



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Sisplatin ve insan mezenkimal kök hücrelerden izole edilen mitokondri naklinin DU-145 hücre proliferasyonuna etkisi

Effect of cisplatin and mitochondria transplantation isolated from human mesenchymal stem cells on DU-145 cell proliferation

Zehra Çiçek¹, Volkan Tekin¹

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Turkey

Cukurova Medical Journal 2021;46(3):1285-1292

Abstract

Purpose: The aim of this study is to evaluate proliferation and cytotoxicity by applying the antineoplastic drug cisplatin and mitochondria isolated from human mesenchymal stem cells (IMSCs) to human prostate cancer cells (DU-145).

Materials and Methods: IMSCs and DU-145 cell line were used in our study. IMSCs were multiplied to ~20x10⁶ cells and mitochondria were isolated according to the protocols in kit. Protein content of the isolated mitochondria was measured by bicinchoninic acid method (BCA). DU-145 cells were seeded into 96-well plates at 10x10³ cells in per well. Cisplatin 6 µM and 14 µM doses were administered for 24 hours. Isolated mitochondria (10x, 100x) were incubated for 24 hours again. Cell proliferation and viability were measured using the tetrazolium salt (MTT) method, and the absorbance values of 570 nm-630 nm were measured in a plate reader, and the cell proliferation percentages were calculated.

Results: 6 µM cisplatin application to DU-145 cells proliferation decreased by 35% compared to the control group, while 14 µM cisplatin reduced it by 68%. When compared with the Cis-6 µM group, there was no significant difference in proliferation in the Cis-6 µM+Mito-10x group while a significant decrease was observed in the Cis-6 µM+Mito-100x group.

Conclusion: When mitochondria are transplanted together with cisplatin to prostate cancer cells, proliferation is further reduced. In addition, mitochondria transplantation may reduce the proliferation of cancerous cells by affecting various intracellular proliferative, apoptotic signaling pathways and by regulating the microenvironment.

Keywords: Stem cell, culture, mitochondria transplantation

Öz

Amaç: Bu çalışmada antineoplastik bir ilaç olan sisplatin ve insan mezenkimal kök hücrelerinden (İMKH) izole edilen mitokondriler, insan prostat kanser hücrelerine (DU-145) uygulanarak, proliferasyon ve sitotoksitenin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, İMKH ve DU-145 hücre hatları kullanıldı. İMKH'ler ~20x10⁶ hücre olacak şekilde çoğaltılarak kitte belirtilen protokollere göre mitokondriler izole edildi. İzole mitokondrilerin protein miktarı, bikinkoninik asit yöntemiyle (BCA) ölçüldü. DU-145 hücreleri, her kuyuda 10x10³ hücre olacak şekilde 96'lık plate'e ekildi. Sisplatin' in 6 µM ve 14 µM dozları 24 saat uygulandı. İnkübasyon sonunda hücre medyumları değiştirildi ve izole mitokondriler (10x, 100x) eklenerek tekrar 24 saat inkübe edildi. Hücre çoğalması ve canlılığı tetrazolyum tuzu (MTT) yöntemiyle, 570nm-630nm absorbans değerleri plate okuyucu da ölçülerek farkları alındı ve hücre çoğalma yüzdeleri hesaplandı.

Bulgular: DU-145 hücrelerine 6 µM sisplatin uygulaması kontrol grubuna göre proliferasyonu %35 oranında azaltırken, 14 µM sisplatin ise hücre proliferasyonunu %68 azalttı. Cis-6 µM grubuyla karşılaştırıldığında, Cis-6 µM+Mito-10x grubunda proliferasyonda anlamlı fark görülmezken, Cis-6 µM+Mito-100x grubunda anlamlı azalma görüldü.

Sonuç: Prostat kanseri hücrelerine sisplatin ile birlikte mitokondri transplantasyonu yapıldığında proliferasyonu daha da azalmaktadır. Ayrıca, mitokondri transplantasyonunun intrasellüler çeşitli proliferatif, apoptotik sinyal yollarını etkileyerek ve mikroçevreyi düzenleyerek kanserli hücrelerin çoğalmasını azaltabilir.

Anahtar kelimeler: Kök hücre, kültür, mitokondri transplantasyonu

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Zehra Çiçek, 1Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Ankara, Turkey E-mail: dr.zehra_cicek@hotmail.com
Geliş tarihi/Received: 09.04.2021 Kabul tarihi/Accepted: 05.08.2021 Çevrimiçi yayın/Published online: 30.07.2021

GİRİŞ

Kanser hastalığı en ciddi sağlık sorunlarından biridir. Karmaşık doğası ve bir o kadar da bilinmeyen mekanizmalara sahip olması; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi birçok tedavi stratejisinin yetersiz olmasının nedeni olarak gösterilmektedir¹. Mitokondri transferi, birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilmektedir ve mitokondri izolasyonu çok çeşitli hücre hatlarından (kök hücre, miyosit, fibroblast, kardiyomyosit vb.) ve dokulardan (iskelet kası, karaciğer vb.) ultrasantrifügasyon metoduyla veya ticari kitler yardımıyla yapılabilmektedir²⁻⁴. Özellikle mitokondri hasarının görüldüğü kardiyomyopati, nörolojik ve iskemik patolojilerin görüldüğü hastalıklarda hücre hasarını azaltıcı, iyileştirici ve anlamlı düzeltici etkilerinin olduğu *in vivo* ve *in vitro* araştırmalarda gösterilmiştir⁵⁻⁷. Mitokondriler, çeşitli dokulardan ve hücre kültürlerinden manuel olarak ve ticari kitler aracılığıyla izole edilebilmektedir⁸. Bununla birlikte hücreler birbirleriyle nanotüp, konneksin-43 içeren gap junctionlar, mikrovezikül ve hücre füzyon gibi mekanizmalarla bağlantı kurarak organel değişimi yapmaktadır^{9,10}. Mitokondri izolasyonu birçok hücre tipinden ve dokuda yapılabilmektedir^{5,11,12}. En sık kullanılanlar arasında, mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır¹³. Bu durumun sebebi olarak da mezenkimal kök hücrelerden izole edilen mitokondrilerin diğer farklı tipteki hücrelerin mitokondrilerinin rejeneratif etkinliklerinden daha iyi olması ve transplantasyon başarılarının yüksek olması olarak gösterilmektedir^{14,15}. Yapılan çalışmalarda izole mitokondrilerin 1-2 saatte alıcı hücrelerin içine girdiği gösterilmiştir. İzole mitokondriler ve alıcı hücre mitokondrileri *MitoTracker* adı verilen floresan boyalarla işaretlenerek, konfokal ve immünofloresan mikroskoplarla hem *in vivo* hem de *in vitro* birçok çalışmada görüntülenmiştir¹⁶⁻¹⁸.

Mitokondrilerin kanserin ilerlemesi, metastazı ve ilaç dirençleriyle ilişkili olduğu bildirilmektedir¹⁹. Çalışmalarda sağlıklı mitokondrilerin kanser hücre mitokondrileriyle yer değiştirerek mitokondri fonksiyonlarını yeniden düzenlediği, ilaç direncini ve aerobik glikolizi engellediği ve kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu bildirilmektedir²⁰. Mitokondriler; apoptoz, hücre proliferasyonu, enerji üretimi, reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumunda ve kalsiyum düzenlenmesinden sorumlu kendine ait sirküler DNA'sı olan organellerdir^{21,22}. Kanser hücrelerinin değişen metabolizmaları nedeniyle glukoz kullanımı ve glikoliz artışı

belirgindir. Glikoliz metabolizmasının kanser hücreleri tarafından tercih edilmesi Warburg etkisi olarak bilinmektedir. Bu yolun tercih edilme nedeni olarak da kanser hücrelerindeki mitokondri hasarı sorumlu tutulmakta ve hücrelerin yeterli enerjiyi üretememeleri gösterilmektedir²⁰. Mitokondriler hücrelerin enerji santralleri olmasının yanında, birçok hücre içi önemli sinyal iletim yoluğu ve fizyolojik fonksiyonun devamlılığından sorumludur²³.

Kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla daha fazla reaktif oksijen ürünleri (ROS) ürettiği bunun sebebinin de mitokondriyal DNA mutasyonu ve disfonksiyonu olduğu öne sürülmektedir. ROS oluşumunun kanserin ilerlemesini artırdığı da bildirilmektedir. Bu bakış açısıyla değerlendirildiğinde kanserli hücrelerin içerisine geçebilen mitokondri miktarının da nakil başarısı için önemli olduğu görülmektedir²⁴. Mitokondri transplantasyonun da izole mitokondrilerin ancak %3-7' sinin ancak alıcı hücreye geçebildiği bildirilmektedir^{25,26}. Meme kanseri hücrelerine mitokondri transferiyle ROS oluşumunun azaldığı, antioksidan bir enzim olan katalazın arttığı bu çalışmada gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde mitokondriyal regülasyonun, transplantasyonla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Daha da önemlisi kanserlerin mitokondriyal kaynaklı hastalık olarak tanımlanmasından ziyade, mitokondriyal metabolik hastalıklar olduğudur²⁴. Hasarlı mitokondrilerin birçok iskemik organ patolojisinde sağlıklı mitokondrilerle değişimiyle hasarlı organda iyileşme görülmüştür. Ayrıca hasar mekanizmalarında gerileme ve iyileşmeyi sağlayan hücre içi sinyalizasyon markerlarında artışlar bildirilmiştir²⁷. Bu çalışmada, insan prostat kanser hücrelerine (DU-145) sisplatin ve insan mezenkimal kök hücrelerinden (İMKH) izole edilen mitokondrilerin proliferasyon üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

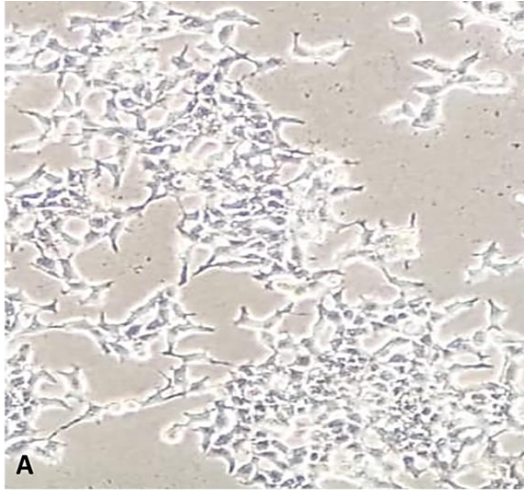
GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültür hatları

Çalışmamızda, insan prostat kanser hücre (DU-145) ve insan mezenkimal kök hücre (İMKH) hatları kullanılmıştır ve hücreler American Type Culture Collection' dan (ATCC#HTB8 1, Rockville, MD, USA) temin edilmiştir. Hücreler ticari olarak üretilmiş hücre hatları olduğundan çalışma için etik kurul onayı alınmamıştır. DU-145 hücreleri prostat kanseri araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir hücre kültürü hattıdır ve DU-145 hücreleri, %90 RPMI-1640 (%1

L-glutaminli, 25 M HEPES, Corning, VA, ABD), %10 FBS (Capricorn Scientific) ve %1 PSA' da (P4333-100mL, Sigma-Aldrich) 25 cm² ve 75 cm² lik flasklarda çoğaltılmıştır. Mitokondriler, İMKH'lerden izole edilmiştir (Şekil 3). İMKH hücreleri, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D6046, Sigma-Aldrich), %10 FBS (A0100, Ceprogen) ve %1 PSA' da) 25 cm² ve 75 cm² lik flasklarda, hücre medyumları her 72 saatte bir değiştirilerek, iç ortamı %5 CO₂, %95 hava karışımı ve nem içeren 37°C olan inkübatörde çoğaltılmıştır.

Hücrelerin pasajlama, çoğaltma işlemleri ve kimyasal uygulamaları, laminar hava akım kabininde (NUVE MN120) steril koşullarda yapıldı. Hücreler flask yüzeyinin %70-80' ini kapladığında pasajlama işlemi yapıldı. Hücre morfolojileri invert mikroskopla (Nikon Eclipse TS100) incelendi. Hücre kültürlerinin morfolojileri Şekil 1' de gösterilmektedir. Hücrelerin toplam sayısı, sağlıklı ve ölü hücre oranı *Trypan Blue* metoduyla boyanarak, mavi renkte boyanan hücreler ölü olarak değerlendirilirken, şeffaf olan ve boyanmayan hücreler ise sağlıklı olarak değerlendirildi²⁸. Ayrıca; DU-145 hücre pasajları, dondurma solüsyonuyla (%70 RPMI-1640+%20 FBS+%10 *Dimethyl sulfoxide* (DMSO, K48856212719, Merck, Germany) cryo tüplerde, -80 °C' de ve sıvı azot tankında depolanırken, İMKH hücre pasajları dondurma solüsyonu (%70 DMEM+%20 FBS+%10 DMSO) bulunan cryo tüplere konularak, -80 °C' de ve sıvı azot tankında depolandı.



Şekil 1. A) DU-145 hücre hattının x100' lük büyütmede invert mikroskop görüntüsü, İMKH hücre hattının x100' lük büyütmede invert mikroskop görüntüsü.

Çalışmamızda DU-145 hücrelerine cisplatin ve İMKH'lerden izole edilen mitokondriler Tablo 1' de belirtilen deney gruplarına uygun olarak doz uygulamaları yapılmıştır ve MTT yöntemiyle hücre sitotoksitesi değerlendirildi.

Tablo 1. Deney grupları

Deney Grupları
1. Kontrol (K)
2. Sisplatin-6 µM (Cis-6 µM)
3. Sisplatin-14 µM (Cis-14 µM)
4. Mitokondri-10x (Mito-10x)
5. Mitokondri-100x (Mito-100x)
6. Sisplatin-6 µM+Mitokondri-10x (Cis-6 µM+Mito-10x)
7. Sisplatin-6 µM+Mitokondri-100x (Cis-6 µM+Mito-100x)
8. Sisplatin-14 µM+Mitokondri-10x (Cis-14 µM+Mito-10x)
9. Sisplatin-14 µM+Mitokondri-100x (Cis-14 µM+Mito-100x)

MTT yöntemi ile hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi

MTT metodu, hücre canlılığı ve sitotoksitesinin değerlendirilmesinde kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntem olup, ucuz ve prosedürü kolaydır. Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri, tetrazolium tuzunu (MTT) mor renkli formazan kristallerine dönüştürmektedir²⁹. Her kuyucukta yaklaşık 10x10³ DU-145 hücresi olacak şekilde, 100 µL hücre süspansiyonu çok kanallı pipet yardımıyla ekildi. Hücreler 24 saat süresince flask tabanına yapışmaları ve çoğalmaları için inkübe edildikten sonra üzerlerindeki hücre medyumları uzaklaştırıldı ve kuyucuklara cisplatin (Cis-6 µM ve Cis-14 µM) dozları uygulandı. 24 saatlik inkübasyon sonunda tek bir DU-145 hücresinin 10 katı ve 100 katı sayıda İMKH' den izole edilen mitokondriler uygulandı. 24 saatlik inkübasyon sonunda kuyucuklardaki kimyasallar uzaklaştırıldı. MTT tartılarak hücre medyumunda çözülür ve 0,2 µM por çapına sahip enjektör ucu filtreden süzülür. Her kuyucuğa 100 µL MTT (5 mg/mL) solüsyonu eklendi ve 3-4 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda kuyucuklardaki MTT solüsyonu uzaklaştırıldı ve 100 µL filtre edilmiş DMSO konuldu, 20-30 dak. sonunda kuyucuklardaki renk değişimi absorbans olarak mikroplate okuyucuyla (Molecular Devices Filter Max F5) 570 nm ve 630 nm dalga

boyunda ölçüldü. Absorbans değerlerinin farkları alınarak grup ortalamaları hesaplandı.

Tablo 2. Hücre proliferasyon yüzde değerleri

GRUPLAR	Hücre Proliferasyon Yüzdesi (%)±SH
1. Kontrol	100 ±0,0125
2. Cis-6 µM	65,3 ±0,0300*
3. Cis-14 µM	32,3 ±0,0047*
4. Mito-10x	100,8±0,0519
5. Mito-100x	71,6 ±0,0253
6. Cis-6 µM+Mito-10x	85,5 ±0,0482
7. Cis-6 µM+Mito-100x	37,5 ±0,0227#
8. Cis-14 µM+Mito-10x	32,9 ±0,0078
9. Cis-14 µM+Mito-100x	27,7 ±0,0082

Mitokondri izolasyonu

Mitokondri izolasyonu, mitokondri izolasyon kiti (Biovision, K288-50) prosedürüne göre yapıldı. 75 cm² lik flasklarda bulunan İMKH' ler hücre kazıyıcı yardımıyla kazınarak santrifüj edildi. İMKH' ler (~20 milyon) 1,5 mL' lik eppendorf tüpüne alınarak içerisine 1 mL mitokondri izolasyon buffer eklendi. 5 saniye vortekslenerek, buz içerisinde 2 dak. inkübe edildi. Daha sonra 10 µL *Reagent A* eklendi ve buz içerisinde 5 dak. süresince, her 1 dakikada bir vorteksle karıştırıldı. İnkübasyon sonunda, +4 °C' de 600xg'de 10 dak. santrifüj yapıldı. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpüne alındı. Ardından +4 °C' de 7000xg hızda 10 dak. santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak, dipte bulunan mitokondri pelleti üzerine 1 mL *storage buffer* konuldu. İzole mitokondriler hemen transplante edilmeyecekse, +4 °C' de buz içerisinde 1 saat buzdolabında muhafaza edildi.

Protein miktarı ölçümü

Total protein tayininde BCA yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır ve çalışmamızda protein ölçümü BCA kitiyle yapıldı (Thermo Fisher Scientific Inc., 23227, MA, USA). İzole mitokondrilerdeki protein miktarı, konsantrasyonu bilinen *bovine serum albumin* solüsyonu standartları ile karşılaştırılarak standart eğri çizildi ve mitokondrilerin protein miktarı hesaplandı. Deneysel prosedürüne göre standartlar konsantrasyonları hazırlandı (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/mL).

Örnekler, standartlar ve kör 20 µL 96 kuyucuklu plate'e konuldu ve her kuyucuğa 200 µL çalışma solüsyonu (50:1 oranında; *Reagent-A*: *Reagent-B*) eklendi ve 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi.

Spektrofotometre' de 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek, protein miktarı; standart eğri fonksiyonuna göre hesaplandı.

İstatistiksel analiz

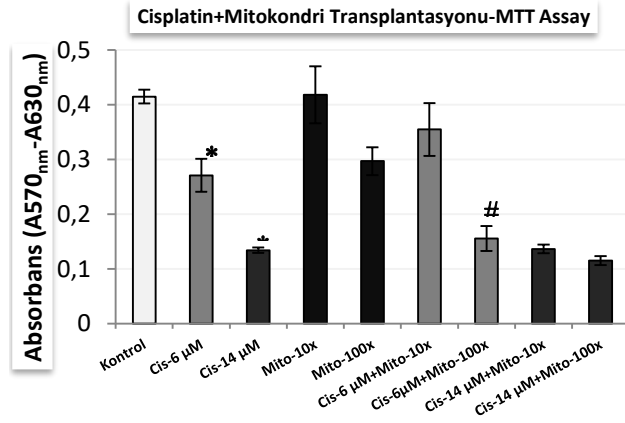
Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics 21.0 paket programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama ± standart hata (ort±SH) olarak ifade edildi. Analizde, grup varyanslarının homojen dağılıp dağılmadığı Levene testiyle değerlendirilerek homojen dağılan proliferasyon verilerinde parametrik bir test olan Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Gruplar arasındaki fark olup olmadığı LSD testiyle gösterildi. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi p<0,05 olarak alınarak sonuç anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

DU-145 hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde; sisplatin ve mitokondrinin 24 saatlik uygulamasında ANOVA testiyle gruplar arasında anlamlı fark bulundu [F(1,132)= 17,732 p=0,000]. *Post Hoc* yapılan LSD testiyle de, Sisplatin' in 6 µM dozunun, DU-145 hücre sayısını kontrol grubuna göre %35 oranında anlamlı olarak azalttığı (p=0,001), 14 µM dozunun ise %68 oranında anlamlı olarak azalttığı belirlendi (p=0,000). Tek başına mitokondri uygulamalarında ise anlamlı bir fark görülmedi (Mito-10x, (p=0,932), Mito-100x, (p=0,120). Cis-6 µM grubuyla karşılaştırıldığında, Cis-6 µM+Mito-10x grubunda proliferasyonda anlamlı fark görülmezken (p=0,055), Cis-6 µM+Mito-100x grubunda %28 oranında anlamlı azalma görüldü (p=0,013). Cis-14 µM grubuyla, Cis-14 µM+Mito-10x (p=0,932) ve Cis-14 µM+Mito-100x (p=0,665) grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi. DU-145 hücrelerinde sisplatin dozlarının ve mitokondri uygulamasının proliferasyon absorbans farkları ve yüzdeleri Şekil 2 ve Tablo 2' de belirtilmiştir.

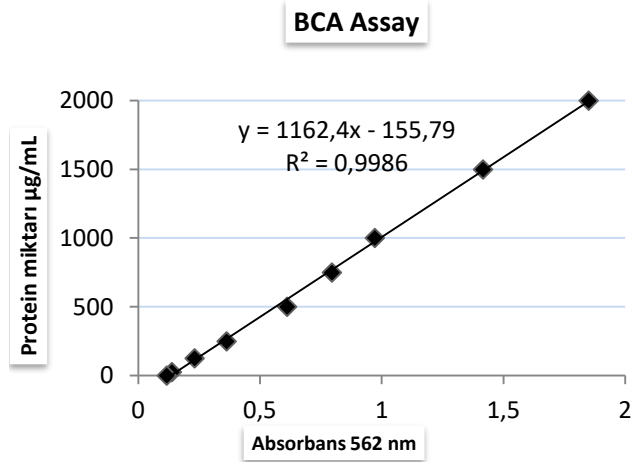
Mitokondri İzolasyonu

İMKH' lerden izole edilen mitokondrilerin protein miktarı, standart eğri fonksiyonundan yararlanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3). Çalışmamızda, izole mitokondrilerin protein miktarı 867,1 µg/mL olarak bulunmuştur. Chang ve ark. yaptıkları çalışmada mitokondri protein miktarını 780±87,9 µg olarak ölçmüş ve bulunan bu değer bizim ölçtüğümüz değerle uyumlu olduğu görülmektedir²⁴.



Şekil 2. Cisplatin ve izole mitokondrilerin DU-145 hücrelerinde proliferasyon absorbans değerler

Veriler ortalama \pm S.H olarak ifade edilmiştir. * $p \leq 0,05$ Kontrol grubuna göre. # $p \leq 0,05$ Cis-6 μ M grubuna göre, Tek Yönlü ANOVA Post hoc LSD testi ($n=8$).



Şekil 3. İzole mitokondrilerin protein miktarı standart eğrisi

TARTIŞMA

DU-145 hücrelerine 6 μ M ve 14 μ M cisplatin uygulaması; prostat kanser hücre hatlarında diğer yapılan çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da hücre sayısını anlamlı olarak azalttı ve hücrelere sitotoksik etkili olduğu belirlendi³⁰. Literatürdeki benzer çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda kullanılan mitokondriler mezenkimal kök hücrelerden elde edilmiştir. İzole mitokondriler, flow sitometriyle sayıları hesaplanarak uygulanabildiği gibi,

protein miktarları ölçülerek belirli dozlarda da verilebilmektedir^{24,31}.

Yapılan bir çalışmada, MDA-MB-231 hücrelerine, cisplatin (2 μ g/mL) dozu ve İMKH'lerden izole edilen mitokondriler (5 μ g/mL) uygulanarak, mitokondri uygulamasının cisplatinle azalan hücre sayısını ve kanser invazyonunu artırdığı, ayrıca cisplatinle indüklenen apoptozu da artırdığı belirlenmiştir, ancak tek başına mitokondri uygulamasının migrasyonu azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada izole mitokondrilere rodamin red 6

(R6G) uygulanarak mitokondriler hasarlanmış ve R6G uygulanan hasarlanmış mitokondrilerle inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerine, sağlıklı mitokondri uygulamasının sisplatinin hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisini artırdığı görülmüştür¹. Bu çalışmada ortaya çıkan sonuçlar, kanser tedavisinde antineoplastiklerle birlikte mitokondri transplantasyonunun ilaç direncini engelleyebileceğini, ayrıca apoptozu aktive ederek kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe edeceği görüşünü desteklemektedir. Bizim çalışmamızda da, 6 µM sisplatin uygulamasıyla azalan hücre sayısının, 100x mitokondri uygulamasıyla Cis-6 µM+Mito-100x grubunda %28 oranında anlamlı azalma görülürken; sisplatin ve mitokondrinin birlikte uygulandığı Cis-6 µM+Mito-10x grubunda hücre sayısında anlamlı azalma görülmemiştir. Bizim çalışmamızla uyumlu benzer bir çalışmada da doksorubisin uygulamasıyla hücre proliferasyonu azalan MCF-7 hattına, MCF-12A hücrelerinden izole edilen mitokondriler nakledildiğinde, MCF-7 hücre sayısının daha da azaldığı belirlenmiştir. Mitokondri uygulamasının hücre çoğalmasını inhibe ettiği gözlenmiştir³².

Mitokondri transplantasyonu yapılan çalışmalarda; mitokondriyal hasarın görüldüğü iskemik kalp hastalıklarında mitokondri transplantasyon dozu değişebilmektedir. Mc Cully ve ark. konjenital iskemik kalp hastalığı olan pediatrik bebeklere; olog olarak iskelet kasından izole edilen mitokondrileri her 1 gram dokuya 2×10^5 sayıda olacak şekilde perikard dokusundan direk enjeksiyonla uygulanmıştır ve kalp fonksiyonlarında düzelleme tespit etmişlerdir. Ayrıca, 4 kg ağırlığında neonatal bir bebekte nakil yapılacak her 1 gram dokuya yaklaşık 1×10^9 sayıda mitokondri uygulamışlardır^{3,33}. *In vitro* yapılan başka bir diğer çalışmada da $\sim 5,000$ hücreye 10^7 sayıda mitokondri uygulaması yapılmıştır³. Literatürdeki mitokondri transplantasyon dozları ele alındığında farklı miktarlarda uygulamalar bulunmakta ve anlamlı düzeltici etkiler bildirilmektedir. Hasarlı bölgenin büyüklüğüne göre; 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 ve 2×10^8 dozlarında mitokondri uygulaması yapılmıştır^{3,34}. Başka bir mitokondri transplantasyon çalışmasında, 10^{10} sayı mitokondri gibi yüksek bir konsantrasyon uygulamasında herhangi otoimmün reaksiyon gözlenmemişlerdir³⁵.

Çalışmamızda, DU-145 hücrelerine mitokondri uygulamasında; 10x dozu 1 hücreye 10 katı sayıda, 100x dozu da 100 katı izole mitokondri miktarı hesaplanarak (1:10 ve 1:100 oranı) uygulanmıştır. Bu oran, izolasyon kitinde belirtilen ve 20 milyon

hücreden izole edilen mitokondri protein miktarıyla eşleştirildiğinde; yani 5 µg/mL mitokondri dozunu 10,000 hücreye uyguladığımızda; 10,000 hücreden izole edilen mitokondri miktarıyla aynı olduğu görülmektedir ($1x=5 \mu\text{g/mL}$). Kanser hücrelerinde mitokondri nakli yapılan bazı çalışmalarda mitokondri transplantasyonunun kanser hücrelerinin çoğalmasını artırdığı görülmüştür, bizim çalışmamızda bu çalışmalarda kullanılan miktarla eşlendiğinde yaklaşık 10 ve 100 kat daha yüksek dozda mitokondri uygulaması yapılmıştır. Çalışmamızda 100 kat fazla mitokondriyle sisplatinin birlikte uygulamasında hücre sayısında anlamlı azalma görülürken, 10 kat fazla uygulamada herhangi bir anlamlı etki görülmedi. Ortaya çıkan bu sonuç yüksek miktarda mitokondri naklinin hücre çoğalmasını inhibe edebileceğini göstermektedir. Bu da aslında mitokondri naklinde hücre içerisine giren mitokondri miktarının da önemli olduğudur.

Ayrıca, mitokondrilerin sağlıklı ve işlevsel olarak izole edilmesi çok önemlidir, izolasyonun hızlı bir şekilde yapılması gereklidir. Mitokondri transplantasyonunda; izole mitokondrilerin canlı, sağlıklı olarak ve zaman kaybetmeden hızlı bir şekilde alıcı dokuya ve hücrelere nakli çok önemlidir³. İnternalize olan mitokondrilerin hücre içerisine girebilmesi ve ATP üretebilmesi, ayrıca hücre içi iyileştirici ve tamir edici mekanizmaları etkileyebilmesi transplantasyonun başarısı için gereklidir. Mitokondrilerin hassas özellikleri olduğu düşünüldüğünde; transplantasyonla ilgili çok fazla çevresel değişken olduğu bilinmelidir³⁶. Mitokondri naklinin etkilerinin değerlendirildiği hayvan ve insan çalışmalarında, mitokondri sayısı hesaplanarak hasarlı bölgeye mitokondriler uygulanabilmektedir. Ayrıca; izole mitokondrilerin total protein miktarı ölçülerek de belirlenen miktarlarda da uygulanmaktadır. Burada gözden kaçırılmaması gereken konu, uygulamadan önce mitokondrilerin hem sayım metodları uygulanırken hem de protein ölçümü yapılırken bekleme süreleri ve mitokondrilerin uygulamaya kadar ki inkübasyon süreleri ve saklama koşullarıdır^{3,7,33}. Mitokondri naklinin başarısı için bu koşulların sağlanması oldukça önemli gibi gözükmektedir. Bizim çalışmamızda da bu sınırlayıcı faktörler göz önünde bulundurulduğunda mitokondrilerin uygulama öncesi bekleme süresini kısaltmak için, izole edilen mitokondrilerde sayım yapmak yerine, izolasyon yapılacak hücre sayısından yola çıkarak, nakil yapılacak hücre sayısına göre (1:1 oranında) uygulama yapılmıştır. Bizim çalışmamızda yaptığımız uygulamayla, total protein hesaplanarak

yapılan uygulama karşılaştırıldığında, iki yöntemin de eşit mitokondri miktarına denk geldiği görülmüştür.

Çalışmanın Kısıtlılıkları: Çalışmamızda mitokondri transplantasyonunun kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden hangi mekanizmaları kullandığı gösterilememiştir. Sadece hücre proliferasyonu değerlendirilmiştir. Bu sebeple ileriki çalışmalarımızda mitokondrinin kanser hücre çoğalması üzerine moleküler etkilerini inceleyebileceğimiz araştırmalar düşünülmektedir. Bunun için de daha ileri araştırma metodlarıyla (*Western blotting, PCR, ELİSA immünfloresan ve immünohistokimyasal görüntüleme vb.*) hücre içi ve dışı sinyalizasyonda spesifik proteinlerin tespit edilmesi planlanmaktadır.

Sonuç olarak, mitokondri transplantasyonu günümüzde yoğun bir şekilde çalışılan bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Mitokondri disfonksiyonu olan birçok hastalıkta, transplantasyonun iyileştirici olumlu etkileri yeni bir tedavi yöntemi olarak heyecan vericidir. Ancak hücre içerisine giren mitokondrilerin hangi intrasellüler mekanizmalar üzerinden hücre tamirini ve çoğalmasını etkilediği soru işaretidir ve konunun aydınlatılmamış yönleride bulunmaktadır. Kanser hücrelerinde de mitokondri uygulaması denemektedir. Ancak çalışmalarda tam olarak kanser hücreleri üzerine etkileri gösterilememiştir ve farklı sonuçlar ve görüşler ortaya konulmaktadır. Özellikle, mitokondri transplantasyonunun hücresel moleküler düzeydeki etkilerinin tam anlamıyla ortaya çıkarılması gerekmektedir. Çalışmamızın ileri aşamalarında, farklı kanser hücre hatlarında farklı mitokondri dozlarının proliferasyon ve migrasyonun değerlendirilmesi planlanmaktadır. Ayrıca, alıcı hücre içerisine giren mitokondrilerin hangi intrasellüler mekanizmaları etkilediği ve proliferatif sinyal yollarıyla ilişkili olduğunun ortaya çıkarılması gerekli gibi gözükmektedir.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarım: ZÇ, VT; Veri toplama: ZÇ, VT; Veri analizi ve yorumlama: ZÇ, VT; Yazı taslağı: ZÇ, VT; İçeriğin eleştirel incelenmesi: ZÇ, VT; Son onay ve sorumluluk: ZÇ, VT; Teknik ve malzeme desteği: ZÇ, VT; Süpervizyon: ZÇ, VT; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Etik Onay: Bu çalışma için Hücreler ticari olarak üretilmiş hücre hatları olduğundan çalışma için etik kurul onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Author Contributions: Concept/Design : ZÇ, VT; Data acquisition: ZÇ, VT; Data analysis and interpretation: ZÇ, VT; Drafting manuscript: ZÇ, VT; Critical revision of manuscript: ZÇ, VT; Final approval and accountability: ZÇ, VT; Technical or material support: ZÇ, VT; Supervision: ZÇ, VT; Securing funding (if available): n/a.

Ethical Approval: Ethical approval was obtained from Çukurova University Faculty of Medicine Non-Interventional Clinical Research

Ethics Committee for this study. (With the date 6.3.2020 and the number 97/1).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

KAYNAKLAR

1. Kheirandish-Rostami M, Roudkenar MH, Jahanian-Najafabadi A, Tomita K, Kuwahara Y, Sato T et al. Mitochondrial characteristics contribute to proliferation and migration potency of MDA-MB-231 cancer cells and their response to cisplatin treatment. *Life Sci.* 2020;244:117339.
2. Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc.* 2009;4:1582-90.
3. McCully JD, Levitsky S, del Nido PJ, Cowan DB. Mitochondrial transplantation for therapeutic use. *Clini Transl Med.* 2016;5:16.
4. Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc.* 2007;2:287-95.
5. Li C, Cheung MKH, Han S, Zhang Z, Chen L, Chen JH et al. Mesenchymal stem cells and their mitochondrial transfer: a double-edged sword. *Biosci Rep.* 2019;39:BSR20182417..
6. Orfany A, Arriola CG, Doulamis IP, Guariento A, Ramirez-Barbieri G, Moskowitsova K et al. Mitochondrial transplantation ameliorates acute limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2020;71:1014-26.
7. Gollihue JL, Rabchevsky AG. Prospects for therapeutic mitochondrial transplantation. *Mitochondrion.* 2017;35:70-9.
8. Ali Pour P, Kenney MC, Kheradvar A. Bioenergetics consequences of mitochondrial transplantation in cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc.* 2020;9:e014501.
9. Nzigou Mombo B, Gerbal-Chaloin S, Bokus A, Daujat-Chavanieu M, Jorgensen C, Hugnot JP et al. MitoCeption: transferring isolated human msc mitochondria to glioblastoma stem cells. *J Vis Exp.* 2017;120:55245.
10. Yang Y, Ye G, Zhang YL, He HW, Yu BQ, Hong YM et al. Transfer of mitochondria from mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells attenuates hypoxia-ischemia-induced mitochondrial dysfunction in PC12 cells. *Neural Regen Res.* 2020;15:464-72.
11. Wang JY, Li HYZ, Yao Y, Zhao TF, Chen YY, Shen YL et al. Stem cell-derived mitochondria transplantation: a novel strategy and the challenges for the treatment of tissue injury. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:106.
12. Caicedo A, Aponte PM, Cabrera F, Hidalgo C, Khoury M. Artificial mitochondria transfer: current challenges, advances, and future applications. *Stem Cells Int.* 2017;2017:7610414. |

13. Murray LMA, Krasnodembskaya AD. Concise review: intercellular communication via organelle transfer in the biology and therapeutic applications of stem cells. *Stem Cells*. 2019;37:14-25.
14. Liu K, Zhou Z, Pan M, Zhang L. Stem cell-derived mitochondria transplantation: A promising therapy for mitochondrial encephalomyopathy. *CNS Neurosci Ther*. 2021;27:733-42.
15. Vasanthan J, Gurusamy N, Rajasingh S, Sigamani V, Kirankumar S, Thomas EL et al. Role of human mesenchymal stem cells in regenerative therapy. *Cells*. 2020;10:54.
16. Konari N, Nagaishi K, Kikuchi S, Fujimiya M. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo. *Sci Rep*. 2019;9:5184.
17. Zhao J, Qu D, Xi Z, Huan Y, Zhang K, Yu C et al. Mitochondria transplantation protects traumatic brain injury via promoting neuronal survival and astrocytic BDNF. *Transl Res*. 2021;235:102-14.
18. Kubat GB, Ozler M, Ulger O, Ekinci O, Atalay O, Celik E et al. The effects of mesenchymal stem cell mitochondrial transplantation on doxorubicin-mediated nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021;35:e22612.
19. Caicedo A, Fritz V, Brondello JM, Ayala M, Dennemont I, Abdellaoui N et al. MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Sci Rep*. 2015;5:9073.
20. Elliott RL, Jiang XP, Head JF. Mitochondria organelle transplantation: introduction of normal epithelial mitochondria into human cancer cells inhibits proliferation and increases drug sensitivity. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136:347-54.
21. Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26:711-23.
22. Popov LD. One step forward: extracellular mitochondria transplantation. *Cell Tissue Res*. 2021;384:607-12.
23. Roushandeh AM, Kuwahara Y, Roudkenar MH. Mitochondrial transplantation as a potential and novel master key for treatment of various incurable diseases. *Cytotechnology*. 2019;71:647-63.
24. Chang JC, Chang HS, Wu YC, Cheng WL, Lin TT, Chang HJ et al. Mitochondrial transplantation regulates antitumour activity, chemoresistance and mitochondrial dynamics in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38:30.
25. Bertero E, Maack C, O'Rourke B. Mitochondrial transplantation in humans: "magical" cure or cause for concern? *J Clin Invest*. 2018;128:5191-94.
26. Cowan DB, Yao R, Thedsanamoorthy JK, Zurakowski D, Del Nido PJ, McCully JD. Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells. *Sci Rep*. 2017;7:17450.
27. Guariento A, Blitzer D, Doulamis I, Shin B, Moskowitzova K, Orfany A et al. Preischemic autologous mitochondrial transplantation by intracoronary injection for myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2020;160:e15-29.
28. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:A3 B 1-3.
29. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-45.
30. Yang C, Lee M, Song G, Lim W. tRNA(Lys)-derived fragment alleviates cisplatin-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Pharmaceutics*. 2021;13:55.
31. Nakamura Y, Park JH, Hayakawa K. Therapeutic use of extracellular mitochondria in CNS injury and disease. *Exp Neurol*. 2020;324:113114.
32. Elliott RL, Jiang XP, Head JF. Mitochondria organelle transplantation: introduction of normal epithelial mitochondria into human cancer cells inhibits proliferation and increases drug sensitivity. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136:347-54.
33. Emani SM, McCully JD. Mitochondrial transplantation: applications for pediatric patients with congenital heart disease. *Transl Pediatr*. 2018;7:169-75.
34. McCully JD, Cowan DB, Emani SM, Del Nido PJ. Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans. *Mitochondrion*. 2017;34:127-34.
35. Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, Ericsson M, Barnett RJ, Drumm C et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304:H966-82.
36. Chernyak BV. Mitochondrial transplantation: a critical analysis. *Biochemistry (Mosc)*. 2020;85:636-41.