5.1. Sınırlılıklar	60
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	62
7. KAYNAKLAR	64
8. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

EKLER

Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

EK-1 Etik Kurul Onayı

Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

EK-2. Tez Denetleme Listesi

Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



SİMGELER VE KISALTMALAR

AD-MKH: Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler

CFSE: Karboksifloresein diasetat süksinimidil ester

DOC: Dioksikolik asit

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EKH: Embriyonik kök hücre

EpKH: Epitelyal kök hücre

FBS: Fetal sıgır serumu

GPI: Glikosil-fosfatidil-inositol

HER2: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2

HKH: Hematopoetik kök hücre

IDO: İndolamin 2,3-dioksijenaz

IL-1b: İnterferon-1 beta

IL-6: İnerlökin-6

IFN γ : İnterferon gamma

Kİ-MKH: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Ki-67: Antijen Kiel-67

μ m: Mikrometre

μ L: Mikrolitre

MAPK: Mitojenle etkinleşen protein kinaz

MCF-7: Meme kanseri hücre hattı

MKH: Mezenkimal kök hücreler

NK: Doğal öldürücü

NKH: Nöral kök hücreler

NO: Nitrik oksit

PBS: Fosfat tamponlu salin çözeltisi

PE: Fikoeritrin

PGE2: Prostoglandin E2

PPG: Palmitlenmiş protein G

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ROS: Reaktif oksijen türleri

sHLA-G5: Çözünebilir insan lökosit antijen G5

TGFb-1: Transforme edici büyüme faktör-beta-1

TNFa: Tümör nekroz faktörü alfa

TSG-6: TNF ile uyarılan gen 6

WJ: Wharton Jeli

WJ-MKH: Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücreler

WST-8: Suda çözünebilir tetrazolium Tuzu-8

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. WJ-MKH'lerin farklılaşma potansiyelleri, kendini yenileme ve immünmodülatör özellikleri (Marino ve ark., 2019).	3
Şekil 1.2. MKH'lerin pro-tümör ve anti-tümör aktiviteleri	5
Şekil 1.3. MKH'lerin tümör bölgesine göçü. Bu süreç temel olarak tümör mikroçevresinden salgılanan sitokinler veya kemokinler tarafından yönlendirilmektedir (Zhang, Huang, Su, ve Gao, 2021).	6
Şekil 1.4. MKH'lerin hedeflenen bölgelerin endotelyumuna olan yönelim özelliğini artırmak için kullanılan hem kovalent hem de kovalent olmayan yüzey modifikasyon tekniklerinin şematik diyagramı (Park ve ark., 2015).	12
Şekil 1.5. Membran interkalasyonu için protein A veya G'nin yüzey alkilasyonu. Protein A veya G bağlanmasıyla immünoglobulin (Ig) immobilizasyonu (Park ve ark., 2018).	13
Şekil 3.1. Ko-Kültür Öncesi Deney Planı.	15
Şekil 3.2. Hücrelerin antikör ile kaplanma süreci. (PA:Palmitik Asit)	16
Şekil 3.3. AKTA Prime Plus Liquid Chromatography System. HiTrap Desalting kolonu ile saflaştırma işlemi.	19
Şekil 4.1. WJ-MKH'lerin (P4) invert mikroskopta görüntüsü. (Ölçek çubukları; A:100 µm; B: 50 µm)	27
Şekil 4.2. WJ-MKH karakterizasyonu CD105, CD90, CD73, CD45, HLA-DR, CD34, hücre yüzey belirteçlerinin akım sitometri histogram grafikleri.	28
Şekil 4.4. Belirlenen PPG dozunun WJ-MKH'lar ile inkübasyon sonrası morfolojik görüntüleri. (Ölçek Çubukları: 100 µm)	29
Şekil 4.5. PPG'nin FPLC grafiği. Saflaştırma aşamasında PPG, IgG ve NHS-palmitik asidin akış sırasında çıktığı yer okla gösterilmiştir. Mavi ok: Absorbans değeri (OD280), Kırmızı ok: Ortam iletkenliği, Yeşil: PPG	30
Şekil 4.6. WJ-MKH'lerin PPG-anti-IgG kaplama verimi grafiği.	31

- Şekil 4.7. Anti-CD24 antikorunun FPLC grafiği. Mavi Ok: Absorbans değeri (OD280), Kırmızı ok: Ortam iletkenliği, Yeşil ok: Anti-CD24 Antikoru 32
- Şekil 4.8. SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattı 24 ve 48 saatlik kültür sonrası invert mikroskop ile görüntüleri (Ölçek çubukları; A,C:100 µm; B,D: 50 µm). 33
- Şekil 4.9. Direkt ko-kültür yöntemi ile kültüre edilen deney gruplarının şematik gösterimi. 34
- Şekil 4.10. Anti-CD24 kaplanmış ve kaplanmamış kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile 48 saatlik ko-kültür sonrası morfolojisi (1:1 Oran). (A, B, C) WJ-MKH:SH-SY5Y(1:1), (D, E, F) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1). (Ölçek Çubukları; A, D: 200 µm, B, E: 100 µm, C, F:50 µm) 34
- Şekil 4.11. Anti-CD24 kaplanmış ve kaplanmamış kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile ko-kültür sonrası morfolojisi (1:3 Oran). (A, B, C) WJ-MKH:SH-SY5Y(1:3), (D, E, F) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:3). Turuncu ok: MKH, Yeşil ok: Nöroblastoma Hücreleri (Ölçek Çubukları; A, D: 200 µm, B, E: 100 µm, C, F:50 µm) 35
- Şekil 4.12. Anti-CD24 kaplanmış ve kaplanmamış kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile ko-kültür sonrası morfolojisi (3:1 Oran). (A, B, C) WJ-MKH:SH-SY5Y (3:1), (D, E, F) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (3:1). (Ölçek Çubukları; A, D: 200 µm, B, E: 100 µm, C, F:50 µm) 36
- Şekil 4.13. Anti-CD24 kaplanmış ve kaplanmamış kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile 24 saatlik ko-kültür sonrası morfolojisi (1:1 Oran). (A, B) WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1), (C, D) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1). Kırmızı ok: Nöroblastoma hücreleri (Ölçek Çubukları; A: 20 µm, B-C: 50 µm, D:20 µm) 36
- Şekil 4.14. Deney grupları arasındaki hücre canlılık (WST-8) analizi grafiği. Kontrol grubuna göre yüzde hesaplamaları (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) 37
- Şekil 4.14a. Antikorla kaplama yapılmamış deney grupları arasında hücre canlılık (WST-8) analizi grafiği. Kontrol grubuna göre yüzde hesaplamaları 38
- Şekil 4.14b. Anti-CD24 antikoru ile kaplama yapılmamış deney grupları arasında hücre canlılık (WST-8) analizi grafiği. Kontrol grubuna göre yüzde hesaplamaları 38

Şekil 4.15. Live-Dead boyaması sonrası floresan mikroskop görüntüleri. (Ölçek çubukları; 200 µm.)	40
Şekil 4.16. Anti-CD24+MKH:SH-SY5Y ko-kültürü sonrası (3:1) oranındaki grupta koloni oluşumunun live-dead boyaması sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Turuncu ok: Anti-CD24+MKH, Beyaz ok: SH-SY5Y. (Ölçek çubuğu; 100 µm.)	41
Şekil 4.17. Tüm deney grupları arasında yapılan MDA analizi grafiği.	42
Şekil. 4.18. Tüm deney grupları arasında gerçekleştirilen LDH analizi grafiği.	43
Şekil 4.19. Deney grupları arasında yapılan DC-FDA boyaması sonucunda ROS seviyelerinin analiz grafiği.	44
Şekil 4.20. Ki-67 geninin ko-kültür sonrası deney grupları arasında karşılaştırmalı ekspresyon grafiği.	45
Şekil 4.21. TGFb1 geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.	45
Şekil 4.22. PDGFRb1 geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.	46
Şekil 4.23. BMP2 geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.	46
Şekil 4.24. p38a geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği	47
Şekil 4.25. IL-1b geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.	47
Şekil 4.26. IL-6 geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafikleri.	48
Şekil 4.27. TNFa geninin (3:1) oranındaki deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği	48
Şekil 4.28. GPX1 geninin (3:1) oranındaki deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği	49
Şekil 4.29. Belirlenmiş deney gruplarında (1:1) gerçekleştirilen apoptoz tayini. (A) Annexin V-7AAD analizinin akım sitometri dot plot grafiği; (B) Apoptoz tayininin nicelik grafiği.	50

Şekil 4.30. Belirlenmiş deney gruplarında gerçekleştirilen CFSE analizi. (A) CFSE analizinin akım sitometri histogram grafiği; (B) CFSE proliferasyon analizinin nicelik grafiği.

51



TABLÖLAR

Tablo 1.1. CD24 temelli terapiler (Altevogt, Sammar, Hüser, & Kristiansen, 2021).	9
Tablo 3.1. Saflaştırmada kullanılan FPLC parametreleri.	18
Tablo 3.2. Ko-kültür çalışmaları için kullanılan deney grupları ve oranları.	22



1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler kendini yenileme potansiyeli ve yüksek çoğalma kapasitesine sahip hücre tipleridir. Kök hücrelerin bu özellikleri onların uzun zamandır rejeneratif tıp ve hücrel tedaviler alanında ön sıralarda tercih edilmesini sağlamaktadır. Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre ve gelişimsel dönemlere göre olmak üzere farklı iki yöntemle sınıflandırılabilirler. Farklılaşma potansiyeline göre kök hücreler; totipotent, multipotent ve unipotent olarak ayrılırken, gelişimsel dönemlere göre kök hücreler ise embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak ayrılmaktadırlar.

Embriyonik kök hücreler (EKH), blastosistlerin iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücrelerdir ve ilk olarak 3,5 günlük fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilmiştir (Evans ve Kaufman, 1981). Bu hücreler yüksek oranda kendini yenileme ve çoğalma kapasitesine sahiptir. EKH'lerin rejeneratif olarak yüksek potansiyelleri olmasına rağmen farklılaşma sürecindeki teratom oluşturma özelliği bu rejeneratif potansiyelin kullanılmasına engel oluşturmaktadır (Lee, Park, Forget, ve Gaines, 2009). EKH'ler hastalık modellemeleri ve ilaç geliştirme deneyleri gibi *in vitro* çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat EKH'lerin tedavide direkt kullanımları etik nedenlerden dolayı yasalarla sınırlandırılmıştır (Taupin, 2006).

Embriyonik olmayan kök hücreleri kaynaklarına göre hematopoetik kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH), nöral kök hücreler (NKH) ve Epitelyal Kök Hücreler (EpKH) vb. olarak sınıflandırabiliriz. HKH'ler kemik iliğinde bulunur ve vücudun tüm kan hücrelerini üretmekten sorumludur. Kemik iliği nakli gerektiren durumlarda gibi hematolojik hastalıkların tedavisinde uzun yıllardır klinik uygulamalarda kullanılmışlardır (Terry ve ark., 2022).

NKH'ler beyin dokusunda bulunur ve yaşam boyunca nöronlar ve glia hücrelerinin üretiminden sorumludurlar. NKH'ler, Parkinson Hastalığı, omurilik hasarları gibi çeşitli sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için kullanılabilecek potansiyele sahiptir (Storch, Sabolek, Milosevic, Schwarz, ve Schwarz, 2004).

EpKH'ler cilt, bağırsak ve diğer organlarda bulunmakla beraber epitelyal dokuların yenilenmesi ve onarımından sorumludurlar. Yanık ve yara oluşumu gibi cilt hasarları için tedavi potansiyeline sahip olmalarının yanı sıra doku mühendisliği uygulamalarında da kullanılabilmektedirler (Chen, Przyborowski, ve Berthiaume, 2009).

1.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

MKH'ler, ilk defa Fridenshtein tarafından 1982 yılında tanımlanmıştır. MKH'ler rejeneratif tıp alanında büyük ilgi görmektedir. MKH'ler, farklı hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri ve immünmodülatör özellikleri nedeniyle çeşitli klinik deneylerde ve hücresel terapilerde kullanılmıştır (Zhao, Ren, ve Han, 2016). Bununla birlikte, birçok klinik araştırmanın odak noktasının, MKH'lerin *in vitro* çoklu potansiyel kapasitelerinden ziyade terapötik potansiyeline kaydığı bilinmektedir (Caplan, 2017).

MKH'ler karakteristik özellik olarak kültür yüzeyine yapışabilen, kolonizasyon gösteren, kendine özgü hücre yüzey antijen eksprese eden ve osteojenik, adipojenik, kondrojenik yönde farklılaşma eğilimi olan hücrelerdir. Bu hücrelerin izolasyon ve kültürünün kolay olması ayrıca yüksek *ex vivo* potansiyelinin olması tedavi edici özelliklerini öne çıkarmaktadır. MKH'ler immün düzenleyici özellikleri ve rejenerasyon kapasiteleri nedeniyle klinik kullanıma girerek Avrupa Birliği Tıp Ajansı (EMA) tarafından İlaç Hücre (Cell Drug) kapsamına alınmıştır. Üretim sürecinde hücrelerin önemli ölçüde manipülasyonuna veya bunların heterolog kullanımına dayalı olarak ileri tedavi tıbbi ürünleri (ATMP'ler) olarak sınıflandırılır (MSCs: Clinical Applications and European Regulatory Aspects, 2013). MKH'ler hücre yüzey belirteçleri yönünden CD13, CD29, CD44, CD90, CD73, CD105, CD46, CD166, HLA-ABC pozitif; CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR negatif olmaları ile karakterizedir (Dominici vd., 2006).

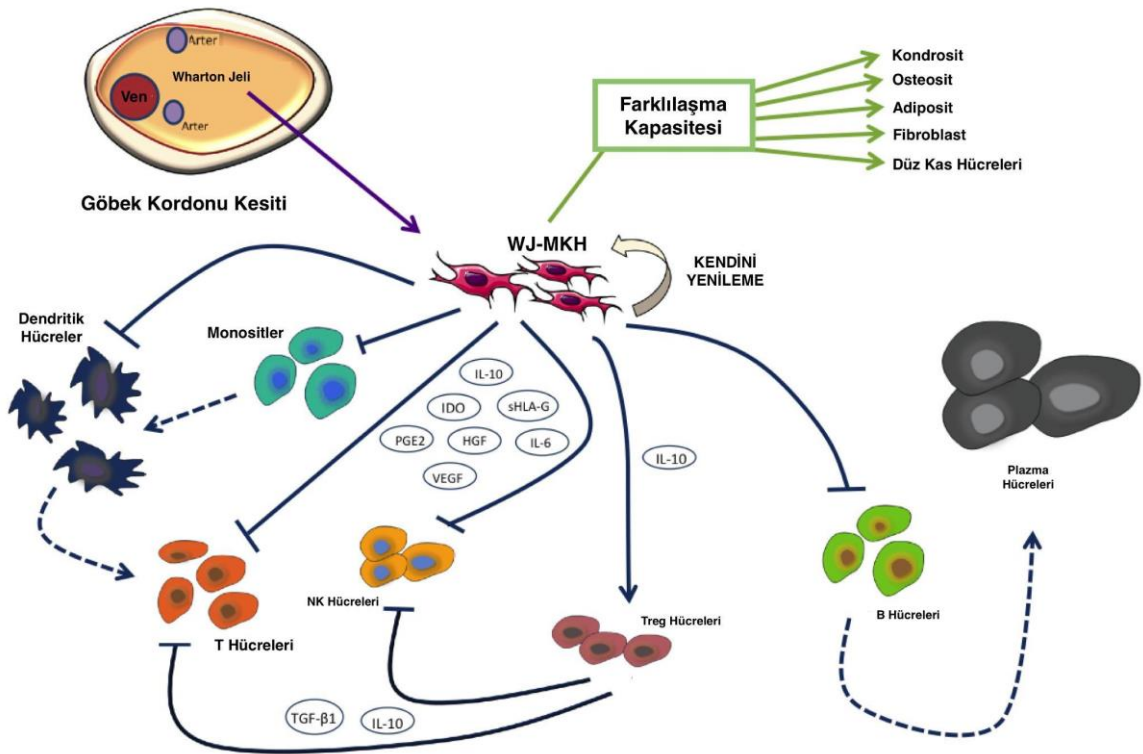
MKH'lerin kolay izolasyonları, *ex vivo* manipüle edilebilmeleri, immünolojik olarak etkileri, hasarlı bölgeye göç edebilme yetenekleri ve farklı hücre dizilerine farklılaşma kapasiteleri hücresel tedavi amaçlı kullanımları açısından onları önemli kılmaktadır. MKH'lerde yapılan genetik müdahaleler bu hücrelerin sağ kalım süresini, engraftmanlarını ve hasarlı bölgeyi iyileştirme kapasitelerini geliştirmeyi amaçlamaktadır (Hodgkinson, Gomez, Mirotso, ve Dzau, 2010). MKH'lerin hasarlı bölgeye göç ederek o bölgedeki

hücreyle füzyon yeteneğine sahip olması da doku tamirine katkı sağlamakta ve birçok araştırma için yeni bakış açıları sağlamaktadır (Fu ve ark., 2019).

1.1.2.1. Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (WJ-MKH)

Wharton Jeli (WJ), Thomas Wharton tarafından ilk defa 1656 tanımlanmıştır. Bu doku amniyotik epitel ile umbilikal damarlar arasında yer alan göbek kordonunun mukoza bağ dokusudur. McElreavey, 1991 yılında MKH'leri göbek kordonunun WJ kısmından izole eden ilk kişidir (McElreavey, Irvine, Ennis, ve McLean, 1991).

Embriyonik kök hücrelerle yakın bir ontogenetik ilişkiye sahip oldukları için, ekstra embriyonik dokudan türetilen mezenkimal kök hücrelerin immün ayrıcalıklı özelliklere ve daha geniş bir multipotent plastisiteye sahip oldukları ve düşünülmektedir (Pappa ve Anagnou, 2009). Üstelik ekstra embriyonik dokuların doğumdan sonra atılması, bu hücrelerin kolay izole edilebilmeleri ve etik sorunlar olmadan kullanılabilmesi avantaj sağlamaktadır.



Şekil 1.1. WJ-MKH'lerin farklılaşma potansiyelleri, kendini yenileme ve immünmodülatör özellikleri (Marino ve ark., 2019).

WJ-MKH'ler farklı mekanizmalar yoluyla B hücreleri, T hücreleri ve Doğal Öldürücü (NK) hücrelerin immünsüpresyonuna aracılık eder. MKH'lerin salgıladığı IDO,

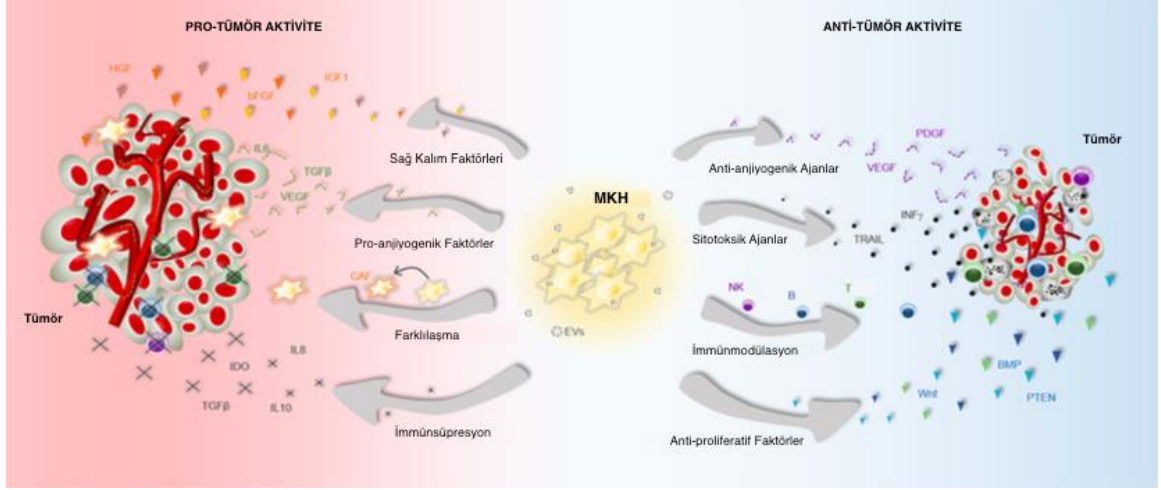
PGE2, sHLA-G5 gibi çözümler faktörler, T hücre ve NK hücrelerinin fonksiyonlarını baskılayabilmektedir. Ek olarak MKH'ler, dendritik hücreleri (DC) inhibe ederek ve regülatör T hücrelerinin (Treg'ler) artmasını indükleyerek dolaylı olarak immün baskılamaya aracılık edebilir (Şekil 1.1).

Yapılan bir çalışmada WJ-MKH'ler, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH), adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH) ve adet kanından üretilen MKH'ler ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda WJ-MKH'lerin daha yüksek proliferatif kapasite gösterdiği bildirilmiştir. WJ-MKH'ler, daha az çevresel müdahaleye, yani dokular üzerindeki hasar geçmişi ve yaşam tarzından kaynaklanan etkilere daha az maruz kalan, korunan bir yenidoğan dokusundan türetilmiş çok genç hücrelerdir. Bu durum daha homojen bir hücre popülasyonunun elde edilmesini sağlayarak terapötik uygulamaların verimini artırabilir (Paladino, De Rodrigues, Da Silva, ve Goldberg, 2019).

WJ'den türetilen kök hücrelerin terapötik faydası, bu hücrelerin rejeneratif ve immünmodülatör potansiyellerinden kaynaklanmaktadır. WJ-MKH'lerin ayrıca Kİ-MKH'lere kıyasla daha güçlü immünmodülatör özellikler sağladıkları düşünülmektedir (D. W. Kim ve ark., 2013).

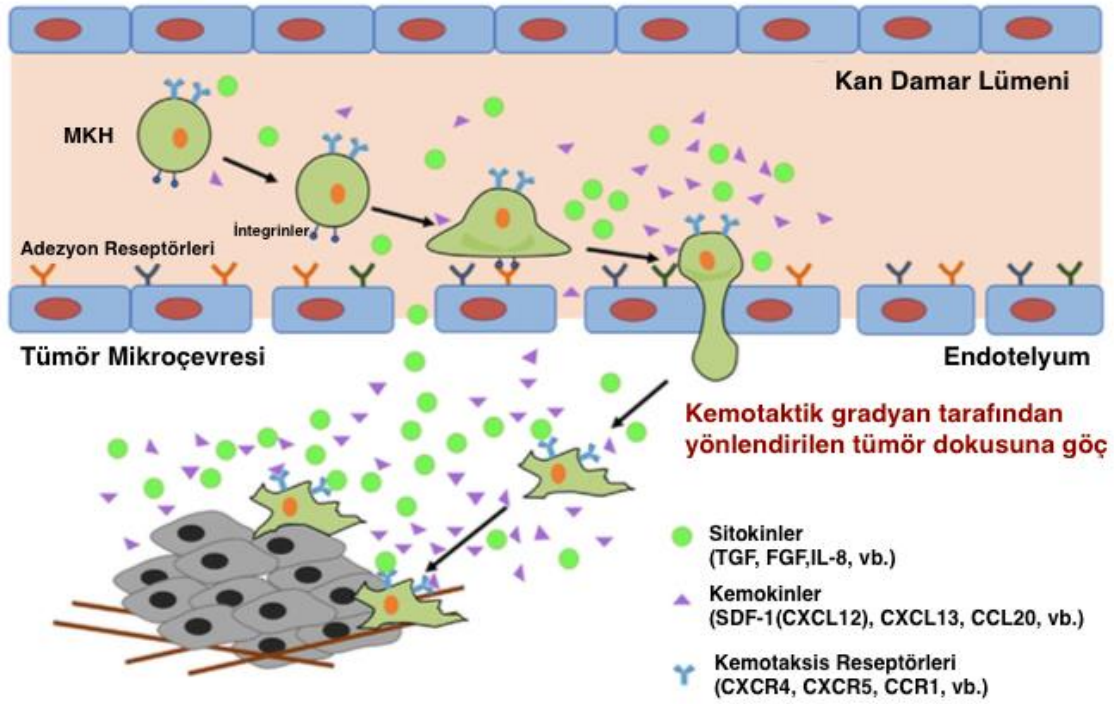
1.1.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Kanseri İlişkisi

MKH'ler tümör hücreleriyle karşılaştıklarında dualistik yani iki yönlü bir davranış sergilemektedirler. Bazı çalışmalarda MKH'lerin anti-tümörojenik özellikleri gösterilirken, bazı çalışmalarda ise pro-tümörojenik özellikleri gösterilmektedir (Musiał-Wysocka, Kot, ve Majka, 2019) (Şekil 1.2). MKH'lerin pro-tümörojenik etkilerinin altında yatan potansiyel mekanizmalar şunları içerebilir: (1) fibroblastlar, perisitler ve diğer bağ dokuları dahil olmak üzere kanserle ilişkili hücreler bileşenlere farklılaşarak kanser mikroçevresine katkıda bulunmak; (2) nörojenik ve anjiyojenik faktörlerin (örn. VEGF; vasküler endotelyal büyüme faktörü) salgılanması yoluyla neovaskülarizasyonun artırılması; (3) kanser hücrelerinin büyümesini teşvik eden büyüme faktörlerinin üretilmesi; (4) metastazı arttırmak ve kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını arttırmak için çözümler faktörlerin serbest bırakılması; (5) bağışıklık sisteminin kanser gelişimini destekleyecek şekilde düzenlenmesi (Yu, Chan, Fung, ve Chan, 2021).



Şekil 1.2. MKH'lerin pro-tümör ve anti-tümör aktiviteleri (Hmadcha, Martin-Montalvo, Gauthier, Soria, ve Capilla-Gonzalez, 2020).

MKH'lerin hedefe yönelik tedavilerde birçok tümör tipinde aracı olarak kullanımları son zamanlarda oldukça öne çıkmaktadır. IFN-1 β ifade eden AD-MKH'lerin MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) hücrelerinin büyümesini *in vitro* koşullarda baskıladığı gösterilmiştir (Ryu ve ark., 2014).



Şekil 1.3. MKH'lerin tümör bölgesine göçü. Bu süreç temel olarak tümör mikroçevresinden salgılanan sitokinler veya kemokinler tarafından yönlendirilmektedir (Zhang, Huang, Su, ve Gao, 2021).

MKH'ler kanser hücreleri ile direkt temas veya çözünür faktörleri (PGE2, IDO, TSG6, NO ve TGF- β) salgılayarak parakrin sinyallerle T lenfositlerin, antijen sağlayan hücrelerin ve NK'ların proliferasyonunu, aktivasyonunu ve etkilerini, interferon-gamma (IFN γ) üretimini regüle edebilmektedirler (Terzioğlu Uşak ve ark., 2017). Nöroblastoma ile ilgili yapılan bir çalışmada MKH'lerin sistemik olarak uygulanması sonucunda tümör büyümesini ve sağ kalımını etkilemezken, intratümöral uygulanmasıyla nöroblastoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmesi yoluyla tümör büyümesini azalttığı ve bu yolla tedavi edilen farelerde sağ kalım süresini uzattığı gösterilmiştir (Bianchi ve ark., 2012).

MKH'ler ile kanser hücreleri arasındaki etkileşim karmaşık ve çok yönlüdür. Doğrudan etkileşimler hücre membran proteinleri etkileşimlerini, trogositozu ve hücre füzyonunu içerirken, dolaylı etkileşimler mRNA'ların ve proteinlerin salınımını, ayrıca büyüme faktörleri ve metabolitler gibi çözünebilen bileşenleri içermektedir (Melzer, von der Ohe, ve Hass, 2018 ; Melzer, Yang, ve Hass, 2016). Bu etkileşimler her iki hücre tipinde de fonksiyonel değişikliklere yol açabilir. Böylece kanser kök hücre nişi oluşturulmasına ve yeni tümör hücre popülasyonlarının ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir. MKH'ler aynı zamanda kanser ilerlemesini, tümör büyümesini ve metastazı

destekleyebilen ya da inhibe edebilen çeşitli hücre sinyal yollarını aktive eden faktörler aracılığıyla etkileyebilir (Torsvik ve Bjerkvig, 2013).

1.2. Nöroblastoma

Nöroblastoma adrenal medulla ve sempatik ganglionlarda görülen, nöral krista kökenli bir tümördür. Nöroblast adı verilen olgunlaşmamış sinir hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğaldığında ortaya çıkar. Adrenal bezler, karın, göğüs, boyun ve pelvis de dahil olmak üzere vücudun çeşitli yerlerinde tümörler oluşturabilen nöroblastların anormal çoğalması ile karakterizedir. (Shohet ve Foster, 2017b).

Nöroblastoma en sık görülen ekstrakraniyal solid tümördür. Tüm çocukluk çağı malignitelerinin %8-10 kadarını oluşturur (Demirkaya ve Sevinir, 2006). Bebeklik döneminde spontan gerileme yaşayan birkaç olgu haricinde hastaların yaklaşık %65'inde tanı anında metastatik bulgu vardır. Terapötik yaklaşımlara rağmen, çoğunda ya hastalığa direnç ya da relaps eğilimi vardır (Ladenstein ve ark., 2018). Kanser hücrelerinin çoğalma hızının artışı veya azalışı bu hücrelerin mikroçevresiyle oldukça ilgilidir (Yu ve ark., 2021).

1.2.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattı

Üç farklı nöroblastoma hücre hattı fenotipi tanımlanmıştır. Nöroblastik (N-tipi), düz veya substrata yapışan (S-tipi) ve ara tip (I-tipi) olmak üzere ayrılmışlardır (Campos Cogo ve ark., 2020). Farklılaşmamış formda, SH-SY5Y hücreleri morfolojik olarak nöroblast benzeri, polarize olmayan hücre gövdeleri ile az sayıda, kesik uzantılarıyla karakterizedir. Hücreler kümeler halinde büyümeye meyillidir ve merkezi bir bölgede kümeler oluşturabilirler (Kovalevich ve Langford, 2013). SH-SY5Y hücreleri, ortam koşullarına bağlı olarak kolinerjik, adrenerjik veya dopaminerjik dahil olmak üzere çeşitli nöronal fenotiplere doğru yönlendirilebilir (Xie, Hu, ve Li, 2010).

SH-SY5Y hücre hattı, 1970 yılında 4 yaşındaki bir dişinin metastatik nöroblastomunun kemik iliği biyopsisinden kültürde oluşturulan ve üç tur klonal seçimden geçmiş olan SK-N-SH hücre dizisinin bir alt hücre hattıdır (Biedler ve Schachner, 1978). SH-SY5Y hücre hattı için yapılmış ilk karakterizasyonlarda orta derecede dopamin- β -hidroksilaz aktivitesi ve düşük seviyelerde kolin asetil-transferaz, asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz, bazal noradrenalin salınımı ve tirozin hidroksilaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Xicoy, Wieringa, ve Martens, 2017).

Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hem adherent hem de yüzen kültür sistemleri ile kültüre edilebildiği gösterilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, nöronal belirteçlerle karakterize edilen daha olgun bir nöron benzeri fenotipe farklılaştırılabilmektedir. Kültür ortamını manipüle ederek SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin, nöron benzeri fenotipe sahip hücrelere farklılaştırılabilmesi, sinirbilim araştırmaları alanında sayısız fayda sağlamıştır. Bu hücreler bir hücre dizisi olarak kabul edildiğinden, primer insan nöron kültürü ile ilgili etik kaygılar mevcut değildir (Ross, Spengler, ve Biedler, 1983). Bu durum da bu hücrelerle çalışmayı avantajlı hale getirmektedir. SH-SY5Y hücreleri Parkinson, Alzheimer, nörotoksisite, iskemi veya Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi hastalıkların araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

1.4. CD24 Yüzey Belirteci

CD24, glikosil-fosfatidil-inositol (GPI) bağlantılı bir glikoproteindir. Yoğun N-bağlı ve O-bağlı glikozilasyonu olan 27 amino asitten oluşan bir membran proteinidir (Huang, Lv, ve Zhao, 2016). CD24 proteini öncül B lenfositler, nötrofiller ve bazı epitelyal hücrelerde eksprese edilir, ancak T-hücreleri, monositler ve kan sistemi dışındaki hücrelerde eksprese edilmez. B hücreli lösemi, akciğer karsinomu, nöroblastoma ve renal hücreli karsinoma gibi birçok kanserde ekspresyonu gösterilmiştir. CD24'ün fonksiyonel rolü, ligandlarla birleşme veya sinyal iletimine katılma yoluyla gerçekleşmektedir. CD2'ün tümör metastazı ve prognozu ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Birçok kanser tipinde aşırı ekspresyonu gözlenmiştir (Gilliam, Menon, ve Pruszk, 2017).

İlk tanımlandığı günden bu yana CD24'ün önemi farklı alanlarda ortaya konmuştur. İmmünolojide CD24, öncelikle T lenfositlerin yanıtları için ortak uyarıcı bir molekül ve otoimmünitenin düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. Bağışıklık sisteminde CD24, hücre çoğalması ve klonal genişlemenin düzenlenmesinde önemlidir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, CD24'ün tümörün fagositozdan kaçmasında oynadığı rol “beni yeme” sinyalini kullanarak hareket ettiği hipoteziyle açıklanmaktadır. CD24'ün bağışıklık sistemi ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimin ara yüzünde yeni bir role işaret etmektedir ve CD24 ifadesi, makrofaj fonksiyonu temelli tedavilere karşı yanıtı inhibe edebilecek şekilde, mevcut immünterapilere karşı potansiyel bir bakış açısı sağlamaktadır (Yang, Zhu, Yang, ve Yang, 2023). Ayrıca CD24 temelli terapiler hali hazırda uzun zamandır farklı hastalıklar için kullanılmaktadır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. CD24 temelli terapiler (Altevogt, Sammar, Hüser, & Kristiansen, 2021).

Ad	Tedavi Türü	Açıklamalar	Yıl	Sonuçlar
SWA11	mAb IgG2a mAb fare anti-insan CD24	İnsan kanser hücrelerinin CD24 ile hedeflenmesi	2013	Tümör büyümesinin gecikmesi, değiştirilmiş sitokin ortamı sağlanmıştır.
ALB9	mAb IgG1 mAb fare anti- insan CD24	Nu/nu farelerde insan mesane kanseri hücreleri Lu-L2'nin tedavisi	2011	Tümör büyümesinin ve metastazın azaltılması sağlanmıştır.
SWA11	IgG2a mAb	İmmün yetmez farelerde miyelom hücrelerinin tedavisi	2019	Multiple Myeloma'da hücre büyümesinin engellenmesi ve tümör ilerlemesi önlenmiştir.
SWA11.dgA	mAb SWA11 ve deglikozile edilmiş risin A zinciri arasındaki antikor-ilaç konjugatı (ADC)	Sünger matrisinde küçük hücreli akciğer kanseri ksenograftlarının tedavisi	1993	Sünger matrislerdeki küçük tümör hücrelerinden klonojenik SW2 hücrelerinin seçici olarak ortadan kaldırılmıştır.
SWA11.dgA	Antikor-ilaç konjugatı (SWA11 mAb ile deglikozile risin A zinciri arasında)	SCID farelerinde insan BL-38 Burkitt lenfomasının tedavisi	1996	Uzamış yaşam süresi gözlenmiştir.
SWA11-ZZ- PE38	ADC (SWA11 mAb ile Pseudomonas exotoxin arasında)	Farelerde ADC'nin toksik olmaması	2011	İnsan HT29 CRC hücrelerinin çoğalmasında azalma gözlenmiştir.
HN-01	Anti-CD24- ADC, antikor- nitrik oksit konjugatı	Farelerde hepatik karsinoma taşıyan HN-01'in tedavisi	2019	Apoptoz indüksiyonu ve tümör büyümesinin baskılanması sağlanmıştır.
cG7-MICA	NKG2D ligandı MHC sınıf I ile ilişkili zincir A (MICA) ve CD24'e yönelik bir mAb'den oluşan bi- spesifik antikör (BsAb)	<i>İn vivo</i> , NK hücreleri üzerindeki cG7- MICA ve anti-tümör etkinliği	2019	NK hücrelerinin alımı, sorafenibe artırılmış yanıt sağlanmıştır.

Anti-CD24-CAR	mAb SWA11'in tek zincirli değişken fragmanından türetilen CAR'ı eksprese eden NK hücreleri	CD24+ over kanser hücrelerine hedefleme	2019	Efektör hücreler etkili öldürme sergilemiştir.
Anti-CD24-CAR	mAb SWA11'in tek zincirli değişken fragmanından türetilen CAR'ı eksprese eden T hücreleri	Farklı PAC ksenogreftleri taşıyan SCID farelerine intratümoral enjeksiyon	2012	CD24'e özgü efektör hücreler farelerin yaşam süresini uzatmıştır.

1.4.1. CD24 ve Kanser İlişkisi

Kanserde CD24, hücre göçünü, istilasını ve çoğalmasını düzenler ve kötü prognozun patoloji biyobelirtecidir. Son zamanlarda tümör hücrelerindeki CD24'ün, bağışıklık sistemi üzerinde bir fren görevi görebileceği bildirilmiştir (Altevogt, Sammar, Hüser, ve Kristiansen, 2021). Aktive edilmiş endotel hücreleri ve trombositler tarafından ifade edilen bir yüzey molekülü olarak, P-selektin (CD62P), CD24 ile bağlanan en çok çalışılan ligandlardan biridir. Bu etkileşimin, CD24 ifade eden tümör hücrelerinin migrasyonunu ve yayılmasını hızlandırabileceği belirtilmiştir (Yeini ve ark., 2021). E-selektin (CD62E), CD24 için başka bir ligand olarak tanımlanmaktadır. CD24'ün E-selektin ile etkileşimde bulunarak tümör hücrelerinin metastazını etkileyebileceğine dair kanıtlar sunulmuştur ve aynı zamanda aktin filamentlerinin yeniden düzenlenmesini sağlayarak, CD24'ün hücre yüzeyindeki adezyon kompleksleri üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir (Yang ve ark., 2023). CD24 için bilinen bir diğer hücre membran ligandı L1 hücre adezyon molekülüdür (L1CAM). CD24'ün, α 2,3-sialik asit aracılığıyla L1'in fibronektin tip III alanına ve aynı zamanda Lewis(x) aracılığıyla TAG-1 (Transient Axonal Glycoprotein 1) ve kontaktine bağlanmasının, nörit büyümesine yol açtığı düşünülmektedir (Yang ve ark., 2023).

Tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD24, immün hücrelerin yüzeyindeki Siglec-10 ile etkileşime girerek bağışıklık tepkilerinin baskılanmasına katkıda bulunur. Tümör hücrelerinin yüzeyindeki CD24 veya immün hücrelerin yüzeyindeki Siglec-10'u

hedefleyen tedavi stratejileri, tümör bağışıklık kaçışını karşılamak için potansiyel bir yol olarak ortaya çıkmaktadır (Yin ve Gao, 2020).

CD24 proteini immünohistokimya ile meme kanserleri, genital sistem kanserleri, sindirim sistemi kanserleri, sinir sistemi kanserleri gibi birçok solid tümörde yaygın olarak tespit edilmektedir. CD24'ün fonksiyonel rolleri ya ligandlarla kombinasyon halinde yerine getirilir ya da neoplazmaların başlatılmasına ve ilerlemesine aracılık eden sinyal iletimine katılır (Ni, Zhao, ve Wang, 2020). Tümör hücreleri yüzeyinde CD24 ekspresyonu, Src/STAT3, EGFR, HER2, Ras-benzeri GTPaz, MAPK dahil olmak üzere birçok onkogenik sinyal yolundaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Panagiotou, Syrigos, Charpidou, Kotteas, ve Vathiotis, 2022).

CD24, muhtemel bir kanser kök hücre belirteci olarak tanınmıştır. Son zamanlarda, mikrotarama (microarray) teknolojisi kullanılarak yapılan pek çok gen profil analizinde çeşitli karsinoma tiplerinde aşırı ifade edilen CD24'ü tanımlayan birçok literatür bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, CD24'ün kanser hücrelerinin çoğalma ve invazyonunu düzenleyebileceğini göstermiş ve farklı kanser türlerinde yeni terapilere ilginç bir hedef olarak destek sağlamıştır (Yang ve ark., 2023).

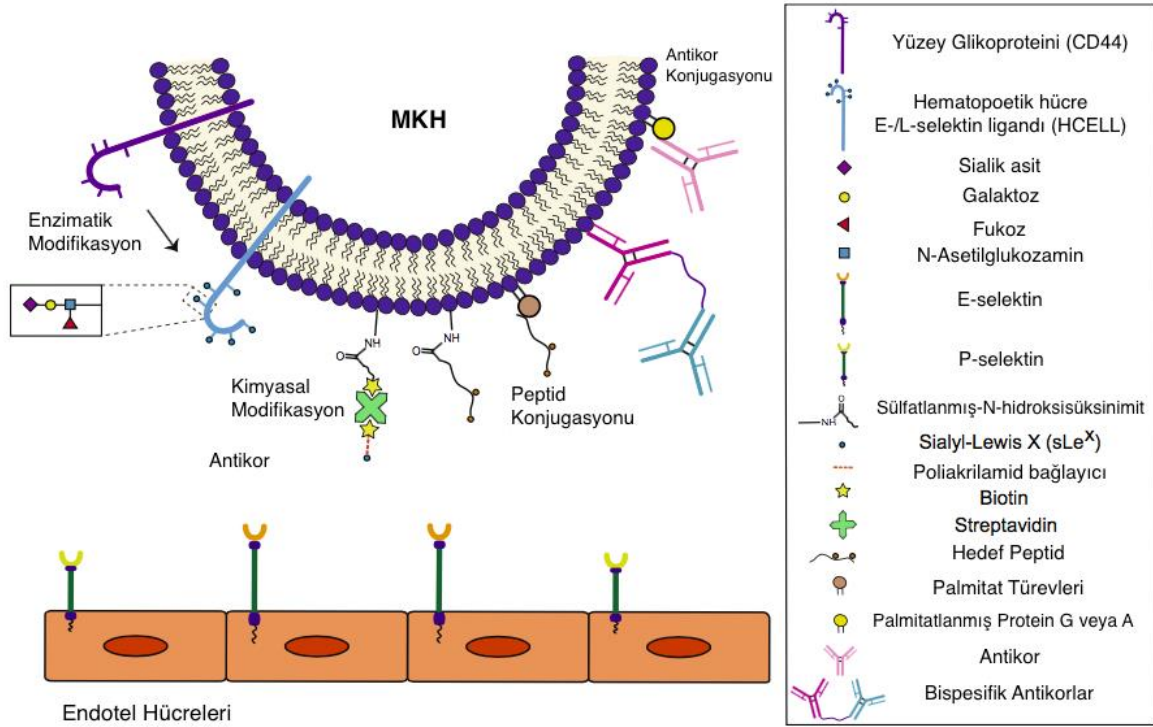
1.4.2. CD24 ve Nöroblastoma İlişkisi

CD24'ün insan merkezi sinir sisteminin gelişimi sırasında geçici olarak ifade edildiğini, nöroblastomalar da dahil olmak üzere nöral hücre kökenli tümörlerin bir belirteci olduğunu ve nöroblastomaların farklılaştıkça CD24 ifadesinin azaldığını belirtilmiştir (Poncet ve ark., 1996). CD24 ekspresyonun metastatik nöroblastomada yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Jensen ve ark., 2015). Ayrıca bu belirtecin nöroblastoma için kanser kök hücre belirteci olarak kullanıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır (Siapati, Rouka, Kyriakou, ve Vassilopoulos, 2011).

Bu bulgular, CD24'ün nöroblastoma ile ilgili önemli bir protein olduğunu ve bu alanda daha fazla araştırma ve olası tedavi müdahaleleri için oldukça önemli olduğunu işaret etmektedir. Preklinik çalışmalarda, monoklonal antikorlar dahil CD24 hedefleyen tedaviler, RNA girişimiyle hedef susturma ve immünoterapi gibi yöntemler anti-tümör etkiyi sağlamada gelecek vaat etmektedir.

1.5. MKH'ler Üzerinde Gerçekleştirilen Yüzey Modifikasyonları

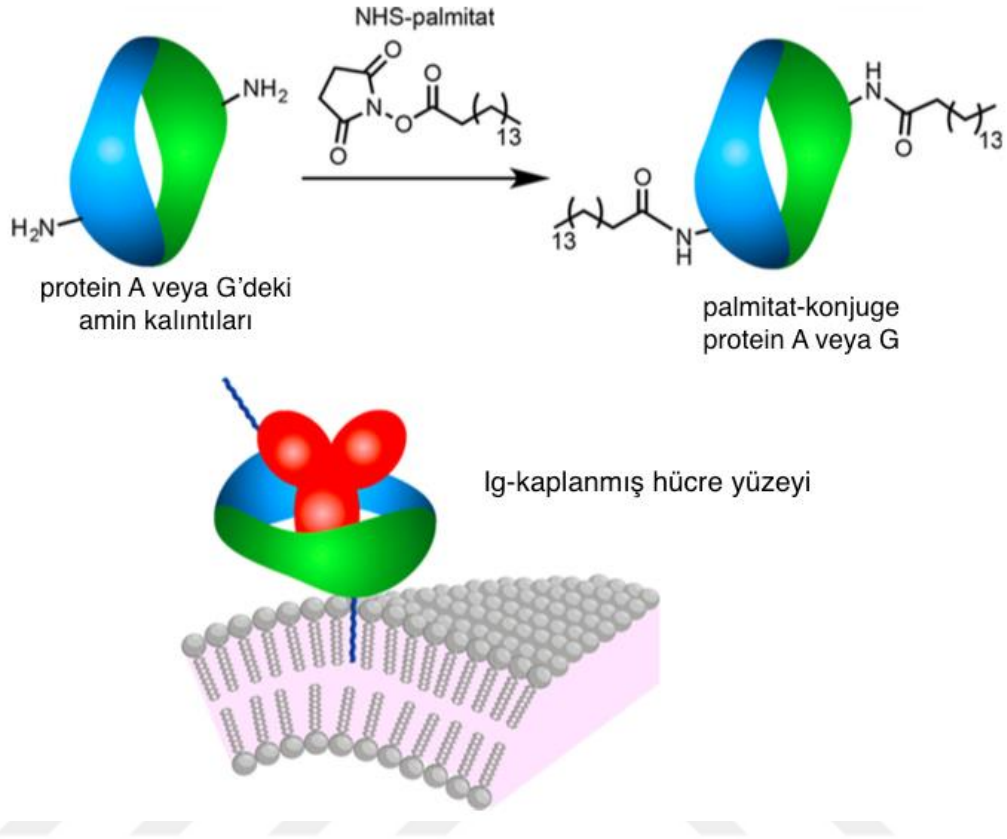
MKH temelli tedavi yaklaşımları oldukça güvenli ve etkili olsa da tek başına MKH uygulaması bazı durumlarda verimli olmamaktadır. Etkinliği arttırmak için araştırmacılar MKH'lerin yüzeyinde bazı modifikasyonlar uygulayarak hedefe yönlendirme yaklaşımını kullanmıştır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. MKH'lerin hedeflenen bölgelerin endotelyumuna olan yönelim özelliğini artırmak için kullanılan hem kovalent hem de kovalent olmayan yüzey modifikasyon tekniklerinin şematik diyagramı (Park ve ark., 2015).

Hidrofobik çıkıntılar gibi hareket eden palmitlenmiş proteinlerin hücre yüzeyine entegrasyonu, potansiyel olarak Fc bölgesine veya bu alana bağlanabilen bir proteine antikor konjugasyonunu sağlamaktadır (Park ve ark., 2015). Daha önce geliştirilen bir prosedürü araştırmacılar optimize ederek ilk kez “protein boyama” adı verilen bir kavramı ortaya koymuşlardır (A. Chen, Zheng ve Tykocinski, 2000; S. A. Kim ve Peacock, 1993). Bu kavram hücre yüzeyine antikor bağlamak için palmitlenmiş proteinlerin hücre membranına ara katman olarak yerleştirilmesini içerirken özel antijenlere olan bağlama yeteneklerini veya hücresel taşıyıcıların canlılığını ve farklılaşma potansiyellerini tehlikeye atmadan gerçekleşmektedir (Park ve ark., 2015). Bu basit ve etkili yöntem, ilk olarak tavşan eksplant modelinde kırık onarımı için kondrositlerin yönlendirilmesinde

kıyırdak ekstraselüler matriksi hedefleyen antikorlar bağlanarak gerçekleştirilmiştir (Dennis, Cohen, Goldberg, ve Caplan, 2004).



Şekil 1.5. Membran interkalasyonu için protein A veya G'nin yüzey alkilasyonu. Protein A veya G bağlanmasıyla immünoglobulin (Ig) immobilizasyonu (Park ve ark., 2018).

Protein G, antikorları hücre yüzeyine immobilize etmek için kullanılmıştır ve protein A'ya göre daha yüksek bir IgG bağlama afinitesi avantajına sahip olduğu bildirilmiştir (Björck ve Kronvall, 1984). Protein G'nin yüzeyindeki amin kalıntıları, palmitik asit gruplarıyla N-hidroksisüksinimit ester aracılığıyla protein A modifikasyonuna benzer şekilde bağlanmaktadır (Şekil 1.5).

2. AMAÇ

Yapılmış olan tez çalışmasında WJ-MKH'lerin yüzeyinde yapılan modifikasyonla anti-CD24 antikoru bağlı (kaplı) olan hücreler SH-SY5Y hücreleri üzerindeki CD24 proteinine hedeflenmiştir. Sonrasında modifiye edilmiş bu WJ-MKH'lerin hedeflenen nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Nöroblastoma hücrelerinin yüzeylerinde bulundurduğu bir membran proteini olan CD24'ü WJ-MKH'lerin membranına kaplayarak bu iki hücre tipinin *in vitro* ortamda kültüre edilmesi ve böylece iki hücrenin tipinin yakın temas halinde etkileşimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan deneyler bu yaklaşımla antikor kaplı WJ-MKH'lerin nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkilerini direkt hücre-hücre etkileşimi ile herhangi bir genetik modifikasyona veya kimyasal bir aracıya gerek kalmadan inceleme imkânı sağlamıştır. Parakrin etkinin yanında hücrelerin direkt temas halindeyken anti-tümör özelliklerin mi pro-tümör özelliklerin mi aktive olduğu analiz edilmiştir. MKH'lerin tümör inhibe edici veya tümör destekleyici etkileri tartışmalı olduğundan kurulacak olan hücre-hücre etkileşimi ile en azından birebir etkileşimin ve bu etkileşimin ön bulgularının incelenmesi hedeflenmiştir.

Yukarıda bahsedilen amaç doğrultusunda çalışmamız;

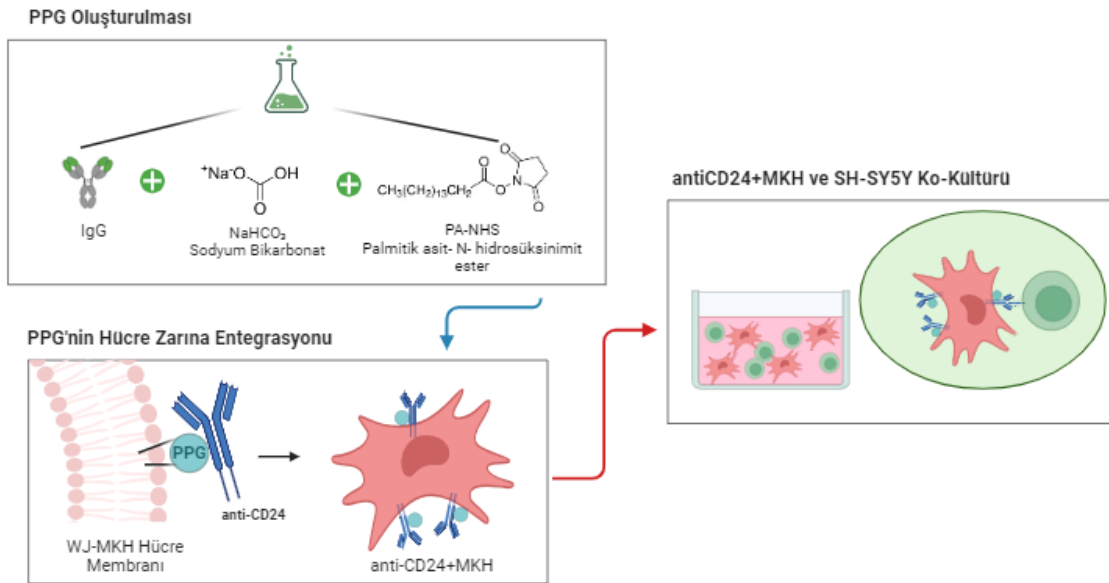
- (a) Palmitasyon reaksiyonu ve anti-IgG proteini (PPG) bağlanmasını gerçekleştirmek,
- (b) WJ-MKH'lerin anti-CD24 antikoru ile kaplanması,
- (c) Entegre olan PPG'nin hücre membranında belirlenmesi,
- (d) Anti-CD24 antikoru kaplanmış WJ-MKH ve SH-SY5Y hücrelerinin direkt ko-kültürü,
- (e) Hücre etkileşimlerini takiben proliferasyon, canlılık, apoptoz, gen ifadelerinin incelenmesi ve morfolojik analizler gibi deneyleri içermektedir.

3. YÖNTEM

Araştırmanın deneyleri KÖGEM laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Deneyler süresince kullanılan hücreler KÖGEM envanterinde bulunan etik kurul onayı alınmış, tanımlanmış standart izolasyon yöntemleri ile elde edilmiş hücrelerdir. Çalışmanın tamamı *in vitro* olarak kurgulanmış ve herhangi bir insana ya da hayvana yönelik doğrudan ya da dolaylı bir müdahalesi yoktur.

3.1. Deney Planı

Tez çalışmasında yapılması hedeflenen analizler öncesi basamaklar; (a) Palmitasyon Reaksiyonu ve PPG Bağlanması, (b) PPG'nin Hücre Zarına Entegrasyonu, (c) Deney Grupları Arası Ko-Kültür şeklindedir (Şekil 3.1). Bu basamakların ayrıntıları ve ko-kültür sonrası tüm analizler detaylı bir şekilde açıklanmıştır.



Şekil 3.1. Ko-Kültür Öncesi Deney Planı.

3.2. WJ-MKH Kültürü ve Karakterizasyonu

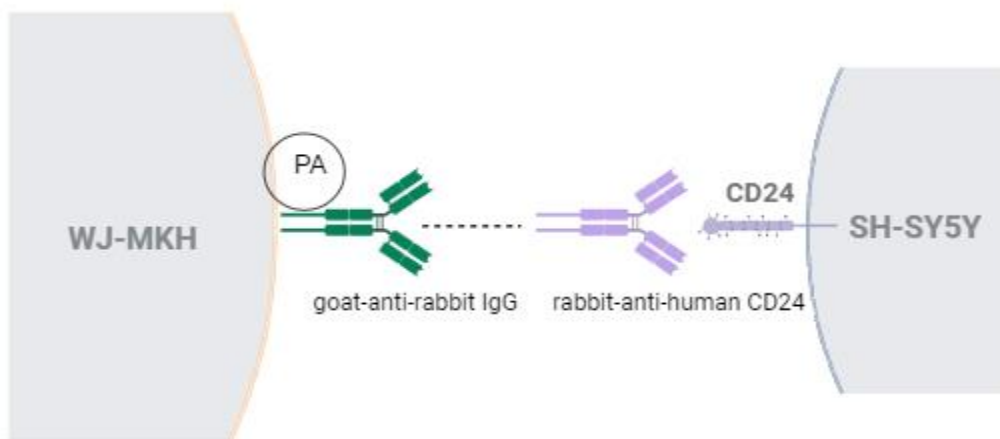
WJ-MKH'leri KÖGEM hücre koleksiyonundan kullanılmıştır. Uygun dondurma solüsyonlarında (CTS Synth-a-Freeze Medium, Thermo) -152°C 'de saklanan hücreler çözülerek tekrar standart kültür ortamı olan %5 CO_2 'li ortamda 37°C 'deki inkübatörlerde kültüre edilmiştir.

WJ-MKH'leri kültür ortamına ekilmiş ve hücreler %70-80 yoğunluğa geldiğinde %0,25 Tripsin/EDTA kullanılarak pasajlanmıştır. Her pasaj arasında, hücre sayımı tripan mavi boyasıyla yapılmıştır. Hücreler, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) içeren RPMI-1640 (+L-glutamin, Sigma) besiyeri ile steril koşullar altında %5 CO₂ ve 37°C'de, nemlendirilmiş bir inkübatörde kültüre edilmiştir.

WJ-MKH'ler, akım sitometri cihazı kullanılarak hücre yüzey belirteçleri yönünden karakterize edilmiştir. Karakterizasyon analizi CD45, HLA-DR, CD34, CD73, CD105, CD90, köklülük belirteçleri FACS CALIBUR cihazı (BD Bioscience) ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. PPG-anti-CD24'ün Hazırlanması ve WJ-MKH'lerin Kaplanması (Palmitasyon Reaksiyonu ve anti-IgG Proteini Bağlanması)

Hücre yüzeyi kaplaması, hücre davranışını modüle etmek için spesifik moleküllerin geçici olarak hücre zarına sabitlendiği bir metodolojidir. Hücreleri belirli bölgelere yönlendirmek için ilgili hücrelere özgü antikorlarla hücre yüzeyinin kaplanması işlemidir. Bu çalışmada iki aşamalı kaplama yöntemi kullanılmaktadır. Palmitlenmiş IgG (PPG)'nin, hücrelerle karıştırılarak hücre zarına entegre olması sağlanmaktadır. İkinci kaplama adımında, uygun antikorlar PPG kaplı hücrelere ilave edilir. İlgili antikor hücre yüzeyinden dışarı doğru uzanan antijen bağlama alanı ile PPG'ye bağlanmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hücrelerin antikor ile kaplanma süreci. (PA:Palmitik Asit)

3.3.1. PPG- anti-CD24'ün Hazırlanması

Anti-rabbit IgG1 (immünoglobulin G1, 500 µg, Biolegend), ticari olarak elde edilmiştir. Palmitik asidin N-hidroksisüksinimit esteri ile esterifikasyon reaksiyonu 100 µL IgG1, 2,2 µL NaHCO₃ ve 10 µL PA-NHS (%3 DOC içeren) oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu tepkime sonrasında lipid türevli IgG oluşmakta ve bu malzeme PPG olarak adlandırılmaktadır (Dennis ve ark., 2004). PPG, HiTrap desalting kolonu (5 mL, Cytiva, Uppsala, Sweden) üzerinde FPLC yöntemiyle saflaştırılmıştır. 1x10⁶ WJ-MKH, PPG ile kaplanmak üzere kültür kabından %0,25 Tripsin/EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve sonrasında serumsuz besiyeri ile süspanse hale getirilmiştir. Süspanse haldeki hücrelerin üzerine, hazırlanan PPG eklenmiş ve 37°C'de çalkalamalı olarak 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler çöktürülerek yıkama yapılmıştır.

3.3.2. Saflaştırma

FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) yöntemiyle hem oluşturulan reaksiyon sonrasında PPG proteini hem de ticari olarak temin edilen anti-CD24 antikoru saflaştırılmıştır. HiTrap Desalting kolonu (5 mL, Cytiva, Uppsala, Sweden) AKTA Prime Plus Liquid Chromatography System (GE, Uppsala, Sweden) cihazına bağlanarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır (Şekil 3.3).

Tablo 3.1. Saflaştırmada kullanılan FPLC parametreleri.

	PPG	anti-CD24
Kolon	Hi-Trap Desalting (Tuzsuzlaştırma Kolonu) ($\cong$ 5 mL)	Hi-Trap Desalting (Tuzsuzlaştırma Kolonu) ($\cong$ 5 mL)
Örnek	PPG Reaksiyon Ürünü- 1mL	anti-CD24 Antikoru-1mL
Elüsyon	20 mL	20 mL
Akış Hızı	1 mL/dk	1 mL/dk
Hedef	DMSO uzaklaştırma/Tuzsuzlaştırma	Tuzsuzlaştırma
Tampon Çözelti	Tris-HCl Tamponu/pH:7,5/10 mM	Tris-HCl Tamponu/pH:7,5/10 mM
Fraksiyon Boyutu	0,5 mL	0,5 mL

Kolon akış hızı 1 mL/dak olarak ayarlanmış ve işlem sırasında tek bir tampon çözelti (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) kullanılmıştır (Tablo 3.1). Kolonun dengelenmesi (equilibration) ilk 30 dk sonunda sağlandıktan sonra aynı akış hızında 500 μ L içerisinde örnek sisteme verilmiştir. Sonraki 30 dk boyunca kolondan geçen örnekler otomatik toplayıcı (autosampler) ile her biri 0,5 mL olacak şekilde toplanmıştır. Toplanan örneklerin konsantrasyon işlemi için Pierce ve Cytivia marka protein konsantratörleri (PES, 10K MWCO) kullanılmıştır. Mikrosantrifüj ile konsantre edilen örneklerin hacmi 50-100 μ L'ye indirilmiştir.



Şekil 3.3. AKTA Prime Plus Liquid Chromatography System. HiTrap Desalting kolonu ile saflaştırma işlemi.

Ultra-LEAF Purified anti-human CD24 (LFA2, 100 µg, Biolegend) ticari olarak temin edilmiştir. Anti-CD24 HiTrap desalting kolonu (5 mL) üzerinde FPLC yöntemiyle saflaştırılmıştır. PPG ile kaplanmış olan hücrelerin üzerine anti-CD24 antikoru eklentisi olan serumsuz medyum eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiş ve 2 saat sonunda hücreler çöktürülerek yıkama yapılmıştır. Böylece, MKH'ler kaplanmış ve CD24 affinitesi kazandırılmıştır.

3.4. PPG Toksik Dozunun Belirlenmesi

Palmitasyon reaksiyonun hücreler üzerindeki toksisitesini ve uygun dozunu belirlemek amacıyla WST-8 testi ile toksisite deneyleri gerçekleştirilmiştir. WST-8 (2-(4-İyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H tetrazolyum, Elabscience) protokolü, hücresel mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından tetrazolyum tuzu WST-8'in formazana dönüşmesine dayanmaktadır. Canlı hücre sayısı mitokondriyal dehidrogenazların aktivitesi ile doğru orantılı olarak artmakta ve buna karşılık oluşan formazan boya miktarında da artış görülmektedir. WST-8 yöntemi metabolik olarak aktif olan hücrelerin ürettiği yüksek miktardaki formazanın ölçülmesine dayanmaktadır.

PPG konsantrasyonunun hücre zarı üzerindeki toksisitesini incelemek için WJ-MKH'ler 0, 10, 20, 50, 100, 150 µg/mL dozlarda PPG ile muamele edildikten sonra canlılık

analizleri WST-8 ile yapılmıştır. Belirli dozlardaki örnekler için %10 WST-8 solüsyonu eklendikten sonra 2 saat %5 CO₂ içeren 37°C’de inkübe edilmiş ve renk değişimi gözlenmiştir. Spektrofotometrede, örneklerin optik yoğunluk (OD) değeri 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.4.1. Entegre Olan PPG’nin Hücre Membranında Belirlenmesi

Hücre membranı üzerindeki antikor kaplaması sonrasında PPG konsantrasyonunun etkisini incelemek için, WJ-MKH’ler belirlenen dozda PPG ile işleme tabi tutulmuş ve ardından PE-anti-IgG ile inkübe edilmiştir. PPG üzerindeki anti-IgG proteini PE-konjuge bağlı antikoru ile işaretlenmiştir. İşaretlenen hücreler akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir.

3.5. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattının Kültürü ve Karakterizasyonu

Tez çalışmasında kullanılan SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri KÖGEM’in hücre koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.5.1. SH-SY5Y Hücre Hattı Kültürü

Kriyoviallerde, -152°C’deki dondurucuda muhafaza edilen hücreler 37°C’de su banyosunda çözüldükten sonra daha önceki çalışmalarımızda yapmış olduğumuz kültür koşulları altında çoğaltılmıştır (Turaç ve ark., 2013). Besiyeri içeriği olarak, %15 FBS, %1 NEAA ve Pen/Strep içeren DMEM F-12 besiyeri hücrelerin kültürü için kullanılmıştır. Ekilen hücreler 37°C’de %5 CO₂ ortamını sağlayan inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi %0,25 Trypsin/EDTA (1X) ile gerçekleştirilmiştir. Pasajı gerçekleştirilen hücreler Thoma lamında sayılarak uygun kültür kaplarına ekimi yapılmıştır. Hücrelerin iki günde bir besiyeri değişimleri gerçekleştirilmiştir.

SH-SY5Y hücreleri, ticari hücre hattı oldukları için standart karakterizasyon gerektirmemekle birlikte daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi CD24 belirtecini pozitif olarak göstermektedir (Ferlemann, Menon, Condurat, Rößler, ve Pruszk, 2017; Turaç ve ark., 2013).

3.5.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması

Tekrar kullanılması planlanan SH-SY5Y hücreleri uzun süre saklanması amacıyla sayımı yapıldıktan sonra %35 FBS, %60 DMEM-F12 ve %5 DMSO içeren ortamda -152°C’de dondurularak saklanmıştır.

3.6. WJ-MKH ve SH-SY5Y Hücrelerinin Ko-Kültür Çalışmaları

WJ-MKH’ler ile SH-SY5Y hücrelerinin planlanan deney grupları baz alınarak uygun eklentileri içeren DMEM-F12 besiyeri içerisinde 6 kuyucuklu kültür kaplarında direkt ko-kültürü gerçekleştirilmiştir.

Ko-Kültür Deney Grupları:

1. WJ-MKH
2. SH-SY5Y
3. WJ-MKH:SH-SY5Y(1:1)
4. WJ-MKH:SH-SY5Y(1:3)
5. WJ-MKH:SH-SY5Y(3:1)
6. anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1)
7. anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:3)
8. anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (3:1)

Tablo 3.2. Ko-kültür çalışmaları için kullanılan deney grupları ve oranları.

Deney Grupları	Oranlar
WJ-MKH	
SH-SY5Y	
WJ-MKH:SH-SY5Y	(1:1)
	(1:3)
	(3:1)
anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y	(1:1)
	(1:3)
	(3:1)

6 kuyucuklu kültür kabında yapılacak analizler için 100.000 hücre/kuyucuk WJ-MKH ekilmiştir. 96 kuyucuklu kültür kabında yapılacak analizler için 10.000 hücre/kuyucuk WJ-MKH ekilmiştir. Buna karşılık her deney tasarımı için deney ortamına belirtilen oranda SH-SY5Y hücresi direkt olacak şekilde ekilmiştir.

3.7. WJ-MKH ve SH-SY5Y Hücreleri Ko-Kültür Sonrası Analizler

3.7.1. WST-8 Analizi

Deney gruplarındaki canlılığın analizi ve karşılaştırılması için 96 kuyucuklu kültür kabına %10 WST-8 solüsyonu eklenmiştir. 2 saat boyunca %5 CO₂'li ve 37°C ortamda inkübe edildikten sonra, renk değişimi gözlenmiştir. Spektrofotometrede, örneklerin optik yoğunluk (OD) değeri 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.7.2. Morfolojik Analizler

Çalışmamızdaki ko-kültür ve kontrol gruplarında hücrelerin kültür sırasındaki morfolojik değişimleri invert mikroskopta (Olympus, IX71) gözlemlenmiştir.

3.7.2.1 Canlı-Ölü (Live-Dead) Analizi

İlgili grupların hücreleri, uygun oranlarda 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saat kültür sonunda live-dead boyaması yapılmıştır. Bu boyama ticari bir kit (Thermo) ile gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığının ölçülmesi prensibi ile çalışan bu kit kalsein-AM (yeşil-canlı hücreleri boyar), propidium iodide (kırmızı-ölü hücreleri boyar) ve Hoechst 33342'den (mavi-tüm hücreleri boyar) oluşan üç renk ile canlı ölü ayrımı yapmaktadır. Kit, plazma membran bütünlüğüne ve esteraz aktivitesine dayalı olarak hücrelerin canlılığını belirlemektedir.

Toplam grup sayısına yetecek kadar boya miktarı hesaplanarak hazırlanmıştır. Kitin protokolü takip edilerek örneklerin üzerine her kuyucuk için 1 mL hazırlanan boyadan eklenmiş ve 40 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler yıkanarak boya ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrası her bir kuyucuğa serumsuz besiyeri eklenerek floresan mikroskopta (Leica, DMI/4000/Microsystems) görüntülenmiştir.

3.7.3. MDA (Malondialdehit) Analizi

Lipid Peroksidasyon Test Kiti (Kolorimetrik/Florometrik), malondialdehitin (MDA) hassas tespiti prensibi ile çalışmaktadır. Lipid peroksidasyonu, lipidlerin oksidatif bozunmasını ifade eder. Bu süreçte serbest radikaller, lipidlerden (genellikle hücre zarlarında) elektron alarak hücre hasarına neden olur. Oksidatif stresi değerlendirmek için lipid peroksidasyonunun kantifikasyonu gerçekleştirilir. Lipid peroksidasyonu, doğal yan ürünler olarak MDA ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi reaktif aldehytleri oluşturur. MDA ve 4-HNE sıklıkla lipid peroksidasyonunun belirteçleri olarak ve oksidatif hasar/oksidatif stres tayini için kullanılmaktadır. Bu analiz ticari kitin yönergelerine göre gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. LDH (Laktat Dehidrogenaz) Analizi

Laktat dehidrogenaz (LDH), çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli bir rol oynayan bir enzimdir. LDH, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve anjiyogenezini uyararak laktat üretimini teşvik etmesi nedeniyle kanser hastalarında kötü bir prognozla ilişkilidir (Farhana ve Lappin, 2020). Laktatın pirüvata dönüşümünü katalizleyen anaerobik metabolik yolda rol oynar. Çalışmamızda ticari kit aracılığıyla yönergelere göre LDH analizi gerçekleştirilmiştir.

3.7.5. Ko-Kültür Sonrası Gen Ekspresyon Profiline Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

Ko-kültür yapılmış deney gruplarına dahil olan hücreler yüzeyden Tripsin/EDTA (%0,25, Gibco, Thermo Fisher Scientific) enzimi ile kaldırılmış ve 15 mL'lik falkon tüpe toplanıp 90 g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Hücreler yıkandıktan sonra GeneJet RNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific) ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücre peletleri 200 µL PBS içerisinde homojenize edildikten sonra 600 µL liziz çözeltisi eklenerek 10 sn. süresince, 300 µL EtOH eklenerek 10 saniye vortekslenmiştir. Örnekler filtreli tüplere aktarılmış ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Ticari kite uygun şekilde yıkama solüsyonları ile filtreler yıkandıktan sonra her örnek için 60 µL dH₂O eklenmiş ve temiz tüplerde santrifüj edilerek filtredeki RNA örneklerinin toplanması sağlanmıştır. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları picodrop spektrofotometre ile 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek ve 1 µg total RNA olacak şekilde cDNA'ya çevrilmiştir. Kalan örnekler -80°C'de stoklanmıştır.

cDNA sentezi, ticari kit (RevertAid First Strand-cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific) kullanılarak yapılmıştır. Hücrelerden izole edilen total RNA cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA sentezi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Öncesinde RNA'ya 65°C'de 5 dk süreyle inkübasyon sonrası rastgele bölgelerden primer bağlanması gerçekleşmiştir. RNA'nın ısıdan etkilenerek bozunmaması için buza alınarak tersine transkripsiyonu sağlayacak enzim karışımı eklenmiştir. 42°C'de 60 dk bekletilerek cDNA sentezi ve 85°C'de 5 dk inkübasyonla enzim inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar gerçek zamanlı PZR için kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanmıştır.

Gen ekspresyon analizi ile her iki hücredeki çoğalma, apoptotik ve anti-inflamatuvar, antioksidan mekanizmalarda yer alan belirteçlerinin analizi amaçlanmıştır. Ekspresyonları

incelenen genler; Ki-67, TGFb1, PDGFRb1, BMP2, p38a, IL-1b, IL-6, TNFa ve GPX1'dır. Gen ekspresyon analizi toplam RNA izolasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezini takiben SYBR Green Master karışımı (RealQ Plus Master Mix Green, Ampliqon) ile gerçek zamanlı PZR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İşlemler gerçek zamanlı PZR cihazı (Lightcycler 480-II, Roche) ile çoğalan DNA fragmanları ölçülmüştür. Actin β housekeeping (iç kontrol) gen olarak kullanılmıştır. Analiz için PZR cihazının programı üzerinde $\Delta\Delta C_p$ hesaplanarak analiz edilmiştir.

3.7.6. DCFDA Boyaması- ROS (Reaktif Oksijen Türleri) Miktar Tayini

5-(6)- karboksi-2',7'-diklorofloresein diasetat (Carboxy-DCFDA, Sigma) floresan oksidan algılama probudur. Hücre içinde esteraz enzimi tarafından hidroliz edildiğinde CDF adı verilen floresan ürünü üretir. DCFDA hücre içi ROS'u tespit etmek için kullanılır (Hempel, Buettner, O'Malley, Wessels, ve Flaherty, 1999). Floresan yoğunluğu hücre içindeki ROS seviyeleri ile orantılıdır. 48 saat sonra ko-kültür sonrasında deney gruplarındaki hücreler ayrı ayrı toplanmıştır. Tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş, 20 μ M DCFDA toplanan hücrelere eklenerek, 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Yıkama sonrasında hücreler akış sitometrisinde FL-1 kapısında analiz edilmiştir.

3.7.7. Apoptoz Tayini

Çalışmamızda belirlenen deney grubu (1:1) için apoptoz tayini ticari kit (Annexin V-PE/7-AAD Apoptoz Kiti, Elabscience) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Annexin V, kalsiyuma bağımlı bir şekilde fosfatidilserine bağlanan annexin ailesinin bir üyesidir. Annexin V etiketli floresan, apoptotik hücre membranı üzerindeki fosfatidilserine bağlanarak akış sitometri ile tespit edilebilir hale gelmektedir. Nükleer boyalar (PI, DAPI, 7-AAD) yüksek bir DNA bağlama kapasitesine sahip olduğu için canlı hücreler tarafından hücre içine alınmazlar. Nekrotik hücrelerde geç apoptoz veya membran bütünlüğünün kaybı nedeniyle nükleer boyalar hücrelere girerek DNA'yı boyamakta ve Annexin V ile kombinasyon halinde kullanıldığında farklı apoptotik aşamalarındaki hücreler ayırt edilebilmektedir (Zimmermann ve Meyer, 2011). Analizler akım sitometri cihazı (BD, FACS CALIBUR) ile gerçekleştirilmiştir.

3.7.8. CFSE Proliferasyon Analizi

Belirlenen deney grupları için CFSE işaretleme ticari kit (Invitrogen, CellTrace, CFSE Cell Proliferation Kit) ile gerçekleştirilmiştir. Karboksiflorescein diasetat süksinimidil ester (CFSE) bir çeşit floresan hücre boyamasıdır. CFSE hücre membranından geçebilmekte ve süksinimidil grubu ile hücre içi moleküllere, lizin ve diğer amin kaynaklarına kovalent bir şekilde bağlanabilmektedir. Gerçekleştirdiği bu kovalent bağlantı aracılığıyla hücre içinde uzun süreler tutulabilmektedir (Weston ve Parish, 1990). CFSE floresan boyası hücre bölünmesi ile hücrelerde yarıya inmektedir. Bu nedenle, CFSE miktarı ile proliferasyon ters orantılı olarak analiz edilmektedir.

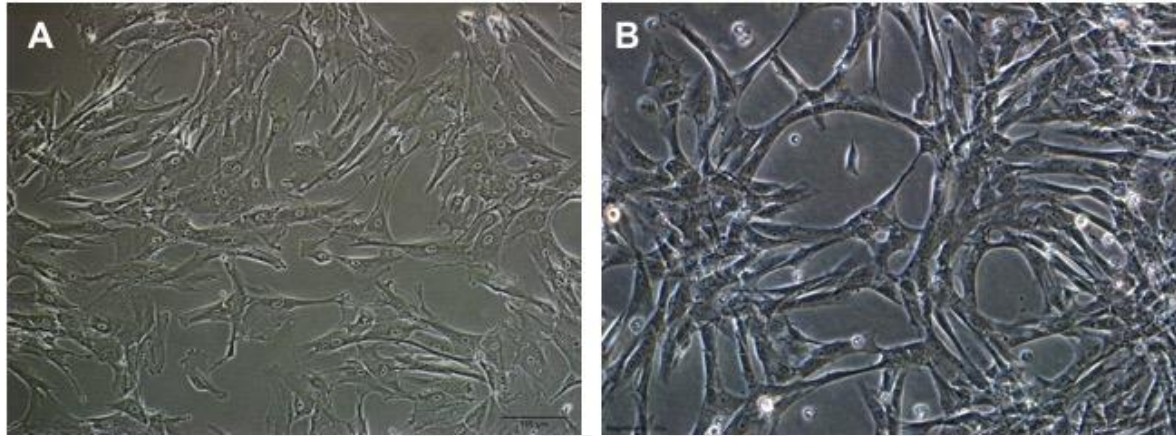
3.8. İstatistiksel Analiz

Deneyler en az 3 tekrarlı yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar standart sapma ($\pm$ SD) göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalama alınarak standart sapma ile gösterilmiştir. Çoklu analizler için ANOVA kullanılmıştır. Bu analizler için Windows Excel tercih edilmiştir. Bulgular arasındaki ikili anlamlı farklılık (p değeri) Student T-Test kullanılarak hesaplanmıştır. İstatistik hesaplama programı olarak SPSS (V.10) kullanılmıştır. Grafikler, üzerinde ifadesi yıldızlarla belirtilmiştir (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4. BULGULAR

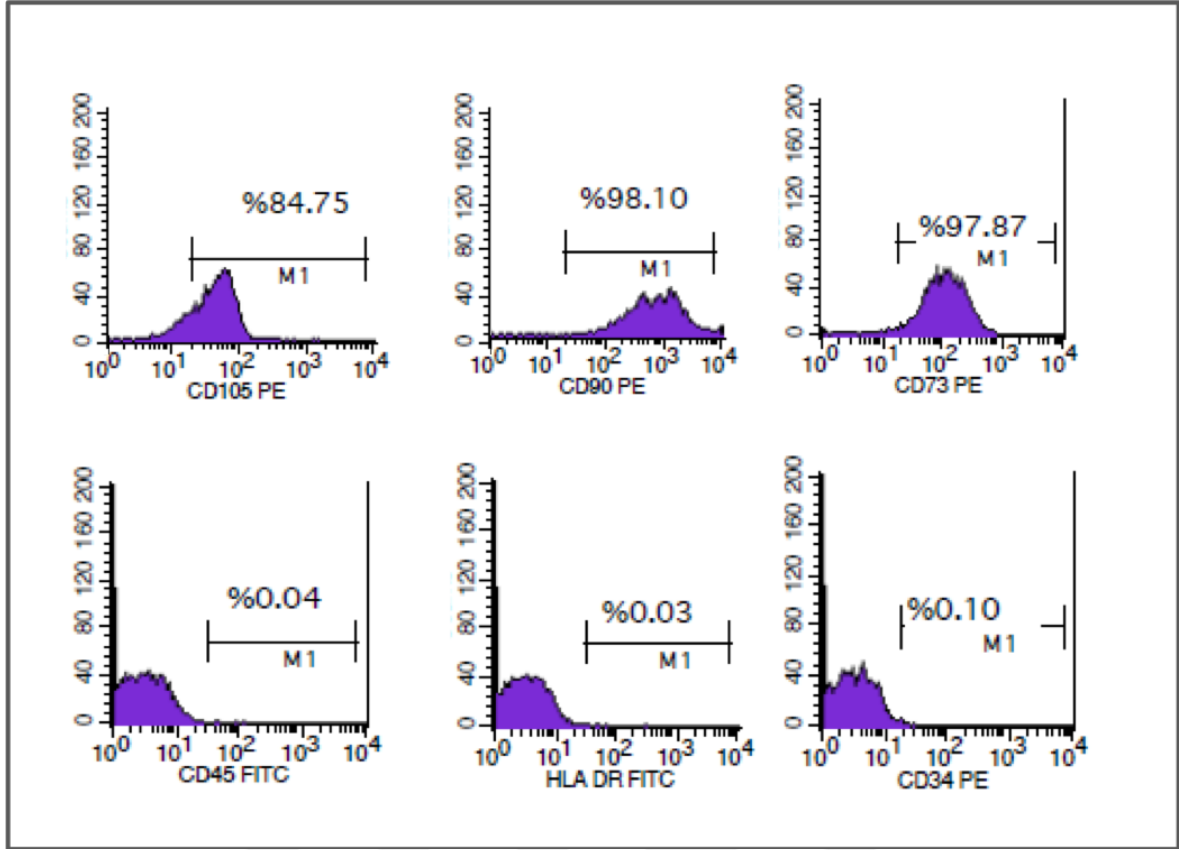
4.1. WJ-MKH Kùltürü ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında -152°C’de saklanan WJ-MKH’leri çözdürme işlemi sonrası %10 FBS, %1 Pen/Strep içeren besiyeri ile steril koşullar altında %5 CO₂ ve 37°C’de nemlendirilmiş bir inkübatörde kùltüre edilmiştir. Kùltür kabı %80-90 yoğunluğa ulaşmadan hücre morfolojileri mikroskopta incelenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. WJ-MKH’lerin (P4) invert mikroskopta görüntüsü. (Ölçek çubukları; A:100 µm; B: 50 µm)

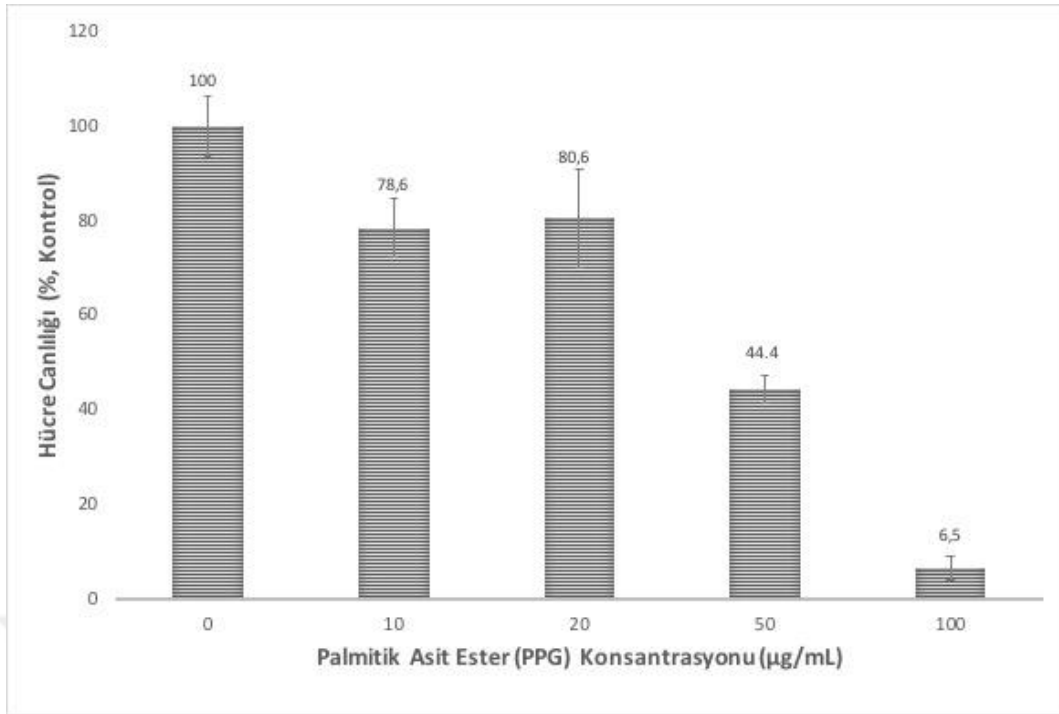
KÖGEM koleksiyonundan kullanılan bu hücrelerin daha önce yapılmış olan karakterizasyon analizleri bu tez çalışması için yeniden tekrar edilmiştir. Karakterizasyon analizleri akım sitometri cihazı (BD, FACS CALIBUR) ile gerçekleştirilmiştir. CD105, CD90 ve CD73 belirteçleri pozitifken CD45, HLA-DR ve CD34 negatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



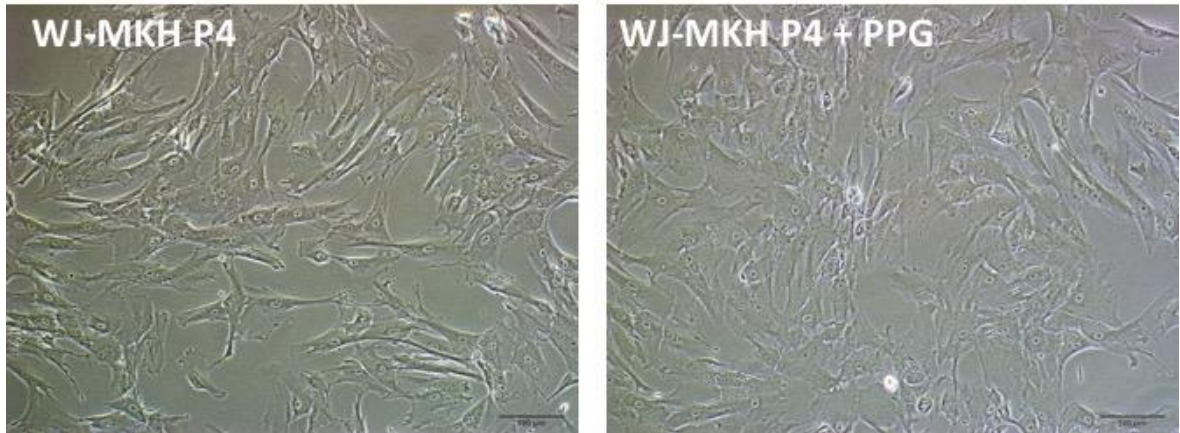
Şekil 4.2. WJ-MKH karakterizasyonu CD105, CD90, CD73, CD45, HLA-DR, CD34, hücre yüzey belirteçlerinin akım sitometri histogram grafikleri.

4.2. PPG'nin Toksik Dozunun Belirlenmesi

PPG'nin WJ-MKH üzerindeki etkilerinin incelenmesi hem morfolojik olarak hem de WST-8 analizleriyle belirlenmiştir. PPG'nin WJ-MKH'leri üzerindeki toksisite testi WST-8 ile gerçekleştirilmiştir. Literatürde %80 canlılık gösteren PPG dozlarının hücre kültüründe kullanılmasının uygun olduğu belirtildiği için, çalışmamızda %80 canlılığa karşılık gelen 20 µg/mL kullanılmıştır (Şekil 4.3). Belirlenen bu doz kaplama dozu olarak kabul edilmiştir. Morfolojik analiz için P4 WJ-MKH'ler 48 saat PPG ile inkübe edilmiş ve canlılıkta herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. WJ-MKH'lere uygulanan farklı konstantrasyonlarda PPG muamelesinden sonra hücre üzerindeki etkilerini gösteren WST-8 analizinin grafiği.

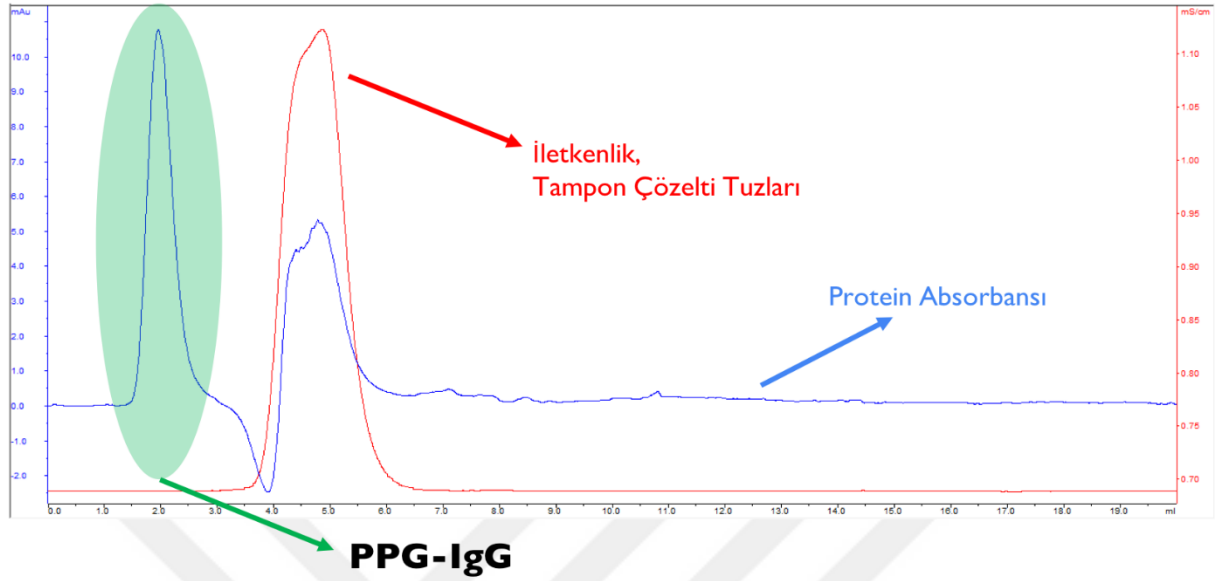


Şekil 4.4. Belirlenen PPG dozunun WJ-MKH'lar ile inkübasyon sonrası morfolojik görüntüleri. (Ölçek Çubukları: 100 µm)

4.3. FPLC Yöntemi ile PPG-anti-IgG Konjuge Molekül Saflaştırması

WJ-MKH'leri kaplama işlemi gerçekleştirilmeden önce PPG, FPLC cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır. Palmitasyon reaksiyonu sonrasında PPG ürününün saflaştırma işlemi FPLC (fast protein liquid chromatography) yöntemiyle HiTrap Desalting kolonu (5 mL, Cytiva, Uppsala, Sweden) kullanılarak yapılmıştır. Bu saflaştırma sonrası reaksiyon sırasında eklenen tuzlarından, azasitidin ya da hücre canlılığını azaltan herhangi

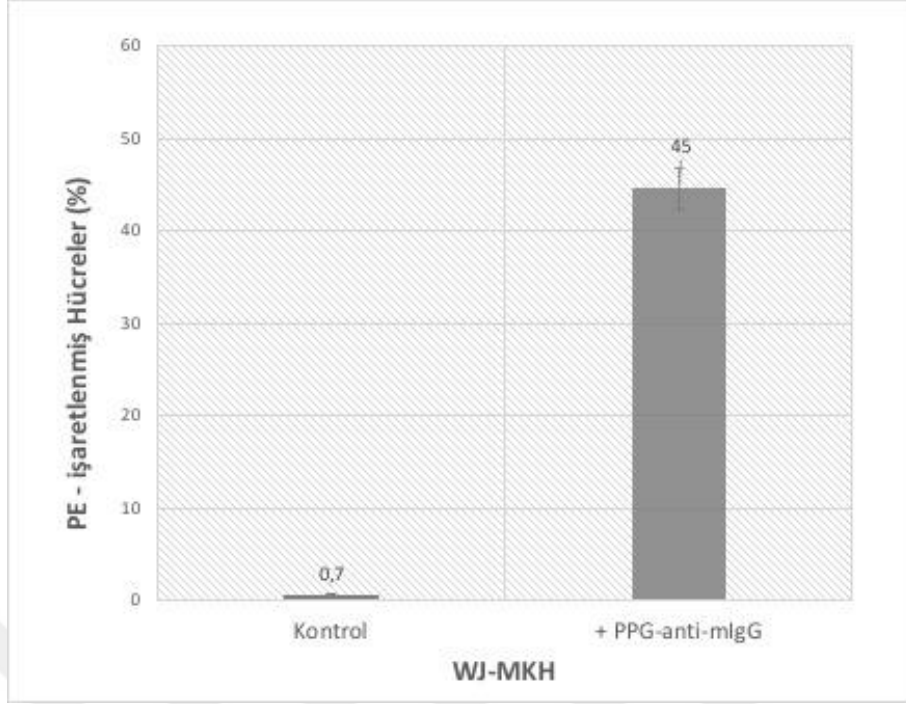
bir içerikten arındırılıp saf olarak hücre kaplaması için elverişli hale getirilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. PPG'nin FPLC grafiği. Saflaştırma aşamasında PPG, IgG ve NHS-palmitik asidin akış sırasında çıktığı yer okla gösterilmiştir. Mavi ok: Absorbans değeri (OD280), Kırmızı ok: Ortam iletkenliği, Yeşil: PPG

4.4. PPG Kaplama Veriminin Belirlenmesi

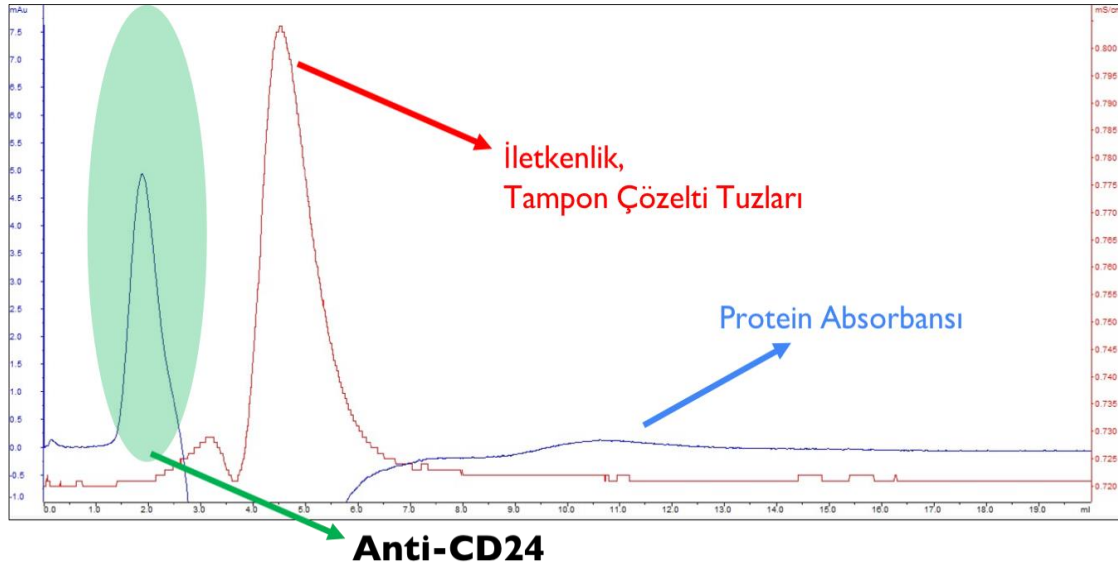
Hücrelerin PPG kaplama verimi IgG-PE (565 nm) boyanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Hücre zarı üzerindeki antikör kaplaması sonrasında PPG konsantrasyonunun etkisini incelemek için, WJ-MKH'ler belirlenen dozda PPG ile işleme tabi tutulmuş ve ardından PE ile inkübe edilmiştir. PPG üzerindeki anti-IgG proteini PE-konjuge bağlı antikoru ile işaretlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. WJ-MKH'lerin PPG-anti-IgG kaplama verimi grafiği.

4.5. FPLC Yöntemi ile anti-CD24 Antikoru Saflaştırması

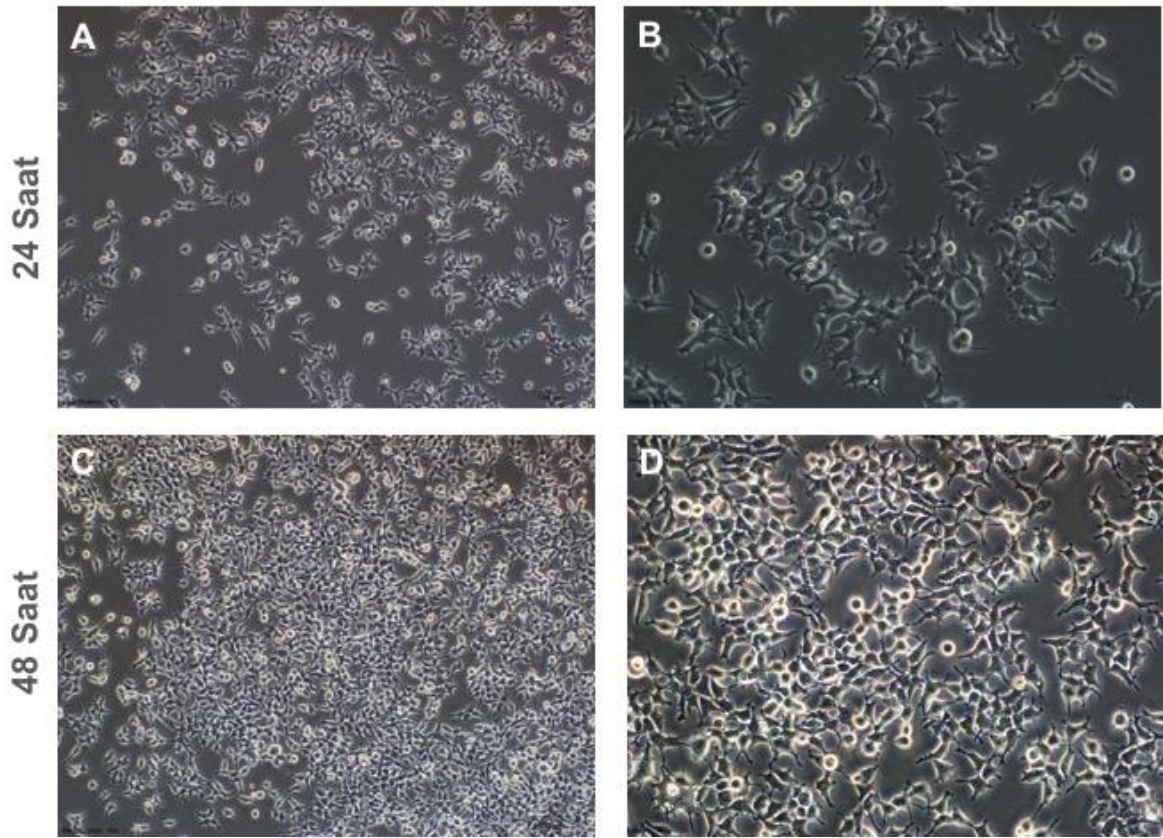
WJ-MKH'leri kaplama işlemi gerçekleştirilmeden önce anti-CD24 antikorunun saflaştırma işlemi PPG saflaştırılmasında olduğu gibi aynı yöntemle gerçekleştirilmiştir. HiTrap Desalting kolonu (5 mL, Cytiva, Uppsala, Sweden) kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırmada amaç antikorların içerisinde azasitidin ya da hücre canlılığını azaltan herhangi bir ajanın ortamdan uzaklaştırılmasıdır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Anti-CD24 antikorunun FPLC grafiği. Mavi Ok: Absorbans değeri (OD280), Kırmızı ok: Ortam iletkenliği, Yeşil ok: Anti-CD24 Antikoru

4.6. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Kültürü

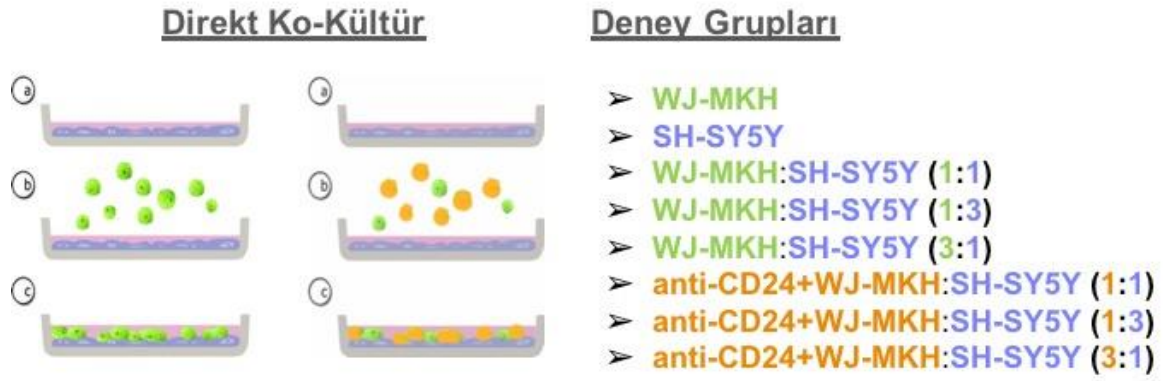
SH-SY5Y hücreleri %15 FBS, %1 NEAA ve Pen/Strep içeren DMEM F-12 besiyeri ile kültüre edilmiştir. Hücreler 24 saat ve 48 saat olmak üzere kültüre edilerek morfolojik olarak invert mikroskop ile gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. SH-SY5Y Nöroblastoma hücre hattı 24 ve 48 saatlik kültür sonrası invert mikroskop ile görüntüleri (Ölçek çubukları; A,C:100 µm; B,D: 50 µm).

4.7. Ko-Kültür Çalışmaları

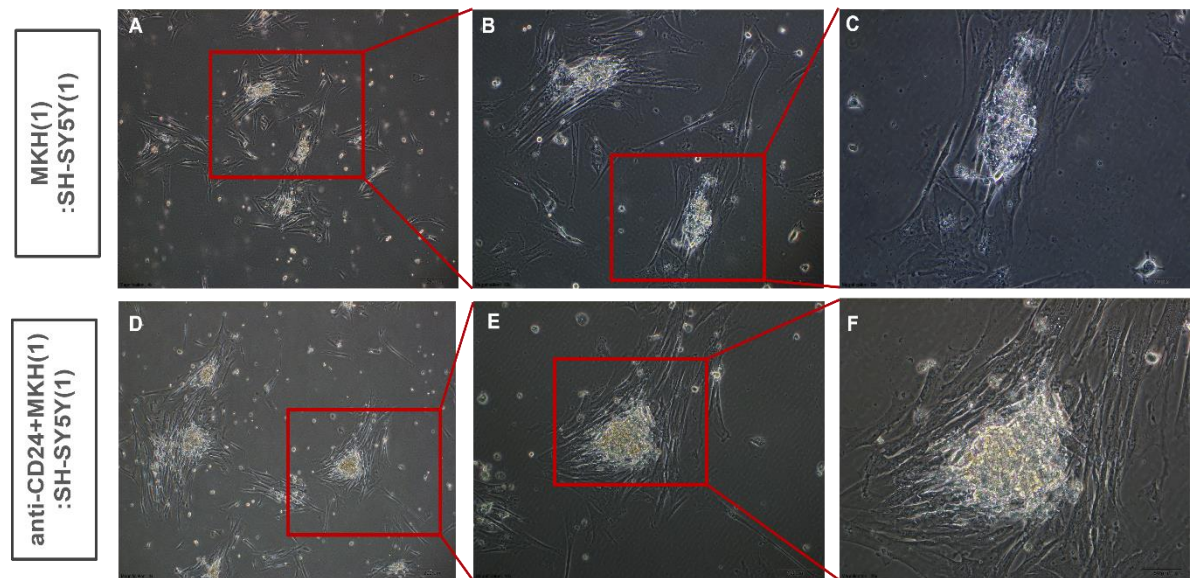
SH-SY5Y hücreleri ve WJ-MKH ve anti-CD24+WJ-MKH grupları arasında direkt ko-kültür yöntemiyle hücrelerin bire bir teması sağlanmıştır (Şekil 4.9). Ko-kültürde 48 saat bekletilen gruplar morfolojik, canlılık, proliferasyon, ROS analizleri ve gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.9. Direkt ko-kültür yöntemi ile kültüre edilen deney gruplarının şematik gösterimi.

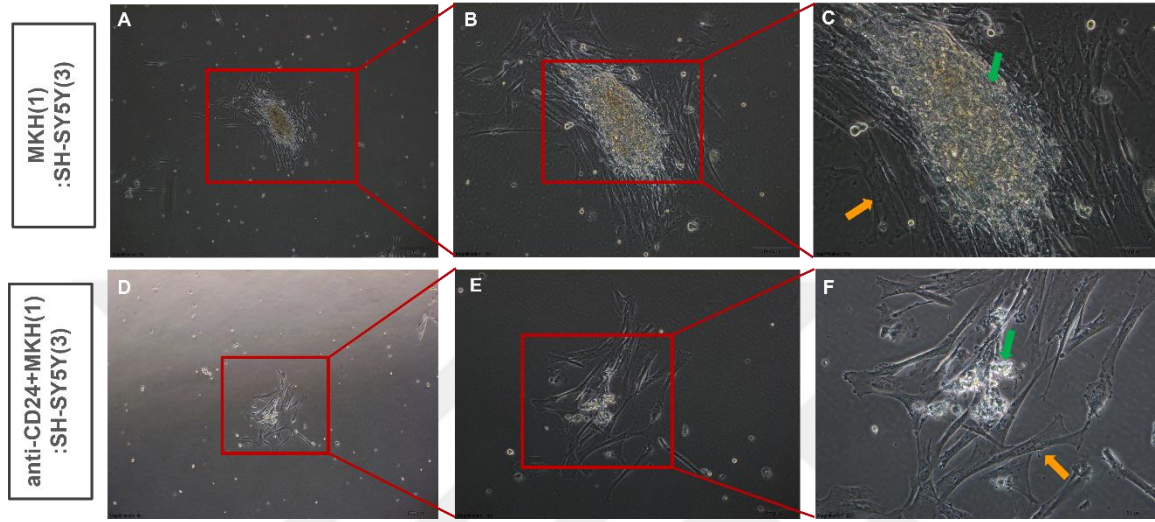
4.6.1. Deney Grupları Arasında Direkt Ko-Kültür Sonrası Morfolojik Analizler

SH-SY5Y, WJ-MKH ve anti-CD24+WJ-MKH hücrelerinin 24 ve 48 saat süren farklı oranlarda ko-kültürleri sonrası hücrelerin morfolojik olarak analizleri gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonraki ko-kültür sonucu WJ-MKH ve SH-SY5Y hücrelerinin birbirine hücre uzantıları çıkararak temas ettikleri gözlenmiştir (Şekil 4.13). Morfolojik analizler sonrasında 48 saatlik ko-kültürlerde nöroblastoma hücrelerinin daha koloni benzeri yapıları WJ-MKH'lerin etrafta kalacak şekilde oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 4.10, 4.11, 4.12).

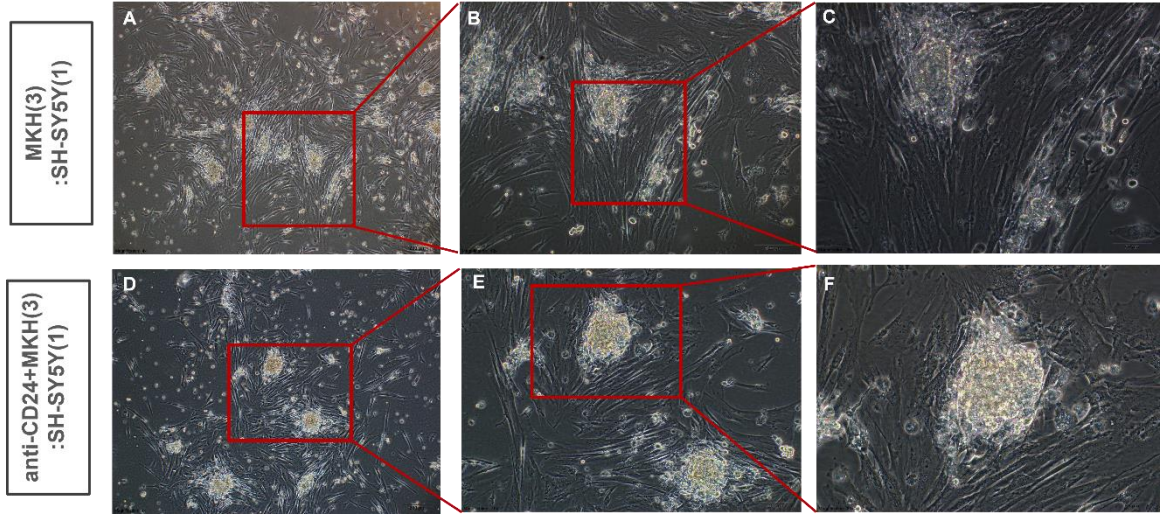


Şekil 4.10. Anti-CD24 kaplanmış ve kaplanmamış kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile 48 saatlik ko-kültür sonrası morfolojisi (1:1 Oran). (A, B, C) WJ-MKH:SH-SY5Y(1:1), (D, E, F) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1). (Ölçek Çubukları; A, D: 200 μ m, B, E: 100 μ m, C, F:50 μ m)

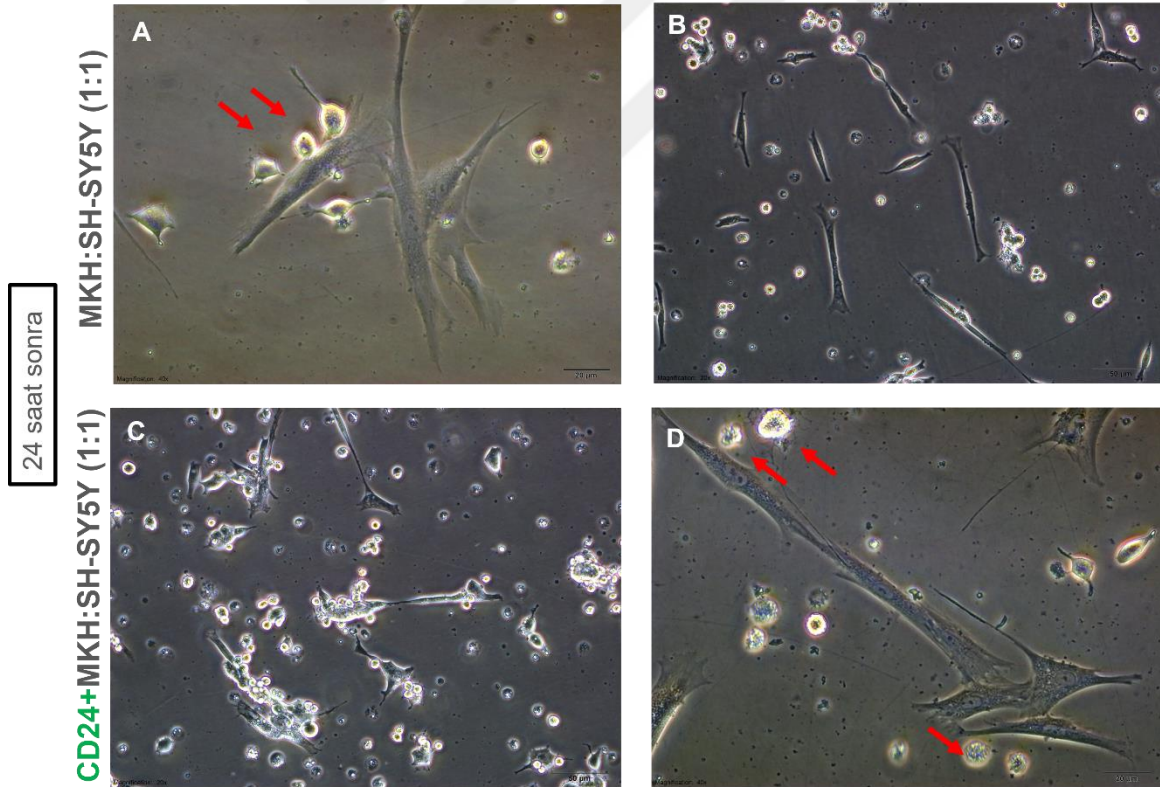
Çalışmalarda WJ-MKH sayıları sabit tutulmuştur ve ko-kültür başlangıcında 12-kuyucuklu kültür kaplarında her kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. Anti-CD24+WJ-MKH'lerin SH-SY5Y hücrelerinden 3 kat fazla kullanıldığı grupta ko-kültürden 48 saat sonra koloni benzeri yapıların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Anti-CD24 kaplanmış ve kaplanmamış kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile ko-kültür sonrası morfolojisi (1:3 Oran). (A, B, C) WJ-MKH:SH-SY5Y(1:3), (D, E, F) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:3). Turuncu ok: MKH, Yeşil ok: Nöroblastoma Hücreleri (Ölçek Çubukları; A, D: 200 µm, B, E: 100 µm, C, F:50 µm)



Şekil 4.12. Anti-CD24 kaplanmış ve kaplanmamış kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile ko-kültür sonrası morfolojisi (3:1 Oran). (A, B, C) WJ-MKH:SH-SY5Y (3:1), (D, E, F) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (3:1). (Ölçek Çubukları; A, D: 200 μ m, B, E: 100 μ m, C, F:50 μ m)

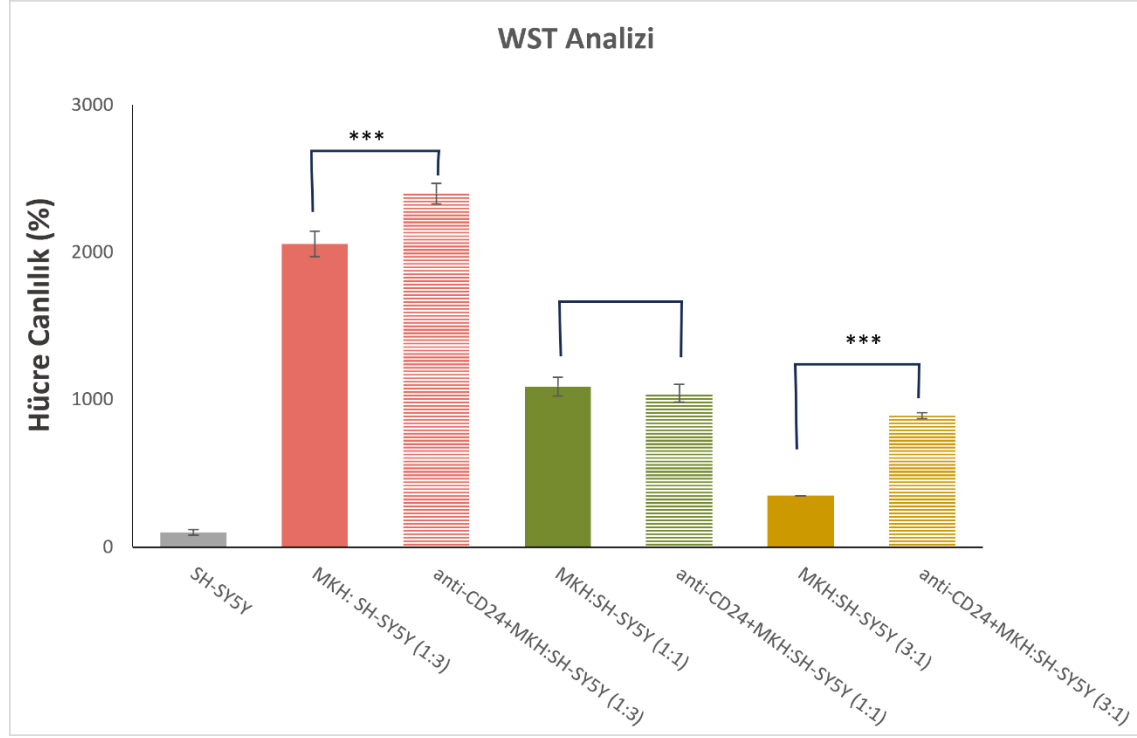


Şekil 4.13. Anti-CD24 kaplanmış ve kaplanmamış kök hücrelerin nöroblastoma hücreleri ile 24 saatlik ko-kültür sonrası morfolojisi (1:1 Oran). (A, B) WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1), (C, D) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1).

(C, D) anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1). Kırmızı ok: Nöroblastoma hücreleri (Ölçek Çubukları; A: 20 µm, B-C: 50 µm, D:20 µm)

4.6.2. Direkt Ko-Kültür Sonrası Hücre Çoğalma Analizi

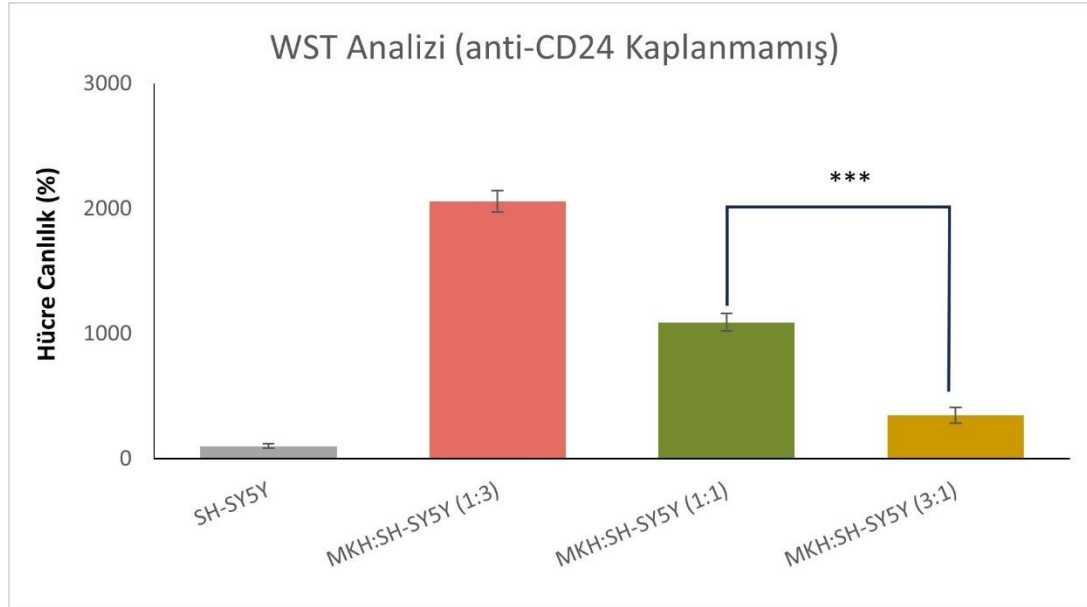
Deney grupları ile kaplamanın 48 saat sonrasındaki ko-kültürde proliferasyona etkisini analiz etmek amacıyla WST-8 testi gerçekleştirilmiştir.



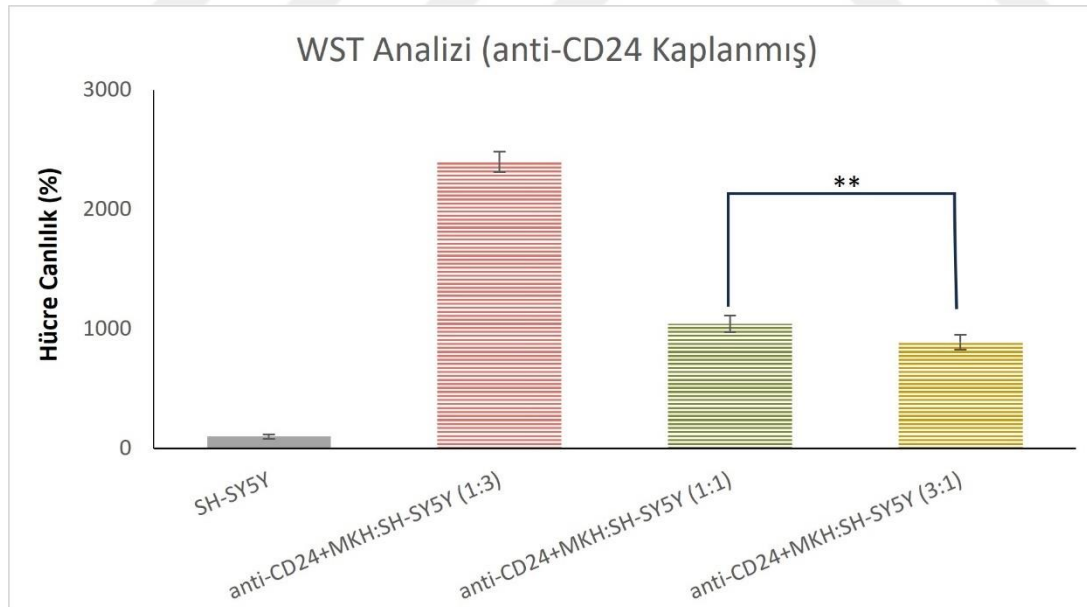
Şekil 4.14. Deney grupları arasındaki hücre canlılık (WST-8) analizi grafiği. Kontrol grubuna göre yüzde hesaplamaları (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

1:3, 1:1 ve 3:1 oranlardaki ko- kültür gruplarında antikor kaplamasının hücreler üzerin etkisini kantitatif olarak da gösterebilmek amacıyla WST-8 testi gerçekleştirilmiştir. (Şekil 4.14). WJ-MKH'leri anti-CD24 ile kaplama yönteminin hücrelerin çoğalma oranlarına etki etmediği ve hücreleri toksik bir etki yaratarak ölüme götürmediği gözlenmiştir. Buradaki analiz sonuçlarına göre belirlenen kaplama dozunun toksik olmadığı görülmektedir. Hücre oranlarındaki yoğunluktan dolayı 1:1 oranındaki hücre gruplarında 1:3 oranındaki gruplara göre daha düşük proliferasyon gözlenirken kaplanmış mezenkimal kök hücrelerin kanser hücreleri üzerinde 1:1 oranında birlikte kültüre edildiklerinde proliferasyonu baskılayabilecekleri öngörülmektedir. Antikor kaplanmamış

gruplardaki canlılık oranları ve anti-CD24 ile kaplanmış gruplardaki hücre canlılık oranları analiz edilmiştir (Şekil 4.14a ve Şekil 4.14b).



Şekil 4.14a. Antikorla kaplama yapılmamış deney grupları arasında hücre canlılık (WST-8) analizi grafiği. Kontrol grubuna göre yüzde hesaplamaları

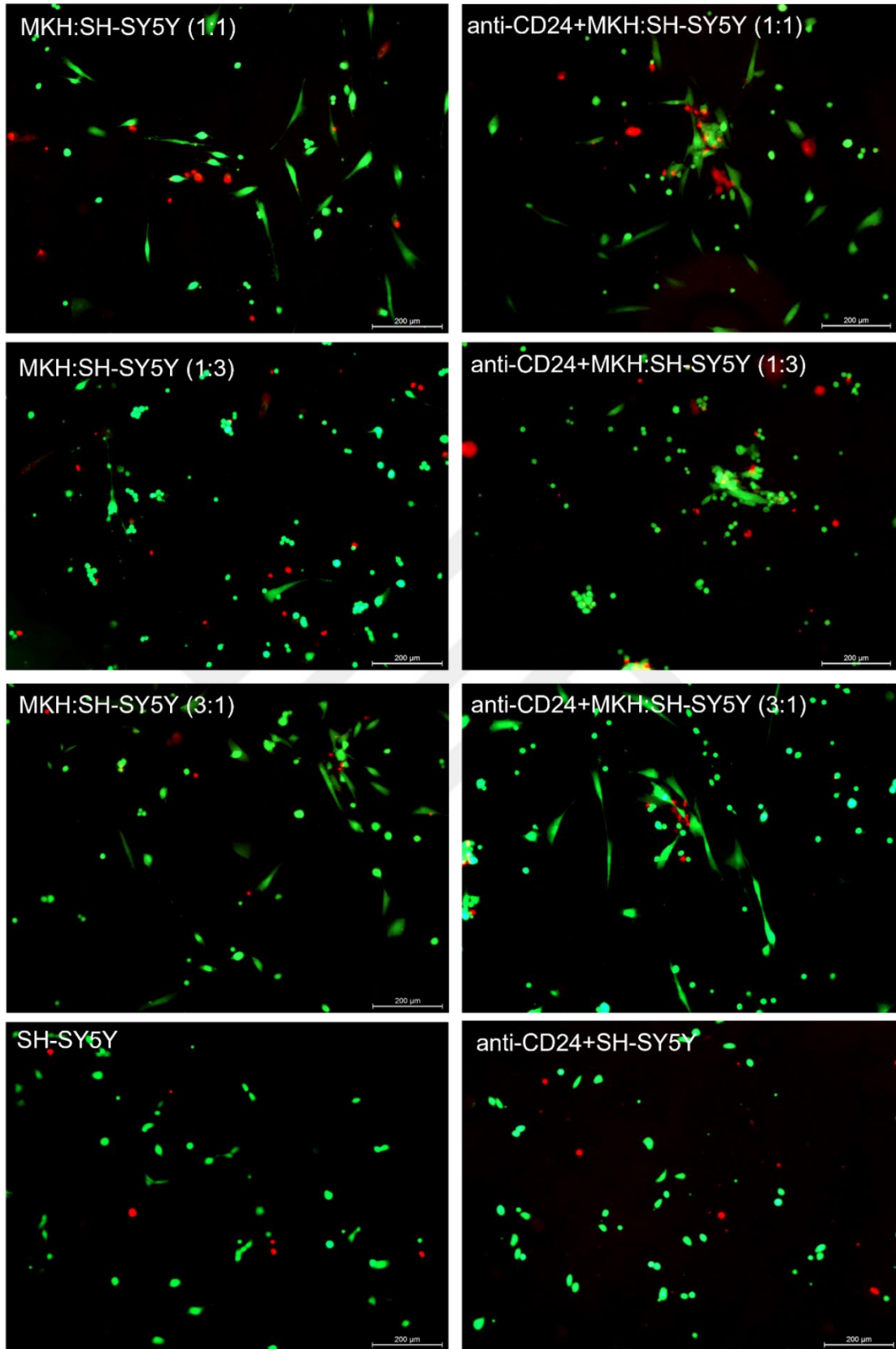


Şekil 4.14b. Anti-CD24 antikoru ile kaplama yapılmamış deney grupları arasında hücre canlılık (WST-8) analizi grafiği. Kontrol grubuna göre yüzde hesaplamaları

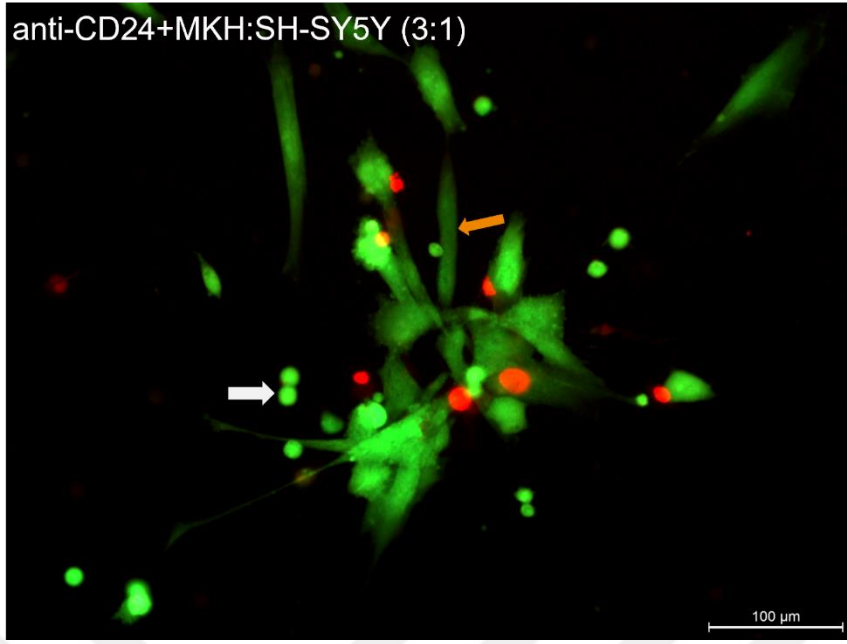
4.6.3. Canlı-Ölü (Live-Dead) Analizi

Deney grupları arasındaki ko-kültürden sonra hücrelerinin etkileşim analizlerinden birisi olan Live-Dead analizi ticari bir kit ile gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığının ölçülmesi prensibi ile çalışan bu kit Kalsein-AM (yeşil-canlı hücreleri boyar), Propidium Iodide-PI (kırmızı-ölü hücreleri boyar) ve Hoechst 33342'den (mavi-tüm hücreleri boyar) oluşan üç renk ile canlı ölü ayrımı yapılmıştır. Gruplar boyama sonrası floresan mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 4.15). Koloni oluşumu bu boyama yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil. 4.16).





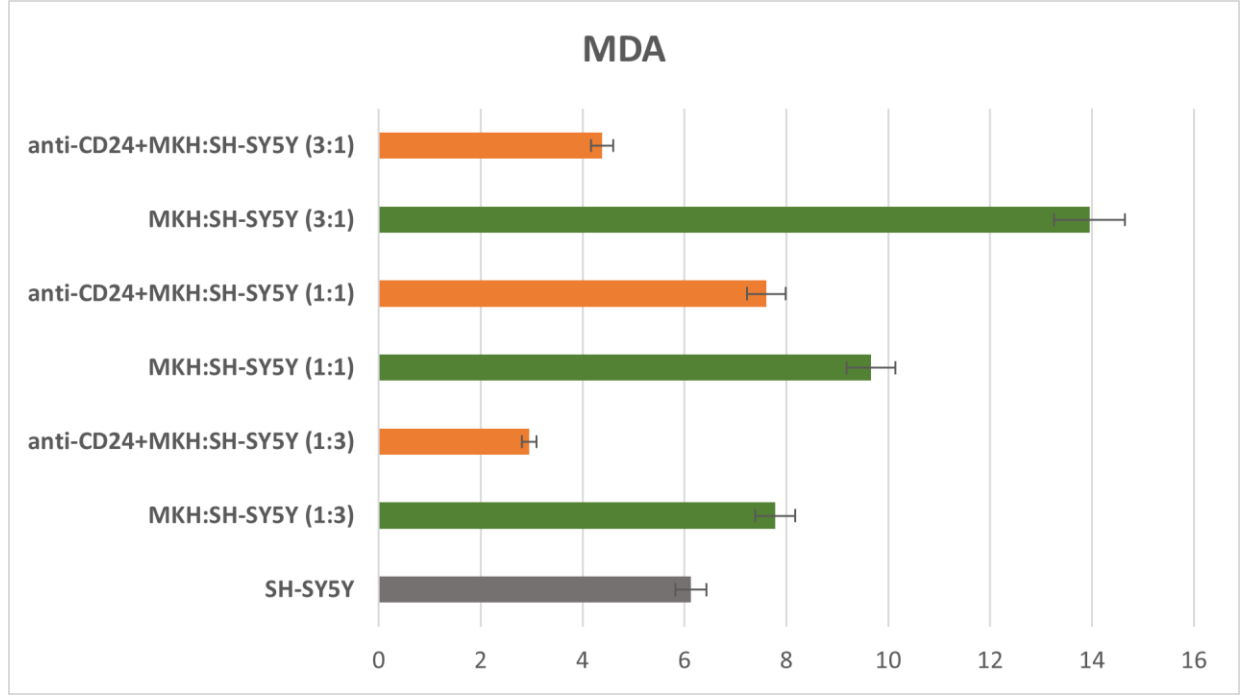
Şekil 4.15. Live-Dead boyaması sonrası floresan mikroskop görüntüleri. (Ölçek çubukları; 200 μm .)



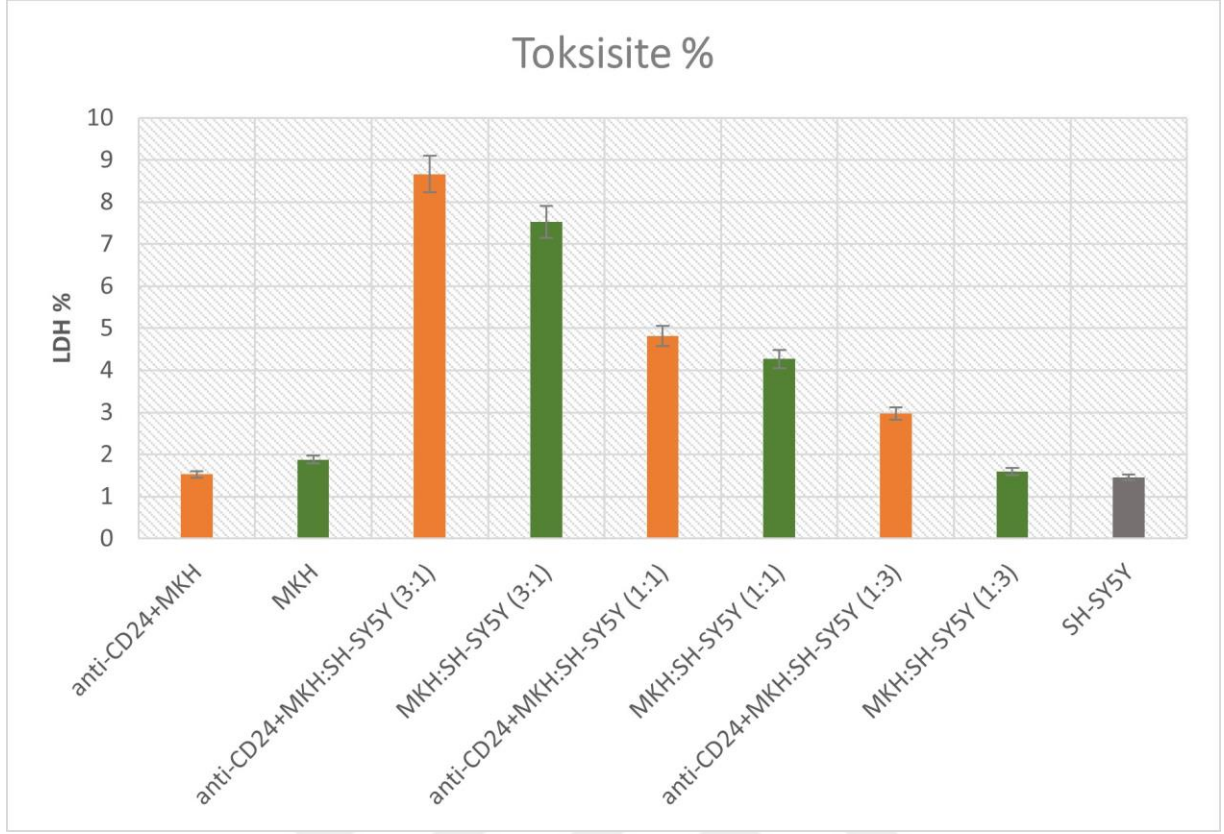
Şekil 4.16. Anti-CD24+MKH:SH-SY5Y ko-kültürü sonrası (3:1) oranındaki grupta koloni oluşumunun live-dead boyaması sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Turuncu ok: Anti-CD24+MKH, Beyaz ok: SH-SY5Y. (Ölçek çubuğu; 100 µm.)

4.6.4. MDA ve LDH Analizi

Kaplanma öncesinde ko-kültür gerçekleştirilen gruplarda oksidatif stresi değerlendirmek için lipid peroksidasyonunun kantifikasyonunu gösteren MDA ve LDH analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Tüm deney grupları arasında yapılan MDA analizi grafiği.



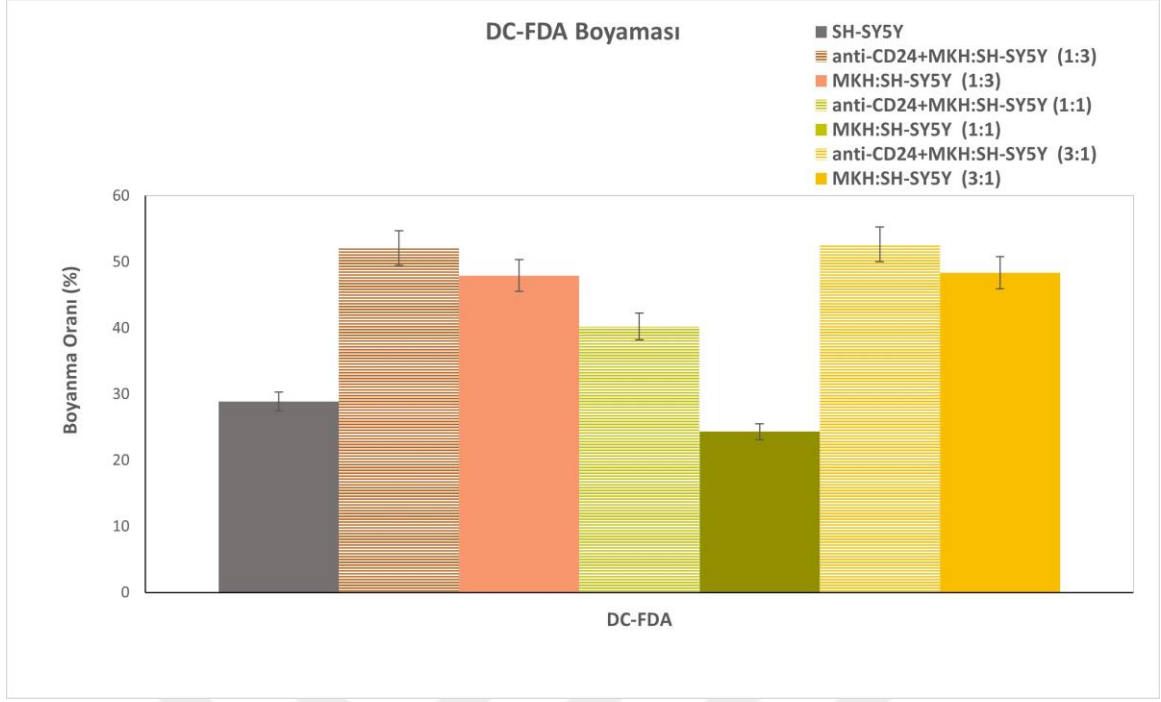
Şekil. 4.18. Tüm deney grupları arasında gerçekleştirilen LDH analizi grafiği.

MKH'nin yüksek oranda olduğu grupta MDA yüksek seviyelerde gözlenmiştir. Bu durumun ortamdaki enflamasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. LDH, ortamdaki hücre membranı parçalanmasını göstermektedir. Ortaya salınan sitoplazmik enzimlerin aktivitesi LDH oranlarını belirlemektedir. Gruplar arasında benzer bir LDH seviyesi gözlenmesi kaplama sonrası toksisitede bir artış olmadığını göstermektedir. Ayrıca en yüksek LDH seviyesi (3:1) oranındaki gruplarda gözlenmiştir (Şekil 4.18).

4.6.5. ROS Analizi

Deney gruplarında ROS miktarını tespit edebilmek için DC-FDA boyaması gerçekleştirilmiştir. Akım sitometrisinde analizi gerçekleştirilen DC-FDA floresan boyama, ışıma miktarı ile doğru orantılı olarak ROS miktarını göstermektedir.

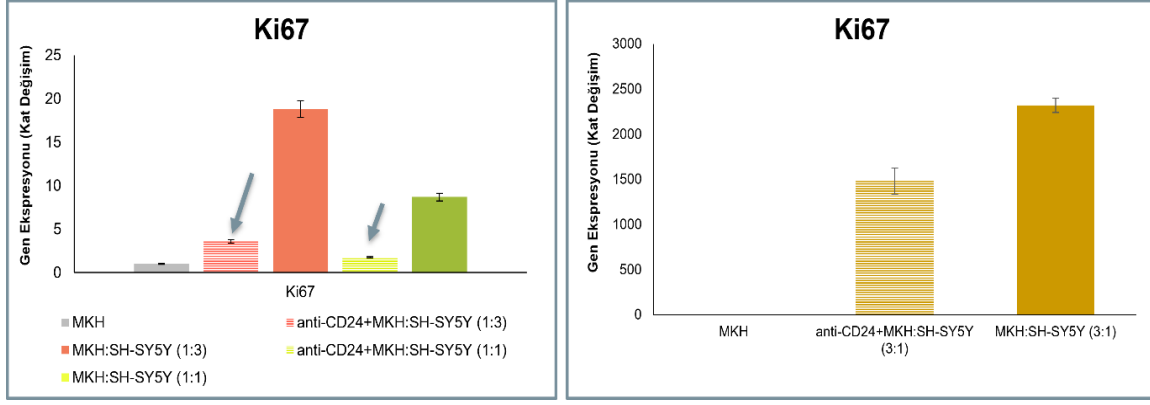
Tüm deney grupları arasında anti-CD24 kaplanmış MKH'lerde ROS yüksek seyrederken diğer gruplarda daha düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Deney grupları arasında yapılan DC-FDA boyaması sonucunda ROS seviyelerinin analiz grafiği.

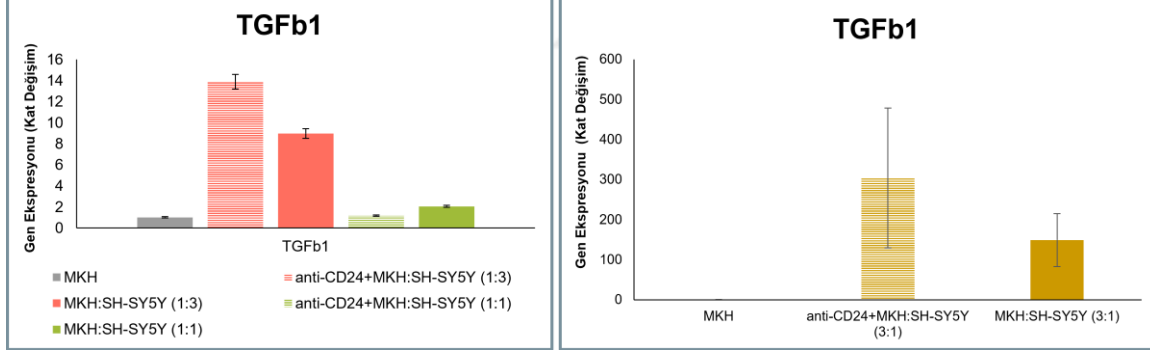
4.6.6. Ko-Kültür Sonrası Gen Ekspresyon Profiline Gerçek Zamanlı PZR ile Değerlendirilmesi

Deney gruplarında ko-kültür çalışmaları sonrası gen ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. Hücrelerin eksprese ettiği her bir genin değerlendirilmesi için Actb (Actin β) geni referans olarak kullanılarak ΔC_p hesaplanmış, WJ-MKH'lere oranlanarak da $\Delta\Delta C_p$ değerleri belirlenmiştir.



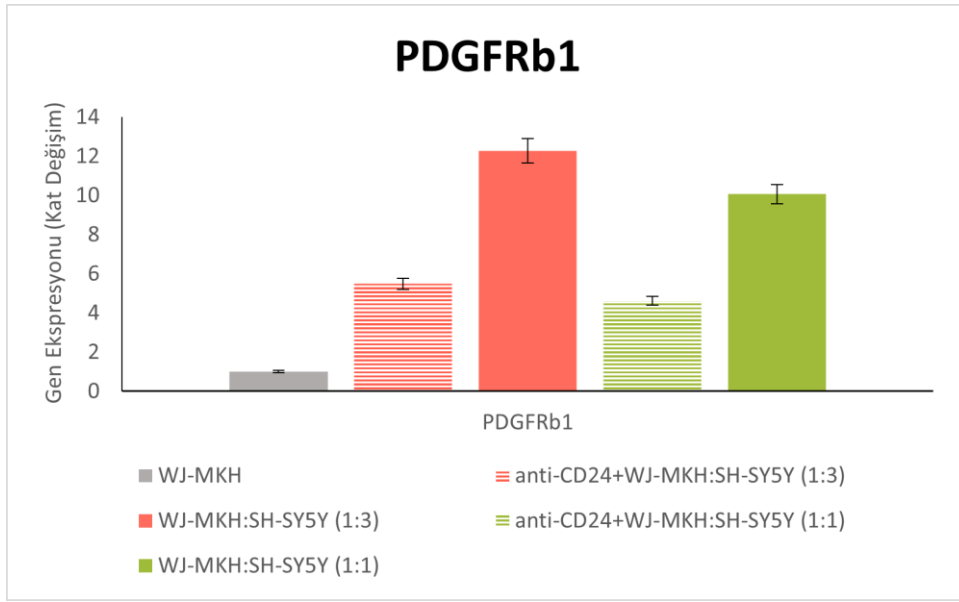
Şekil 4.20. Ki-67 geninin ko-kültür sonrası deney grupları arasında karşılaştırmalı ekspresyon grafiği.

Hücre çoğalmasının bir belirteci olarak Ki-67 ekspresyonu tüm gruplar için incelenmiştir. Anti-CD24+WJ-MKH'ler ile yapılan ko-kültür sonrasında anti-CD24+ olmayanlara göre anlamlı derecede düşüş gözlenmiştir. Ki-67 gen ekspresyon analizi incelendiğinde en yüksek Ki-67 ifadesinin WJ-MKH:SH-SY5Y (3:1) olan ko-kültür grubunda olduğu belirlenmiştir. En düşük Ki-67 ifadesi ise anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y(1:1) grubunda görülmüştür (Şekil 4.20).



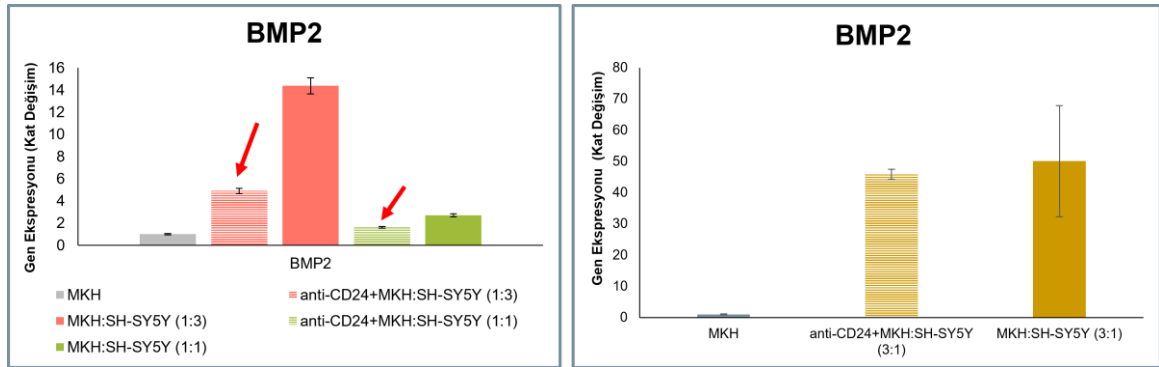
Şekil 4.21. TGFb1 geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.

TGFb geninin hücresel faaliyetleri düzenlediği bilinmektedir. Deney grupları arasında TGFb1'nin ekspresyonları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasında en yüksek TGFb1 gen ifadesi anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (3:1) grubunda gözlenmiştir. En düşük TGFb1 gen ifadesinin ise anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1) grubunda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.22. PDGFRb1 geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.

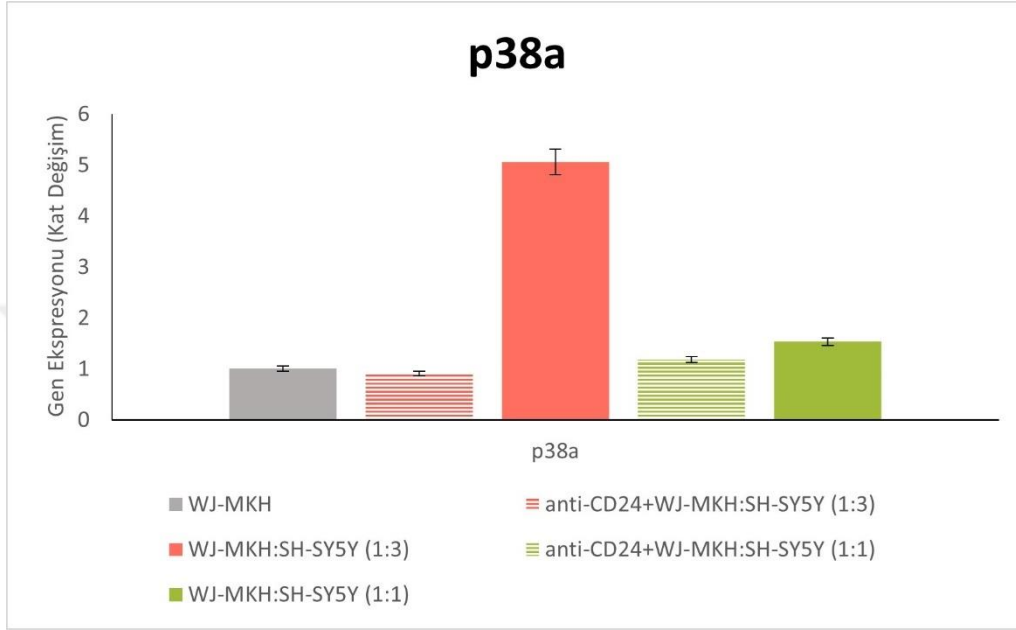
PDGFRb1 geninin hücrelerin köklülük özelliklerinin devamında ve ayrıca tümör anjiyogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Deney grupları arası yapılan karşılaştırmalarda en yüksek PDGFRb1 ekspresyonu WJ-MKH:SH-SY5Y (1:3) grubunda görülmüştür. Anti-CD24 antikoru ile kaplama yapılan gruplarda diğer gruplara göre PDGFRb1 geni ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir (Şekil.4.22).



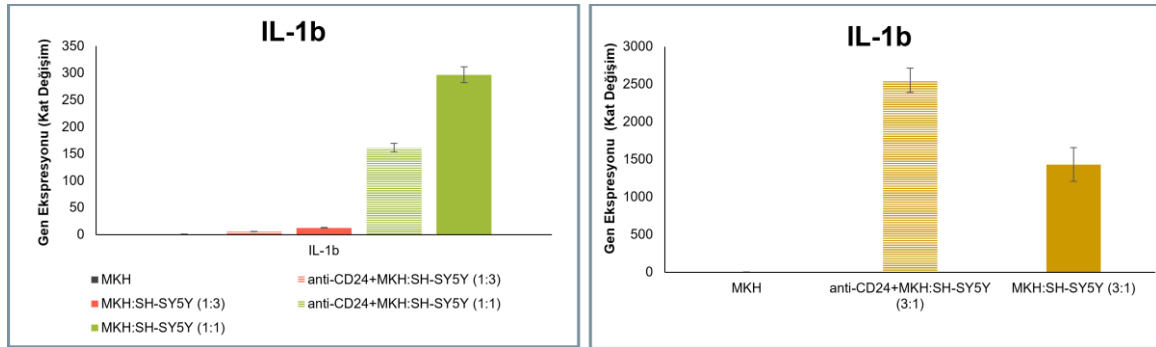
Şekil 4.23. BMP2 geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.

BMP2 geninin nöroblastoma hücrelerinin büyüme duraksaması ve nöronal farklılaşması üzerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Deney grupları arası yapılan karşılaştırmalarda en düşük BMP2 ekspresyonu anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y(1:1) grubunda görülmüştür. Anti-CD24 antikoru ile kaplama yapılan gruplarda kaplama yapılmamış diğer gruplara göre BMP2 geni ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir (Şekil.4.23).

p38a geni, MAPK ailesinin bir üyesi olarak, tümörögenez ve kanser agresifliği de dahil olmak üzere çeşitli hücrel süreçlerle ilişkilendirilmiştir. Deney grupları arası yapılan karşılaştırmalarda en yüksek ekspresyon WJ-MKH:SH-SY5Y (1:3) grubunda görülmüştür. Anti-CD24 antikorı ile kaplama yapılan gruplarda diğer gruplara göre p38a geni ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir (Şekil.4.24).



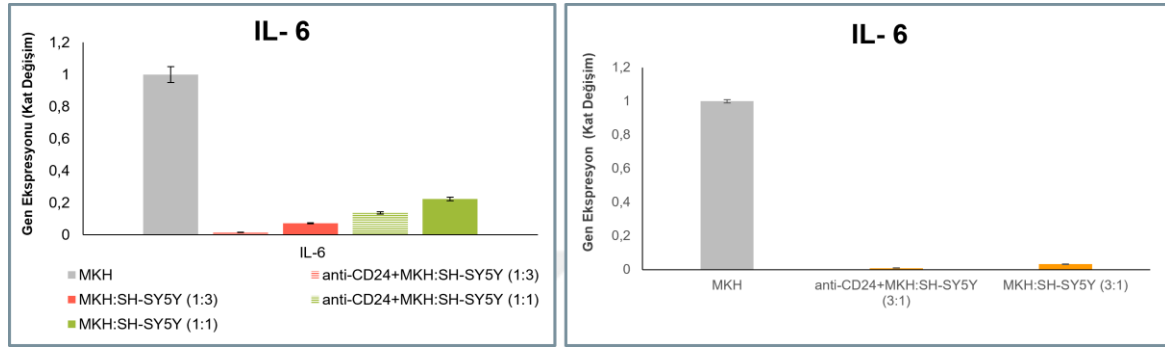
Şekil 4.24. p38a geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.



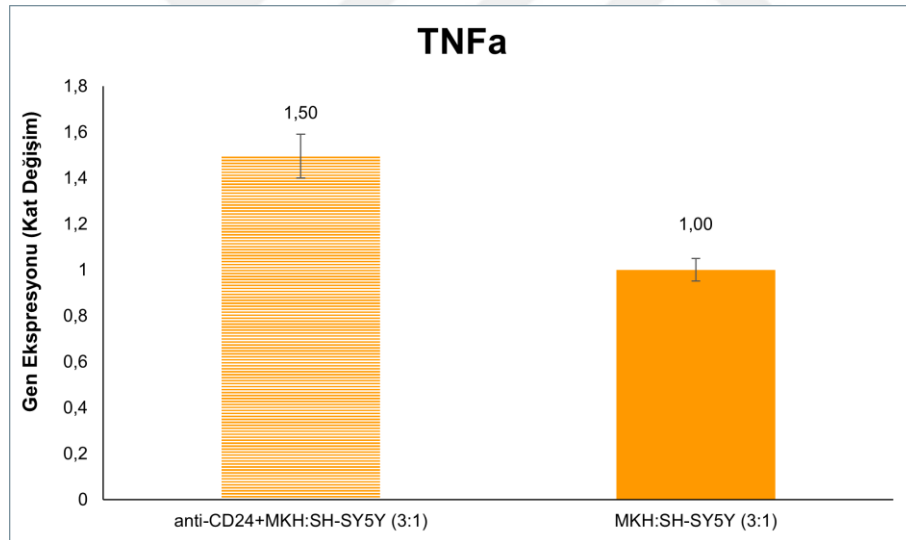
Şekil 4.25. IL-1b geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.

IL-1b'nin, MKH'lerin migrasyonunu, bağışıklık hücrelerine çekilmesini ve rejeneratif tedavi potansiyellerini etkileyen temel bir düzenleyici olduğu ayrıca nöroblastomada apoptotik süreci düzenlemede potansiyel bir rolü olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Deney grupları arası yapılan karşılaştırmalarda MKH ve nöroblastoma hücrelerinin 1:1 oranda olduğu iki grupta diğer gruba göre anlamlı bir yükseliş görülmekle

beraber en yüksek ekspresyon anti-CD24+-MKH:SH-SY5Y (3:1) grubunda gözlenmektedir (Şekil.4.25). En yüksek IL-6 ekspresyonu ise WJ-MKH'lerin yalnız olduğu grupta gözlenmiştir. Bunun sebebi IL-6'nın, MKH'ler tarafından salgılanan immünsüpresyonda görevli önemli bir sitokin olmasıdır. Aynı zamanda, IL-6, MKH'lerin migrasyonunu teşvik etmektedir. Anti-CD24 antikorlu ile kaplı MKH'lerin bulunduğu gruplarda diğer gruplara göre daha düşük IL-6 ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 4.26).

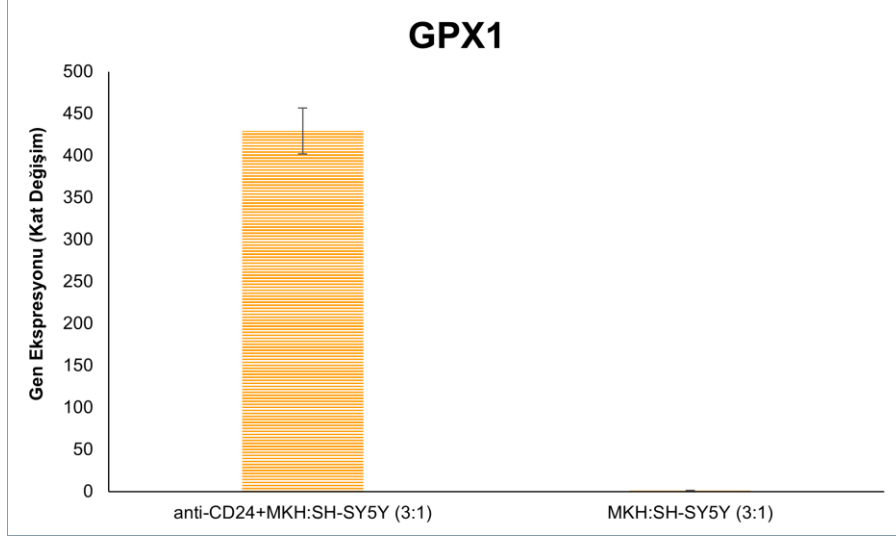


Şekil 4.26. IL-6 geninin deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafikleri.



Şekil 4.27. TNFa geninin (3:1) oranındaki deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.

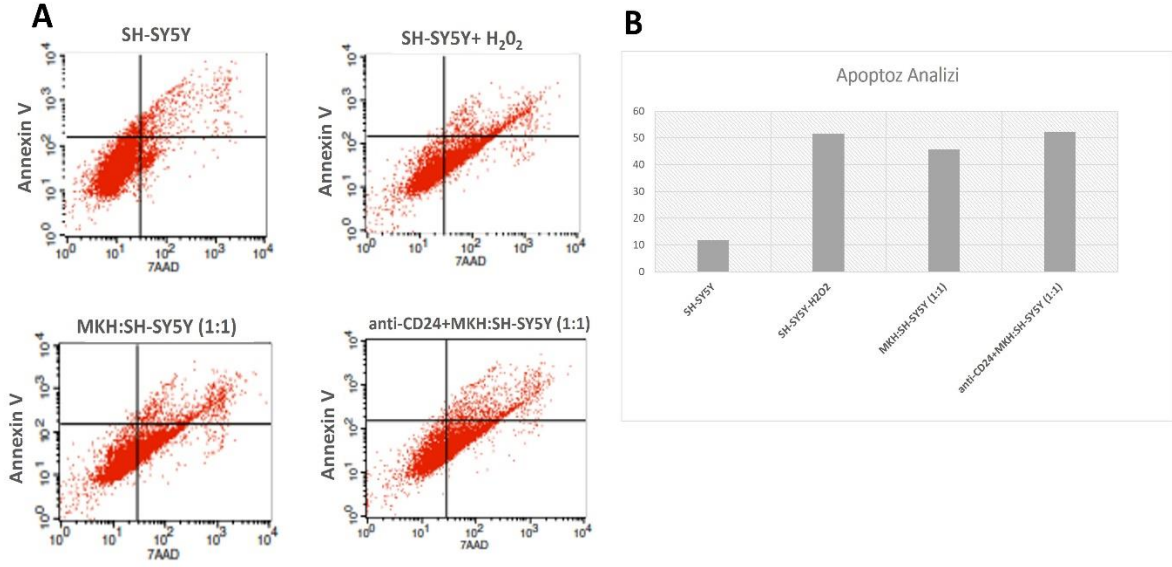
Deney grupları arasında sadece (3:1) oranındaki gruplarda ek olarak TNFa ve GPX1 gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Anti-CD24+ olan grupta yaklaşık 1,5 kat daha yüksek TNFa ifadesi gözlenmektedir (Şekil 4.27). GPX1 gen ifadesinin ise yine antikor kaplaması yapılan grupta kaplama yapılmayan gruba göre oldukça arttığını görülmektedir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. GPX1 geninin (3:1) oranındaki deney gruplarında ko-kültür sonrası ekspresyon grafiği.

4.6.7. Apoptoz Tayini

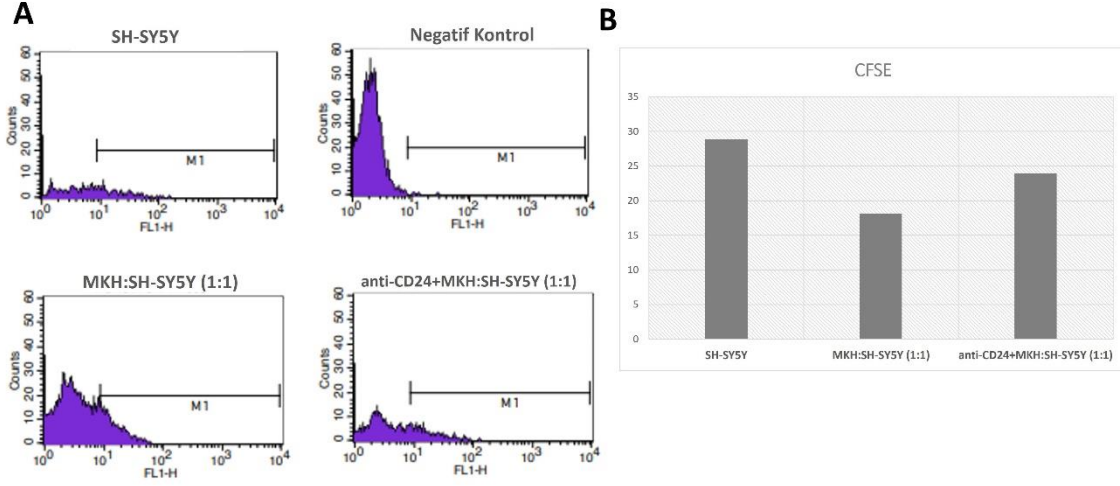
WST-8 hücre canlılık analizi sonuçlarına göre MKH ve nöroblastoma hücreleri arasında yapılan ko-kültürde (1:1) oranı için apoptoz tayini gerçekleştirilmiştir. Bu analiz ticari kit kullanılarak üreticinin yönergeleri doğrultusunda uygulanmıştır. Pozitif kontrol için SH-SY5Y hücreleri H_2O_2 (hidrojen peroksit) ile apoptoz için inkübe edilmiştir. Apoptoz tayini akım sitometri cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Apoptotik hücrelerin (1:1) oranındaki ko-kültür sonrası anti-CD24 antikoru ile kaplanmış MKH'lerin bulunduğu grupta kaplanmamış gruba göre daha fazla olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Belirlenmiş deney gruplarında (1:1) gerçekleştirilen apoptoz tayini. (A) Annexin V-7AAD analizinin akım sitometri dot plot grafiği; (B) Apoptoz tayininin nicelik grafiği.

4.6.8. CFSE Proliferasyon Analizi

MKH ve nöroblastoma hücreleri arasında yapılan ko-kültürde (1:1) oranı için CFSE işaretlemesi kullanılarak proliferasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Ticari kit kullanılarak gerçekleştirilen bu analiz ile apoptoz analizi bulguları birbirine koreledir. Ko-kültür sonrası (1:1) oranında anti-CD24 antikorlu ile kaplanmış MKH'lerin bulunduğu grupta kaplanmamış gruba göre daha yüksek CFSE miktarı tayin edilmiştir. Bu durum bu grupta proliferasyonun daha az olduğunu göstermektedir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Belirlenmiş deney gruplarında gerçekleştirilen CFSE analizi. (A) CFSE analizinin akım sitometri histogram grafiği; (B) CFSE proliferasyon analizinin nicelik grafiği.

5. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler (MKH), sahip oldukları rejeneratif özellikler nedeniyle günümüzde klinik kullanımda yüksek potansiyel sahibidir. Diğer kaynaklardan elde edilen kök hücrelere kıyasla WJ kaynaklı MKH'lerin yapılan çalışmalar sonucu daha terapötik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin WJ-MKH'ler hematopoietik kök hücrelerle kıyaslandıklarında komşu hücrelerden destek almadan çoğalma ve farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Mendes, Robin, ve Dzierzak, 2005). Ayrıca WJ dokusu embriyonik kökeni dolayısıyla diğer erişkin MKH'lere göre daha düşük oranda senesense (yaşlanma oranı) sahiptir. Bu durum WJ-MKH'lerin erken pasajlarını klinik kullanım için oldukça uygun adaylar haline getirmektedir (Drobiova ve ark., 2023).

İleri tıbbi tedavi ürünleri (ATMPs) arasında olan MKH'ler artık sadece hücre içeriği için değil ayrıca hücrelerin salgıladığı sekretomları nedeniyle de oldukça yüksek önem taşımaktadır. MKH'lerin sekretomları, elde edilen doku kaynağına, kaynağın yaşına ve kullanılan hücre kültürü/farklılaşma ortamına bağlı olarak farklılıklar içermektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin sekresyon ürünlerinde belirgin farklılıklar gözlenmiştir (Shin ve ark., 2021).

Yapılan araştırmalarda WJ-MKH sekresyon ürünlerinin karşılaştırmalı analizleri birçok proteinin varlığını ortaya koymaktadır. Bu hücreler pro-tümör ve anti-tümör etki gösteren sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve granülosit-makrofaj koloni uyaran faktörü (GM-CSF) vb.) salgılamaktadır (Mirabdollahi, Haghjooyjavanmard, ve Sadeghi-aliabadi, 2019). WJ-MKH'lerin ve kemik iliği kaynaklı (Kİ) MKH'lerin gen ekspresyon profillerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada iki kaynaktan elde edilen MKH'lerin arasında önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur. Bu genler, immünmodülasyon, anjiyogenez, yara iyileşmesi, apoptoz, kemotaksi ve anti-tümör etki gibi farklı süreçlerde rol oynamaktadır (Barrett ve ark., 2019). WJ-MKH'lerin çalışmamızda tercih edilme nedeni yönlendirmeyi hedeflediğimiz nöroblastoma hücrelerine karşı olan etkisinden yüksek verimi alabilmek ve ayrıca klinik olarak allojenik kullanıma uygun olmasıdır. Sekresyon proteinlerinin çeşitliliği ve tez çalışmamızdaki amaca uygunluğu bu WJ kaynağını potansiyel aday haline getirmiştir.

MKH'lerin tümör hedefli taşıyıcı olarak kullanılmaları, tümör ilerlemesine karşı terapötik etkiyi artırma ve normal dokulara olan zararı azaltmada oldukça verimli olduğu

düşünülmektedir. Yapılan bazı çalışmalar tümör mikroçevresinin kronik yaralardaki mikroçevre ile benzer olduğunu ve MKH'lerin yönlendirilmiş göçünü tetikleyen proinflamatuvar sitokinlerin yüksek düzeyde ortamda bulunduğunu göstermiştir (Zhang, Huang, Su, ve Gao, 2021).

MKH'ler günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır fakat kök hücrelerin etkinlik seviyeleri bu kullanımı bazı durumlarda sınırlandırmaktadır. MKH'lerin lokal veya sistemik enjeksiyonlarının uzun vadeli sonuç almada yetersiz kaldıkları düşünülmektedir. Bu nedenle hedeflendirilmiş MKH'lerin istenilen bölgelere yönlendirilerek etkinliğinin artırılmasını amaçlayan çalışmalar tasarlanmaktadır. Bu kapsamda literatürde, hücreleri antikorlar veya peptitlerle kaplama, doğal hücre yüzey moleküllerini hedeflenen bölgeye bağlanabilen hale getirme, genetik modifikasyonlar veya hücre yüzey moleküllerini biyotinleme sonrası streptavidin ve biyotinleştirilmiş antikorlarla kaplama alanlarında çalışmalar yapılmaktadır (Kean, Lin, Caplan, ve Dennis, 2013). Bu yöntemler MKH'lerin enjeksiyonları ile bileştirildiğinde hedeflenen bölgelere göçü, etkinliği artırırken enjeksiyon için gereken hücre sayısını azaltabilir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda MKH'lerin etkinliklerinin artırılması için genetik modifikasyon, bazı fonksiyonel ajanların entegrasyonu ve hücre yüzey modifikasyonları gibi yöntemlere başvurulmuştur. Bu yöntemleri kullanmadaki amaç potansiyeli artırmanın yanı sıra hücreleri hedeflenen bölgeye/işleve yönlendirmektir. MKH'lerde gerçekleştirilen genetik modifikasyonlar kök hücrelerin doğal özelliklerini etkileyebilme riski barındırmaktadır. Bu nedenle nanopartikül (NP) tabanlı MKH yönlendirme sistemleri oldukça ilgi çekici olmuştur (Gao, Zhang, Hu, ve Sun, 2013). Tasarlanan sentetik NP tabanlı taşıyıcı sistemler umut verici sonuçlar göstermiş olsa da toksisite, taşıma verimi, hücrenin doğal özelliklerini koruma ve salınım verimi gibi parametrelerin uygunluğu bazı sınırlılıklar oluşturmaktadır. Bu sınırlılıkların doğrultusunda araştırmacılar MKH'lerin yüzey modifikasyonlarına yönelmişlerdir (Park ve ark., 2015).

Yaptığımız çalışmada hücre yüzey modifikasyon yöntemlerinden olan kovalent olmayan modifikasyon temelli antikor konjugasyon yöntemi kullanılmıştır. MKH'lerin spesifik olarak hedef bulma (homing) özelliğini artırmak amacıyla uygulanan antikor konjugasyon yöntemi antikorların hedef bölgedeki aşırı ifade edilen antijenlere yüksek bir afinite ile çekilmelerini temel almaktadır (Park ve ark., 2015). Literatür çalışmalarında

kullanılan yöntemlere benzer bir yöntem geliştirerek çalışmamızda palmitik asidin esteriyile IgG birleştirilmiş ve sonrasında MKH'lere verilerek hücrelerin kaplanması sağlanmıştır. Sonrasında üzerine eklenen anti- CD24 sayesinde de spesifik bir hedefleme amaçlanmıştır.

Benzer strateji özellikle kanser immünterapilerinde oldukça ilgi çekici konumdadır. Söz konusu yaklaşımla oluşturulan bispesifik antikorlar, iki farklı antijene aynı anda bağlanabilen veya antikor bağlama alanı T hücresi ile konjuge reseptörü olan kimerik antijen reseptörüdür (CAR-T) (Suzuki, Curran, ve Cheung, 2015). CAR-T temelli yaklaşıma benzer olarak antikorların kök hücrelere konjuge edilerek, MKH'lerin hedefe yönltilmesi literatürde az sayıda da olsa başarıyla gerçekleştirilmiştir (Dennis ve ark., 2004). Bispesifik antikorlar hücreleri hedeflenen bölgeye yönlendirebilen bir yaklaşım sunmaktadırlar. Araştırmacılar aynı yöntem ile anti-c-kit ve anti-VCAM-1 bispesifik antikorları kullanılarak c-kit+ fare kök hücrelerini, VCAM-1 eksprese eden hasarlı fare miyokard hücrelerine yönlendirmede başarılı olmuşlardır (Lum ve ark., 2004). Yine aynı strateji, anti-CD45-anti-myozin hafif zincir kinazına konjuge edilerek kalpteki hasarlı damar yapısına hematopoetik kök hücrelerin hedeflenmesinde kullanılmıştır (Zhao ve ark., 2008). Bispesifik antikor yönteminde, üretimdeki zorluklar, maliyetler ve düşük stabilite gibi parametreler bu stratejinin MKH modifikasyonunda kullanımını sınırlamaktadır (Kean ve ark., 2013).

Alternatif olarak antikor konjugasyon yöntemi palmitlenmiş PPG veya protein-A (PPA)'nın kullanımı olarak karşımıza çıkmaktadır. Her iki bileşik de antikorların Fc alanına bağlanır fakat bağlanma seçicilikleri, antikorun türüne ve köken aldığı türün immünoglobulin (IgG) alt tipine bağlı olarak değişmektedir. Yapılan tez çalışmasında bu literatür çalışmalarının sonuçlarına dayanarak palmitik asidin esteriyile IgG birleştirilmiş ve sonrasında WJ-MKH'lerle birleştirilerek hücrelerin kaplanması sağlanmıştır. Sonraki aşamada üzerine eklenen anti-CD24 antikoruna ile nöroblastoma hücrelerine yönlendirilmesi amaçlanmıştır.

Antikor konjugasyonu ile hücre yüzey modifikasyonu alanında yapılan ilk çalışmalardan biri olan araştırmada palmitatla konjuge edilmiş protein G, kondrojenik progenitör hücrelerinin zarına entegre edilmiştir. Daha sonra tip II kollajen antikoruna kaplaması ile hücrelerin kondrotin matriksine yönelmesi hedeflenmiştir. Kaplama yapılmayan hücrelere kıyasla kıkırdak yaralanma bölgesinde yapışmanın arttığı ve bu

gerçekleştirilen konjugasyonun hücrelerdeki canlılık, büyüme ve kondrojenik farklılaşmayı minimum düzeyde etkilediği gösterilmiştir (Dennis ve ark., 2004). Palmitlenmiş G proteini kullanılarak MKH'leri hasarlı endotel dokuya hedeflemek amacıyla ICAM-1 antikoruyla kaplanarak insan vasküler endotel hücreleri (HUVEC) ile inkübe edildiğinde, TNF α ile indüklenme (ICAM-1 ekspresyonunu artırmak için) durumunda, endotelyuma yapışan MKH sayısını artırdığı belirlenmiştir (Ko ve ark., 2009). Antikor kaplamanın oluşturduğu verimli etkiler göz önünde bulundurularak çalışmamızda MKH'lere antikor kaplama yöntemi gerçekleştirilerek kaplanan hücrelerin literatürde ilk defa kanser hücrelerine yönlendirilmesi sağlanmıştır.

Tez çalışmamızda MKH yüzeyine kaplamak amacıyla anti-CD24 antikoru seçilmiştir. CD24 proteininin, küçük bir çekirdeğe sahip, ısıya dayanıklı ve geniş ölçüde glikolizasyon geçiren bir protein olduğu, farklı ligandlara bağlanarak işlevini yerine getirdiği ve kanser hücrelerinin fonksiyonları ile yakın ilişkili olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2023). CD24, bir GPI (glikozilfosfatidilinozitol)-ankorlu (çapalı) membran proteini olarak, tümör büyümesi ve metastazda önemli bir rol oynamaktadır. CD24'ün ekspresyonu, tümör hücresi çoğalmasında artış, çeşitli substratlara yapışma ve hareketlilikle ilişkilendirilmiştir (Baumann ve ark., 2005). Glioma hücrelerinde, CD24'ün, *in vivo* ortamda metastazı teşvik ettiği ve insan gliomalarının beyin metastazında potansiyel bir rol oynadığı gösterilmiştir (Senner ve ark., 1999). Ayrıca, CD24'ün, aktive olmuş endotel hücrelerinde ve trombositlerdeki yapışma reseptörü olan P-selektinin bir ligandı olarak tanımlandığı ve bazı kanser türleri için bir tanı moleküler belirteci olarak önerildiği belirlenmiştir (Lim, 2005). Bu proteinin ayrıca insan tümörlerinde Src/STAT3 aktivitesini kontrol ettiği görülmektedir; aşırı ifadesinin aktiviteyi artırarak tümör büyümesine yol açabildiği düşünülmektedir (Bretz ve ark., 2012). Birçok çalışma, CD24'ün birçok insan kanserinde aşırı ifade edildiğini, ancak sağlıklı insan dokularında neredeyse tespit edilemez olduğunu göstermektedir. Ayrıca, CD24'ün genellikle progenitör hücrelerde veya metabolik olarak aktif hücrelerde yüksek düzeyde ifade edildiği ancak terminal olarak diferansiye olmuş hücrelerde daha düşük düzeyde ifade edildiği öne sürülmektedir (Yang ve ark., 2023).

Yapılan tüm çalışmalar CD24'ün çeşitli kanser türlerinin ilerlemesi ve metastazında önemli bir rol oynadığını işaret etmektedir. CD24'ün insan merkezi sinir sisteminin gelişimi sırasında geçici olarak eksprese edildiği ve insan nöral hücre soyunun

tümörlerinin bir belirteci olduğu, nöroblastomalarda ise kanser hücreleri farklılaşmaya yöneldikçe CD24 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Poncet ve ark., 1996). Tüm bu bilgilerden yola çıkarak MKH'lerin yüzeyinde gerçekleştirilen bir modifikasyonla CD24+ olan nöroblastoma hücrelerine direkt hücre-hücre temasıyla etkileşimi desteklemek üzerine çalışmamızı kurguladık. Daha önceden izolasyonu gerçekleştirilmiş olan WJ-MKH hattı ve nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) KÖGEM koleksiyonundan kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan WJ-MKH hattının karakterizasyonları hücrelerin çözme aşamasından sonra tekrarlanmış ve CD105, CD90 ve CD73 belirteçleri pozitifken CD45, HLA-DR ve CD34 negatif olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu karakterizasyon verileri kullandığımız hücrelerin kök hücre özelliklerini taşıdığını göstermektedir. PPG'nin oluşturulması, saflaştırılması, uygun dozun ve kaplama veriminin belirlenmesi gibi optimizasyon aşamalarını takiben PPG'nin bağlandığı WJ-MKH'lere anti-CD24 antikorumun bağlanması sağlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, hücrelerin ikinci aşama olan antikor kaplamasının akabinde hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir ve bu analizlerde kaplamanın hücre çoğalmasında bir değişiklik yaratmadığı belirlenmiştir (Q. Chen, Li, Chen, Du, ve Wan, 2019). PPG yöntemi ile kaplama yapılmış çalışmalardan birisinde PPG kaplaması sonrası hücre üzerindeki etkiler propidyum iyodür (PI) alımının akım sitometrik analizi ile gösterilmiştir (Dennis ve ark., 2004). Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında ise PPG'nin hücreler üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı hem morfolojik analizlerle hem de WST-8 analizi ile gösterilmiştir. Ayrıca diğer çalışmalardan farklı olarak hücrelerin PPG kaplanma verimi IgG-PE boyanmasıyla belirlenmiştir. Ko-kültür sonrası analizler için hem 24 saatlik ko-kültür hem de 48 saatlik ko-kültür sonucu gözlenen morfolojik temasın sonuçlarına göre deneylerin 48 saatlik ko-kültür sonrası yapılması çalışmamız için uygun görülmüştür. Anti-CD24 kaplaması sonrasında deney gruplarında hücre çoğalması açısından herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiştir. Bu sonuçların ışığında hem PPG'nin hem de anti-CD24 kaplamasının hücre modifikasyonlarında güvenli bir şekilde kullanılabileceği çalışmamızla gösterilmiştir. Anti-CD24 kaplamanın ko-kültür gruplarındaki etkisi live-dead boyama ile de incelenmiştir ve 1:1 oranında bağlanmış olan hücrelerde serbest haldeki hücrelere göre daha fazla ölü hücre gözlenmiştir. Ayrıca anti-CD24+MKH'lerin fazla olduğu grupta (3:1) koloni oluşumunun daha belirgin olduğu görülmektedir.

Deney grupları arasında yapılan gen ekspresyonu karşılaştırma analizlerinde hücre çoğalmasının ve nöroblastomanın prognostik bir faktörü olan Ki-67 belirtecinin anti-

CD24+WJ-MKH'in bulunduğu gruplarda düşüşe geçtiği gözlenmiştir. Ki-67'nin ifadesi nöroblastomada malignite ile ilişkilendirilmiş ve hücre çoğalmasını inhibe etmek amaçlı moleküler hedefli ilaçların etkinliğini değerlendirmek için kullanılabileceği öne sürülmüştür (Watanabe ve ark., 2019). Örneğin gliomalarda yüksek Ki-67 ifadesi, kötü genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (W. J. Chen, He, Tang, Ren, ve Chen, 2015). Çalışmamızda, Ki-67'de gözlenen downregülasyon, antikor kaplama aracılığı ile yönlendirilen MKH'lerin ortamdaki anti-kanser etkiyi arttırdığını düşündürmektedir. Yapılan gen ekspresyonu analizlerinde hücre içindeki birçok işlevi düzenlemesinin yanında hücre farklılaşmasını teşvik ettiği bilinen TGFB1 geni de deney gruplarını karşılaştırmak amacıyla incelenmiştir. Tüm ko-kültür grupları arasında en yüksek TGFB1 geni anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (3:1) grubunda gözlenmiştir. Anti-CD24+WJ-MKH:SH-SY5Y (1:1) grubunda ise oldukça düşük bir ifade gözlenmiştir. TGFB1'in kanserin erken aşamalarında anti-tümör, geç aşamalarında pro-tümör rol oynadığı bilinmektedir. Bu durum, TGFB1 geninin çok yönlü bir gen olmasından dolayı nöroblastoma hücrelerinin yoğun olduğu grupta daha yüksek ifadesinin görülmesi olarak açıklanabilir. Literatürde, TGFB geninin, nöroblastoma gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Scarpa ve ark., 1996). TGFB1'in insan nöroblastoma hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını, histotip özgül bir etkiyle düzenleyebileceğini göstermiştir. Bu bulguları destekleyen Turco ve ark., TGFB reseptörünün artan ifadesinin nöroblastoma hücrelerinde malign fenotipi baskılayabileceğini ve farklılaşmayı tetikleyebileceğini belirtmiştir (Turco vd., 2000).

PDGFRb1'in, tümör anjiyogenezisinde ve MKH'lerin farklılaşması ve göçünde önemli bir rol oynadığı bu süreçte neuropilin-1 (NRP-1) ile etkileşime girdiği bilinmektedir (Dhar ve ark., 2010). Ayrıca, PDGF reseptörleri, PDGFRb1 dahil olmak üzere, özellikle neovaskülarizasyon sırasında MKH'lerin vasküler hücrelere çekilmesi ve farklılaşması konusunda MKH'lerin kaderini düzenlemede etkilidir (Ball, Bayley, Shuttleworth, ve Kielty, 2010). Çalışmamızda anti-CD24+WJ-MKH'lerin bulunduğu gruplarda PDGFRb1 ifadesinde anlamlı derecede düşüş gözlenmiştir. Bu durum yine anti-CD24 ile kaplamanın ortamdaki anti-kanser etkiyi arttırdığını göstermektedir.

BMP2'nin, nöroblastoma hücrelerinin büyüme duraksaması ve nöronal farklılaşması üzerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Nakamura, Ozaki, Koseki, Nakagawara, ve Sakiyama, 2003). BMP2 tedavisinin nöroblastoma hücrelerini nöronlara farklılaştırabildiği, nöral özgül transkripsiyon faktörlerinin ifadesini artırarak

desteklenmektedir (Du ve Yip, 2010). Tez çalışmamızda BMP2'nin anti-CD24+WJ-MKH'lerin bulunduğu gruplarda kaplama olmayan gruplara göre daha düşük ifade edildiği gözlenmiştir. BMP2'nin nöroblastoma gelişimindeki rolü karmaşıktır, çünkü BMP2 reseptörü olan BMPR'nin düşük düzeyde ifadesi, nöroblastoma hücrelerinde artmış hücre büyümesi ve klonojeniklikle ilişkilendirilmiştir (Cui ve ark., 2017). Bu bulgular, BMP2'nin nöroblastomada farklılaşmayı teşvik ederken aynı zamanda tümör gelişimine katkıda bulunabilecek dualistik bir rolü olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda analiz edilen genlerden biri olan p38a geni, p38 MAPK ailesinin bir üyesi olarak, tümörögenез ve kanser agresifliği de dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerle ilişkilendirilmiştir (Xu ve ark., 2021). Bununla birlikte, p38a, doku homeostazını düzenlenmesi bağlamında EGF reseptör sinyallemesini inhibe ederek tümör baskılayıcı bir rol de oynamaktadır (Martínez-Limón, Joaquin, Caballero, Posas, ve de Nadal, 2020). p38a'nın kanserdeki bu iki yönlü rolü, malign hücre dönüşümünü etkileme yeteneği ve potansiyel pro-tümöröjenik işlevleriyle desteklenmektedir (Igea ve Nebreda, 2015). Deney grupları arasında en yüksek p38a ifadesi herhangi bir kaplama işleminin yapılmadığı nöroblastoma hücrelerinin daha yüksek oranda bulunduğu ko-kültür WJ-MKH:SH-SY5Y (1:3) grubunda gözlenmiştir. Diğer gruplarda ekspresyon seviyesi aynı düzeyde seyretmiştir. Yapılan analizde kanser hücrelerinin ortamda fazla olmasıyla artan p38a ifadesi, p38a'nın nöroblastomadaki rolünün hem tümörü teşvik eden hem de tümörü baskılayan yönde olması durumuyla ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda ko-kültür sonrası analiz edilen diğer iki gen ise IL-1b ve IL-6'dır. IL-1b, NF-κB yolunu kullanarak MKH'lerin migrasyonunu uyarma, monositleri ve granülositleri modüle etme yeteneklerini artırmaktadır. Ayrıca, IL-1b, MKH'lerde nörogenezi teşvik eder ve potansiyel olarak rejeneratif kapasitelerini artırabilir (Carrero ve ark., 2012; Greco ve Rameshwar, 2007). Yapılan başka bir çalışmada, IL-1b ekspresyonu inhibisyonunun, melanomada kanser hücrelerinin büyümesini azalttığını göstermiştir (Moossavi, Parsamanesh, Bahrami, Atkin, ve Sahebkar, 2018). IL-6 ise özellikle hücre çoğalmasını ve sağkalımını teşvik etmek suretiyle nöroblastoma ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, nöroblastoma hücrelerinin büyümesini ve sağkalımını destekleyen kemik iliği mikroçevresinin oluşumunda da rol alır (Ara ve ark., 2009; Song ve ark., 2007). Aynı zamanda, IL-6, MKH'lerin migrasyonunu teşvik ederek, onların rejeneratif ve terapötik özelliklerine katkıda bulunabilir. Bunun yanında IL-6 MKH'lerin diferansiye olmamış durumlarını sürdürmelerine katkıda bulunur ki bu, terapötik potansiyelleri için

önemlidir (Casson, O’Kane, Smith, Dalby, ve Berry, 2018; Pricola, Kuhn, Haleem-Smith, Song, ve Tuan, 2009). Tüm bu bilgilerin ışığında IL-1b’nın pro-inflamatuar bir sitokin olması dolayısıyla kök hücre ve kanser hücrelerinin oranlarının eşit olduğu gruplarda anlamlı derecede yüksek bir ifadeye sahip olduğu gözlenmiştir. Ortamda nöroblastoma hücre oranı arttıkça bu sitokinde düşüş gözlemlemekteyiz. Gen ekspresyonu analizinden aldığımız bu sonuçlar ortamdaki enflamasyon arttıkça yükselen MDA sonuçlarıyla da koreledir. MDA analizlerinde de 3 kat fazla oranda WJ-MKH’lerin bulunduğu grupta en yüksek MDA seviyesine ulaşıldığı belirlenmiştir.

TNFa’nın MKH’lerin immün modülatör fonksiyonlarında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Tümör oluşumunu, istilayı ve metastazı teşvik edebilirken aynı zamanda anti-tümör etkilere de sahiptir (Mocellin ve Nitti, 2008). Çalışmamızda MKH’lerin fazla olduğu ve anti-CD24+ olan grupta kaplama yapılmamış gruba göre daha yüksek TNFa gen ifadesi gözlenmiştir. Bu genin antikor kaplı olan grupta yüksek olması diğer gen ekspresyonlarının paternleri ile korele olarak anti-tümör etkiyi desteklediğini gösterebilir.

Tez çalışmasında ROS miktarının artış azalışını değerlendirebilmek için DC-FDA boyaması yapılarak akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Kaplanmış MKH’lerin bulunduğu grup kaplama yapılmayan grupla karşılaştırıldığında kaplanmış grubun ROS miktarında artış gözlenmiştir. ROS miktarının ortamda artması oksidatif stresin yüksek olduğunu ve anti-kanser etkinin mevcut olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca ortamda ROS’un artışı kanser hücresi ölümünü desteklediğini bildiren görüşler literatürde mevcuttur (S. J. Kim, Kim, ve Seo, 2019; Molavian ve ark., 2016). Oksidatif stresi belirlemek için yaptığımız MDA analizinde görülen antikor kaplanmış gruplardaki düşüş antioksidan mekanizmaya dahil olan bir gen olan GPX1 (Glutasyon peroksidaz-1)’in artışı ile korele bir sonuç vermiştir. Oksidatif stresin düşmesi karşısında aktifleşen antioksidan mekanizmasının antikor kaplamanın bir etkisi olduğu gözlenmiştir.

Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışması, literatürde yapılan antikor konjügasyon yöntemi ile MKH’lerin nöroblastoma hücrelerine yönlendirilmesi üzerine yapılan ilk çalışmadır. Daha çok parakrin etkilerin incelendiği çalışmalardan farklı olarak iki hücrenin birbirlerine yakın bir noktada etkileşime geçmeleri için antikor tabanlı bir bağlanma gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonların sonrasında uygun dozun belirlenmesiyle WJ-MKH’lerin anti-CD24 antikoruna ile kaplanması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen PPG ve anti-CD24 kaplamanın hücrelere toksik bir etkisi olmadığı bu

nedenle güvenilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Anti-CD24'ün bağlanmasıyla hücre yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen MKH'lerin CD24+ nöroblastoma hücrelerine (SH-SY5Y) yönlendirilmesi sonrası MKH'lerin iki yönlü etkileri incelenmiştir. Bu etkilerin daha çok ortamda MKH oranları düşükken pro-tümör aktivitenin varlığı düşünülse de anti-CD24+MKH oranları arttıkça anti-kanser etkinin arttığı gözlenmektedir.

Antikor aracılı yönlendirme yöntemi direkt hücre-hücre temasıyla herhangi bir genetik modifikasyona veya kimyasal bir aracıya gerek kalmadan etkileşimi inceleme fırsatı yaratmaktadır. Bu çalışmayla, kök hücrelerin kanser hücreleriyle etkileşimini analiz edebilmek hem tedavi yöntemleri hem de kanser araştırmaları açısından önem taşımaktadır.

5.1. Sınırlılıklar

WJ-MKH'leri kaplamak için kullanılan anti-CD24 antikorunun ticari olarak temini ve saflaştırma maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle PPG reaksiyonu sonrasında, antikoru asgari miktarda kullanılarak optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan ve WJ-MKH'lerle birleştirilen anti-CD24 antikorunun stabilitesi, ne kadar süre saklanabileceği hakkında literatürde bilgi olmaması ko-kültür sonrası gruplar üzerindeki analiz sürelerini uzatmış ve her ko-kültür grup seti öncesinde yeniden reaksiyon kurma zorunluluğu gibi zorluklar ortaya çıkarmıştır.

In vivo ortamda tümör mikroçevresindeki kanser hücrelerinin sayısının belirlenememesi gibi sınırlılıklar çalışmamızın zorluklarından birisini oluşturmaktadır. Çalışmamızın başlangıcında *in vivo* benzeri bir ortamın *in vitro*ya aktarımı şeklinde tasarlanan deney grupları; nöroblastoma hücre oranlarının daha fazla (WJ-MKH (1):SH-SY5Y (3) /anti-CD24+WJ-MKH (1):SH-SY5Y (3)) ve eşit (WJ-MKH (1):SH-SY5Y(1) / anti-CD24+WJ-MKH(1):SH-SY5Y(1)) olacağı şekilde düzenlenmiştir. Deneyler sürecinde MKH'lerin ortamda arttıkça anti-kanser etkinin de arttığı gen ifadeleri sonuçlarında gözlense de WST-8 hücre canlılık analizlerinde kaplama yapılan gruplarda aynı sonuçlar elde edilememiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak çalışmanın ikinci bölümü olan MKH'lerin daha fazla (WJ-MKH (3):SH-SY5Y(1) /anti-CD24+WJ-MKH(3):SH-SY5Y(1)) olduğu deney grupları tasarlanmış ve ilgili analizlerin yapılması amacıyla eklenmiştir. Deney grupları arasında (1:1) ko-kültür oranı seçilerek bu oran üzerinde apoptoz ve proliferasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Anti-CD24 antikorunun temini ve

saflaştırma işlemlerinin maliyeti analizlerin çeşitlendirilmesini ve deney grupları kurulurken oranların çeşitlendirilmesini sınırlandırmıştır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz antikör aracılı yönlendirme yöntemi direkt hücre-hücre temasıyla herhangi bir genetik modifikasyona veya kimyasal bir aracıya gerek kalmadan etkileşimi inceleme fırsatı yaratmaktadır.

Çalışmadaki ilk amaç olan antikör kaplama işlemi çeşitli optimizasyon ve saflaştırma basamaklarından sonra başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. İleriki çalışmalarda saflaştırılan PPG ve anti-CD24 antikörünün stabilite ve saklama koşullarıyla ilgili çalışmaların yapılması bu yöntem ile gerçekleştirilecek olan analizleri hızlandıracağını öngörmekteyiz. Ayrıca anti-CD24+WJ-MKH'lerin saklama koşullarının ve süresinin optimizasyonlarının gerçekleştirilmesi de bu çalışmanın *in vitro* tümör modellerinde uygulanabilmesi için potansiyel fayda sağlayacaktır.

Çalışmamızdaki ikinci amaç olan deney grupları arası ko-kültürler yeterli sayıda hücrenin eldesi ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu ko-kültürler sonrasında yapılan analizler kaplanmamış olan WJ-MKH'lerin bulunduğu gruplarda yapılan çalışmalarda düşük MKH oranında kanser hücrelerinin çoğalmasını az da olsa desteklediği ancak yükselen MKH oranlarında anti-kanser etkinin mevcut olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Anti-CD24+MKH'lerle yapılan ko-kültürlerde, kaplama sonrası BMP2, PDGFRb1 gibi tümör ilişkili ve Ki-67 gibi hücre çoğalması ilişkili genlerde düşüş gözlenmiştir. Bu hücre çoğalmasının azaldığını ve anti-kanser etkinin bu grupta daha yüksek olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle çalışmamıza, WJ-MKH'lerin oranının nöroblastoma oranından daha fazla sayıda olan deney grubunu ekleyerek bu sonuçları kanıtlayabilecek analizler eklenmiştir. Ko-kültür oranını (1:1) olarak tuttuğumuzda hem apoptoz tayini analizlerinde hem de proliferasyon analizlerindeki sonuçların doğrultusunda, bu oranın en verimli anti-kanser etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Anti-CD24 antikörünü MKH'lerin membranına çapalamanın yanı sıra başka nöroblastomada ifade edilen antikörlerin çapalanması işlemiyle çoklu antikör kaplama işlemi gerçekleştirilmesi çalışmayı daha etkili ve çok yönlü kılacaktır. Ayrıca farklı kanser hücresi hatlarıyla anti-CD24+WJ-MKH'lerin direkt teması sağlanarak aynı etkilere ulaşıp ulaşılmayacağı değerlendirilebilir. İlerleyen çalışmalarda ortama makrofaj gibi immün hücrelerin eklenmesi kaplama yönteminin verimliliğinin kanıtlanması açısından önemli bir adım olacaktır.

Çalışmamızda antikor kaplanmış MKH'lerin nöroblastoma hücreleri ile *in vitro* ortamda direkt teması hedeflenmiş ve bu temas sonrası etkileşim incelenmiştir. Tümör mikroçevresinin karmaşık yapısından dolayı *in vivo* ortamda MKH'lerin direkt temastaki etkilerinin incelenmesi yaptığımız tez çalışmasının sonuçlarını daha da netliğe ulaştıracaktır. Yapılan deneylerin *in vivo* ortamda tümör modellerinde denenmesi anti-CD24+MKH'lerin etkinliğini kanıtlamak açısından önem taşımaktadır.

Gelecekte MKH'lerin antikor konjugasyon yöntemi ile modifikasyonun *in vivo* tümör modelleri üzerinde denenmesi verimliliğinin kanıtlanması açısından etkili olacaktır. Ayrıca antikor kaplama yönteminin farklı antikorlar kullanılarak *in vitro* hastalık modellerinde de denenmesi bu yöntemin etkinliğinin analiz edilmesi açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Altevogt, P., Sammar, M., Hüser, L., & Kristiansen, G. (2021). Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *International Journal of Cancer*, C. 148. <https://doi.org/10.1002/ijc.33249>
- Ara, T., Song, L., Shimada, H., Keshelava, N., Russell, H. V., Metelitsa, L. S., ... DeClerck, Y. A. (2009). Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Research*, 69(1). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0613>
- Ball, S. G., Bayley, C., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2010). Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochemical Journal*, 427(1). <https://doi.org/10.1042/BJ20091512>
- Barrett, A. N., Fong, C. Y., Subramanian, A., Liu, W., Feng, Y., Choolani, M., ... Bongso, A. (2019). Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Show Unique Gene Expression Compared with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using Single-Cell RNA-Sequencing. *Stem Cells and Development*, 28(3). <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0132>
- Baumann, P., Cremers, N., Kroese, F., Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R., Uede, T., ... Sleeman, J. P. (2005). CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Research*, 65(23). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0619>
- Bianchi, G., Morandi, F., Cilli, M., Daga, A., Bocelli-Tyndall, C., Gambini, C., ... Raffaghello, L. (2012). Close Interactions between Mesenchymal Stem Cells and Neuroblastoma Cell Lines Lead to Tumor Growth Inhibition. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048654>
- Biedler, J. L., & Schachner, M. (1978). Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Research*, 38, 3751-3757.
- Björck, L., & Kronvall, G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *The Journal of Immunology*, 133(2). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.133.2.969>
- Bretz, N. P., Salnikov, A. V., Perne, C., Keller, S., Wang, X., Mierke, C. T., ... Altevogt, P. (2012). CD24 controls Src/STAT3 activity in human tumors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(22). <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1055-9>

- Campos Cogo, S., Gradowski Farias da Costa do Nascimento, T., de Almeida Brehm Pinhatti, F., de França Junior, N., Santos Rodrigues, B., Regina Cavalli, L., & Elifio-Esposito, S. (2020). An overview of neuroblastoma cell lineage phenotypes and in vitro models. *Experimental Biology and Medicine*, C. 245. <https://doi.org/10.1177/1535370220949237>
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6). <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Carrero, R., Cerrada, I., Lledó, E., Dopazo, J., García-García, F., Rubio, M. P., ... Sepúlveda, P. (2012). IL1 β Induces Mesenchymal Stem Cells Migration and Leucocyte Chemotaxis Through NF- κ B. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3). <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9364-9>
- Casson, J., O’Kane, S., Smith, C. A., Dalby, M. J., & Berry, C. C. (2018). Interleukin 6 plays a role in the migration of magnetically levitated mesenchymal stem cells spheroids. *Applied Sciences (Switzerland)*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/app8030412>
- Chen, A., Zheng, G., & Tykocinski, M. L. (2000). Hierarchical Costimulator Thresholds for Distinct Immune Responses: Application of a Novel Two-Step Fc Fusion Protein Transfer Method. *The Journal of Immunology*, 164(2). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.2.705>
- Chen, M., Przyborowski, M., & Berthiaume, F. (2009). Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, C. 37. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v37.i4-5.50>
- Chen, Q., Li, Y., Chen, Z., Du, H., & Wan, J. (2019). Anti-VCAM 1 Antibody-Coated mesenchymal stromal cells attenuate experimental colitis via immunomodulation. *Medical Science Monitor*, 25. <https://doi.org/10.12659/MSM.914238>
- Chen, W. J., He, D. S., Tang, R. X., Ren, F. H., & Chen, G. (2015). Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(2). <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.2.411>
- Cui, X., Yang, Y., Jia, D., Jing, Y., Zhang, S., Zheng, S., ... Dong, K. (2017). Downregulation of bone morphogenetic protein receptor 2 promotes the development of neuroblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.095>
- Demirkaya, M., & Sevinir, B. (2006). Nöroblastom. *Güncel Pediatri*, 3, 128-132.

- Dennis, J. E., Cohen, N., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (2004). Targeted delivery of progenitor cells for cartilage repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 22(4). <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2003.12.002>
- Dhar, K., Dhar, G., Majumder, M., Haque, I., Mehta, S., Van Veldhuizen, P. J., ... Banerjee, S. (2010). Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Molecular Cancer*, 9. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-209>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4). <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Drobiova, H., Sindhu, S., Ahmad, R., Haddad, D., Al-Mulla, F., & Al Madhoun, A. (2023). Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a concise review of their secretome and prospective clinical applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, C. 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1211217>
- Du, Y., & Yip, H. (2010). Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation. *Differentiation*, 79(2). <https://doi.org/10.1016/j.diff.2009.10.003>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819). <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Farhana, A., & Lappin, S. L. (2020). Biochemistry, Lactate Dehydrogenase (LDH). İçinde *StatPearls*.
- Ferlemann, F. C., Menon, V., Condurat, A. L., Rößler, J., & Pruszk, J. (2017). Surface marker profiling of SH-SY5Y cells enables small molecule screens identifying BMP4 as a modulator of neuroblastoma differentiation. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13497-8>
- Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, G. (2019). Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, C. 8. <https://doi.org/10.3390/cells8080784>
- Gao, Z., Zhang, L., Hu, J., & Sun, Y. (2013). Mesenchymal stem cells: A potential targeted-delivery vehicle for anti-cancer drug, loaded nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, C. 9. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.06.003>

- Gilliam, D. T., Menon, V., & Pruszk, J. (2017). The CD24 surface antigen in neural development and disease. *Neurobiology of Disease*, C. 99. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.12.011>
- Greco, S. J., & Rameshwar, P. (2007). Enhancing Effect of IL-1 α on Neurogenesis from Adult Human Mesenchymal Stem Cells: Implication for Inflammatory Mediators in Regenerative Medicine. *The Journal of Immunology*, 179(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3342>
- Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., & Flaherty, D. M. (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(1-2). [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00061-1)
- Hmadcha, A., Martin-Montalvo, A., Gauthier, B. R., Soria, B., & Capilla-Gonzalez, V. (2020). Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, C. 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00043>
- Hodgkinson, C. P., Gomez, J. A., Mirotso, M., & Dzau, V. J. (2010). Genetic engineering of mesenchymal stem cells and its application in human disease therapy. *Human Gene Therapy*, C. 21. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.165>
- Huang, L., Lv, W., & Zhao, X. (2016). CD24 as a Molecular Marker in Ovarian Cancer: A Literature Review. *Cancer Translational Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.4103/2395-3977.177563>
- Igea, A., & Nebreda, A. R. (2015). The stress kinase p38 α as a target for cancer therapy. *Cancer Research*, C. 75. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0173>
- Jensen, T., Vadasz, S., Phoenix, K., Claffey, K., Parikh, N., & Finck, C. (2015). Descriptive analysis of tumor cells with stem like phenotypes in metastatic and benign adrenal tumors. *Journal of Pediatric Surgery*, 50(9). <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.04.012>
- Kean, T. J., Lin, P., Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2013). MSCs: Delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2013/732742>
- Kim, D. W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S. D., & Borlongan, C. V. (2013). Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: Phenotypic characterization and Optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, C. 14. <https://doi.org/10.3390/ijms140611692>

- Kim, S. A., & Peacock, J. S. (1993). The use of palmitate-conjugated protein A for coating cells with artificial receptors which facilitate intercellular interactions. *Journal of Immunological Methods*, 158(1). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90258-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90258-9)
- Kim, S. J., Kim, H. S., & Seo, Y. R. (2019). Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, C. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5381692>
- Ko, I. K., Kean, T. J., & Dennis, J. E. (2009). Targeting mesenchymal stem cells to activated endothelial cells. *Biomaterials*, 30(22). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.038>
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology*, 1078. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Ladenstein, R., Pötschger, U., Valteau-Couanet, D., Luksch, R., Castel, V., Yaniv, I., ... Lode, H. N. (2018). Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 19(12). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30578-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30578-3)
- Lee, H., Park, J., Forget, B. G., & Gaines, P. (2009). Induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: An argument for continued research on human embryonic stem cells. *Regenerative Medicine*, C. 4. <https://doi.org/10.2217/rme.09.46>
- Lim, S. C. (2005). CD24 and human carcinoma: Tumor biological aspects. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59(SUPPL. 2). [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(05\)80076-9](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(05)80076-9)
- Lum, L. G., Fok, H., Sievers, R., Abedi, M., Quesenberry, P. J., & Lee, R. J. (2004). Targeting of Lin-Sca⁺ hematopoietic stem cells with bispecific antibodies to injured myocardium. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 32(1). <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.019>
- Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., ... Selleri, C. (2019). Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *International Journal of Stem Cells*, C. 12. <https://doi.org/10.15283/ijsc18034>
- Martínez-Limón, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., & de Nadal, E. (2020). The p38 pathway: From biology to cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, C. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>

- McElreavey, K. D., Irvine, A. I., Ennis, K. T., & McLean, W. H. I. (1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochemical Society Transactions*, 19(1). <https://doi.org/10.1042/bst019029s>
- Melzer, C., von der Ohe, J., & Hass, R. (2018). Concise Review: Crosstalk of Mesenchymal Stroma/Stem-Like Cells with Cancer Cells Provides Therapeutic Potential. *Stem Cells*, C. 36. <https://doi.org/10.1002/stem.2829>
- Melzer, C., Yang, Y., & Hass, R. (2016). Interaction of MSC with tumor cells. *Cell Communication and Signaling*, C. 14. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0143-0>
- Mendes, S. C., Robin, C., & Dzierzak, E. (2005). Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*, 132(5). <https://doi.org/10.1242/dev.01615>
- Mirabdollahi, M., Haghjooyjavanmard, S., & Sadeghi-aliabadi, H. (2019). An anticancer effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell secretome on the breast cancer cell line. *Cell and Tissue Banking*, 20(3). <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09781-8>
- Mocellin, S., & Nitti, D. (2008). TNF and cancer: The two sides of the coin. *Frontiers in Bioscience*, C. 13. <https://doi.org/10.2741/2884>
- Molavian, H. R., Goldman, A., Phipps, C. J., Kohandel, M., Wouters, B. G., Sengupta, S., & Sivaloganathan, S. (2016). Drug-induced reactive oxygen species (ROS) rely on cell membrane properties to exert anticancer effects. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep27439>
- Moossavi, M., Parsamanesh, N., Bahrami, A., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2018). Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Molecular Cancer*, C. 17. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0900-3>
- Musiał-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplantation*, C. 28. <https://doi.org/10.1177/0963689719837897>
- Nakamura, Y., Ozaki, T., Koseki, H., Nakagawara, A., & Sakiyama, S. (2003). Accumulation of p27KIP1 is associated with BMP2-induced growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(1). [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01138-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01138-0)
- Ni, Y.-H., Zhao, X., & Wang, W. (2020). CD24, A Review of its Role in Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. *Current Gene Therapy*, 20(2). <https://doi.org/10.2174/1566523220666200623170738>

- Paladino, F. V., De Rodrigues, J. M., Da Silva, A., & Goldberg, A. C. (2019). The immunomodulatory potential of wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells International*, C. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3548917>
- Panagiotou, E., Syrigos, N. K., Charpidou, A., Kotteas, E., & Vathiotis, I. A. (2022). CD24: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *Journal of Personalized Medicine*, C. 12. <https://doi.org/10.3390/jpm12081235>
- Pappa, K. I., & Anagnou, N. P. (2009). Novel sources of fetal stem cells: Where do they fit on the developmental continuum? *Regenerative Medicine*, C. 4. <https://doi.org/10.2217/rme.09.12>
- Park, J., Andrade, B., Seo, Y., Kim, M. J., Zimmerman, S. C., & Kong, H. (2018). Engineering the Surface of Therapeutic “living” Cells. *Chemical Reviews*, C. 118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00157>
- Park, J. S., Suryaprakash, S., Lao, Y. H., & Leong, K. W. (2015). Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods*, C. 84. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.002>
- Poncet, C., Frances, V., Gristina, R., Scheiner, C., Pellissier, J. F., & Figarella-Branger, D. (1996). CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule, is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. *Acta Neuropathologica*, 91(4). <https://doi.org/10.1007/s004010050442>
- Pricola, K. L., Kuhn, N. Z., Haleem-Smith, H., Song, Y., & Tuan, R. S. (2009). Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(3). <https://doi.org/10.1002/jcb.22289>
- Ross, R. A., Spengler, B. A., & Biedler, J. L. (1983). Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 71(4). <https://doi.org/10.1093/jnci/71.4.741>
- Ryu, H., Oh, J. E., Rhee, K. J., Baik, S. K., Kim, J., Kang, S. J., ... Eom, Y. W. (2014). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- β and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters*, 352(2). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.06.018>
- Scarpa, S., Coppa, A., Ragano-Caracciolo, M., Mincione, G., Giuffrida, A., Modesti, A., & Colletta, G. (1996). Transforming growth factor β regulates differentiation and proliferation of human neuroblastoma. *Experimental Cell Research*, 229(1). <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0352>

- Senner, V., Sturm, A., Baur, I., Schrell, U. H. M., Distel, L., & Paulus, W. (1999). CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(8). <https://doi.org/10.1097/00005072-199908000-00002>
- Shin, S., Lee, J., Kwon, Y., Park, K. S., Jeong, J. H., Choi, S. J., ... Lee, C. (2021). Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and wharton's jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
- Shohet, J., & Foster, J. (2017). Neuroblastoma. *BMJ (Online)*, 357. <https://doi.org/10.1136/bmj.j1863>
- Siapati, E. K., Rouka, E., Kyriakou, D., & Vassilopoulos, G. (2011). Neuroblastoma cells negative for CD44 possess tumor-initiating properties. *Cellular Oncology*, 34(3). <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0022-z>
- Song, J., Duncan, M. J., Li, G., Chan, C., Grady, R., Stapleton, A., & Abraham, S. N. (2007). A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *PLoS Pathogens*, 3(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030060>
- Storch, A., Sabolek, M., Milosevic, J., Schwarz, S. C., & Schwarz, J. (2004). Midbrain-derived neural stem cells: From basic science to therapeutic approaches. *Cell and Tissue Research*, C. 318. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0923-5>
- Suzuki, M., Curran, K. J., & Cheung, N. K. V. (2015). Chimeric antigen receptors and bispecific antibodies to retarget T cells in pediatric oncology. *Pediatric Blood and Cancer*, C. 62. <https://doi.org/10.1002/pbc.25513>
- Taupin, P. (2006). Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy: Challenges and new strategies. *Medical Science Monitor*, C. 12.
- Terry, V. H., Zimmerman, G. E., Virgilio, M. C., Painter, M. M., Bixby, D., & Collins, K. L. (2022). Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPCs). İçinde *Methods in Molecular Biology* (C. 2407). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1871-4_11
- Terzioğlu Uşak, Ş, G. D., Y. E. N., Z. N., vd. (2017). Mezenkimal Kök Hücrelerin Meme Kanseri Tedavisinde Güncel Katkıları. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 7(13), 109-117. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 7(13), 109-117.
- Torsvik, A., & Bjerkvig, R. (2013). Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression. *Cancer Treatment Reviews*, C. 39. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.03.005>

- Turaç, G., Hindley, C. J., Thomas, R., Davis, J. A., Deleidi, M., Gasser, T., ... Pruszk, J. (2013). Combined Flow Cytometric Analysis of Surface and Intracellular Antigens Reveals Surface Molecule Markers of Human Neuropoiesis. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068519>
- Turco, A., Scarpa, S., Coppa, A., Baccheschi, G., Palumbo, C., Leonetti, C., ... Colletta, G. (2000). Increased TGF β type II receptor expression suppresses the malignant phenotype and induces differentiation of human neuroblastoma cells. *Experimental Cell Research*, 255(1). <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4750>
- Wang, Y., Yu, H., Yu, M., Liu, H., Zhang, B., Wang, Y., ... Xia, Q. (2023). CD24 blockade as a novel strategy for cancer treatment. *International Immunopharmacology*, C. 121. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110557>
- Watanabe, S., Suzuki, T., Kondo, Y., Naoe, A., Uga, N., Yasui, T., ... Tsuchiya, T. (2019). Evaluation of Ki-67 as prognostic factor for pediatric neuroblastoma and the possibility of molecular-targeted drugs with vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptor. *Minerva Pediatrics*. <https://doi.org/10.23736/s0026-4946.18.05444-0>
- Weston, S. A., & Parish, C. R. (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Journal of Immunological Methods*, 133(1). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90322-M](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90322-M)
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, C. 12. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>
- Xie, H. R., Hu, L. Sen, & Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, C. 123. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021>
- Xu, W., Liu, R., Dai, Y., Hong, S., Dong, H., & Wang, H. (2021). The Role of p38 γ in Cancer: From review to outlook. *International journal of biological sciences*, C. 17. <https://doi.org/10.7150/ijbs.63537>
- Yang, Y., Zhu, G., Yang, L., & Yang, Y. (2023, Aralık 1). Targeting CD24 as a novel immunotherapy for solid cancers. *Cell Communication and Signaling*, C. 21. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01315-w>
- Yeini, E., Ofek, P., Pozzi, S., Albeck, N., Ben-Shushan, D., Tiram, G., ... Satchi-Fainaro, R. (2021). P-selectin axis plays a key role in microglia immunophenotype and glioblastoma progression. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22186-0>

- Yin, S. S., & Gao, F. H. (2020). Molecular Mechanism of Tumor Cell Immune Escape Mediated by CD24/Siglec-10. *Frontiers in Immunology*, C. 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01324>
- Yu, J. Le, Chan, S., Fung, M. K. L., & Chan, G. C. F. (2021). Mesenchymal stem cells accelerated growth and metastasis of neuroblastoma and preferentially homed towards both primary and metastatic loci in orthotopic neuroblastoma model. *BMC Cancer*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08090-2>
- Zhang, T., Huang, T., Su, Y., & Gao, J. (2021a). Mesenchymal Stem Cells-Based Targeting Delivery System: Therapeutic Promises and Immunomodulation against Tumor. *Advanced Therapeutics*, C. 4. <https://doi.org/10.1002/adtp.202100030>
- Zhang, T., Huang, T., Su, Y., & Gao, J. (2021b). Mesenchymal Stem Cells-Based Targeting Delivery System: Therapeutic Promises and Immunomodulation against Tumor. *Advanced Therapeutics*, C. 4. <https://doi.org/10.1002/adtp.202100030>
- Zhao, Q., Ren, H., & Han, Z. (2016). Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, C. 2. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>
- Zhao, T. C., Tseng, A., Yano, N., Tseng, Y. T., Davol, P. A., Lee, R. J., ... Padbury, J. F. (2008). Targeting human CD34+ hematopoietic stem cells with anti-CD45 X anti-myosin light-chain bispecific antibody preserves cardiac function in myocardial infarction. *Journal of Applied Physiology*, 104(6). <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01109.2007>
- Zimmermann, M., & Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 740. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_8