

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SERVİKAL KANSER İÇİN DOCETAXEL YÜKLÜ
EKSOZOMLARIN GELİŞTİRİLMESİ ve TERAPÖTİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

MELİKE CENİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Özge ÇEVİK

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-20013 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Melike CENİK tarafından hazırlanan “Servikal kanser için docetaxel yüklü eksozomların geliştirilmesi ve terapötik etkilerinin belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / /

Üye (T.D.) : (ünvan, adı soyadı) (üniversite) (imza) ...

Üye : (ünvan, adı soyadı) (üniversite) (imza) ...

Üye : (ünvan, adı soyadı) (üniversite) (imza) ...

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

.....
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans programına başladığım ilk günden bu yana bana son derece özverili, sorumlu, yardımsever ve hassas davranan; deneyimini, bilgisini ve bilim insanlığının getirdiği vizyonu her an benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Özge ÇEVİK'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen, tüm bilgilerini benimle içtenlikle paylaşan, sadece hoca değil, aynı zamanda arkadaşım gibi olan Dr. Burçin İrem ABAS' a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamda ve sosyal anlamda sonsuz desteklerini her zaman hissettiğim, sıcacık dostluklarıyla her anımda yanımda olan çalışma arkadaşlarım Bilge KOCABIYIK ve Dilara USLU' ya sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman koşulsuz yardım eden, bildiklerini benimle paylaşan hocalarıma ve desteklerinden dolayı tüm BİLTEM personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için, bana her zaman güç veren ve daima arkamda olduklarını hissettiğim canım annem Raziye CAN ve eşim Sinan CENİK' e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Serviks Kanseri.....	4
2.2. Hastalığın Patogenezi	5
2.3. İnsan Papilloma Virüsü (HPV).....	6
2.4. HPV Aracılı Karsinogenez	8
2.5. Rahim Ağzı Kanserinde Güncel Tedaviler.....	10
2.6. Hücre Dışı Veziküller	14
2.6.1. Apoptotik Cisimler (ApoBD)	15
2.6.2. Mikroveziküller (MV)	17
2.6.3. Eksozomlar	19
2.7. Eksozomların Oluşumu ve Salgılanması.....	20
2.8. Eksozomların Membran Bileşimleri ve İçeriği	22
2.8.1. Proteinler	23
2.8.2. Lipidler	25
2.8.3. Nükleik Asitler	27

2.9. Eksozomların İzolasyon Yöntemleri	27
2.9.1. Ultrasantrifüj Esaslı İzolasyon Teknikleri	28
2.9.2. Ultrafiltrasyon Yöntemi.....	30
2.9.3. İmmünoafinite kromatografisi	31
2.9.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi	32
2.9.5. Polimer Esaslı Çökeltme Yöntemi	33
2.9.6 Mikroakışkan Esaslı İzolasyon Teknikleri	35
2.10. Eksozomların Fonksiyonları.....	36
2.11. Eksozomlar ve Kanser	37
2.12. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Eksozomlar	39
2.13. Klinik Uygulamalarda Eksozomlar	41
3. GEREÇ ve YÖNTEM	44
3.1. Kullanılan Malzemeler	44
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	44
3.3. Hücre Kültürü	45
3.3.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması.....	45
3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması.....	45
3.3.4. Hücre Sayımı	46
3.4. Eksozomların İzolasyonu	46
3.5. Eksozomlara Docetaxel (Doc) Yüklenmesi	48
3.6. Eksozomların Boyut ve Karakterizasyonlarının Belirlenmesi	49
3.6.1. Eksozomların Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Görüntülemesi.....	49
3.6.2. Eksozomların Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	49
3.6.3 Docetaxelin Eksozomlara Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi.....	50
3.7 Hücrelere Eksozom Uygulanması	50
3.8. BCA Protein Tayini	51
3.9. MTT Deneyi ile Hücre Canlılığının Saptanması	52

3.10. İlaç Yüklü Eksozomların Migrasyon Üzerine Etkisi.....	53
3.11. Protein ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	54
3.11.1 SDS-PAGE/Western Blot Analizi	54
3.11.1.1. Hücre lizatı elde edilmesi	56
3.11.1.2 Elektroforez	56
3.11.1.3 Transfer işlemi.....	57
3.11.1.4 Antikor uygulaması ve görüntüleme	57
3.11.2. RNA İzolasyonu ve RT-PCR	57
3.12. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin İncelenmesi	60
3.13. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	61
4.1. Eksozomların Boyut ve Karakterizasyonları	61
4.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	62
4.3. Sitotoksite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	63
4.4. Migrasyon Deneyine İlişkin Bulgular	66
4.5. Western Blot Analizi	67
4.6. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Sonuçları	70
4.7. Q-PCR Bulguları	71
5. TARTIŞMA.....	74
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	97

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAV	: Adeno ilişkili virüs
ALIX	: Alg2-etkileşen protein X
APC	: Antijen sunan hücre
ApoBD	: Apoptotik cisimler
ARF6	: ADP-ribosilasyon faktörü 6
ATPase	: Adenosin trifosfataz
ATPS	: Sulu iki fazlı sistemler
BBB	: Kan beyin bariyeri
Bp	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albümin
CDK	: Sikline bağlı kinaz inhibitörleri
CC	: Serviks kanseri
cDNA	: Komplementer DNA
CIN	: Servikal intraepitelyal neoplazi
CIRCCa	: Metastatik veya tekrarlayan servikal kanserli hastalarda carboplatin ve paclitaxel ile kombine cediranib
CNS	: Merkezi sinir sistemi
COP	: Kaplama protein kompleksi
CTLA-4	: Anti-sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4
DC	: Dendritik hücre
DDS	: İlaç dağıtım sistemleri
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOC	: Docetaxel
DPBS	: Dulbecco's phosphate buffer saline
DOX	: Dokсорubisin
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
ESCRT	: Taşıma için gerekli olan endozomal sıralama kompleksi

EV	: Extra celüler (hücre dışı) vezikül
EXO	: İlaç yüklemesi yapılmayan eksozom
EXO-DOC	: Docetaxel yüklü eksozom
FBS	: Fetal bovin serum
GDNF	: Glial hücre hattı kaynaklı nörotropik faktör
GOG	: Jinekolojik onkoloji grubu
GTP	: Guanozin trifosfat
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü
HPV	: İnsan papilloma virüsü
HSPS	: Isı şok proteini
Ig G	: İmmunoglobülin g
ILV	: İntra luminal (lümen içi) vezikül
LNCRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
LPBA	: Lizosifosfatidik asit
LPC	: Fosfatidilkolin
MHC	: Büyük histo-uyumluluk kompleksi
miRNA	: mikroRNA
MLCK	: Miyozin hafif zincir kinazı
mRNA	: Mesajcı RNA
MSC	: Mezenkimal stromal hücreleri
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MV	: Mikrovezikül
MVB	: Multivesiküler cisimler
NCIC CTG	: Kanada klinik araştırmalar ulusal kanser enstitüsü
NCT	: Ulusal klinik araştırmalar grubu
PARP	: Poli ADP-riboz polimeraz
PARP	: Poli ADP-riboz polimeraz
PAX	: Paklitaksel
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PD 1	: Programlanmış hücre ölümü
PDGFR	: Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü
PD-L1	: Programlı ölüm ligandı
PEG	: Polietilen glikol

PKM 2	: Piruvat kinaz tip M2
PLD	: fosfolipaz D
PS	: Fosfatidilserin
PVDF	: Polivinilidin florür
Rb	: Retinoblastom
RNA	: Ribonükleik asit
SEM	: Taramalı elekteron mikroskobu
SM	: Sfingomiyelin
SNARE	: N-etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma protein reseptörleri
SS	: Standart sapma
TGF-β	: Transforming growth factor beta
tRNA	:Transfer RNA
TSAB6	: Tümör baskılayıcı ile aktiveleştirilen yol 6
TSG101	: Tümör duyarlılığı geni 101
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
VPS4	: Vakuolar protein sınıflandırması ile ilişkili protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	2020 yılına ait, kadınlar arasında en sık görülen kanserler için insidans ve ölüm oranlarının dağılımı.....	4
Şekil 2.	2020 yılına ait, serviks kanseri için bölgelere özel tahmini vaka ve ölüm oranlarının grafiği.	5
Şekil 3.	HPV 16 yapısı ve viral proteinler.....	7
Şekil 4.	Normal, premalign lezyonlarda (sırasıyla hafif, orta ve şiddetli displazi; sırasıyla CIN 1, CIN 2 ve CIN 3) ve serviks kanserinde normal ve HPV ile enfekte olmuş skuamöz epitel hücrelerinin dağılımı	9
Şekil 5.	Hücre dışı veziküllerin şematik gösterimi	15
Şekil 6.	Apoptoz sırasında apoptotik cisimlerin oluşumu.....	17
Şekil 7.	MV' lerin oluşumu ve salınım mekanizması.	18
Şekil 8.	Eksozom ve mikrovezikül oluşumu	20
Şekil 9.	Eksozomların biyogenezi	21
Şekil 10.	Eksozom biyogenezinde pH' nın etkisi.....	22
Şekil 11.	Çeşitli proteinler (sitosolik proteinler, transmembran proteinler, ısı şok proteinleri ve adezyon proteini, tetraspaninler, vb.), lipidler ve nükleik asitler (mRNA, miRNA, lncRNA ve DNA) içeren eksozom kompleksi.....	23
Şekil 12.	Diferansiyel ultrasantrifüj esaslı eksozom izolasyonunun şematik gösterimi.	29
Şekil 13.	Gradyan yoğunluk ultrasantrifüj esaslı eksozom izolasyonunun şematik gösterimi..	30
Şekil 14.	Jel filtrasyon kromatografisi bazlı eksozom izolasyonu prensibi	33
Şekil 15.	ATPS eksozom izolasyonunun şeması.....	34
Şekil 16.	Terapötik moleküllerin eksozomlara yüklenmesi..	40
Şekil 17.	Eksozomların boyut büyüklükleri grafiği	61
Şekil 18.	Eksozomların SEM görüntüleri.....	62
Şekil 19.	Docetaxel yükleme miktarlarının hesaplanmasına ilişkin grafik.....	63
Şekil 20.	Docetaxel'in HELA ve NIH-3T3 hücrelerinde MTT sonuçları.....	63
Şekil 21.	Exo ve Exo-Doc HELA hücrelerinde MTT sonuçları	64
Şekil 22.	HELA hücrelerinde hücre canlılığının mikroskop görüntüleri	65
Şekil 23.	Exo ve Exo-Doc uygulaması sonrası hücre ölümlerinin gösterilmesi	65

Şekil 24. HELA hücrelerinde scratch ölçümlerinin mikroskop görüntüsü	66
Şekil 25. HELA hücrelerinde scratch ölçümleri kapanma yüzdeleri grafiği	67
Şekil 26. HELA hücrelerinde western blot bant görüntüleri.....	67
Şekil 27. HELA hücrelerinde BAX protein ekspresyon düzeylerinin densitometrik analiz grafiği.....	68
Şekil 28. HELA hücrelerinde Bcl-2protein ekspresyon düzeylerinin densitometrik analiz grafiği.....	68
Şekil 29. HELA hücrelerinde Pro-Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeylerinin densitometrik analiz grafiği	69
Şekil 30. HELA hücrelerinde Pro-Kaspaz-9 protein ekspresyon düzeylerinin densitometrik analiz grafiği	70
Şekil 31. HELA hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyleri.....	71
Şekil 32. HELA hücrelerinde qPCR ile BAX gen ekspresyon düzeyleri	72
Şekil 33. HELA hücrelerinde qPCR ile Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri	72
Şekil 34. HELA hücrelerinde qPCR ile Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri.....	73

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. HeLa hücrelerinin mikroskop görüntüsü (10x).....	45
Resim 2. Thoma lamında sayım için hücrelerin hazırlanması	46
Resim 3. Ultrasantrifüj cihazı ve santrifüj tüpleri	47
Resim 4. Elektroporatör cihazı ve küveti	48
Resim 5. Docetaxel yüklü eksozomların santrifüj sonucu görüntüsü	48
Resim 6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazı	49
Resim 7. Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümlerinin yapıldığı Zetasizer cihazı	50
Resim 8. BCA yöntemi ile protein konsantrasyonunun belirlenmesi	52
Resim 9. Formazan kristallerinin DMSO ile çözüldükten sonraki görüntüsü	53
Resim 10. HeLa hücrelerine uygulanan scratch testi mikroskop görüntüsü	53

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. HPV viral proteinlerinin listesi ve temel fonksiyonları.....	8
Tablo 2. Rahim ağzı kanseri tedavisinde araştırılan anti-anjiyojenik terapötik ajanların özeti	12
Tablo 3. Eksozomların ilaç dağıtım aracı olarak kullanıldığı bazı çalışmaların özeti.....	41
Tablo 4. SDS-PAGE/WESTERN BLOT deneyleri için hazırlanan çözeltiler ve bileşenleri	55
Tablo 5. Poliakrilamid jel içerikleri	56
Tablo 6. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği (1 örnek için)	58
Tablo 7. RT- PCR' da kullanılan primerler	59
Tablo 8. RT-PCR içeriği	59
Tablo 9. Eksozomların partikül büyüklüğü, polidispersite ve zeta potansiyel ölçümleri.....	62
Tablo 10. % Enkapsülasyon etkinliği ve % Etkin madde yükleme kapasitesi değeri	62

ÖZET

SERVİKAL KANSER İÇİN DOCETAXEL YÜKLÜ EKSOZOMLARIN GELİŞTİRİLMESİ ve TERAPÖTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Cenik M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020.

Serviks kanseri, rahim ağzı kanser olarak bilinir. Bu kanser türünün kadınlarda görülme sıklığı yüksek olmakla birlikte, kanserle ölümler arasında yaygın olarak görülmektedir. Serviks kanseri için kemaoterapiler kullanılmakta ve kombine ilaç tedavileri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Farmasötiklerin nanopartiküller içerisinde enkapsülasyonu; kontrollü salım sağlanması, ilaç toksisitesini azaltması ve istenilen bölgeye hedeflendirilebilme özellikleri sayesinde kanser tedavisinde yaşanan problemlere çözüm sunmaktadır. Eksozomlar, hücrelerin kendi yapılarından salınan nano boyuttaki veziküllerdir. Eksozomların, çeşitli hücrelere proteinleri, RNA' ları, biyomolekülleri transfer edebileceği gösterilmiştir. Eksozomlar ilaç dağıtımı için seri üretilebilir bir kapasiteye sahip olup, tümör büyümesini baskıladığı konusunda da çalışmalar yer almaktadır. Bu tez çalışmasında bir mikrotübül inhibitörü olan kemoterapide kullanılan docetaxel' in, eksozomlar içerisinde yüklenip yeni bir taşıyıcı sistem geliştirilerek, serviks kanseri için terapötik etkileri araştırıldı. Çalışmada serviks kanser hücreleri olan HELA' dan salınan eksozomlar izole edildi ve eksozomlara elektroporasyon yöntemiyle docetaxel yüklendi. Yükleme yapılan eksozomların karakterizasyon çalışmaları (partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği) yapıldı. Sitotoksitenin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanıldı. Uygun doz belirlendikten sonra servikal kanser tedavisi için hücrelere uygulandı. Docataxel yüklü eksozomların migrasyon üzerine etkisi strach testi yapıldı. Apoptoz üzerine etkilerini anlamak için Bax, Bcl-2, Pro kaspaz-3 ve Pro kaspaz-9 proteinlerinin hücre içi ifadeleri Western blot yöntemi kullanılarak saptandı. Gen ifadeleri üzerine etkisi ise RT-PCR yöntemi ile saptandı. Yapılan çalışmalar sonucunda docetaxel yüklü eksozomlar, docetaxel çözeltisine göre daha yüksek sitotoksik etkiye yol açmıştır. Çalışmalar, docetaxel yüklü eksozomların kanser tedavisinde yeni bir yol olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Eksozom, Serviks kanseri, migrasyon, docetaxel, ilaç taşıyıcı sistem

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DOCETAXEL LOADED EXOSOMES FOR CERVICAL CANCER AND DETERMINATION OF THERAPEUTIC EFFECTS

Cenik M. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Molecular Biotechnology Program, Master Thesis, Aydın, 2020.

Although the incidence of cervical cancer in women is high, it is common among cancer with deaths. Chemotherapies are used for cervical cancer and there are many studies on combined drug therapies. Encapsulation of pharmaceuticals into nanoparticles; It offers a solution to the problems experienced in cancer treatment thanks to its controlled release, reducing drug toxicity and targeting to the desired area. Exosomes are nano-sized vesicles released from the cells' own structures. It has been shown that exosomes can transfer proteins, RNAs, biomolecules to various cells. Exosomes have a mass manufactured capacity for drug delivery. There are also studies that it suppresses tumor growth. In this thesis study, was investigated the therapeutic effects of docetaxel, a microtubule inhibitor, used in chemotherapy and were loaded into exosomes and a development new carrier system, for cervical cancer. In the study, exosomes released from HELA, which are cervical cancer cells, were isolated and docetaxel was loaded into the exosomes by electroporation. Characterization studies (particle size, zeta potential and encapsulation efficiency) of loaded exosomes were done. MTT method was used to determine cytotoxicity. Applied to cells for cervical cancer treatment after appropriate dose was determined. The effect, on the cell migration of docetaxel loaded exosomes scratch test was performed. Intracellular expressions of Bax, Bcl-2, Pro caspase-3 and Pro caspase-9 proteins were determined using Western blot method to understand their effects on apoptosis. The effect on gene expression was determined by RT-PCR method. As a result of the studies, docetaxel loaded exosomes caused a higher cytotoxic effect than docetaxel solution. Studies have shown that docetaxel-loaded exosomes may be a new way of treating cancer.

Keywords: Exosome, Cervical cancer, migration, docetaxel, drug delivery system

1. GİRİŞ

Serviks kanseri (Rahim ağzı kanseri, CC), dünyadaki en yaygın kadın maligniteler arasındadır. İnsidansı, insan papilloma virüsü (HPV) taramasından olduğu gibi bir aşılama ile de engellenebilir (Cohen ve ark, 2019). HPV, CC' nin başlıca nedensel faktördür. Yüksek riskli HPV' ye ve cinsel davranış değişikliklerine sürekli maruz kalma, CC' nin görülme sıklığını artırır (Vaccarella ve ark, 2016).

Cinsel açıdan aktif kadınlarda çok sık görülen HPV' lerin enfeksiyonu uterus serviksindeki tümör yaralanmalarının iyileştirilmesinde önemli rol oynayabilir. Uterus servikal karsinomu (CC) kadınlarda en sık görülen üçüncü tümördür ve yüksek riskli HPV, bu tümörün toplamında bulunur (Formana ve ark, 2012). HPV, epitelinin derin katmanlarına servikal mikrodalgalar yoluyla ulaşabilir ve viral DNA' nın bir epizom olarak tutulduğu, konakçı hücre genomu boyunca çoğaldığı olgunlaşmamış çoğalma hücrelerine girebilir. Sonuç olarak, enfekte olmuş olgunlaşmamış servikal hücreler proliferatif bir durumda kalır ve terminal farklılaşmasını engeller (Hebner ve Laimins, 2006). Pap-Smear testi uygulanırken fırça yardımı ile vajinal sürüntüden alınan örnek, patologlar tarafından değerlendirilerek normal – anormal hücre sınıflandırması yapılır. Sonucu şüpheli gelen olgularda kolposkopik inceleme yapılmalıdır. Serviksin optik olarak büyütülerek görüntülenmesi tekniği olan kolposkopik incelemede pozitif bulgu saptanırsa, kolposkopi altında biyopsi işlemi gerçekleştirilir. Biyopsi ile serviks kanseri tespit edilmişse, tedavi seçeneklerini belirleyebilmek için hastalığın boyutlarının tespiti gerekir. Tümörün boyutu, yayılımı, önde idrar kesesi, arkada ise kalın bağırsak ilişkisinin değerlendirilmesi için vajinal ve rektal muayene, MR ve PET/CT yapılabilir. Ultrasonografi ile serviks kanserinin durumu net olarak değerlendirilemez. Rahim ağzı kanseri genellikle bölgesel olarak yayılan bir hastalıktır. Metastazlarını genellikle lenf yolları ile yapar. Kan damarı yolu ile organ metastazı çok daha az oranda görülür. Genel olarak hastalığın rahim ağzı ile sınırlı olduğu vakalar, cerrahi ile tedavi edilir. Cerrahinin genişliğini, hastanın yaşı, çocuk isteği, tümörün büyüklüğü ve yayıldığı alan belirler. İhtiyaca göre, rahimin bırakılıp serviksin konizasyon ile çıkarılmasından başlayarak, rahimin yanlarındaki dokular (parametrium) ve vagenin 1/3 üst kısmıyla birlikte geniş olarak çıkarıldığı, pelvik ve paraaortik lenf bezlerinin alındığı ameliyatlara kadar kapsamı genişleyen cerrahi teknikler uygulanabilir. Kanser rahim ağzı dışına çıkıp, rahimin yanlarına (parametrium) yayıldığında, radyoterapi

ilk tedavi seçeneği olur. Rahim ağzında bulunan tümör hacmi büyüdükçe, hastaların tedavisinde kemo-radyoterapi ilk tedavi seçeneği olarak düşünülür. Kısıtlı tedavi seçeneği bulunan serviks kanseri için yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Eksozomlar, 1.13-1.21 g/ml yoğunluğa ve 30-100 nm çapa sahip, lipit çift tabakaları ile çevrili düzleştirilmiş yarım kürelerdir. Genellikle endozomal yoldan üretilirler.(Wang ve Xie, 2017). Eksozomlar, plazma, tükürük, idrar, lateks, beyin omurilik sıvısı ve assit gibi farklı vücut sıvılarında bulunabilir (Shen ve ark, 2018). Eksozomlar, hücreler tarafından hücre dışı boşluğa salınan hücresel proteinler, lipidler, RNA (miRNA'lar, mRNA'lar, lncRNA) ve DNA' lar içeren hücresel zarın bir kısmı ile sarılmış özel paketlerdir. Bazı raporlar, eksozomların içeriğini, hücreler arası bir iletişim mekanizması yoluyla diğer hücelere aktarabildiklerini ve hedef hücrelerin içindeki çoklu sinyal yollarını etkileyebileceğini göstermiştir (Mohankumar ve ark, 2016; Zamani ve ark 2018).

Son yıllarda, eksozomlar, hücreler arası iletişimde kilit performans göstergeleri olarak keşfedilmiştir. Eksozomlar, hücre-hücre sinyalleşmesine aracılık eden biyolojik sinyal molekülleri içeren nano boyuttaki veziküllerdir. Hücre kaynaklı eksozomlar, hücelere veya sentetik nanoparçacıklara kıyasla terapötik maddelerin taşınmasında önemli rollere sahiptir. Terapötik içeriğini hedef hücelere ve dokulara vermek için yüzeylerinde belirli ligandlar veya proteinlerle modifiye edilebilirler (Vakhshiteh ve ark 2019).

Eksozomlar, stabilite, biyoyumluluk ve düşük immünojeniklik özellikleri ve bir kargo ile yüklenme olasılığı nedeniyle, bir dizi patolojik durumda ilaçlar ve küçük moleküller için terapötik dağıtım ajanları olarak giderek daha fazla araştırılmaktadır. Önemli olarak, eksozomlar, hücre içerisine alınmada temel gönderilen moleküllerin aktivitesini korurken iyi bir stabiliteye sahip olmasıyla göze çarpan, güvenli, hücre içermeyen ve kontrol edilebilir bir sistemdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, siRNA' lar, miRNA' lar, shRNA' lar ve kurkumin ve doksorubisin ve paklitaksel olarak anti-enflamatuar/antikanser ajanların taşınmasında eksozomlar araştırılmıştır (Mangino ve ark, 2019).

Eksozomlar, örneğin spesifik yüzey ligandlarını ve reseptörlerini eksprese etmek ve bunları terapötik ajanlara yüklemek suretiyle belirli hastalıkları hedeflemek için uyarlanabilir. Eksozomların ana hücre hattındaki biyogenez yoluyla manipülasyonuna alternatif olarak, eksozomlar saflaştırılabilir ve daha sonra terapötik molekülleri dahil etmek için modifiye edilebilir. Sistemik yolla verilen eksozomlar tercihi olarak karaciğerde, dalakta ve böbreklerde birikir, ancak dozajı ölçeklendirerek ve değiştirerek, dağılımını etkilemek mümkündür. Eksozom membran bileşimini hücre tipine göre etkilendiğinden, tümör eksozom içeriğinin

tümör oluşumunu artırabilen moleküllerde zenginleştirilmemesine dikkat edilmelidir (Mangino ve ark, 2019).

Diyabet, kanser ve kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar gibi patolojik durumlarda terapötik eksozomların uygulamaları, bazıları faz I'de ve bazıları faz II klinik denemelerde araştırılmaktadır. HPV tümörleri kendileri için, sınırlı lokalizasyonları nedeniyle hedeflenebilir lezyonları temsil eder ve kendilerini aktif veya pasif olabilen bir eksozom bazlı immünoterapötik yaklaşımın saldırısına yol açar (Mangino ve ark, 2019).

İmmünoterapide eksozomları kullanan ilk çalışmalar, 20 yıl önce yapılmıştır ve MHC-sınırlı T-hücre yanıtlarını indüklemek için B-hücresi kaynaklı eksozomları kullanmıştır (Raposo ve ark, 1996). Bir sonraki çalışmalarda, eksozomlar, melanom, glioma, hepatoselüler karsinom ve böbrek hücreli karsinom gibi birçok kanser için tümör aşılari olarak önerilmiştir (Zitvogel ve ark, 1998; Chaput ve ark, 2004; Zhang ve ark, 2010; Bu ve ark 2011; Mahaweni ve ark 2013, Rao ve ark 2016).

Son zamanlarda serviks kanser hücresi olan HeLa hücrelerinden türetilen eksozomlarla taşınan dendritik hücreleri kullanan rahim ağzı kanseri immünoterapisi önerilmiştir. Rahim ağzı kanseri hastalarından monosit kaynaklı dendritik hücreler, in vitro DC' lere olgunlaştırılmış ve HeLa hücreleri kültür ortamından uygun bir protokolle saflaştırılmış eksozomlarla atılmıştır. DC den salınan eksozomlarla serviks kanserinin tedavi edilebileceği öne sürülmüştür (Ren ve ark, 2018). Fare hayvan modelinde, rahim ağzı kanseri immünoterapisinde faydalı HP' ye özgü sitotoksik aktivite, eksozomlar kullanılarak da gösterilmiştir (Chen ve ark, 2018).

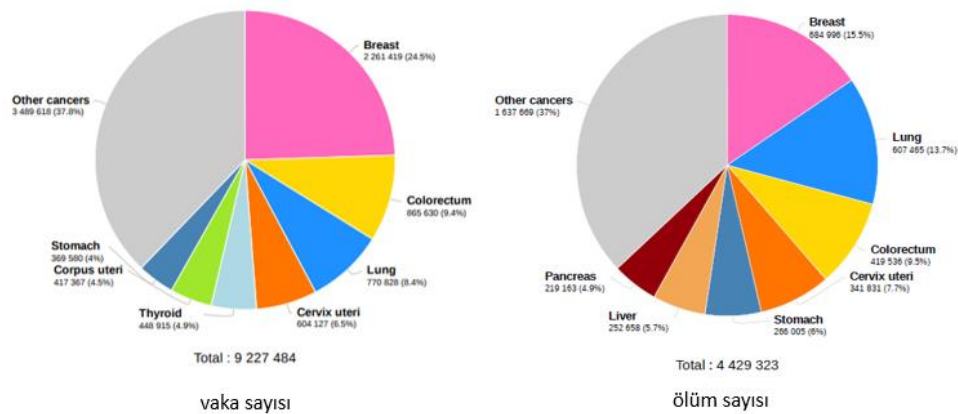
Bu tez çalışmasında HELA hücrelerinden elde edilen eksozomlara yüklenen kemoterapik ajanın anti-kanser potansiyeli araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

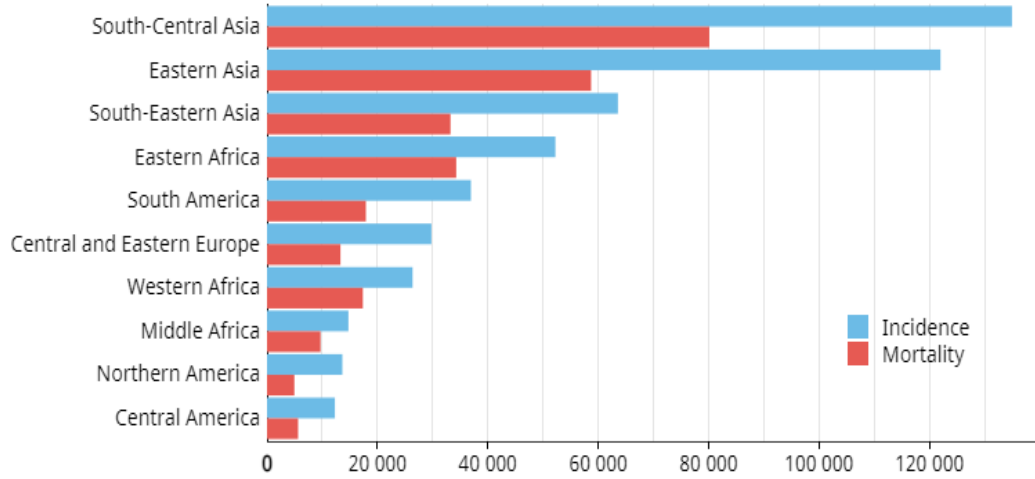
2.1. Serviks Kanseri

Rahim ağzı kanseri olarak da bilinen serviks kanseri, dünya çapında 2020 yılında tahmini 770.000 vaka ve 341.000 ölümlle, kadınlarda en sık teşhis edilen dördüncü kanser ve kanser ölümünün dördüncü önde gelen nedeni olarak sıralanmaktadır (Şekil 1). Dünya çapında rahim ağzı kanseri ölümlerinin yaklaşık % 85' i az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmektedir. Ölüm oranı düşük gelirli ve orta gelirli ülkelerde daha zengin ülkelere göre 18 kat daha fazladır. Az gelişmiş bölgelerde yaşayan kadınlar arasında ikinci en yaygın kanserdir. En yüksek bölgesel insidans ve ölüm oranları Güney-Orta Asya' da (Hindistan), Doğu Asya' da (Çin ve Japonya), Güneydoğu Asya' da (Endonezya), Güney Afrika' da ve Doğu Afrika' da (Tanzanya, Etiyopya) görülmektedir, Göreceli olarak, oranlar Kuzey ve Batı Amerika, Avrupa ve Batı Asya' da (Suudi Arabistan ve Irak) 7-10 kat daha düşüktür (Şekil 2) (WHO, GLOBOCAN 2020).

Birçok çalışma, düşük ekonomik durum, kötü kişisel ve cinsel hijyen, sigara içme, erken yaşta cinsel aktivite ve birden fazla cinsel partnere sahip olmanın rahim ağzı kanseri gelişimi için risk faktörlerinden bazıları olduğunu bildirmiştir. Ancak birincil risk faktörü HPV enfeksiyonudur (Small ve ark, 2017)



Şekil 1. 2020 yılına ait, kadınlar arasında en sık görülen kanserler için insidans ve ölüm oranlarının dağılımı (Dünya Sağlık Örgütü, Globocan 2020).



Şekil 2. 2020 yılına ait, serviks kanseri için bölgelere özel tahmini vaka ve ölüm oranlarının grafiği (Bray ve ark, 2018).

2.2. Hastalığın Patogenezi

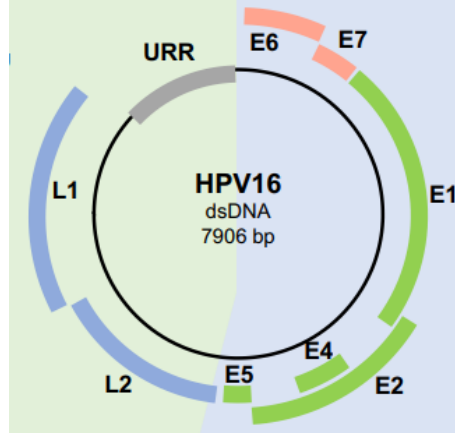
Kadın üreme sisteminin bir parçası olan serviks, rahimin alt kısmıdır; silindirik şeklindedir ve vajinaya endoservikal kanaldan bağlanır. Serviks iki tip epitel hücresi ile kaplıdır. Bunlar ektoerviksi kaplayan tabakalı skuamöz epitel ve endoserviksi kaplayan sütunlu epitel hücreleridir. Bu hücreler arasındaki geçiş bölgesine squamocolumnar kavşağı denir. Ektoervikste ortaya çıkan tümörler sıklıkla invaziv servikal karsinom vakalarının yaklaşık % 75' ini oluşturan skuamöz hücreli karsinomlardır. Servikal epitelyumdaki skuamöz hücrelerin premalign değişiklikleri, servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) olarak bilinir. CIN erken evrede tedavi edilmezse veya HPV, konakçı hücresel fonksiyonları deaktive edebiliyorsa in situ ve invaziv karsinoma ilerleyebilir (Small ve ark, 2017).

Epitel hücreleri normal bir servikte iyi organize edilir. Bununla birlikte, CIN ve kanserde, HPV ile enfekte olan hücreler displastik hale gelir. Displazi, bir dokuyu oluşturan hücrelerde kanser öncüsü olabilen anormal hücrelerin varlığıyla tanımlanır. Histolojik olarak CIN' ler şiddet derecesine göre üç sınıfa ayrılır: CIN 1 hafif displazi, CIN 2 orta displazi ve CIN 3 şiddetli displazi olarak tanımlanır. CIN 1 lezyonları düşük dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar olarak sınıflandırılır ve epitelyumun alt üçte birinin displazi gösterdiği hafif displazi anlamına gelir. İstatistiksel verilere göre, CIN 1 lezyonlarının % 70-80' inden

fazlası tedavi olmadan kendiliğinden geriler veya saptanamaz hale gelir. Bu nedenle, CIN 1 hastalık gelişimindeki bir aşamadan ziyade bir enfeksiyon durumunu yansıtır. HPV enfeksiyonundan sonra CIN 1' in saptanması hastalık ilerlemesini temsil etmez. Epitelin üçte ikisi etkilendiğinde orta derecede displazi (CIN 2), epitelin tam kalınlığının üçte ikisinden fazlası etkilendiğinde şiddetli displazi (CIN 3) olarak adlandırılır. CIN 2 ve CIN 3 lezyonları yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyonlar olarak sınıflandırılır. Gerilemeyen CIN 1 lezyonları, enfeksiyonu takip eden 2-3 yıl içinde CIN 2/3 şeklinde gelişebilir. CIN 2 lezyonlarının yaklaşık % 2' sinin CIN 3' e geliştiği tahmin edilmektedir. CIN 3, 12 ay içinde invaziv kansere % 0,2 ila % 4 oranında ilerleme potansiyeli olan gerçek bir öncül olarak kabul edilir. Tedavi edilmemiş CIN 3, 30 yıllık bir süre içinde % 30 invaziv kanser olma olasılığına sahiptir, ancak uygun şekilde tedavi edilmiş CIN 3' ün sadece % 1' i invaziv olacaktır. HPV enfeksiyonundan serviks kanseri gelişimine kadar geçen süre tipik olarak 20 yıldır; bu nedenle serviks kanserlerinde hızlı ilerleme nadiren görülür (Holowaty ve ark, 1999; Chan ve ark, 2019).

2.3. İnsan Papilloma Virüsü (HPV)

HPV, 8000 baz çifti büyüklüğünde, küçük genomlu, zarfsız, çift sarmallı DNA virüsleridir. Bu küçük DNA molekülünün moleküler biyolojisi karmaşıktır. Şekil 3' te gösterildiği gibi viral replikasyona ve hücrenin transformasyonuna katılan 4000 baz çiftinde (bp) kodlanmış altı erken protein, üç düzenleyici protein (E1, E2 ve E4) ve üç onkoprotein (E5, E6 ve E7) vardır. DNA molekülünün bir başka 3000 bp bölgesi, virüsün kapsidini oluşturan iki yapısal protein L1 ve L2' yi kodlar. Viral DNA replikasyonu ve transkripsiyonel düzenleyici elemanlar, 1000 bp' lik bir bölgede kodlanan uzun bir kontrol bölgesi (LCR) tarafından kontrol edilir (Chan ve ark, 2019).



Şekil 3. HPV 16 yapısı ve viral proteinler (Sanjose ve ark, 2018).

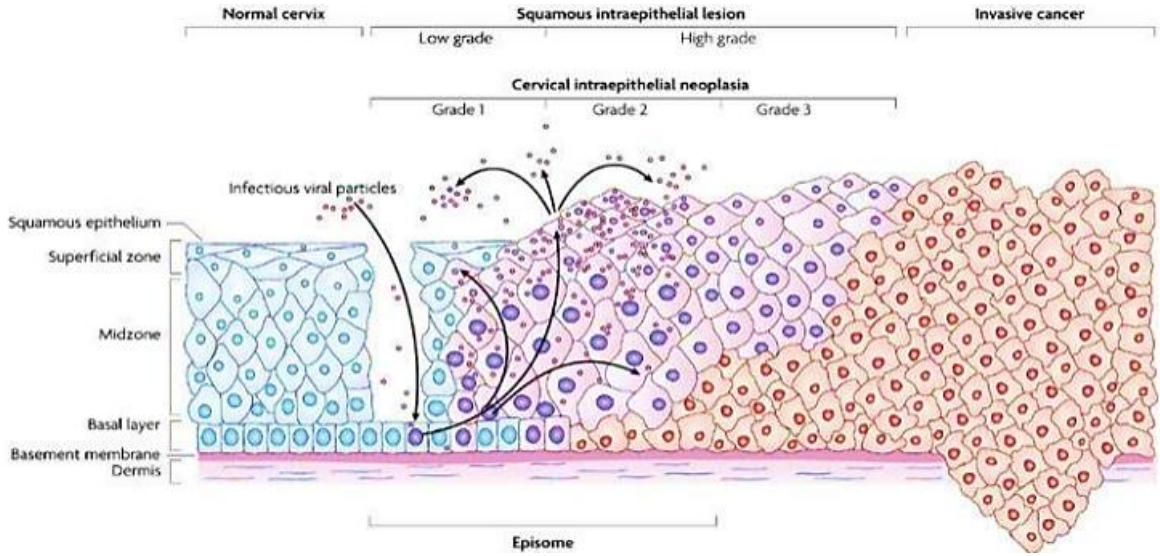
Bugüne kadar 200’ den fazla HPV genotipi tanımlanmıştır. Yüksek riskli HPV’ ler mukozal enfeksiyon ile, düşük riskli HPV’ ler kutanöz lezyonlarla ilişkilidir. HPV 6, 11, 42, 43 ve 44 gibi düşük riskli HPV tipleri, sıklıkla siğiller oluşturan ancak nadiren malign tümörlerde bulunan iyi huylu lezyonlarla ilişkilidir. HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ve 70 gibi yüksek riskli HPV’ ler, rahim ağzı kanseri lezyonları ile ilişkilidir. (De Villiers ve ark, 2004). Bunlardan HPV6 veya HPV11 düşük riskli tipler genellikle genital siğiller gibi iyi huylu hastalıklara neden olurken, HPV16 ve HPV18’ in alt tipleri, yüksek dereceli displazi ve kanserle yakından ilişkili bulunmuştur. Karsinogenez durumunda, HPV 16 veya HPV 18’ in sürekli enfeksiyonu nedeniyle servikal kanserlerin % 70’ i ve CIN 3 lezyonlarının % 50’ si gelişir. HPV genomu, yalnızca sekiz proteini kodlamaktadır. Her biri HPV yaşam döngüsünde ve konakçı hücrelerin kanserli hücrelere dönüşümünde önemli bir rol oynamaktadır. Tablo 1’ de HPV viral proteinlerinin enfeksiyonun başlangıcında ve daha sonra kansere ilerlemesinde ana işlevleri listelenmektedir (Sanjose ve ark, 2018).

Tablo 1. HPV viral proteinlerinin listesi ve temel fonksiyonları

Viral Protein	Proteinin Fonksiyonları
E1	Viral DNA replikasyonu ve transkripsiyonu
E2	V6 DNA replikasyonu, apoptoz, E6/E7 transkripsiyon baskılayıcı
E4	Viral DNA replikasyonu
E5	Bağıışıklık tanıma (büyük histo uyumluluk kompleksi, MHC)
E6	p53 bozulması, hücre döngüsü regülasyonunda değişiklik, apoptoz direnci
E7	Retinoblastom bozulması, S faz hücre döngüsüne yeniden giriş, p16 aşırı ekspresyonu
L1	Büyük viral kapsid proteini
L2	Küçük viral kapsid proteini

2.4. HPV Aracılı Karsinogenez

Karsinogenez, normal hücrelerin anormal hale geldiği ve kanser hücrelerine dönüştüğü bir süreçtir. HPV ile enfekte epitel hücrelerinin invaziv kansere ilerlemesi, konakçı hücre genlerinde DNA değişikliklerinin birikmesiyle ilişkili uzun vadeli bir süreçtir. Bu değişiklikler onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde hem epigenetik hem de genetik değişiklikleri içerir. HPV, konakçı bazal yassı hücrelere mikro yara veya aşınma yoluyla girer (Şekil 4). Virüs, bazal epitel hücreleri içinde doğrudan viral replikasyonu sağlayan bir dizi genetik olayın meydana geldiği enfeksiyonu başlatmak için konakçı hücreye entegre olabilmelidir. Viral DNA entegrasyonu konak DNA sentez makinelerinin çalışmasına yol açar. Bu noktada, virüs bazal epitel hücrelerinde sürekli replikasyonunu sağlamak için konakçı bağıışıklık sisteminden kaçınmalıdır. Sonuç olarak virüs, hücre çoğalmasını teşvik ederken, hücresel apoptotik mekanizmaları inhibe eder ve bağıışıklık savunma mekanizmalarından kaçabilir (Balasubramaniam ve ark, 2019).



Şekil 4. Normal, premalign lezyonlarda (sırasıyla hafif, orta ve şiddetli displazi; sırasıyla CIN 1, CIN 2 ve CIN 3) ve serviks kanserinde normal ve HPV ile enfekte olmuş skuamöz epitel hücrelerinin dağılımı. Karsinogenezin ilk aşaması, epitelyal bariyeri tehlikeye atan mikrotravmalar yoluyla bazal tabakanın enfeksiyonu ile başlar. Daha sonra virüs, genomunu çekirdek zarf kopmaları yoluyla çekirdekteki konak genom içine entegre olur. Çekirdeğe girdikten sonra HPV, konakçı genomunun kontrolünü ele geçirir, kendini çoğaltır ve epitelyuma yayılır. Viral genomun daha fazla replikasyonu konakçı hücrelerin normal hücrelere kıyasla düzensiz bir şekilde büyümesine neden olur. Daha sonra virionlar konakçı epitelyumun ölü yassı hücreleri ile atılırlar (Sanjose ve ark, 2018).

HPV onkoproteinlerinden, E6 ve E7, viral onkoproteinler olarak işlev görür ve konakçı hücresel fonksiyonun değiştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. HPV' ler, konakçıdaki tümör baskılayıcı genlerin normal işlevini bozmak için E6 ve E7 onkoproteinlerini aşırı eksprese eder ve viral proteinler konakçı hücrelere zarar vermeye başlar. Konakçı hücreler, DNA hasar tepkisi yoluyla DNA' larına verilen hasarı onarmak için özel bir mekanizma geliştirdiler. Hasar gören DNA onarıldıktan sonra hücre döngüsü kontrol noktaları hafifletilebilir ve hücrelerin bölünmeye devam etmesine izin verilir. Belirli koşullar altında, hücreler DNA hasarını onaramazsa, apoptoz gerçekleşir. Bununla birlikte, HPV ile ilişkili kanserde, E6/E7 viral proteinleri, hem sikline bağlı kinaz (CDK) inhibitörlerini (p21, p27, p16) inhibe ederek hem de p53 ve retinoblastomu (pRb) azaltarak hücre döngüsü kontrol noktası kontrolünü bozar. E6, p53 tümör baskılayıcı proteinini, hücresel ubiquitin ligazı E6AP ile bağlayarak, P53' ün E6 onkoprotein kaynaklı apoptoz ile bozunmasını sağlar ve dolayısıyla

hücre çoğalmasına yol açar. E7, tümör baskılayıcıların retinoblastom (Rb) ailesine ve ayrıca hücre döngüsü regülasyonunda yer alan diğer proteinlere bağlanır. Böylece, pRb' nin E7 onkoproteini tarafından bozunması, hücre döngüsünün S fazına programlanmamış girişe neden olur ve bu da hücrelerin çoğalmasını teşvik eder. HPV ile enfekte bazal hücreler bölündükçe, viral genomlar, biri bazal tabakadan ayrılan, stratum granulosum'a doğru göç eden ve farklılaşan hücrelerine bölünür. Normal enfekte olmamış epitelde, hücreler bazal tabakadan ayrılırken hücre döngüsünden çıkarlar ve bu genellikle suprabasal hücrelerde çekirdek kaybına neden olur. Enfekte hücreler bazal tabakayı terk ettikçe, E7 proteininin etkisi nedeniyle hücre döngüsünde aktif kalırlar. Hücreler, S fazını oldukça farklılaşmış hücrelerde tekrar oluşturur ve viral replikasyon için gerekli hücresel replikasyon faktörlerinin ekspresyonunu aktive eder. E7 varlığı, enfekte olmuş tüm epitel tabakaları boyunca çekirdeklerin karakteristik bir şekilde tutulmasına yol açar. Viral onkoproteinlerin hücre ölümsüzleştirilmesi ve hücre döngüsü kapasitesinin farklılaşmada tutulması için gerekli olmasının yanı sıra, farklılaşmamış bazal hücrelerde ekstrasözomal HPV formlarının sürdürülmesi için E6 ve E7' nin de gerekli olduğu gösterilmiştir (Longworth ve Laimins, 2004).

2.5. Rahim Ağzı Kanserinde Güncel Tedaviler

Son yıllara ait istatistik veriler, HPV aşılarının kullanımının, spesifik HPV genotiplerine bağlı enfeksiyon ve hastalığı önlemek için çok etkili olduğunu göstermektedir. Aşı programları dünyanın birçok ülkesinde çok başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ticari olarak üç profilaktik aşı mevcuttur; bunlar Cervarix (HPV16 ve HPV18 'e karşı iki değerlikli bir aşı), Gardasil (HPV6, 11, 16 ve 18'e karşı bir çift değerlikli) ve Gardasil 9 (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45'e karşı 9 değerli aşı) , 52 ve 58). Bunlar, mayada (Gardasil) ve böcek hücrelerinde (Cervarix) HPV' nin L1 majör kapsid proteininin rekombinant ekspresyonunun bir araya getirilmesinden elde edilen viral benzeri partiküller içeren enfeksiyöz olmayan alt birim aşılarıdır (Chan ve ark, 2019). Dünya sağlık örgütü şu anda 9 - 14 yaş aralığındaki kızların HPV' ye karşı aşılanmalarını önermektedir.

Rahim ağzı kanseri tanısı histopatolojik inceleme ile konulmaktadır. Evreleme, tümör büyüklüğü ve hastalığın pelvis içinde ve uzak organlara yayılması temelinde yapılır. Tedavi hastalığın evresine bağlıdır ve seçenekler arasında cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi bulunur (Dünya Sağlık Örgütü, 2020).

Ulusal Kanser Enstitüsü, ileri evre rahim ağzı kanseri tedavisi için radyoterapi gerektiren vakalarda eş zamanlı cisplatin içeren kemoretarapinin radyasyon terapisine dahil edilmesini önermiştir. Bu teknik hızla dünya çapında kabul edilmiş ve cisplatin kullanımı standart haline gelmiştir (Small ve ark, 2017). Servikal kanserden ölüm riski, eşzamanlı kemoradiasyon tedavisi kullanılarak % 30 ile % 50 arasında azaltılmıştır. Beş randomize, faz III çalışması (GOG-85, RTOG-9001, GOG-120, GOG-123 ve SWOG-8797), radyasyon tedavisi ile eş zamanlı olarak verilen sisplatin bazlı tedavi için genel bir sağkalım avantajı göstermiştir (Whitney ve ark, 1999; Peters ve ark, 2000).

Tek ajan olarak cisplatin, sitotoksik ilaçlar arasında en aktif kemoterapik ajan olarak kabul edilir. 1970' lerde üç haftada bir 50 mg/m² intravenöz olarak uygulanan tek ajanlı cisplatin, tekrarlayan servikal kanserini tedavi etmek için en sık kullanılan ilaç olmuştur (Thigpen ve ark, 1989). Daha yakın zamanlarda yapılan çalışmalar cisplatin ile kombine yaklaşımların önemli sağkalım faydası olduğunu göstermektedir. Jinekolojik onkoloji grubu (GOG) faz 3 klinik çalışmalarda ileri ve tekrarlayan rahim ağzı kanserinde paclitaxel, vinorelbine, gemcitabine, topotecan ile cisplatinin ikili kombinasyonlarının toksisitesini ve etkinliğini değerlendirmiştir ([GOG - 0204](#), [NCT00064077](#)) (Monk ve ark, 2009).

Rahim ağzı kanserini tedavi etmenin yeni bir yolu, kritik hücre yollarında yer alan spesifik molekülleri inhibe etmeyi amaçlayan hedeflenmiş ajanları bir veya daha fazla geleneksel kemoterapötik ilaç ile birlikte kullanmaktır. Bu konuda yapılan bir çalışmada ilk kez, ilerlemiş vakalarda akıllı ilaç-kemoterapi kombinasyonunun tek başına kemoterapi uygulamasına göre yaşamı uzattığı saptanmıştır. 2014 yılında rahim ağzı kanserinde FDA tarafından onaylanan ilk hedef ilaç, dolaşımdaki vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) karşı yönlendirilen rekombinant insanlaştırılmış bir monoklonal antikör olan bevacizumab olmuştur (Barra ve ark, 2017). Roche ve Genentech firmaları tarafından geliştirilen “Bevacizumab” adlı ilacın amacı tümörün büyümesi için gerekli olan kan damarları oluşum sinyalini bloke etmektir. Kemoterapi tedavisi ile birlikte kullanıldığında damar içi dokusu üreme faktörünü engellediği onaylanmıştır. Amerika ve Avrupa’da Avastin, ülkemizde Altuzan adıyla piyasaya sürülen ilacın, ilerlemiş rahim ağzı kanseri hastalarının ömrünü 4 ay daha uzattığı, klinik çalışmalar ile saptanmıştır (Tewari ve ark, 2014). ([GOG-0240](#), [NCT00803062](#))

GOG 240 sonuçlarını takiben, ek çalışmalar metastatik, tekrarlayan veya kalıcı serviks kanseri hastalarında diğer tedavilerle birlikte Bevacizumab' ı araştırmıştır. CECILIA yapmış olduğu faz 2 çalışmalarında, karboplatin ve paclitaxel ile birlikte kullanıldığında bevacizumab'ın etkinliğini değerlendirmiştir. ([NCT02467907](#)). Halen değerlendirilmekte olan bevacizumab harici diğer anti-anjiyojenik terapiler arasında, eşzamanlı kemoradiasyon tedavisi

ile kombinasyon halinde nimotuzumab, karboplatin ve paclitaxel ile nintedanib ve platin çiftli apatinib bulunmaktadır ([NCT02009579](#), [NCT03469531](#)). Klinik çalışmalardan alınan anti-anjiyojenik tedavi ile ilgili ek özet bilgiler Tablo 2’ de verilmiştir. (Cohen ve ark, 2020).

Tablo 2. Rahim ağzı kanseri tedavisinde araştırılan anti-anjiyojenik terapötik ajanların özeti

İlaç	Ek terapiler	Etki mekanizması	Çalışma	Potansiyel toksisiteler
Bevacizumab	Cisplatin/Paclitaxel Topotecan/Paclitaxel Carboplatin/Paclitaxel	Anti-VEGF-A	GOG 240	Hipertansiyon, tromboz, nefrotik sendrom, döküntü, baş ağrısı, bağırsak delinmesi
Pazopanib	Tekli terapi	Anti-VEGFR-1,2,3	CECILIA	
Lapatinib	Tekli terapi	Anti-EGFR Anti-Her2/neu	Monk ve ark.(2010)	
Neratinib	Tekli terapi	Anti-Her2/neu	SUMMIT NCT01953926	
Cediranib	Carboplatin/Paclitaxel	Anti-VEGFR1,2,3	CIRCCa	
Cetuximab	Cisplatin	Anti-EGFR	NCIC CTG-184	
Sunitinib	Tekli terapi	Anti-VEGFR1,2,3	NCT03413579	
Nimotuzumab	Cisplatin/Vinorelbine eş zamanlı kemoradyasyon	Anti-EGFR	NCT03469531 NCT03413579	
Nintedanib	Carboplatin/paclitaxel	Anti-VEGFR, FGFR, PDGFR	NCT02009579	

Poli ADP-riboz polimeraz (PARP), tek iplikçikli DNA kopmalarının onarımında rol oynayan hücre içi bir proteindir. Bu enzim, tümör hücreleri tarafından, malignitenin ayırt edici özelliği olan yüksek mutasyon yükünün belirlenmesinde DNA replikasyonundaki hataları onarmak için kullanılır. PARP inhibitörleri, tümör hücrelerinde DNA onarım mekanizmasını bloke etmeyi amaçlayan bir anti-kanser ilaç sınıfıdır ve özellikle homolog rekombinasyon eksikliği olarak bilinen DNA onarım yollarında zaten mevcut olan doğal hataları olan hastalarda etkilidir. Bu ilaçlar, özellikle yumurtalık kanserinde jinekolojik maligniteler dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde araştırılmıştır. Serviks kanser hücrelerinde PARP, tedavi için potansiyel bir hedefi temsil eden normal hücrelere kıyasla daha yüksek seviyelerde bulunur (Cohen ve ark, 2020).

GOG/NRG Onkolojisinden yapılan iki çalışma ileri evre serviks kanserinde PARP inhibitörü kullanımını değerlendirmiştir. Faz I çalışmasında veliparib, ileri, kalıcı veya tekrarlayan servikal kanseri olan hastaların tedavisinde paklitaksel ve sisplatin ile birleştirildi. Deneme kaydı sırasında ölçülebilir hastalığı olan hastaların % 34' ünde objektif yanıtlar elde edilmiştir. Sonuçlar araştırmacıların, kalıcı ve tekrarlayan servikal kanserde cisplatin ve paklitaksel ile birlikte veliparibin güvenli ve uygulanabilir olduğu sonucuna varmasına neden olmuştur (Thaker ve ark, 2017).

Son yıllarda, bağışıklık sisteminin, kanser ilerlemesinin tanınması ve kontrolündeki rolünü anlamaya odaklanılmaktadır. Bağışıklık kontrol noktası reseptörleri yoluyla iç sinyalleme, anti-tümör bağışıklığının baskılanmasına yol açar ve tümör ilerlemesine katkıda bulunur. Bu sinyaller inhibe edilebilir, bu da tümör tanınmasının artmasına, daha sonra tümör büyümesinin daha iyi kontrol edilmesine ve hatta azaltılmasına yol açar. İmmünsüpresyon sinyalini bloke etmek için iki farklı yol açıkça monoklonal antikor tedavisi ile hedeflenir. Anti-programlanmış hücre ölümü (PD-1) ve anti-sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4), serviks kanseri de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde incelenen iki hedeftir (Cohen ve ark, 2020).

Keynote 158, PD-1 ile etkileşime giren, ligandları ve sonuçta T hücresi tükenmesi ile etkileşimi önleyen insanlaştırılmış bir monoklonal antikor olan pembrolizumabın güvenliğini ve etkinliğini değerlendiren Faz II klinik çalışmasıdır ([NCT02628067](#)). Pembrolizumab monoterapisinde ilerlemiş serviks kanseri olan hastalarda dayanıklı antitümör aktivitesi ve yönetilebilir güvenlik gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına dayanarak, ABD Gıda ve İlaç İdaresi, kemoterapi sırasında veya sonrasında ilerlemiş olan ilerlemiş PD-L1 pozitif serviks kanseri olan hastalar için pembrolizumabın hızlandırılmış onayını vermiştir (Chung ve ark, 2019) . Hem PD-1 inhibitörleri (pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab) hem de PD-L1

inhibitörleri (atezolizumab, avelumab, durvalumab) diğer servikal kanser çalışmalarında değerlendirilmektedir.

Yapılan tüm serviks kanseri tedavilerinin farklı toksisite profilleri vardır. Örneğin, bevacizumab tedavisi alan hastalarda, almayanlara göre daha yüksek oranda gastrointestinal fistüller, tromboembolik olaylar, hipertansiyon, gastrointestinal ve genitoüriner kanamalar gözlenmiştir. Kemoterapiyle beraber bevacizumab alan dört hastada ölümcül yan etkiler bildirilmiştir (Tewari ve ark, 2014). Toksikiteye ek olarak, ilaç direnci de kanser tedavisinde bir engel olarak kalmaktadır. Tüm bu sonuçlar yeni, daha etkili ve daha az toksik yaklaşımlarla, serviks kanseri için erken tanı yöntemleri ve tedavi stratejilerinin uygulanmasının aciliyetini vurgulamaktadır. Eksozomlar, serviks kanserinin tedavisinde ve ilaç direncinde önemli bir rol oynayabilirler. Hedefe yönelik tedavilerin keşfinde, hücreler arasındaki bilgilendirici taşıyıcılar olarak eksozomların kullanılması gelecek çalışmalarda ümit vaat etmektedir. Ayrıca, serviks kanserinde tanı ve yeni terapötik stratejiler için umut verici bir biyobelirteçlerdir.

2.6. Hücre Dışı Veziküller

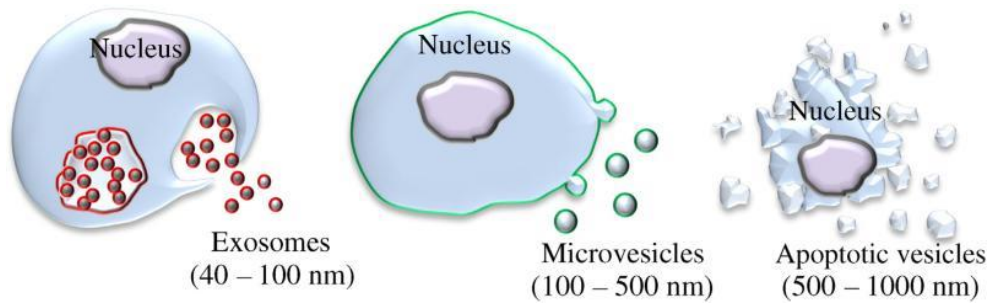
Vücudumuzun hemen hemen tüm hücreleri, hücre dışına, hücre dışı veziküller (EV' ler) olarak adlandırılan, çeşitli tipte nanometre boyutunda, membrandan türetilmiş, çift katlı lipid tabakalı veziküller salmaktadır. EV' ler tükürük, amniyotik sıvı, anne sütü, meni, burun salgısı, beyin omurilik sıvısı, lenf, gözyaşı, idrar, kan plazması veya serum dahil olmak üzere çeşitli biyolojik sıvılarda tespit edilmiştir (Dilsiz 2020). EV' ler, genellikle onları serbest bırakan hücrelerin adını taşır. Örneğin, kardiyomyositlerden salınan veziküllere kardiyomomlar, prostat epitel hücrelerinden alınan veziküllere prostatozomlar ve tümör hücrelerinden salınan veziküllere onkozomlar denir (Kang ve ark, 2017). EV' ler hücreler arası iletişime sinyal organelleri olarak aracılık ederler. Hücre-hücre iletişimi, dokular arası iletişim ve homeostazinin sağlanması için önemli araçlardır. (Antimisiaris ve ark, 2018).

EV' lerin varlığı 70 yıldan fazla süredir bilinmektedir. EV' lerin hücre sinyallemedeki rolü, yapıları, biyogenezleri ve fonksiyonları ile ilgili bilgilerin çoğu 1980' lere kadar anlaşılamamıştır. 1987' de Johnstone ve arkadaşları sıçan retikülositlerinde yaptığı çalışmada, EV' lerin biyogenezini tanımlamış ve bunlara "eksozom" adını vermiştir. Kesin biyogenez yolu ve ayrıntılı yapıları 1990' ların sonlarına kadar belirsiz kalmıştır. Başlarda EV' lerin hücre içi rolünün atık ve sitotoksik maddelerin hücreden çıkarılması olduğu düşünülmekteydi. Valadi ve

ark (2007) çalışmalarında ekzozom lümeninde nükleik asitlerin varlığını bildirdiğinde, EV'lerin biyoaktif molekülleri de taşıyabileceği ve alıcı hücelere verebileceğini, böylece alıcı hücrelerin fizyolojik durumunu bozabileceği anlaşılmıştır. James Rothman, Randy Schekman ve Thomas Sudhof vezikül çalışmasına katkıları ve hücre fizyolojide EV'lerin rolünü göstermeleri nedeniyle 2013 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülüne layık görülmüştür. Bu keşifler, ekzosomları çöp taşıyıcı konumundan yeni bir hücre içi iletişim aracı konumuna geçirmiş ve çeşitli alanlarda çalışan araştırmacıların EV'lere olan ilgisini arttırmıştır (Srivastava ve ark, 2020).

Salgılanan EV'lerin taşıdıkları hücre kaynakları ve hücre kaynaklarının patofizyolojik durumlarını yansıtan protein ve nükleik asitler, hastalığın teşhisi ve seyri hakkında bilgi vermek için biyobelirteç olarak kullanılabilir. EV'ler tümör oluşumu, metastaz, inflamasyon ve bağışıklık sisteminin aktivasyonu gibi çeşitli patolojilere katkıda bulunmaktadır (Antimisiaris ve ark, 2018). Bu veziküller, hastalıklar, terapötik ajanlar veya ilaç verme araçları için biyobelirteç kaynakları olma potansiyeli nedeniyle biyomedikal araştırma topluluğundan büyük ilgi görmektedir (Lai ve ark, 2013).

Membrandan türetilen EV'ler, hücre kökenlerine, boyutlarına, salım şekillerine, içeriklerine ve fonksiyonlarına bağlı olarak üç farklı sınıfa ayrılır. Bunlar; ekzosomlar (~40-100 nm), mikroveziküller (~100-500 nm) ve apoptotik cisimler (~500-1000 nm) olarak adlandırılır. (Şekil 5).



Şekil 5. Hücre dışı veziküllerin şematik gösterimi (Batrakova ve Kim, 2015).

2.6.1. Apoptotik Cisimler (ApoBD)

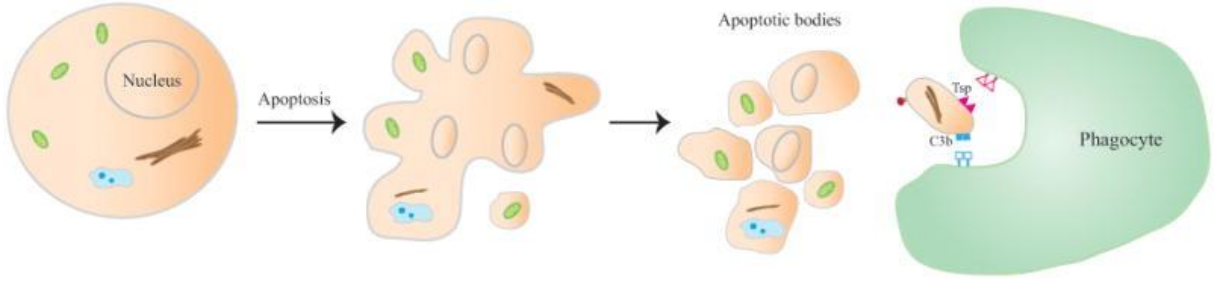
Birçok farklı hücre tipi, fizyolojik olarak programlanmış bir hücre ölümü olan apoptoza uğrar. Apoptoz, normal hücre döngüsünde, bağışıklık sisteminin uygun gelişimi ve işleyişinde,

hormona bağılı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümünde meydana gelen aktif bir süreçtir. Gelişim ve yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynar ve dokularda düzenli hücre popülasyonlarını sürdürmek için homeostatik bir mekanizmayı temsil eder (Atkin-Smith ve Poon, 2017).

Apoptoza giren hücreler, muhtemelen toksik veya immünojenik hücrel içeriklerin hücre dışı matrise sızmasını önlemek için, hücrel içeriklerini apoptotik cisimlere ayırırlar. Apoptotik cisimler, 50-5000 nm arasında değişen boyutlara, 1.16-1.28 g/ml yoğunluğuna sahip, heterojen bir vezikül grubudur. Mikronükleuslar, kromatin kalıntıları, sitosol kısımları, bozulmuş proteinler, DNA fragmanları, bozulmamış organeller gibi çeşitli hücrel bileşenler ve makrofajlar tarafından hızla yok edilmelerini sağlayan sinyal moleküllerini içerirler. Ayrıca, daha büyük boyutlu ApoBD' lerde proteinler, lipitler, RNA ve DNA molekülleri bulunur. Spesifik hücrel içerikleri ve yüksek yoğunlukları nedeniyle, diğer iki vezikül grubundan kolaylıkla ayırt edilebilirler. Eksozomlar ve mikroveziküller normal hücrel süreçler sırasında salınırken, apoptotik cisimler sadece programlanmış hücre ölümü sırasında oluşur ve salınır (Şekil 6) (Kooijmans ve ark, 2012).

Hücre dışı alanda bırakıldıktan sonra, ApoBD' ler makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagositozlanır ve fagolizozomlar içinde bozunur. Apoptotik hücreleri saran ve sindiren makrofajlara "tingible vücut makrofajları" denir. Tingible cisimler, apoptotik hücrelerden salınan nükleer kalıntıların parçalarıdır (Battistelli ve Falcieri, 2020).

ApoBD' lerin fagositoz yoluyla makrofajlarla temizlenmesi, fagositler üzerindeki tanıma reseptörleri ve apoptotik hücre zarının bileşimindeki spesifik değişikliklerle olur. Bu değişikliklerden ilki, fosfatidilserinin (PS) lipit tabakasının dış kısmına translokasyonunu içerir. Normalde membranının iç tabakasında yer alan PS, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış tabakasına göç eder. Translokasyon yapan bu PS' ler fagositler tarafından tanınan Annexin V' ye bağlanır. Bir başka membran değişikliği trombospondin veya tamamlayıcı protein C3b' nin bağlanması için alanlar oluşturan yüzey moleküllerinin oksidasyonudur. Trombospondin ve C3b, fagosit reseptörleri tarafından tanınmayı sağlar. Annexin V, trombospondin ve C3b, apoptotik cisimlerin biyobelirteçleri olarak kabul görmektedir (Akers ve ark, 2013).



Şekil 6. Apoptoz sırasında apoptotik cisimlerin oluşumu. Apoptoz ile ölmekte olan bir hücrenin ilk olarak kromatini yoğunlaşmaya başlar. Ardından hücrenin boyutları küçülür, hücresel içerik apoptotik cisimler olarak adlandırılan membran veziküllerine parçalanır. ApoBD'lerin fagositoz yoluyla makrofajlarla temizlenmesine fagositler üzerindeki tanıma reseptörleri ve apoptotik hücre zarının bileşimindeki spesifik değişiklikler aracılık eder. (Akers ve ark, 2013).

2.6.2. Mikroveziküller (MV)

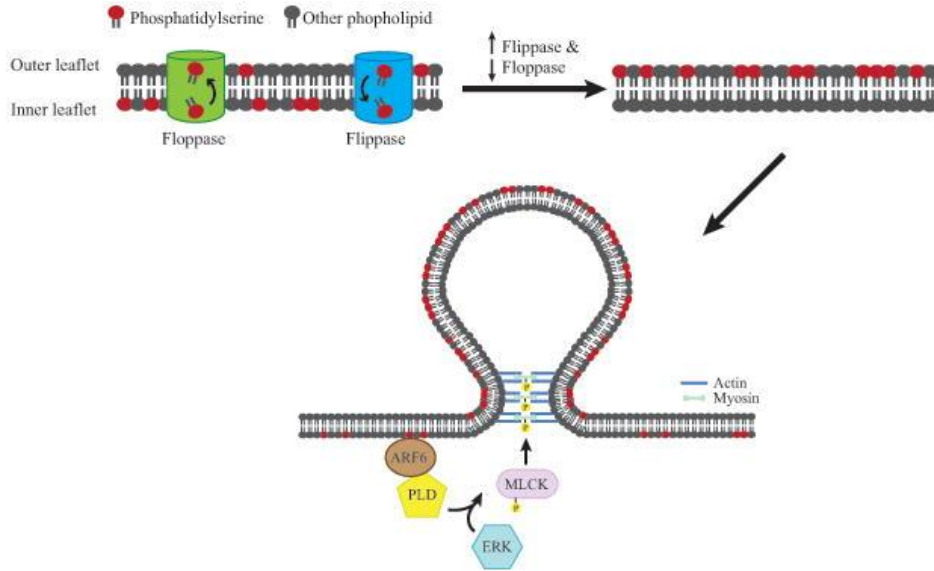
Mikroveziküller olarak bilinen diğer EV tipleri ektozomlar, dökülme vezikülleri, mikropartiküller, plazma membranından türetilen veziküller veya eksoziküller olarak da adlandırılırlar. MV'ler, 50-1000 nm arasında değişen boyuttadırlar. Belirli proteinleri ve lipitleri taşırlar ve daha sonra yüklerini belirlenmiş alıcı hüresine teslim ederler (Ha ve ark, 2016).

MV'ler plazma membranlarından füzyon yoluyla oluşurlar. MV'lerin oluşumu fosfolipidlerin yeniden dağılımı ve hücre iskeletindeki protein kasılması arasındaki dinamik etkileşimin sonucudur. Plazma membranı içindeki protein ve fosfolipid dağılımı homojen olmaktan uzaktır ve asimetrik dağılım gösterir. Membran asimetrisi, plazma zarının bir tabakasından diğerine fosfolipidleri aktaran aminofosfolipid translokaz enzimleri tarafından düzenlenir. Flippazlar, fosfolipidleri dış tabakadan iç tabakaya, floppazlar ise iç tabakadan dış tabakaya aktaran translokazlardır. Membran tomurcuklanması/vezikül oluşumu, aminofosfolipid translokazların aktivitesi yoluyla fosfatidilserinin dış zar tabakasına translokasyonu ile indüklenir. Tomurcuklanma işlemi aktin-miyozin etkileşimleri ile hücre iskelet yapılarının kasılması ile tamamlanır (Akers ve ark, 2013).

Vezikül oluşumu için gerekli uyaranlar ve yoğunluk, hücre tipleri arasında değişebilir (Kooijmans ve ark, 2012). Artan hücre içi Ca^{2+} seviyeleri mikroveziküllerin sekresyonunun

artmasına neden olmaktadır. Örneğin eritrositler, uygun bir iyonofor ile kombinasyon halinde yüksek seviyelerde hücre dışı Ca^{2+} ile uyarılabilir (Bucki ve ark, 1998).

Bir melanom modelinde, GTP-bağlayıcı protein ADP-ribosilasyon faktörü 6' nın (ARF6) aşırı ekspresyonu, mikrovezikül salgısının artmasına neden olur. MV tomurcuklanmasını etkinleştirmek için, ARF6, hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazı (ERK) plazma membranına alan fosfolipaz D' nin (PLD) aktivasyonu ile başlayan bir sinyalleme kaskatı başlatır. ERK, miyozin hafif zincir kinazını (MLCK) fosforile ederek aktive eder. Miyozin hafif zincirinin MLCK tarafından fosforilasyonu ve aktivasyonu, mikroveziküllerin salınmasını tetikler (Muralidharan-Chari ve ark, 2009) (Şekil 7). Bu sinyalleşme kaskadı, ekzomların salgılanmasını değiştirmez. Bu da, mikroveziküllerin ve ekzomların biyogenezinin farklı olduğunu desteklemektedir.



Şekil 7. MV' lerin oluşumu ve salınım mekanizması. MV' lerin dışa doğru tomurcuklanması, aminofosfolipid translokazların aktivitesi yoluyla PS' lerin dış zar tabakasına translokasyonu ile başlar. Aktifleştirilmiş ARF6, fosfolipaz D' nin aktivasyonu ile başlayan, MLCK' nın fosforilasyonunda ve aktivasyonunda sona eren, sinyalleme kaskatı başlatır. Böylece MV salınımı gerçekleşir (Akers ve ark, 2013).

2.6.3. Eksozomlar

Eksozomlar, 1.13-1.21 g / ml yoğunluğa, 30-120 nm çapında değişen boyutlara sahip, çift fosfolipid tabakayla çevrili küçük membran vezikülleridir (Wang ve Xie, 2017). EV' lerin bilinen en küçük alt gruplarını oluştururlar. Hücre büyümesi, hücre hasarı, inflamasyon, hipoksi, oksidatif stres ve karsinogenez ile fizyolojik koşulların değişmesi eksozomların salgılanmasını tetikler (Lim ve Kim, 2019). Eksozomlar, B hücresi, T hücresi, makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri, epitel hücreler, trombositler, retikülositler, tümör hücresi gibi çoğu hücre tipinde multiveziküler endozomlardan salgılanırlar (Denzer ve ark, 2000). İn vivo olarak saptanan eksozomların çoğu (yaklaşık % 80) trombositlerden türetilir (Antimisiaris ve ark, 2018).

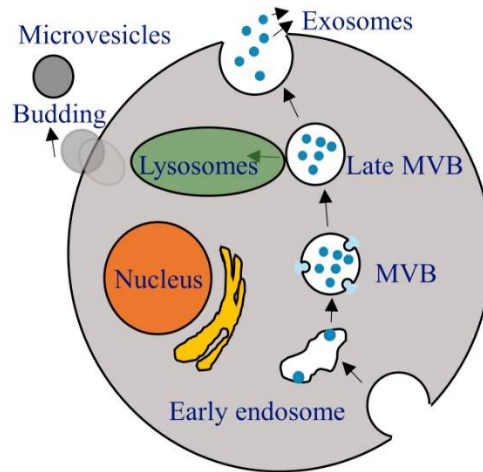
Eksozomlar plazma, serum, idrar, gözyaşı, tükürük, anne sütü, lenf, safra, beyin omurilik sıvısı, eklem sıvısı gibi birçok vücut sıvısında bulunurlar. Bu vesiküller; protein, lipid, miRNA, mRNA ve DNA gibi önemli molekülleri taşıyarak, hücreler arası haberleşmede ve moleküllerin transferinde aracı olarak görev alırlar (Wang ve Xie, 2017).

Eksozom kelimesi ilk kez 1970 yılında Johnstone ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Olgunlaşan alyuvar hücreleri ile çalışırken, “neredeyse muntazam büyüklükte, zarla çevrili bir yapı ile içi dolu kese” oluşumunu gözlemlemiş ve bu vezikülleri “eksozom” olarak adlandırmışlardır (Ha ve ark, 2016). 1980' lerin sonlarında, terimin kullanımı, multiveziküler cisimlerin (MVB) plazma membranı ile kaynaşmasının ardından alyuvarların farklılaşması sırasında salınan endozomal kökenli küçük vezikülleri tanımlamak için uyarlanmıştır (Guo ve ark, 2017). Raposo ve ark (1996) B hücrelerinden izole edilen eksozomların T hücrelerini uyarma özelliğini bulduğunda, eksozomlar immünolojide önemli bir hedef haline gelmiştir.

Teoride, eksozomlar ve mikroveziküller kökenlerine göre açıkça ayırt edilebilir, ancak pratikte böyle bir ayırım nadiren mümkündür. Bu nedenle, eksozom ve mikroveziküller arasındaki ayırım yoğunluk, boyut, morfoloji, protein ve lipid bileşimi gibi fenotipik özelliklere dayanarak yapılmaktadır. Eksozomlar, tipik olarak MV' lerin içindeki ILV' ler ile karakteristik özelliklere sahiptir. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde, biyolojik sıvılarda küresel yapıdadırlar. Mikroveziküllerden daha homojen boyutlarına ek olarak, daha yoğun oldukları ve 1.13-1.19 g/ml yüksekliklerinde bir sükröz yoğunluk gradyanı üzerinde yüzdükleri düşünülmektedir (Kooijmans ve ark, 2012). Ek olarak, genellikle tetraspanin, ısı şoku proteinleri, füzyon proteinleri, sitosolik proteinler, lizozomal proteinler gibi diğer veziküllerden ayırt etmek için kullanılan endozomal yola özgü benzersiz yüzey proteinleri ile Alix, TSG101, nükleik asitler ve reseptörleri içerir (Antimisiaris ve ark, 2018).

2.7. Eksozomların Oluşumu ve Salgılanması

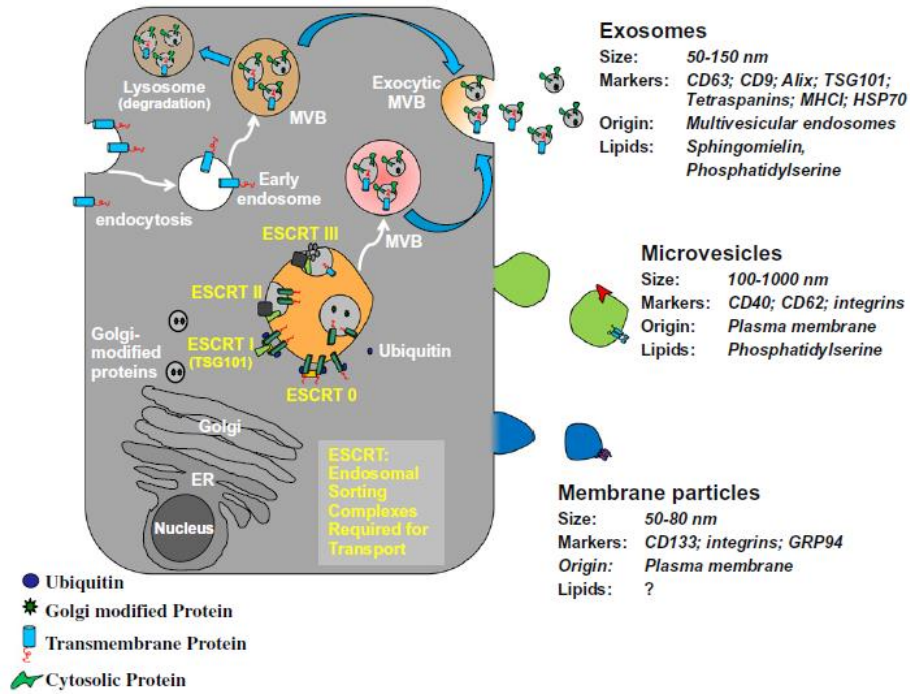
Eksozomların biyogenezi, erken endozomlara yol açan plazma zarının içe doğru tomurcuklanmasıyla başlar. Erken endozomlar, golgi kompleksi ile etkileşimleri içeren bir süreç yoluyla olgunlaşarak, geç endozom haline gelir. Bu geç endozomların membranı, içe doğru tomurcuklanmaya uğrar ve nükleik asitlerle birlikte plazma zarından ve Golgi'den proteinler içeren intralüminal veziküller (ILV) oluşturur. Bu ILV'lerin geç endozomlar içinde birikmesi, çok kesecikli yapılar yani multivesiküler body'ler (MVB) olarak adlandırılır. MVB'ler, lizozomlar tarafından parçalanabilir veya ILV'leri eksozom olarak hücre dışı boşluğa serbest bırakmak için plazma membranı ile kaynaşır. MVB'ler hücre membranı ile kaynaştıktan sonra eksozomlar, ekzositoz yoluyla hücre dışına salınırlar (Şekil 8) (Ha ve ark, 2016).



Şekil 8. Eksozom ve mikrovezikül oluşumu (Ha ve ark, 2016)

MVB'ler içinde ILV'lerin üretilmesinin, ubiquitine edilmiş yükleri tanıyabilen birçok proteinden oluşan, taşıma için gerekli olan endozomal sıralama kompleksine (ESCRT) bağlı olduğu bildirilmiştir. ESCRT, eksozomlara protein ayırmanın anahtar moleküler makinesidir. ESCRT; ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III adlı birbiriyle koordineli protein kompleksinden ve çeşitli bileşenlerden (TSG101, ALIX) oluşur. Kompleks, seçilen proteinleri ILV'lere ayırmada görev alır. ILV'ler içinde bulunan proteinlerin bazıları ubiquitinedir. ESCRT makineleri, protein tirozin fosfat HD-PTP ile etkileşimi yoluyla bu proteinlerin ayrışmasına katılır (Meldolesi, 2018).

ESCRT-0, endozomal zardaki ubikutinlenen proteinleri tanıma ve sekrete edilmesinden, endositoz reseptörlerin her yerde çoğaltılmasından sorumludur. Endozomlarda ubikutinlenmiş membran proteinleri MVB yoluna girerken, ubikutinlenmemiş proteinler plazma membranında veya golgi kompleksinde geri dönüştürülür. ESCRT-I 'in bir bileşeni olan tümör duyarlılığı geni 101 (TSG101), ubikutinlenmiş protein ile bir kompleks oluşturur ve ESCRT-II kompleksini aktive ederek, tomurcuk oluşumunu indükler. MVB proteinleri ayrılır ve deubikuitin enzimi ile ILV' lere ayrılmadan önce proteinlerden ubikutin ayrılır. Son aşamada ise ESCRT-III, vakuolar protein sınıflandırması ile ilişkili protein 4 (VPS4) adenosin trifosfataz (ATPase) ile tomurcuklanan vezikülün membrandan ayrılmasını sağlar (Şekil 9) (Barile ve Vassalli, 2017).



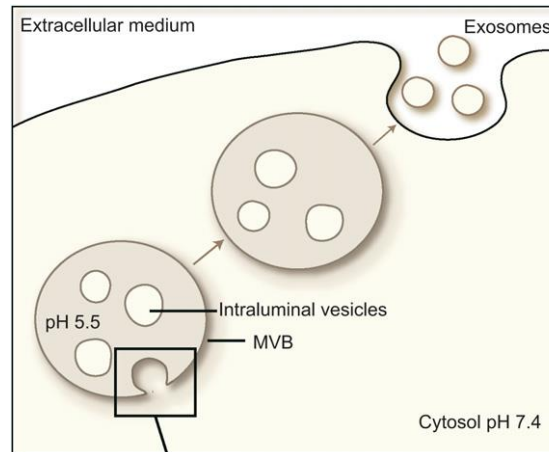
Şekil 9. Eksozomların biyogenezi (Barile ve Vassalli, 2017).

MVB oluşumunun ikinci yolu ESCRT' den bağımsızdır ve endozomal membranın spesifik lipit bileşimine dayanır. Seramidlerin eksozom biyogenezinde rol aldığı bildirilmiştir. Membranın dış tarafındaki seramid açısından zengin lipidlerin ve tetraspanin CD63' ün ILV oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Guo ve ark, 2017).

MVB' ler hücrede farklı işlemlere uğrayabilir ve içeriklerini bozan lizozomlarla veya hücreden eksozomları serbest bırakan plazma membranı ile birleşebilir. Bu mekanizma klantin, kaplama protein kompleksi I ve II (COP I ve II), çözünür N-etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma protein reseptörleri (SNARE) ve GTPazlar gibi birçok proteini içerir. RAB27, SLP4 ve SLAC2B'nin RNA etkileşimi aracılı parçalamasının eksozom salınımını olumsuz etkilediği, bu proteinlerin eksozomların salgılanmasında önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Farooqi ve ark, 2018).

Ayrıca, p53, Piruvat kinaz tip M2' nin (PKM2) ve tümör baskılayıcı ile aktifleştirilen yol 6'nın (TSAP6) ekspresyonunun, tümör hücrelerinde eksozom salgılanmasını arttırdığına dair kanıtlar vardır. Hücre içi Ca^{+} birikiminin ve mikro-ortam pH' ındaki değişimin eksozom salgılanmasını etkilemektedir (Subra ve ark, 2007).

pH' ın eksozom davranışı üzerindeki etkisi Laulagnier ve ark (2004) tarafından gösterilmiştir. Şekil 10' de gösterildiği gibi ILV' ler MVB içindeki asidik bir pH ortamında (pH 5.5) üretilir ve eksozomlar haline gelmek için nötr bir pH ortamına salınırlar.

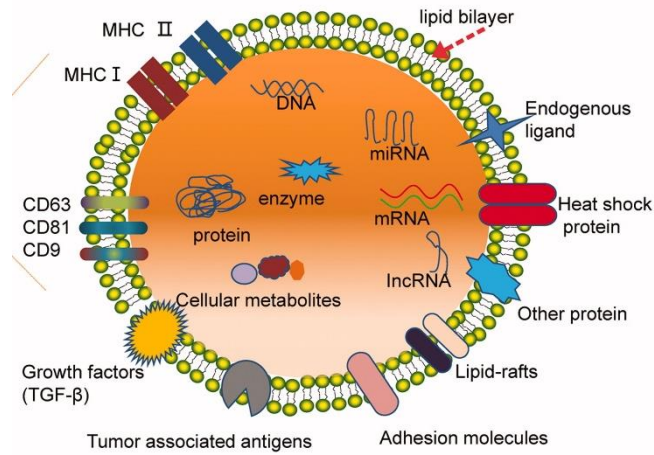


Şekil 10. Eksozom biyogenezinde pH' ın etkisi. Vezikül tomurcuklanmasını tetikleyen ilk olay, MVB ler içinde kümeler halinde organize edilen ILV' lerin asidik pH' ta oluşumudur (Subra ve ark, 2007).

2.8. Eksozomların Membran Bileşimleri ve İçeriği

Eksozomlar, mRNA, uzun kodlamayan RNA (lncRNA), miRNA ve hatta çift sarmallı DNA gibi genetik materyal yüklerine ek olarak birçok zara bağlı lipit ve protein içerirler (Şekil

11). Eksozom veritabanı olan ExoCarta (www.exocarta.org) 2020 verilerine göre eksozomlarla ilişkili olduğu tanımlanan şu anda yaklaşık 9769 protein, 1116 lipid, 3408 mRNA, 2838 miRNA vardır. Eksozomların bileşimi ve içeriği, ana hücrelerine, fizyolojik koşullarına ve çevresel stres faktörleri ve uyaranlara bağlı olarak birbirinden farklılık gösterir (Mignot ve ark, 2006).



Şekil 11. Çeşitli proteinler (sitosolik proteinler, transmembran proteinler, ısı şok proteinleri ve adezyon proteini, tetraspaninler, vb.), lipidler ve nükleik asitler (mRNA, miRNA, lncRNA ve DNA) içeren eksozom kompleksi (Meng ve ark, 2020).

Belirli patolojilerle ilişkili eksozom kompozisyonundaki değişiklikleri analiz eden çoğu çalışma, eksozom RNA kargolarındaki fonksiyonel değişikliklerin karakterize edilmesine odaklanmıştır, ancak eksozom membran proteinlerinin potansiyel düzenleyici rollerine ilgi gün geçtikçe artmaktadır. (Hu ve ark, 2020).

2.8.1. Proteinler

Eksozomların yüzeyi tetraspaninler (CD63, CD81, CD9, TSPAN6, TSPAN8), ısı şok proteinleri (Hsp70 ve Hsp90), hücre adezyon proteinleri (integrin, laktaderin), hücre iskelet proteinleri (aktin, tübülün), füzyon proteinleri (GTPaz, annexin, flotillin) ve eksozomların işlevini doğrudan etkileyebilen proteinler (MHC-I, MHC-II, FasL, WNT) gibi hücre tipine özgü birden fazla protein ailesinin varlığı ile karakterize edilir. Çoğu durumda, eksozomların alıcı

hücrelere bağlanması, yüzeylerindeki proteinler ile alıcı hücrelerin plazma zarındaki reseptörler arasındaki spesifik etkileşimlerle sağlanır (Zhang ve ark, 2019).

Tetraspaninler, eksozomlarda yaygın olarak tespit edilen bir transmembran protein ailesidir. Bunlar arasında sıklıkla eksozom markerleri olarak kullanılan CD9, CD63, CD81 ve CD82 bulunur (Kooijmans ve ark, 2012). Tetraspaninler hücrede, füzyon, sinyalleşme, hücre-hücre yapışması ve proliferasyon gibi çok sayıda fonksiyona aracılık ederler. (Hemler, 2005). Ancak eksozomlardaki, fonksiyonu büyük ölçüde bilinmemektedir.

Tetraspaninler EV yüzeyinde oldukça fazladır, bu da EV fonksiyonunda rol oynayabileceklerini göstermektedir. EV üretimi sırasında tetraspaninlerin sitosolik proteinlerle etkileşime girdiği ve muhtemelen luminal kargo yükleme sürecine katıldığı bildirilmiştir (Meldolesi, 2018). Bununla birlikte, tetraspaninlerin, Tspan8, CD49 ve CD106' nın, pankreatik adenokarsinom türevi eksozomların fibroblastlar ve endotelial hücreler tarafından bağlanması ve tutulmasında rol oynadığı görülmüştür. Ayrıca CD9' un eksozomların hedef hücreleriyle füzyonunda rol oynaması, tetraspaninlerin eksozomlarda ve hücre zarlarında benzer fonksiyonlara sahip olabileceğini göstermektedir (Nazarenko ve ark, 2010).

Tetraspaninler, sınırlı ligand-reseptör etkileşimi ve bazı durumlarda biyokimyasal veya immünolojik tespiti önleyebilen küçük boyutları nedeniyle nispeten az çalışılmıştır. Bununla birlikte, füzyon, hücre göçü, hücre-hücre yapışması ve sinyal olaylarının aracılığı olarak işlevleri, onları ilaç keşfi alanında ilginç hedefler yapmıştır. Ayrıca, eksozomlardaki (büyük ölçüde bilinmemekle birlikte) işlevlerinden, ilaç verme sistemleri olarak eksozom mimetiklerinin özelliklerini geliştirmek için faydalanılabilir (Kooijmans ve ark, 2012).

Eksozomlarda bulunan bir diğer protein, integrinlerdir. ExoCarta veri tabanına göre integrinler, kanser ve bağışıklık hücrelerinden türetilen eksozomlarda tespit edilen en bol proteinler arasındadır (Van Dommelen ve ark, 2012). Yapışma molekülleri olarak işlev görürler ve hücre dışı matrise hücre bağlanmasını sağlarlar. Eksozomlarda, integrinler veziküllerin hedef hücrelerine adreslenmesinde rol oynarlar (Ha ve ark, 2016). Bir başka eksozomal adezyon proteini laktadherindir (EGF faktörü VIII veya MFG-E8 olarak da bilinir). Bu protein yaygın olarak bağışıklık hücrelerinden ve fibroblastlardan türetilen eksozomlarda bulunur. Apoptotik hücrelerin veya eksozomların hedef hücrelerin yüzeyi arasında bir iskele proteini görevi görür (Kooijmans ve ark, 2012).

Tetraspaninler ve integrinler dışında, eksozomlarda ilaç iletim özelliklerini geliştirme potansiyeline sahip diğer proteinler de tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi, CD55 ve CD59 dur. B hücreleri, dendritik hücreler, kolorektal kanser hücreleri, tükürük ve bronşiyal epitel hücreleri

dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan türetilen eksozomlarda bulunmuşlardır. Bu proteinler eksozomları kompleman aracılı lizizden korumaktadır (Kooijmans ve ark, 2012).

Füzyon protein moleküllerinin eksozomlar üzerindeki lipit fraksiyonlarına bağlı olduğu bulunmuştur. Anneksinler, flotilin, GTPazlar, RAB'ler ve ADP ribozilleme faktörleri gibi proteinler, farklı bölmeler arasında hücre içi vezikül taşınması ve füzyon fonksiyonları ile ilişkilidir (Colombo ve ark, 2014).

Antijenik peptitlerin büyük histo-uyumluluk kompleksi (MHC) molekülleri tarafından T hücrelerine sunulması genellikle hücre yüzeyinde gerçekleşir. Bununla birlikte, B lenfositleri ve dendritik hücreler (DC) gibi antijen sunan hücrelerin (APC) in vitro T hücresi çoğalmasını uyarabilen peptit yüklü MHC molekülleri taşıyan eksozomları salgıladıkları gösterilmiştir. APC' ler tarafından salgılanan eksozomların T hücre proliferasyonunu in vitro uyarma ve anti tümör immün yanıtlarını in vivo indüklemeye yeteneğine sahip oldukları görülmüştür (Raposo ve ark., 1996).

DC' den türetilmiş eksozomlar, ILV' lere ayırmak için ubiquitinlenmiş kargo proteinlerini seçen korunmuş makinenin bir parçası olan TSG101 ve ALIX' i içerir. Tsg101, taşıma ESCRT-I için gerekli olan endozomal sıralama kompleksinin bileşenlerinden biridir. ALIX' in ESCRT-II ve ESCRT-III' ü bağladığı gösterilmiştir. Bu bileşenlerin ILV' nin içe doğru tomurcuklanmasına ve yayılmasına izin verdiği düşünülür, ancak AAA ATPase VPS4'ün etkisi ile endozomal zardan ayrılır (Février ve Raposo, 2004).

Isı şok proteinleri (Hsps), eksozomların biyogenezinde de önemli bir rol oynamaktadır. Hsps ailesinin bir üyesi olan Hsp20'nin, doğrudan ESCRT- I kompleksinin önemli bir bileşeni olan TSG101 ile etkileşime girerek eksozomların biyogenezine aracılık ettiği tespit edilmiştir. Hsp20, TSG101 için yüksek bir afiniteye sahiptir bu da Hsp20 'nin, TSG101' in ubiquitin proteinlerini tanımasına yardımcı olan ESCRT-I kompleksinin bir parçası olabileceğini gösterir (Reddy ve ark , 2018).

2.8.2. Lipidler

Dolaşımdaki eksozomların çift katlı lipit tabakası, seramid, sfingomiyelin (SM), fosfatidilkolin (LPC), fosfatidil-etanolamin, fosfatidilserin (PS), gangliosid GM3 ve fosfatidilinositol gibi plazma membran lipitlerinden oluşur. Bu lipitlerin oranları, farklı hücre tiplerinden türetilen eksozomlar arasında değişmektedir. Örneğin fosfatidilkolin,

retikülositlerden türetilen eksozomlardaki lipitlerin neredeyse yarısını oluştururken, mast hücrelerinden ve dendritik hücrelerden türetilmiş eksozomlardaki toplam lipit içeriğinin üçte birinden daha azını oluşturur (Kooijmans ve ark., 2012). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, 300 ml kan için ortalama 60 mg protein ile kanda dolaşan eksozomların varlığını ortaya koymuştur. Bu miktarda eksozom, yaklaşık 2 nmol LPC taşıyacak olan 20 nmol fosfolipidi temsil eder. 300 ml kan için böyle bir LPC miktarı, yaklaşık 7 nM' lik bir konsantrasyona eşdeğerdir. Bu nedenle eksozomlar, dolaşımdaki küçük bir LPC kaynağını temsil etmektedir (Caby ve ark, 2005).

Eksozom membran lipit bileşenleri, intralüminal veziküllerin biyogenezi için önemli olan seramidle birlikte yüksek konsantrasyonlarda kolesterol ve sfingomiyelin ile karakterize edilir. Ek olarak, eksozom membran lipitleri, diğer hücre zarlarında bulunmayan ve kolesterol birikmesine katkıda bulunan alışılmadık bir fosfolipit olan lizosifosfatidik asidi (LPBA) içerir. Lizosifosfatidik asidin, yeni oluşan eksozomların kendisine dahil edilmeden bu zarındaki vezikül tomurcuklanmasına katkıda bulunabileceği varsayılmıştır. (Meldolesi, 2018)

Genel olarak eksozomlar, ebeveyn hücreleri plazma zarlarına kıyasla sfingomiyelin, kolesterol, GM3 ve fosfatidilserin bakımından artış, fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin bakımından azalma gösterirler (Raposo ve Stoorvogel, 2013). Sfingomiyelin ve kolesterolün hidrojen bağları oluşturduğu düşünülür, bu da sfingomiyelin/kolesterol bilayerlerinin sıkı bir şekilde paketlenmesine ve düşük su geçirgenliğine neden olur. Bu nedenle, eksozomların sertliklerini artırır. Eksozomların artan membran sertliği, kolayca ayrışmamalarını ve biyolojik sıvılarda stabiliteilerinin artmasını sağlamaktadır. Bu sayede deterjan muamelelerine karşı mikrotaneciklerden daha dirençli oldukları bulunmuştur (Record ve ark, 2018).

Sfingomiyelin ve GM3, eksozomun sertliğini belirlemekten sorumluyken, fosfatidilserinin çeşitli biyolojik süreçlerde bir sinyal molekülü olarak rol oynadığı bilinmektedir. PS farklı tiplerde fosfolipid taşıma enzimleri yoluyla eksozomların plazma membranında eksprese edilir. Dış proteinlerin yerleştirilmesinde rol oynar, eksozomun plazma membranına sinyal ve füzyona izin verir (Ha ve ark, 2016).

Seramid, ILV' lerde ve MVB membranında bulunan esansiyel lipitlerden biridir. Eksozomal membranın iç kısmı seramid ile zenginleştirilmiştir. Sfingomiyelinden tip 2 nötr sfingomiyelinaz ile sentezlenir. Seramid molekülleri spontan membran invajinasyonuna neden olarak bazı alanları kümelemektedir. Böylece ILV oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Trajkovic, 2008).

2.8.3. Nükleik Asitler

Mast hücreleri tarafından salgılanan ekzomlardaki nükleik asitlerin keşfinden sonra (Valadi ve ark, 2007), çok sayıda çalışmacı tarafından EV' lerde genetik materyalin varlığını analiz etmiştir. miR ve mRNA, eksozomlarda tanımlanan ilk nükleik asit sınıflarıydı. Daha sonra, transfer RNA' lar (tRNA' lar), lncRNA' lar ve viral RNA dahil olmak üzere eksozomlarda diğer tüm RNA türleri tanımlandı (Kalluri, 2016).

Eksozomların vücut sıvılarında koruyucu ve zenginleştirilmiş stabil bir miRNA kaynağı sağladığı, biyolojik moleküllerinin fizyolojik olmayan koşullar altında (çoklu dondurma-çözülme döngüleri, uzun süreli depolama ve aşırı pH) bozulmasını önlediği bulunmuştur. Eksosomal olarak türetilmiş miRNA'nın -20 ° C' de 5 yıla kadar stabil kaldığı ve donma-çözülme döngülerine dirençli olduğu bildirilmiştir. Eksozomlar miRNA'ları bozulmaya karşı koruyarak serbest miRNA' lardan daha kararlı olmalarını ve spesifik alıcı hücreler tarafından etkin bir şekilde entegre olmalarını sağlar. Bu nedenle, eksozomların taşıdığı yük içinde miRNA' lar, türetildikleri hücre tipinin kimliği, tedavi direnci de dahil olmak üzere hedef ve hücresel durum hakkında bilgi sağlayabilir. Özellikle kanserde gen ekspresyonunun temel düzenleyicisi olarak bilinirler ve tümör oluşumu, metastaz ve çeşitli terapilere karşı dirençte önemli bir rol oynarlar. Dolayısıyla kanser ve diğer hastalıklar için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilirler (Dilsiz, 2020).

2.9. Eksozomların İzolasyon Yöntemleri

Eksozomları hücrelerden ve biyolojik sıvılardan etkili bir şekilde izole etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Eksozom izolasyonu için boyut, şekil, yoğunluk veya yüzey antijenleri gibi belirli bir eksozom özelliklerinden yararlanır. Bununla birlikte, kullanılan tüm yöntemlerin en zorlu tarafı, eksozomları diğer hücre dışı veziküllerden, hücresel kalıntılardan ve etkileşen moleküler bileşenlerden spesifik olarak saflaştırmaktır. Bu nedenle, daha fazla uygulama yapılmadan önce her bir izole edilen eksozom serisinin kalitesi incelenmelidir. Eksozom boyutu, boyut dağılımı, morfoloji, miktarın yanı sıra protein ve RNA kompozisyonunu ölçmek için çeşitli teknikler kullanılmaktadır (Antimisiaris ve ark, 2018).

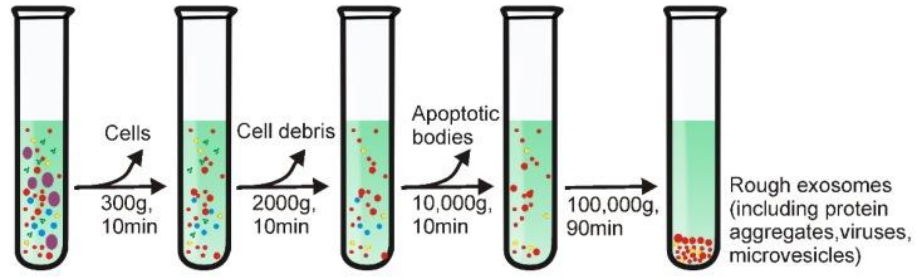
Literatürde tarif edilen tüm eksozom izolasyon yöntemlerinde ilk adım, ebeveyn hücrelerini serumsuz ortamda kültürlenmek ve hücrelerin ortamı koşullandırmasına izin

vermektedir. Koşullandırılmış ortam daha sonra uygulanan spesifik izolasyon yöntemine göre farklı şekillerde toplanır ve işlenir (Kang ve ark, 2017).

2.9.1. Ultrasantrifüj Esaslı İzolasyon Teknikleri

Santrifüjleme genellikle partiküllü malzemeleri ayırmak ve saflaştırmak ve ayrıca nükleik asitler ve proteinler gibi biyopolimerler dahil olmak üzere polimerik malzemelerin hidrodinamik özelliklerini analiz etmek için kullanılır. Merkezkaç kuvvetine bağlı olarak, bir süspansiyon içindeki parçacıklar fiziksel özelliklerine, çözücünün yoğunluğuna ve viskozitesine göre sırayla ayrılabilir. Ultrasantrifüj esaslı eksozom izolasyonu altın standart olarak kabul edilir ve eksozom izolasyonunda en sık kullanılan ve rapor edilen tekniklerden biridir. Ultrasantrifüjlemenin, eksozom araştırmalarında kullanıcılar tarafından kullanılan tüm eksozom izolasyon tekniklerinin % 56' sını oluşturduğu tahmin edilmektedir. (Li ve ark, 2017). Kullanım kolaylığı, teknik olarak az uzmanlık gereksinimi ve karmaşık numune ön işleme olmaksızın büyük hacimli preparatlarla uyumluluk nedeniyle, eksozomları hücre kültür ortamı, serum, idrar, beyin omurilik sıvısı ve tükürük gibi çeşitli kaynaklardan izole etmek için son 30 yılda yaygın olarak ultrasantrifüj kullanılmıştır (Batrakova ve Kim, 2015).

Eksozomların diferansiyel ultrasantrifüjleme ile izolasyonu genellikle bir numunedeki diğer bileşenlerden yoğunluk ve boyut farklılıklarına dayanarak eksozomları izole etmek için farklı merkezkaç kuvveti ve süresine sahip bir dizi santrifüjleme çevriminden oluşur. (Li ve ark, 2017) . Şekil 12' de gösterildiği gibi, test edilen numunelerin özelliklerine göre, önce düşük hızda santrifüjleme (300 xg) ile büyük biyo-partikülleri ayrılır. Daha sonra süpernatant, büyük döküntüleri ve bozulmamış organelleri gidermek için 10.000-20.000 xg' ye tabi tutulur. Saflaştırılmış eksozom izolasyonu için apoptotik cisimler ve protein agregatları gibi kontaminantları sırayla gidermek için 100.000 xg' ye kadar santrifüjleme gerçekleştirilir (Yang ve ark, 2020). Son olarak, izole edilmiş eksozomlar bir kez daha yeniden süspansiyon edilir ve daha fazla analiz için -80 ° C' de saklanır. Eksozomları izole etmenin bu yöntemi pelletleme yöntemi veya basit ultrasantrifüj yöntemi olarak da bilinir (Li ve ark, 2017).



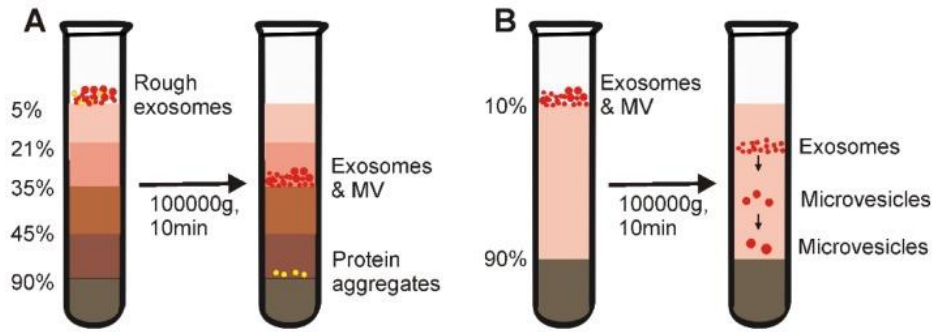
Şekil 12. Diferansiyel ultrasantrifüj esaslı ekzozom izolasyonunun şematik gösterimi. Diferansiyel ultrasantrifügasyon, 300 xg'den 100.000 xg'ye kadar santrifüj kuvvetleri ile çoklu santrifüjleme döngüleri ile gerçekleştirilir. Her santrifüjleme adımından sonra, süpernatant daha fazla santrifüj için toplanırken hücreler, hücre döküntüleri ve apoptotik cisimler içeren pelletler çıkarılır. Son santrifüjlemeden (100,000 xg) sonra, süpernatant uzaklaştırılarak ekzozom içeren pelletler ve kirletici proteinler toplanır. Santrifüjleme 4 ° C'de gerçekleştirilir (Yang ve ark, 2020).

Diferansiyel ultrasantrifüjlemeyle ilgili bir sorun, ekzozomların ve diğer veziküllerin, proteinleri veya protein-RNA agregatlarını tortulaştırmasıdır. Bir sükröz yoğunluk gradyanı, kullanılarak ekzozomlardan farklı yoğunluklara sahip kontaminantlar uzaklaştırılıp, teorik olarak daha saf ekzozomlar elde edilebilir. Gradyan santrifüjlemeuzun (~ 62-90 saat) santrifüj süresi gerektirir, ancak tek başına ultrasantrifüjlemeden daha saflaştırılmış bir ekzozom izolatu sağlar (Batrakova ve Kim, 2015).

İzopiknik ultrasantrifüjleme ve hareketli bölge ultrasantrifüjleme olmak üzere iki tip yoğunluk gradyanlı ultrasantrifügasyon vardır. İzopiknik ultrasantrifüjlemede ilk olarak, numunedeki partikül yoğunluğu aralığını kapsayan değişen yoğunluklarda biyoyoumlu ortam tabakaları, aşağıdan yukarıya doğru yoğunluğu azalan bir tüpe yerleştirilir (Şekil 13, A). Daha sonra, söz konusu numune yoğunluk gradyanlı ortamın üzerine eklenir, ardından uzun bir süre santrifüjlenir (örn. 16 saat boyunca 100, 000 xg). Sonunda, ekzozomlar, apoptotik cisimler ve protein agregatları dahil olmak üzere hücre dışı bileşenler, aynı yoğunlukta katmanda kademeli olarak statik bir konuma (izopiknik konum) ulaşır. Bu yöntem sayesinde, farklı yüzdürme yoğunluklarına sahip bileşenler kolaylıkla ayrılabilir; protein agregatları santrifüj tüpünün dibinde birikirken, ekzozomlar 1.10 ve 1.18 g ml⁻¹ arasındaki tabakada kalır (Yang ve ark, 2020).

Bu yöntem etkili bir şekilde protein agregatları gibi yaygın kontaminantlardan ekzozomları ayırmakla birlikte, farklı boyutlardaki benzer yüzdürme yoğunluğuna sahip

mikroveziküller ile hücre dışı vezikülleri ayıramaz. Bu teknik sorunu çözebilmek için çalışmalarda parçacıkları hem boyut hem de yoğunluk ile ayıran hareketli bölge yoğunluk-gradyanlı santrifüj kullanmıştır. Şekil 13, B' de gösterildiği gibi hareket eden bölge ultrasantrifüjyonu, numunedeki tüm çözünenlerden daha düşük bir yoğunluğa sahip bir ortama sahiptir. Çözünen maddelerin yoğunluğu gradyan ortamın yoğunluğundan daha büyük olduğu için, santrifüjlemeden sonra, numunedeki tüm çözünenler sadece yoğunluğa değil aynı zamanda kütle / boyuta dayanarak sıralı olarak ayrılacak, böylece veziküllerin karşılaştırılabilir yoğunluklarla izole edilmesine izin verilecektir. Bununla birlikte, izopiknik ultrasantrifüjlemenin aksine, bu tip ultrasantrifüjleme içindeki ortamın konsantrasyonu tüm örnek bileşenlerinkinden daha düşük olduğundan, tüm çözünmeyen partiküller uzun süreli santrifüjlemeden sonra tüpün alt kısmında peletlenebilir. Bu nedenle, santrifüj süresi dikkatli bir şekilde optimize edilmelidir. Ek olarak, eksozomların peletlenmesini önlemek için, yüksek yoğunluklu bir tampon genellikle santrifüj tüpünün altına yerleştirilir (Yang ve ark, 2020).



Şekil 13. Gradyan yoğunluk ultrasantrifüj esaslı eksozom izolasyonunun şematik gösterimi. İzopiknik yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjasyonu (A), Hareketli bölge gradyanlı ultrasantrifüjleme (B) (Yang ve ark, 2020).

2.9.2. Ultrafiltrasyon Yöntemi

Eksozomların boyutlarına göre izolasyonu, ultrafiltrasyon membranları kullanılarak elde edilebilir. Geleneksel filtrasyon yöntemlerine benzer şekilde, ultrafiltrasyon, hücre dışı vezikülleri klinik örneklerden veya hücre kültürü ortamından izole etmek için ultra ince membranlar kullanır. Bu sayede daha küçük agregatların ve çözünür bileşenlerin eksozomlardan ayrılması sağlanır. Yaygın olarak kullanılan filtreler, 0.8 µm, 0.45 µm veya 0.22

µm gözenek boyutlarına sahip olanlardır, burada 800 nm, 450 nm veya 200 nm' den büyük veziküller korunur. Daha büyük vezikül popülasyonları çıkarıldıktan sonra, spesifik vezikül popülasyonu muhafaza edilir ve zar tarafından konsantre edilirken, belirtilen boyuttan daha küçük bileşenleri çıkarmak için akıştan ikinci bir filtrasyon adımı dahil edilebilir (Kang ve ark, 2017). Ultrafiltrasyon genellikle diğer eksozom izolasyon tekniklerinin bir tamamlayıcısıdır. Genellikle ultrasantrifüleme ve çöktürme tekniklerinden sonra bir temizleme adımı olarak bu yöntem kullanılır (Ayala-mar ve ark 2019).

Filtrasyon yönteminin iki dezavantajı vardır. Birincisi, ultrafiltrasyonla elde edilen üründe mikroveziküller ve apoptotik cisimler de bulunacağı için, sadece eksozomlar izole edilemez. Ayrıca, ortaya çıkan çözelti içinde eksozom boyutunu veya moleküler ağırlığı taklit eden yüksek miktarda bol miktarda protein de bulunur. İkincisi, malzemeleri filtrasyon membran gözeneklerinden geçirmek için, kuvvet (basınç veya merkezkaç kuvveti) veya altına vakum uygulanır. Çözeltideki materyaller daha konsantre hale geldikçe, ilave kuvvet gereklidir ve membran gözenekleri filtrelenen malzemeler tarafından bloke edilebilir. Ultrasantrifügasyon yöntemi ile karşılaştırıldığında, ultrafiltrasyon bazlı eksozom izolasyonu önemli ölçüde işlem süresini kısaltır ve klasik ultrasantrifüj stratejisine ideal bir alternatif sunarak özel ekipman gerektirmez (Kang ve ark, 2017).

2.9.3. İmmünoafinite kromatografisi

İmmünoafinite kromatografisi, taneciklere, filtrelere veya diğer matrislere kovalent olarak bağlı antikorların, hedef partikül ve hedef olmayan partiküller üzerindeki spesifik yüzey proteinlerine veya antijenlere bağlandığı bir işlemdir. Bağlı olmayan kısım atılır ve istenen bağlı kısım, sabit fazın tipik olarak düşük bir pH tamponuyla yıkanmasıyla toplanabilir. Eksozomların zarında bol miktarda protein ve reseptör bulunması, bu proteinler (antijenler) ve antikorları arasındaki immüno-duyarlı etkileşimlere ve reseptörlerle ligandlar arasındaki spesifik etkileşimlere dayanarak eksozomların izolasyonu için oldukça spesifik teknikler geliştirmek için mükemmel bir fırsat sunar. Eksozomların izolasyonu için genellikle CD9, CD81, CD63, TSG101, Alix gibi EV' lerin yüzey proteinlerine spesifik antikorlar kullanılır (Théry ve ark, 2006).

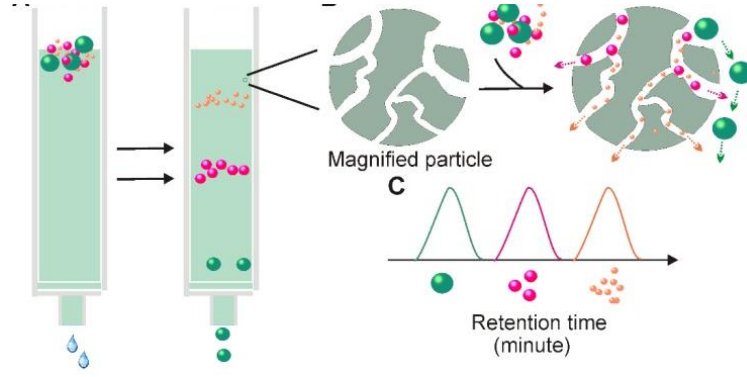
İmmünoafinite, birden fazla izolasyon yöntemi kullanan hibrit yaklaşımlara dahil edilmiştir. EV' ler, minimum plazma hacminde antikorlarla kaplanmış manyetik boncuklar kullanılarak izole edilebilir. Manyetik boncukların izolasyonu EV' leri zenginleştirir. Bu,

EV'lerin ve proteinlerin saptanmasını tek bir cihazda birleştiren çoklu bir tekniktir (Kang ve ark, 2017). Zarovni ve ark (2015) mikron altı boyutlu manyetik parçacıklar geliştirmiştir. 1 ml hücre kültürü süpernatantı ile antikor kaplı manyetik partiküllerin yakalama etkinliğinin, ultrasantrifüjlemeninkine yakın olduğu bulunmuştur.

İmmünoafinite prosedürlerinin ana avantajı, izole edilen eksozomların kalitesi ve saflığıdır. Antijen-antikor etkileşimleri oldukça spesifik olduğundan bu teknik, kirleticiler olmadan hücre dışı veziküllerin bir alt popülasyonunu seçici olarak izole etmek için çok yararlıdır (Ayala-mar ve ark 2019).

2.9.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Moleküler eleme olarak da bilinen jel filtrasyon kromatografisi farklı boyutlardaki bileşenlerin, boyutlarına göre ayrıldığı bir yöntemdir. Bunun için hetero gözenekli jel boncuklar kullanılır. Bu boncuklar çeşitli boyutlarda çok sayıda gözenek veya tünelden oluşur. Moleküllerin boyut ve şeklindeki farklılığa bağlı olarak gözeneklerden geçişi değişmektedir. Küçük yarıçapa sahip bileşenler, bir labirente benzeyen birçok küçük gözenekten geçerken, daha büyük yarıçapa sahip bileşenler, çok fazla gözeneğe nüfuz edemez. Buna bağlı olarak, jel içindeki gözeneklerin boyutları moleküllerin jelden geçiş hızını belirler. Şekil 14' de gösterildiği gibi küçük moleküller jel boncuklar içindeki gözenekler tarafından tutulduğu için jele geçiş yapamayan büyük moleküller kolondan daha önce ayrılmaktadır. Bu şekilde eksozomlar, farklı boyutlardaki veziküllerden ve kontaminantlardan ayrılabilir (Taylor ve Shah, 2015). Jel filtrasyon kromatografisinin matriksi genellikle agaroz (Sephrose), dekstran (Sephadex) gibi doğal veya poliakrilamid (Sephacryl, BioGel) gibi sentetik polimerlerden oluşmaktadır. Jeller bu moleküllerin çapraz bağlanarak üç boyutlu ağlar kurulmasıyla oluşur (Yang ve ark, 2020).



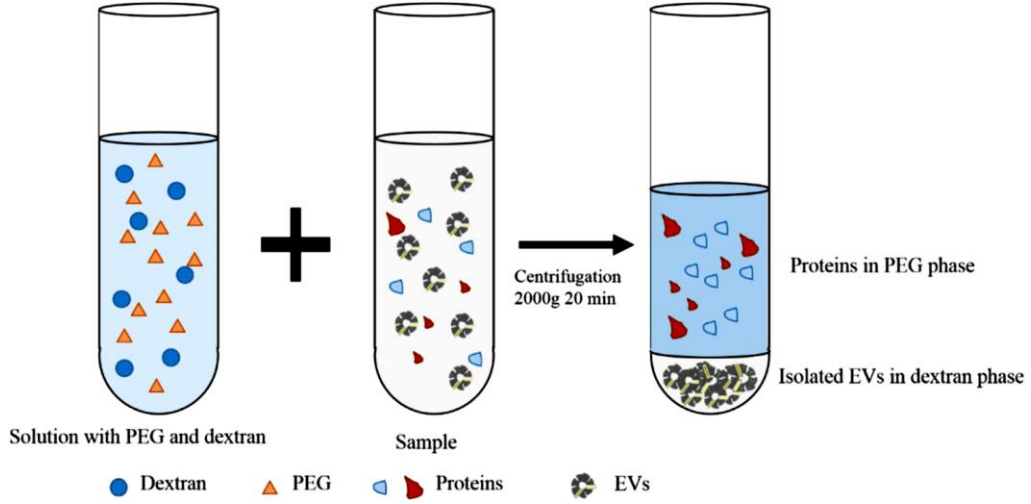
Şekil 14. Jel filtrasyon kromatografisi bazlı ekzozom izolasyonu prensibi (Yang ve ark, 2020)

2.9.5. Polimer Esaslı Çökeltme Yöntemi

Polimer çökeltme, tipik olarak polietilen glikol (PEG) içeren bir çözelti kullanılarak, virüsleri ve diğer makromolekülleri izole etmek için 50 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır. Mevcut polimer esaslı ekzozom çökeltme yönteminde genellikle 6000 ila 20000 Da moleküler ağırlığa sahip PEG kullanır. İlk olarak, hücre döküntüsü ve apoptotik cisimler gibi büyük kirletici parçacıkları uzaklaştırmak için bir ön işlem gereklidir, ardından ön işleme tabi tutulmuş numuneler PEG çözeltisi ile birleştirilir ve gece boyunca 4 ° C’ de inkübe edilir. Karışım daha sonra ekzozomları içeren bir pelet oluşturmak için düşük hızda (1500 xg) santrifüjlenir prensibi (D. Yang ve ark, 2020). Çökeltme çözeltisi genellikle ağırlıkça % 50 PEG çözeltisidir (% 30 ila % 50 PEG arasında değişen konsantrasyonlar da kullanılabilir). Bu PEG çökeltme çözeltisi genellikle bir fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi içinde hazırlanır. Polimerin izolasyondan sonra çıkarılması için Sephadex G-25 spin kolonlarını kullanıma dahil edilmiştir (Taylor ve Shah, 2015).

Polimer bazlı ekzozom çökeltmesinin büyük bir dezavantajı, proteinler ve polimerik malzemeler gibi ekzozom dışı diğer kirleticilerin birlikte çökeltmesidir. Bu tür kirleticilerin varlığı, aşağı akış analizini de bozabilir. Shin ve ark, PEG ve dekstran karıştırılarak oluşturulan bir ATPS (Sulu iki fazlı sistemler) sistemi kullanılarak EV’ lerin izole edilmesi için bir yöntem geliştirmiştir (Kırbaş ve ark, 2019). ATPS’ ler iki polimerin veya polimerlerin, çeşitli biyomolekülleri ayırmak ve izole etmek için kullanılan tuz çözeltileri ile karıştırılmasıyla oluşturulur. ATPS, hücreler, proteinler ve metal iyonları dahil olmak üzere çeşitli maddeleri ayırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 15 ‘de gösterildiği gibi nispeten daha hidrofobik çözelti olan PEG ve daha hidrofilik ve daha yoğun çözelti olan Dekstran ile

karıştırıldığında, dekstran altfaz PEG üst fazı olmak üzere iki fazlı bir sistem oluşur. Buna göre, eksozom içeren çözeltilere PEG ve dekstran ilave edildikten sonra düşük hızlı bir santrifüjlendikten sonra, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip parçacıklar farklı fazlara ayrılır. Eksozomlar tercihen dekstran fazında birikirken, proteinler ve diğer makromoleküler kompleksler tercihen PEG fazında birikir. Bu yöntem, 15 dakika gibi kısa bir sürede yüksek EV geri kazanım verimliliği (~% 70) sağlamıştır (Shin ve ark, 2015).



Şekil 15. ATPS eksozom izolasyonunun şeması (Kang ve ark, 2017).

EV'lerin ATPS tabanlı izolasyonu, önceki izolasyon yöntemlerine göre belirgin bir avantaja sahiptir. Yöntem teknik olarak kolaydır, özel ekipman gerektirmez ve hızlı bir şekilde yüksek verimlilik ve saflıkta EV izole edilebilmektedir. EV'leri izole etmek için ATPS kullanmanın dezavantajı ise, EV'lerin nihai süspansiyonunda dekstranın varlığıdır. Dekstran, daha heterojen bir dağılıma yol açan numunenin viskozitesini artırır ve jel elektroforez çalışmalarında çalıştırıldığında bozulmalara neden olur, monohidrik alkollerde ve ketonlarda çözünmez, bu da RNA izolasyonu gibi yöntemlerde kullanılmasını önler (Kırbaş ve ark, 2019).

2.9.6 Mikroakışkan Esaslı İzolasyon Teknikleri

Mikroakışkan cihazlar, mikrolitre ve daha küçük hacimlerdeki sıvıların mikro ölçekteki kanallar içerisinde kontrol edilmesini ve hareket ettirilmesini sağlayan sistemlerdir. Mikroakışkan teknolojileri, hızlı, düşük maliyetli ve yüksek hassasiyetleri nedeniyle eksozom ayırmak için ideal araçlardır. Günümüzde laboratuvarlarda fonksiyonel bileşenlerin entegrasyonunu içeren bir çip üzerinde eksozomların mikro ölçekteki davranışları araştırılmaktadır (Ayala-mar ve ark 2019).

Eksozomları izole etmek için immünoafinite bazlı mikroakışkan yaklaşım, immünoafinite kromatografi tekniğine benzer ve benzer prensiplerle çalışır. Birçok çalışmacı, eksozomların ve mikro-taneciklerin izole edilmesinde çip bazlı immünoaf mikroakışkan yaklaşımlar geliştirmiş, bu da eksozom içeriklerinin kantitatif ve yüksek verimli analizine izin vermiştir (Batrakova ve Kim, 2015). Chen ve ark. serum ve hücre kültürü ortamından eksozom ayrılması için ilk immünoafinite esaslı cihazı sunmuştur. Ayırma, eksozomların anti-CD63 IgG kaplı mikroakışkan kanal yüzeylerine seçici bağlanmasına dayanmaktadır. Çalışmada, küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarından 400 µL serum örneğinden eksozomlar izole edilmiş ve izole edilen eksozomlardan yaklaşık 30 ng RNA ekstrakte edilmiştir (Chen ve ark, 2010).

Boyut esaslı eksozom ayırma cihazları genellikle nanofiltre, nanoporöz membran veya nanoarray içerir, bunlar genellikle enine kesite yerleştirilir veya mikroakışkan kanalın substratları üzerinde üretilir. Eksozomlar, örnek sıvılar kanaldan aktığında bu yapılarda fiziksel olarak hapsolür. Geleneksel eksozom ayırma yöntemleri ile karşılaştırıldığında, bu cihazlar üstün ayrılmış eksozom boyutu homojenliği elde eder (F. Yang ve ark, 2017). Wang ve ark (2013) 40-100 nm çapında eksozom benzeri lipit veziküllerini seçici olarak yakalamak için silikon "mikropiller üzerinde nanotel" yapısını oluşturan siliyer mikropillerden oluşan bir cihaz sunmuştur. Lipit veziküllerinin geri kazanımı, mikropillerin PBS içinde bir gece boyunca nanotellerle çözülmesi gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bu cihaz henüz kan, idrar veya diğer vücut sıvıları gibi klinik örnekleri test etmek veya eksozomlardaki protein veya RNA analizi için kullanılmamıştır. Davies ve ark (2012) belirli bir boyutta gözenekli bir zardan hücre dışı veziküllerin elenmesine dayanan bir yöntem geliştirmiştir. Bu yaklaşımda, hücre dışı veziküller, basınç ve elektroforez ile kanın bir zardan elenmesi yoluyla toplanmıştır. Uygulanan elektrik alanı, eksozomların kontaminantlardan ayrılmasına yardımcı olmuştur. Boyut esaslı ve immünoafinite esaslı ayırma yöntemlerinin sınırlamaları ve dezavantajları göz önüne alındığında, birkaç grup daha hızlı ve daha kolay eksozom ayırımı için harici kuvvetlerin

kullanımını mikroakışkan tasarımlarla birleştirmek veya entegre etmek için çalışmıştır. Bu yöntemler “dinamik” ayırma yöntemleri olarak kategorize edilebilir (F. Yang ve ark, 2017). Bir çalışmada Cho ve ark (2016) membran yüzeyindeki EV’ leri yakalamak için 30 nm gözenek boyutunda bir diyaliz membranı kullanmıştır. EV’ lerin ve proteinlerin manipülasyonu için gözenekli diyaliz membranından bir elektrik alanı uygulanmıştır. Bu cihazda, hedef olmayan nanoparçacıklar uzaklaştırılmış ve aynı zamanda EV’ ler elektriksel kuvvetler tarafından membran üzerinde yakalanmıştır. Bu yöntem, 30 dakika gibi kısa bir sürede % 65’ e kadar EV geri kazanımı ve % 83.6’ ya kadar protein uzaklaştırması sergilemiştir.

2.10. Eksozomların Fonksiyonları

İlk olarak 1967’de Peter Wolf kan pıhtılaşması sırasında trombosit salgılayan veziküllerin varlığından söz etmiştir. 1980 yılında, Trams ve arkadaşları trofik maddelerin veya besin maddelerinin hücreler arası taşınmasında EV’ lerin oynadığı önemli rolü ortaya çıkarmıştır. 1983’ te iki grup, transferrin ve reseptörünün geri dönüşümü yoluyla salgı veziküllerinin retikülosit olgunlaşmasındaki rolünü tanımlamıştır. 1996’ da Raposo ve arkadaşları antijen sunumu ve T hücresi stimülasyonunda B hücrelerinden türetilen EV’ lerin önemini göstermiştir. O zamandan beri birçok çalışma, antijen sunan hücrelerden türetilen eksozomların, hücre yüzeyinde MHC sınıf I ve II moleküllerini eksprese edebildiklerini, bu da CD8+ ve CD4+T hücrelerinin spesifik bağışıklık tepkilerini indüklemesine yardımcı olduğunu göstermiştir (Becker ve ark, 2017).

Eksozomlar membran yüzeylerinde ve lümenlerinde bulunan miRNA, mRNA, lipit, proteinler, çeşitli kodlayıcı olmayan RNA’lar, mitokondriyal DNA, genomik DNA gibi işlevsel molekülleri bir hücreden diğerine aktararak hücre-hücre iletişimi yoluyla normal fizyolojik fonksiyonlara aracılık ederler. Ek olarak, spesifik mRNA’ ların ve miR’ lerin verilmesi yoluyla alıcı hücrelerin gen ekspresyonunu düzenleyebilirler (Kibria ve ark, 2019). Genel olarak, eksozomların fonksiyonları, vücutta hedefe özgü bir şekilde hücre-hücre iletişimini sağlamaktır. Şu anda, eksozomların eritrositlerin olgunlaşması, gereksiz proteinlerin ve RNA’ nın ortadan kaldırılması, bağışıklık yanıtlarında antijen sunumu, pıhtılaşma, inflamasyon ve anjiyogenez gibi birçok biyolojik sürece dahil olduğu bilinmektedir (Ha ve ark, 2016).

Normal biyolojik süreci içermenin yanı sıra, eksozomların birçok yaygın hastalık ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Merkezi sinir sistemi (CNS) hastalıklarında, çalışmalar CNS hücreleri tarafından salınan eksozomların kan beyin bariyerinden (BBB) geçebileceğini ve

nörodejenerasyon, travma ve inme gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Zhang ve ark, 2019). CNS hastalıklarından biri olan Alzheimer hastalığında, eksozomların β -amiloid peptit ve α -sinüklein gibi çeşitli patojenik proteinleri taşıyabildiği ve salgılayabildiği kanıtlanmıştır (Kanninen ve ark, 2016). Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda, eksozomların yanlış katlanmış proteinlerin sağlıklı nöronlardan yakındaki hücrelere taşınmasından sorumlu olduğu ve böylece hastalığın hücreden hücreye yayılmasından sorumlu olduğu bulunmuştur (Ghidoni ve ark, 2008).

Eksozomlar yoluyla çeşitli farklı kardiyak hücre tipleri arasındaki etkileşimler miyokardiyal fonksiyonu etkileyebilir. Bang ve meslektaşları kardiyak fibroblastların miR-21'in eksozomal transferi yoluyla kardiyomiyositlerin hipertrofik cevabını desteklediğini ve miR-21'in kardiyak fibroblast sekretomunun düzenlenmesinde ve hipertrofik cevabın belirlenmesinde kritik bir rol oynadığını kanıtlamıştır (Bang ve ark, 2014).

2.11. Eksozomlar ve Kanser

Eksozomların kanserin evrimindeki rolleri yıllar içinde genişlemiştir. Birçok araştırmacı, kanser eksozomlarında bulunan onkojenik sinyal moleküllerinin kısmen kanserin patogenezinde ve gelişiminden sorumlu olduğunu bildirmiştir. Kanser hücreleri ayrıca tedavi direncine aracılık eden eksozomları salgılar ve bu da kanser hücresinin hayatta kalmasını ve alıcı hücrelerde gen ekspresyonunu düzenleyerek DNA onarımını artırır (Dilsiz, 2020).

Eksozom salgısı kanserde artar. Kanserli hastaların plazma ve diğer vücut sıvılarındaki eksozom seviyeleri sıklıkla yükselir. Kanser hücreleri normal sağlıklı hücrelere kıyasla yaklaşık on kat daha fazla eksozom üretebilir (Mulcahy ve ark, 2014). Tek bir eksozomun yaklaşık 500 kopyaya miRNA taşıyabileceği tahmin edilmiştir. Normal insan kanındaki eksozom miktarının, kanser hastalarında yaklaşık 10^9 eksozom/ml olduğu bildirilmiştir (Dilsiz, 2020).

Eksozomlara tümör ve normal hücreler arasında onkogen taşıdıklarından dolayı onkomomlar adı verilmiştir. Eksozomların tümörden lokal veya uzak vücut bölgelerine yatay bilgi transferi, tümör büyümesini ve metastazını kolaylaştırır. Bu işlem genellikle, lümen içine paketlenmiş miRNA gibi küçük kodlayıcı olmayan RNA'ların transferi yoluyla gerçekleşir (Koh ve ark, 2020).

Birçok çalışma, eksozomal miRNA'ların, güçlü biyolojik stabilite, dokuya özgü ekspresyon ve tüm biyolojik sıvılara salgılanması ile birlikte birçok hücresel süreçte önemli doğal rolleri nedeniyle insan kanseri için çok umut verici yeni bir terapötik strateji

oluşturduğunu göstermiştir. Bu bulgular göz önüne alındığında, ekzo-miRNA' lar normal hücrelerin malign hücrelere dönüşümü sırasında önemli bir fonksiyon oynayabilir. Çalışmalar, dolaşımdaki ekzo-miRNA'ları kanserler için terapötik izlemede potansiyel tanı ve prognostik biyobelirteçler olarak tanımlamıştır. (Dilsiz, 2020). Alıcı hücrelere verilen miRNA'lar, hücrenin içeriğine bağlı olarak ya translasyonu baskılayarak ya da birden fazla mRNA'nın bozulmasına neden olarak gen ekspresyonunu düzenler. miRNA'nın tümörden alıcı hücrelere yatay olarak aktarılması transkriptomlarının yeniden programlanmasıyla sonuçlanır ve tümör ilerlemesi ve metastazı etkileyen fonksiyonel değişiklikleri indükler (Whiteside, 2016).

miRNA' lar, özellikle kanserde gen ekspresyonunun temel düzenleyicisi olarak bilinir ve tümör oluşumu, tümör büyümesi, anjiyogenez, metastaz, ve çeşitli terapilere karşı dirençte önemli bir rol oynar. Hem olgun miRNA hem de pre-miRNA transkriptleri, DICER, TRBP ve AGO2 gibi miRNA biyogenezi bileşenlerinin eksozomlarda bulunması, kanser hücrelerinden türetilen eksozomal miRNA' ların, tümör oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Melo ve arkadaşları, meme kanseri hücrelerinden ve meme kanseri olan hastaların serumlarından türetilen eksozomların tümör oluşturmak için tümörejenik olmayan epitel hücrelerini kışkırttığını göstermiştir (Melo ve ark, 2015).

Kanser hücrelerinden izole edilen eksozomlar, farelerde tümör büyümesini, muhtemelen tümörejenik miRNA' ların verilmesiyle önemli ölçüde teşvik eder. Benzer şekilde, yüksek seviyelerde prostaglandin PGE2 ve TGF- β içeren eksozomlar, immün hücrelerinin tümörden kaçışını ve tümör büyümesini destekler (Kibria ve ark, 2019).

Eksozomların metastazlarda anjiyogenez ve tümör hücresi göçünü teşvik ederek tümör ilerlemesine katkıda bulunduğu dair kanıtlar vardır. Örneğin, kolorektal kanserden türetilen eksozomlar, endotelial proliferasyonu artıran ve böylece tümör anjiyogenezini indükleyen mRNA' lar içerir. miRNA-9, sitokin sinyalinin 5 baskılanmasının ekspresyonunu inhibe ederek endotelial hücrelerin göçünü teşvik etmiş ve damar oluşumunu destekleyen etkiler göstermiştir. Ek olarak, miRNA-210'un endotelial hücrelerde spesifik genlerin ekspresyonunu baskıladığı ve pro-anjiyojenik aktivitenin artmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, glioblastomdan türetilen eksozomlarda bulunan proteinler, mRNA ve sfingomiyelin, tümör anjiyogenezini, tümör invazivliğini ve damar lümeni oluşumunu desteklemektedir (Guo ve ark, 2017).

Tümörden salgılanan eksozomlar ayrıca T lenfositlerini ve doğal öldürücü hücreleri inaktive edebilen veya düzenleyici T lenfositlerin ve miyeloid hücrelerin bağışıklık tepkilerini bastırmak için farklılaşmasını teşvik edebilen immünosüpresif molekülleri taşır (Raposo ve Stoorvogel, 2013).

2.12. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Eksozomlar

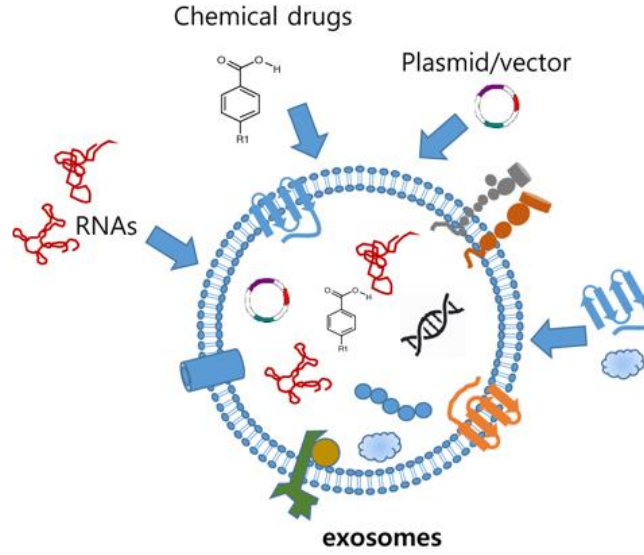
Son yirmi yılda çeşitli nano bazlı ilaç dağıtım sistemleri (DDS) keşfedilmiştir ve şu anda ilaç hedefleme uygulamaları için bu sistemler kullanılmaktadır. Tüm nano bazlı DDS' ler arasında, klinik olarak ilk onay alan lipozomlardır (Antimisiaris ve ark, 2018). Lipozomlar, sulu bir ortamda çeşitli boyut ve şekillerde kendi kendine bir araya gelen fosfolipid membranlı sentetik veziküllerdir. İlaçların yüksek yüklerini barındırabilen, toksik olmayan ve biyouyumlu yapılarına ek olarak, ilaçların bozulmasını engellemek ve hücrelere ilaç endositozunu artırmak için birden fazla ilaç yükleme yeteneğine sahiptirler. Lipozom destekli ilaç dağıtımının birçok biyomedikal alan üzerinde büyük bir etkisi olmuştur. Birkaç lipozomal formülasyonun terapötik bileşikleri stabilize ettiği, hücresel / doku alım engellerinin üstesinden geldiği ve biyodağılımın geliştirildiği kanıtlanmış, böylece kapsüllenmiş ilaçların hedef bölgelere etkili bir şekilde verilmesi ve sistemik toksisitesinin en aza indirilmesi sağlanmıştır (Deshpande ve ark, 2013).

En çok tercih edilen ilaç verme sistemleri lipozomlar ve polimerik nanoparçacıklardır. Polimerik nanoparçacıklar, ilaç moleküllerinin tuzağa düşürülmesine, kapsüllenmesine ya da bağlanmasına yardımcı olan ilaç dağıtım sistemleridir. Bu uygulama sistemlerinin her ikisi de, anti-kanser ilaçları, anti-fungal ilaçlar ve analjezikler dahil olmak üzere farklı tipte ilaç molekülleri vermek için kullanılmıştır. İdeal bir lipozomun uzun bir dolaşım kabiliyeti, stabilite ve toksisite olmadan konakçı bağışıklık sisteminden kaçınma yeteneği hala anlaşılammıştır. Öte yandan, polimerik nanoparçacıklar lipozomal sistemlerden daha iyi stabiliteye sahip olabilirler, ancak biyouyumlulukları ve uzun vadeli potansiyel güvenliği endişe kaynağıdır. Bu durumlarda, uzun bir dolaşım yarılanma ömrü, dokuları hedefleme için içsel yetenek, biyouyumluluk ve minimum toksisite sorunu gibi ideal bir ilaç dağıtım sisteminin arzu edilen özelliklerinin çoğuna sahip eksozomlar, lipozomal veya polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerine göre üstün bir seçenek gibi görünmektedir (Ha ve ark, 2016).

Eksozomlar sadece tıpta gelecekteki biyobelirteçleri değil, aynı zamanda kanser tedavisinde diğer ilaç verme araçlarına göre düşük immünojenlik ve toksisiteye sahip, hedeflenmiş antikanser ilaçların verilmesi için taşıma araçları olarak çok değerli ve etkili bir 'nanovektör' olarak da temsil edilebilir. Küçük, toksik olmayan, immünojenik olmayan ve zar kompozisyonu vücuttaki hücrelere benzer olduğu için insana özgü olduğundan hedef hücrelere ilaç verme aracı olarak kullanılabilir (Bu ve ark, 2018).

Eksozomlar ideal bir ilaç dağıtım aracının birçok özelliğine sahiptir. İlk olarak, eksozomlarda lipit, protein ve genetik materyallerin varlığı bu biyolojik materyallerin

eksozomlara yüklenebileceğini ima eder. Kimyasal ilaçlar, proteinler, RNA'lar, DNA'lar ve lipitler, toksisiteyi sınırlandırırken biyoyararlanımlarını arttırabilen farklı yöntemlerle eksozomlara yüklenebilir. Lipitte çözünen ilaçlar, immünojenik veya toksik ilaçların hedef hücrelere taşınımı için idealdirler (Şekil 16) (Lim ve Kim, 2019).



Şekil 16. Terapötik moleküllerin eksozomlara yüklenmesi. Eksozomlara RNA'lar, çeşitli kimyasal ilaçlar, plazmid/vektörler ve proteinler yüklenebilir (Lim ve Kim, 2019).

Eksozomların, terapötik ilaç verme aracı olarak kullanılması amacıyla yapılan kapsamlı araştırmalardan bazıları Tablo 3' de yer almaktadır.

Tablo 3. Eksozomların ilaç dağıtım aracı olarak kullanıldığı bazı çalışmaların özeti

Çalışma	Referans
Kurkumin iletiminin iyileştirilmesi için eksozom kullanılması	Sun ve ark, 2010
T hücrelerine siRNA iletimi için eksozomların kullanılması	Wahlgren, 2012
siRNA'nın HeLa ve Fibrosarkom hücre hattına (HT1080) eksozomlar ile taşınımı	Shtam ve ark, 2013
Antitümör miRNA'nın meme kanseri hücrelerine eksozom aracılığıyla iletimi	Ohno ve ark, 2013
Doksorubisinin tümör dokusuna iletiminde eksozomların kullanılması	Tian ve ark, 2014
Kan beyin bariyerine eksozom aracılığıyla paklitaksel ve doksorubisin iletimi	Yang ve ark, 2015
Parkinson tedavisi için BBB boyunca eksozomlarla katalaz verilmesi	Haney ve ark, 2015
Kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncine karşı eksozom ile kapsüllenmiş paklitakselin gelişimi	Kim ve ark, 2016
Dendritik hücreden türetilen eksozomların karaciğer kanserindeki etkileri	Lu ve ark, 2017
Parkinson hastalığında dopamin yüklü eksozomların terapötik etkinliğinin araştırılması	Qu ve ark, 2018

2.13. Klinik Uygulamalarda Eksozomlar

Klinik ortamlarda, eksozomal bazlı ilaç verme sistemlerini tanıtmak için çeşitli yaklaşımlar uygulanabilir. İlk olarak, aferez ile periferik kandan toplanan lökositler çoğaltılabilir ve kültürlenebilir, gerekirse spesifik hücre tiplerine göre ayırt edilebilir ve daha

sonra eksozomal taşıyıcılar terapötik bir madde ile yüklenebilir ve hastaya tekrar uygulanabilir (Batrakova ve Kim, 2015).

Eksozomlar birçok klinik çalışmada kullanılmak üzere onaylanmıştır ve insanlarda eksozom temelli terapilerle ilgili deneyimler hızla genişlemektedir (Mignot, 2006). İleri metastatik melanomlu 15 hastanın monosit kültürlerinden eksozomlar saflaştırılmıştır. Daha sonra eksozomlara ex vitro melanom antijeni yüklenmiş ve terapötik aşılama yoluyla anti-melanom bağışıklığını arttırmak amacıyla hastalara tekrar verilmiştir. Hastaların 21 aya kadar otolog ekzomomları iyi tolere edildiği bildirilmiştir. İlk eksozom Faz I denemesi, büyük ölçekli eksozom üretiminin fizibilitesini ve eksozom uygulamasının güvenliğini vurgulamıştır (Escudier ve ark, 2005). Benzer bir çalışmada, ileri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarına 4 hafta boyunca haftada bir otolog eksozom enjekte edildi ve benzer düşük seviyeli bağışıklık tepkileri gözlemlendi (Morse ve ark, 2005). Bir başka çalışmada, kolorektal kanserin immünoterapisinde granülosit-makrofaj koloni uyarma faktörü (GM-CSF) ile birlikte asit türevi eksozomlar kullanılmıştır. İlerlemiş kolorektal kanserli toplam 40 hasta bu klinik çalışmaya dahil edilmiş ve 100 ila 500 µg ekzomal formülasyonlar kullanılmıştır. Eksozom bazlı tedavilerin, antijene özgü T lenfosit yanıtının indüklenmesinde güvenli, uygulanabilir ve etkili olduğu bildirilmiştir (Dai ve ark, 2008).

Yapılan bir klinik çalışmada mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomlara MiR-12 yüklemesi yapılmış ve iskemik inme geçiren hastalara uygulanarak 12 ay boyunca hastaların iyileşme süreleri izlenmiştir. Devam eden bu klinik çalışmada (NCT03384433) doublecortin ve von Willebrand faktörün sinir sistemi hücrelerinin sayısını önemli ölçüde artıracığı düşünülmektedir.

Farklı bir çalışmada diş hastalıkları arasında sıklıkla rastlanan periodontitise karşı adipoz dokudan izole edilen kök hücrelerden salınan eksozomların tedavi edici etkinlikleri araştırılmaktadır. Bu klinik çalışma (NCT04270006) faz1 aşamasında olup dişeti iltihabı, cep derinliği, kemik düzeylerindeki değişiklikler hastalarda eksozom uygulaması ile izlenmektedir.

Koronavirüs pnömonisi olan şiddetli hastaların tedavisinde allojenik adipoz mezenkimal kök hücrelerden türetilen eksozomların aerosol inhalasyon yolu ile hastalara uygulanmaktadır. Devam eden pilot klinik çalışmada (NCT04276987) adipoz mezenkimal kök hücrelerden (MSC-Exo) türetilen eksozomların aerosol solunmasının güvenliğini ve etkinliğini araştırmaktır.

Son olarak, üzümlerden elde edilen eksozomlar, James Graham Brown Kanser Merkezi'nde ([NCT01294072](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01294072)) başlatılan faz I klinik araştırmalarda kanser tedavisi için

kullanılmıştır. Bu çalışmada, bitki kaynaklı eksozomlara düşük moleküler ağırlıklı bir anti-enflamatuar ajan olan kurkumin yüklenmiş ve kolorektal kanserli hastalara oral yoldan uygulanmıştır. Çalışmanın tahmini olarak Aralık 2022' de bitmesi planlanmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Kullanılan Malzeme	Marka
HeLa hücre hattı	ATCC–CCL-2
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma
Fetal Bovin Serum (FBS)	Gibco
%25 Trypsin-EDTA (1X)	Gibco
Penicilin-Streptomycin (10.000 units)	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS)	Sigma
Kemilüminesans Reaktif	Santa Cruz

3.2. Kullanılan Cihazlar

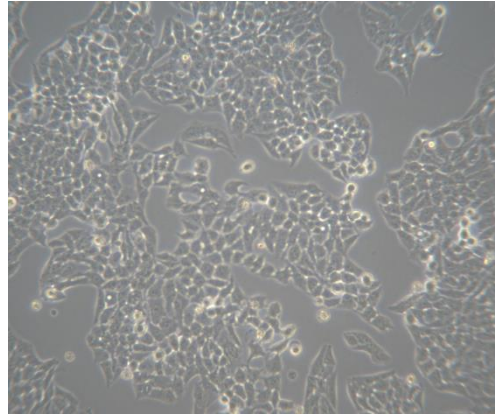
Cihaz	Marka
Laminar Kabin	HERA safe
CO ₂ İnkübatör	Nüve EC 160
Microplate Spektrofotometre	BioTek Epoch
SDS-PAGE	BioRad (Tetra Cell)
Western Blot	BioRad (Transblot Turbo)
Mikroskop	Olympus BX51
Santrifüj	Hettich / Ependorf
Elektroporatör	BioRad Gene-Pulser Xcell
Ultrasantrifüj	Beckman Coulter
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)	FEI Quanta 250 FEG
Zeta-sizer Nano ZS	Malvern
Real Time PCR	Thermo Fisher Scientific -US
Kemilüminesans ve Floresan Görüntüleme Sistemi	Syngene

3.3. Hücre Kültürü

Çalışmalarda insan serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücre hattı kullanıldı. HeLa hücreleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Merkezi (BİLTEM) laboratuvarında -196 °C sıvı azotta saklanan, Prof. Dr. Özge ÇEVİK'e ait hücre stoklarından elde edildi.

3.3.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması

HeLa hücreleri 90 mm' lik steril hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler, DMEM + % 10 FBS + penisilin (100 U/ml) + streptomisin (100 µg/ml) içinde, 37 °C' de, % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılıp çoğaltıldı (Resim 1).



Resim 1. HeLa hücrelerinin mikropkop görüntüsü (10x)

3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

Hücreler büyütülüp, % 80 - 90 oranında çoğaltıldığında pasajlama işlemi uygulandı. Öncelikle besiyeri çekilerek 2 kez DPBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve % 5 CO₂ içeren etüvde 1 dk bekletildikten sonra, Tripsin-EDTA'nın aktivitesini durdurmak için FBS içeren medium konuldu. Kalkan hücreler falkona toplanıp 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp, çöken pellet medyumda süspansiyon edilerek,

yapılacak işlemlere göre hücre kültür plaklarına ekim yapıldı.

Çalışma süresince belirli aralıklarda hücreler stoğa alınmak üzere donduruldu. Hücreleri pasajlamak için yapılan tüm işlemler tekrarlandıktan sonra hücreler dondurma besiyeri içerisinde -80 °C’ de saklandı.

3.3.4. Hücre Sayımı

Hücre plaklarına ekim yapılmadan önce, her bir kuyucuğa belli sayıda hücre ekebilmek için hücreyi pasajlandıktan sonra Tripan Mavisi ile boyanmış Thoma Lamında (Iso Lab) hücre sayımı yapıldı. Thoma lamı yönteminin esası; mikroskop altında 0,1 mm³ hacimde sayım yapılarak hesaplama yardımıyla numunenin bir ml’ sinde bulunan hücre sayısını belirlemektir.

Sayım için; 10 µL hücre süspansiyonu, 15 µl PBS ve 25 µl Tripan Mavisi karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 5 dakika sonunda Thoma Lamına 10 µl yükleme yapıldı ve ışık mikroskopunda sayım gerçekleştirildi. Ölü hücreler tripan mavisi ile boyanırken, canlı hücrelerde boyanma gözlemlenmedi. Yalnızca boyanmamış olan canlı hücreler sayıldı. Thoma Lamındaki 16 kareli olan 4 bölgede ayrı ayrı sayım yapıldı ve bu 4 bölgenin ortalaması alındı. Seyreltme faktörü dikkate alınarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı ve böylece her bir kuyucuğa ekilecek olan hücre miktarı belirlendi (Resim 2).



Resim 2. Thoma lamında sayım için hücrelerin hazırlanması

3.4. Eksozomların İzolasyonu

HeLa hücrelerinden eksozom izolasyonu için hücreler 90 mm hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler hücre kültür kabının tabanına yapıştıktan ve % 80 kabın tabanını kapladıktan

sonra mevcut besiyeri alınarak yerine FBS içermeyen besiyeri eklendi. Hücre kültürü için kullanılan FBS yüksek oranda eksozom içerdiğinden çapraz kontaminasyonu engellemek ve kirliliği elimine edebilmek için hücreler serumsuz besiyerinde 48 saat bekletildi. Serumsuz besiyerinde 48 saat bekletildikten sonra, hücrelerin yoğunlukları ve canlılıkları mikroskop altında incelendi. Daha sonra medyumlar toplanıp ve Beckman Coulter ultrasantrifüj cihazında 90.000 rpm' de 8 saat santrifüj edildi (Resim 3). Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet süspansiyon edildi. % 100 saflıkta eksozom elde edebilmek amacıyla Cell guidance systems Exo-spin™ (Cat EX03-50) eksozom saflaştırma kiti kullanıldı.

1. 100 µl örnek bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 300 ×g' de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve kalan hücre kalıntılarını gidermek için 16.000 ×g' de 30 dakika santrifüj edildi.
3. Kolon kullanmadan önce 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Exo-spin™ kolonu atık toplama tüpüne yerleştirildi. Kolon üzerindeki koruyucu tampon aspire edilerek atıldı.
4. Kolon üzerine 250 µl PBS eklendi ve 50 ×g' de 10 saniye boyunca santrifüjlendi. İşlem toplamda 2 kez tekrarlandı.
5. Eksozom içeren süpernatant ve kolon yeni bir atık tüpüne yerleştirildi.
6. 60 saniye boyunca 50 ×g' de santrifüjlendi. Altta kalan sıvı atıldı.
7. Kolon 1,5 ml' lik mikrosantrifüj toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonun üstüne 200 µl PBS eklendi.
8. Saflaştırılmış eksozomları elüe etmek için 50 ×g' de 60 saniye santrifüjlendi.



Resim 3. Ultrasantrifüj cihazı ve santrifüj tüpleri

3.5. Eksozomlara Docetaxel (Doc) Yüklenebilmesi

İzole edilen eksozomlara Docetaxel yüklenebilmesi için elektroporasyon tekniği kullanıldı. Bu teknik, iletken bir çözelti içinde süspansiyon edilen eksozomlara bir elektrik alanı uygulayarak eksozom zarında küçük gözenekler oluşturur. Elektrik akımı, eksozomların fosfolipid çift tabakasını bozar, böylece geçici gözeneklerin oluşmasına neden olur. İlaçlar daha sonra gözenekler yoluyla eksozomların iç kısmına yayılabilir. (Luan ve ark, 2017).

Saflaştırılmış eksozom ve Doc farklı oranlarda karıştırıldıktan sonra elektroporasyon kuvvetlerinde 160 V ve 500 μ F' de bekletildi ve cihaz optimizasyon koşullarında ilaç yüklemesi yapıldı (Resim 4).



Resim 4. Elektroporasyon cihazı ve küveti

Daha sonra 90.000 rpm' de santrifüj edilerek, Docetaxel yüklü eksozomların (exo-doc) ayırılması sağlandı. İlaç ve eksozom ayırımı yapılarak Exo-Doc elde edildi (Resim 5).



Resim 5. Docetaxel yüklü eksozomların santrifüj sonucu görüntüsü

3.6. Eksozomların Boyut ve Karakterizasyonlarının Belirlenmesi

3.6.1. Eksozomların Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Görüntülemesi

Eksozomlar, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsünden hizmet alımı yapılarak Taramalı Elektron Mikroskobu ile görüntülendi. Altın kaplama yapılarak, morfolojik değerlendirilmeleri için SEM (FEI Quanta 250 FEG) ile taramalar yapıldı (Resim 6).



Resim 6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazı

3.6.2. Eksozomların Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Eksozomların partikül büyüklükleri ve zeta potansiyellerinin ölçülmesinde Malvern NanoZS cihazı kullanıldı (Resim 7). PBS ile seyreltilerek hazırlanan eksozomlar ve docetaxel yüklü eksozomlar ölçüm kuvvetlerine yerleştirildi. Ölçüm kuvvetlerinde cihazdaki gerekli ayarlamalar yapıldıktan sonra, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri (PS: Particle size, PDI: Polydispersity Index, ZP: Zeta Potential) yapıldı. PS olarak hidrodinamik çap (hydrodynamic diameter) kullanıldı. Her bir ölçüm üç defa tekrarlandı.



Resim 7. Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümlerinin yapıldığı Zetasizer cihazı

3.6.3 Docetaxelin Eksozomlara Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Docetaxelin eksozomlara enkapsüle edilmesinin etkinliğini ve etkin madde yükleme kapasitelerini belirlemek için elde edilen formülasyonda eksozomların protein tayini yapılarak içerisindeki miktar hesaplandı. Docetaxelin UV’ de spektrum alındığı zaman en uygun ölçüm yapılabilecek absorbans 230 nm olarak belirlendi. Bu yüzden Docetaxel yükleme miktarının hesaplanmasında UV spektrofotometrede 230 nm’ de ölçülen absorbanslar kullanıldı ve aşağıdaki formüllere göre enkapsülasyon etkinliği ve madde yükleme kapasitesi hesaplandı.

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{\text{Eksozomlardaki Docetaxel miktarı}}{\text{Başlangıçta kullanılan Docetaxel miktarı}} \times 100$$

$$\% \text{ Etkin madde yükleme kapasitesi} = \frac{\text{Eksozomlardaki Docetaxel miktarı}}{\text{Eksozomların miktarı } (\mu\text{g})} \times 100$$

3.7 Hücrelere Eksozom Uygulanması

Docetaxel yüklü eksozomların, serviks kanser hücresi olan HeLa hücrelerini hedefleme potansiyelleri invert mikroskopta görüntülenerek araştırıldı. Mikroskopik görüntüleme için, HeLa hücreleri 200.000 hücre/ml yoğunluğunda 24 kuyulu plakalarda 37 °C’de % 5 CO₂ içeren ortamda 24 saat boyunca inkübe edildi. İlaç yüklü eksozom ve ilaç yüksüz boş eksozom

örneklerinden ortama ilave edildi. 24 ve 48 saat sonra mikroskopta hücre morfolojileri kontrol edildi ve hücre sayımı yapıldı.

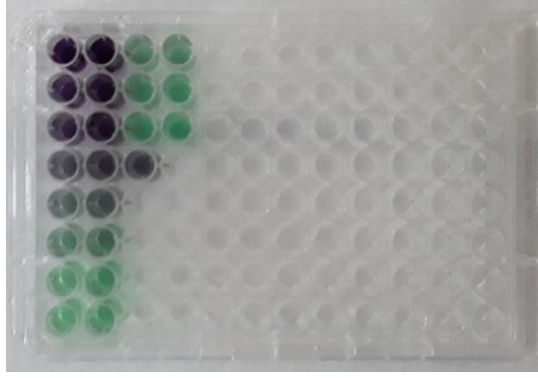
3.8. BCA Protein Tayini

Eksozomlardaki protein konsantrasyonunu belirlemek için Bicinchoninicasit (BCA) protein tayin kiti (Smart BCA Protein Assay Kit by Intron, cat no: 21071) kullanıldı. İki BCA molekülünün bir Cu^{+1} iyonu ile şelasyonuyla mor renkli ürün oluşur. (20-2,000 ug / ml) BCA ile renk oluşumundan proteinin makromoleküler yapısı, peptit bağlarının sayısı ve dört belirli amino asidin (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) varlığının sorumlu olduğu bildirilmiştir. Protein konsantrasyonları hesaplanırken genellikle sığır serum albümini (BSA) gibi yaygın bir proteinin standartları referans alınmaktadır. Proteinden bilinen konsantrasyonda bir dizi seyreltme hazırlanır ve bilinmeyen örnekteki absorbans miktarı, standart ile karşılaştırılarak örnekteki toplam protein miktarı hesaplanmaktadır.

Hücre lizis solüsyonu ile toplanan örnekler BCA protein tayin kitine uygun şekilde 96 kuyucuklu elisa plakasına 2 tekrarlı olacak şekilde yüklendi. Üzerine hazırlanan BCA solüsyonu eklenerek 37 °C' de 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı (Resim 8). Süre sonunda 562 nm' de ölçüm alındı ve alınan absorbans değerleri Microsoft Excel programına aktarılarak toplam protein miktarları hesaplandı.

Hazırlanan çözeltiler:

- BCA solüsyonu: Reaktif A ve Reaktif B, 1:50 oranında hazırlandı.
- BCA standart solüsyonu: 2 mg / ml stok solüsyon, PBS ile 2000 µg / ml, 1500 µg / ml, 1000 µg / ml, 500 µg / ml, 250 µg / ml, 125 µg / ml ve 25 µg / ml olacak şekilde seri dilüsyon hazırlandı.
- Eksozom içeren örnekler 1:50, 1:100 ve 1:1000 olacak şekilde PBS ile seyreltildi.
- 96 kuyucuklu elisa plakasına 25 µl örnek veya 25 µl standartlar yüklendikten sonra üzerlerine 200 µl BSA solüsyonu eklendi.
- 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında microplaka okuyuculu spektrofotometrede 562 nm' de ölçüm alındı.



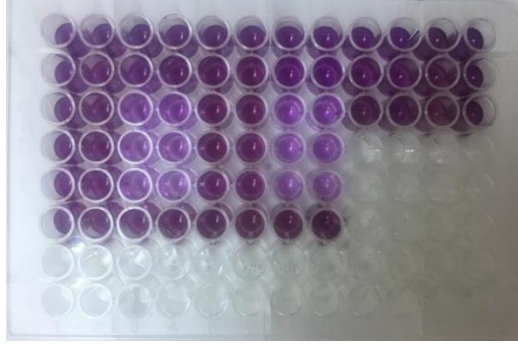
Resim 8. BCA yöntemi ile protein konsantrasyonunun belirlenmesi

3.9. MTT Deneyi ile Hücre Canlılığının Saptanması

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) içerisinde fenol kırmızısı bulunmayan hücre kültür ortamı veya tuz solüsyonunda hazırlandığında sarımtırak bir çözelti oluşturan, suda çözünen bir tetrazolyum tuzudur. Çözünmüş haldeki MTT aktif hücrelerin mitokondrial dehidrogenaz enzimleri tarafından çözünmez özellikteki mor formazan kristallerine dönüştürülür (Slater ve ark, 1963). Hücre metabolik faaliyet gösteriyorsa daha fazla mitokondriyal enzime sahip olacağından daha fazla tetrazolin tuzunu indirgemesi beklenir. Formazon oluşumunun fazla olduğu kuyularda daha koyu mor renk gözlenirken, daha az olduğu kuyularda açık mor rengi gözlenir. Suda çözünmeyen bu formazan kristalleri izopropanol, DMSO gibi çözücüler kullanılarak çözünür ve çözünen materyal spektrofotometrik yolla ölçülür (Turut ve ark, 2020).

Docetaxel ve docetaxel yüklü eksozomların, HeLa kanser hücreleri ve NIH-3T3 fibroblast hücreleri üzerinde gösterdikleri sitotoksosite, MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Hücreler 96 kuyucuklu plak içine, her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde 100 µl büyüme medyumu olan DMEM içine ekildi. Hücreler, 24 saat, 37 °C'de ve % 5 CO₂ içeren ortamda çoğaltıldı. Sitotoksosite çalışmaları için hücreler 0-1000 nM docetaxel, 0-10 µg/ml eksozom içerecek şekilde farklı konsantrasyonlarıyla 24 saat boyunca inkübe edildi. Her konsantrasyondan 5 tekrar çalışıldı. 24 saat sonunda, 5 mg/ml olacak şekilde PBS içerisinde çözülerek hazırlanan MTT çözeltisinden her bir kuyucuğa 10 µl ilave edildi ve hücreler 37 °C'de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı ve DMSO eklenerek oda sıcaklığında formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı ve ardından spektrofotometrede 570 nm' de ölçüm yapıldı (Resim 9).

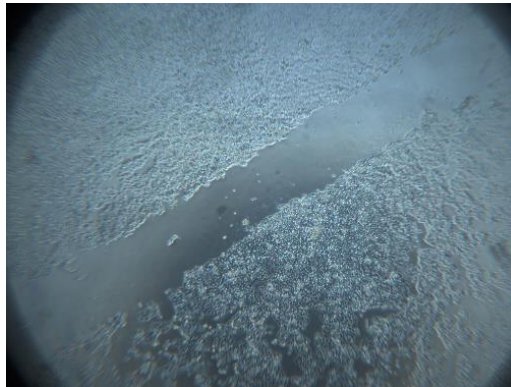
Eksozomlara ilaç yüklemesi yapılmadan önce saf ilacın yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonları (IC 50) hesaplandı.



Resim 9. Formazan kristallerinin DMSO ile çözüldükten sonraki görüntüsü

3.10. İlaç Yüklü Eksozomların Migrasyon Üzerine Etkisi

HeLa hücrelerinden elde edilen ilaç yüklü eksozomların, hücre migrasyonuna etkisinin araştırılması amacıyla Scratch testi yapıldı (Cevik ve ark 2019). 24 kuyucuklu plak içine HeLa hücreleri ortalama 200.000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. HeLa hücrelerinde çizgiler oluşturuldu ve örnekler ilave edildi. 0. ve 24. saat görüntüleri alınarak, ilaç yüklü eksozomların migrasyon ve proliferasyon üzerine olan etkisi değerlendirildi (Resim 10).



Resim 10. HeLa hücrelerine uygulanan scratch testi mikroskop görüntüsü.

3.11. Protein ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

3.11.1 SDS-PAGE/Western Blot Analizi

Suda çözünebilir ve çözünemeyen hücrel proteinlerin denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırılmasında Walker (2002) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. İşlem sırasında kullanılan çözeltiler Tablo 4’de, verilmiştir.

Tablo 4. SDS-PAGE/WESTERN BLOT deneyleri için hazırlanan çözeltiler ve bileşenleri

Çözeltiler	Bileşenleri
% 30 Stok Akrilamid-Bis çözeltisi	Akrilamid 30 g Bis 0.8 g Distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.
1.5 M Tris- HCl tamponu pH:8.8	Tris base 18,15 g 6 N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. Distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.
0.5 M Tris- HCl tamponu pH:6.8	Tris base 6 g 6 N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. Distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.
%10 Sodyum dodesilsülfat (SDS)	SDS 10 g Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
%10 Amonyum persülfat	Amonyum Persülfat 0.1 g Distile su ile 1 ml'ye tamamlandı.
2X Örnek yükleme tamponu	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 2.5 ml Gliserol 1.25 ml % 10 SDS 2 ml % 5 Bromofenol mavisi 0.2 ml Betamerkaptoetanol 0.5 ml dH ₂ O 3.55 ml
1X Transfer tamponu	Tris 5.82 g Glisin 2.93 g %10 SDS 3.75 ml Methanol 200 ml (en son konlur) Distile su ile 1000 ml' ye tamamlandı.
10X Stok yürütme tamponu (pH 8.3)	Tris 30.3 g Glisin 144 g SDS 10 g Distile su ile 1000 ml' ye tamamlandı. Kullanım sırasında 50ml 10X yürütme tamponuna 450ml distile sui lave edilerek 1X tampon çözeltisi kullanıldı.
10X TBS	Tris 24,2 g NaCl 80 g Distile su ile 1000 ml' ye tamamlandı.
1X TBST	Tween 20 10ml 10X TBST 90 ml
Bloklama çözeltisi % 2 BSA	BSA 1 g 50 ml TBST içinde çözdürüldü.

3.11.1.1. Hücre lizatı elde edilmesi

HeLa hücreleri 100.000 hücre / ml yoğunluğunda 6 kuyulu plakalarda, 24 saat 37 ° C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler toplandıktan sonra örnek yükleme tamponu ile 95 °C' de 5 dk denatüre edildi. Elde edilen örnekler -20 °C'de saklandı.

3.11.1.2 Elektroforez

Elde edilen proteinlerin elektroforezi için poliakrilamid jel hazırlandı. Yürütme jeli % 12' lik yükleme jeli %4' lük olarak hazırlandı. Tablo 5' de verilen oranlarda yürütme ve yükleme jeli hazırlandı. APS ve TEMED karışıma en son eklendi. Jellerin hazırlanacağı camlar ilk olarak alkolle temizlendi. Ardından camların altından sızdırma olmayacak şekilde ayarlanarak jel dökme aparatına yerleştirildi. Jel dökme aparatına yerleştirilen iki cam arasındaki boşluğa ilk olarak % 12' lik yürütme jeli döküldü. Jel döküldükten sonra hava kabarcıklarının giderilmesi ve jeli düzeltmek için üzerine bir miktar izopropanol döküldü. Jel polimerleştikten sonra izopropanol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı. Ardından % 4' lük yükleme jeli döküldü ve taraklar takılarak polimerleşmesi beklendi.

Tablo 5. Poliakrilamid jel içerikleri

% 12' lik Yürütme Jeli	% 4' lük Yükleme Jeli
3.4 ml distile su	6.1 ml distile su
4 ml % 30 Akrilamid/Bisakrilamid	1.3 ml % 30 Akrilamid/Bisakrilamid
2.5 ml 1.5 M Tris- HCl pH:8.8	2.5 ml 0.5 M Tris- HCl pH:6.8
0.1 ml %10 SDS	0.1 ml %10 SDS
50 µl %10 APS	50 µl %10 APS
5 µl TEMED	10 µl TEMED

Jel dökme aparatlarından çıkarılan camlar, yürütme tankına dikkatlice yerleştirildi. Tankın içine yeterli miktarda 1X yürütme tamponu dolduruldu. Örnekler kuyu başına 25 µg/ml oranında kuyucuklara yüklendi. Bir kuyuya 2 µl standart yüklendi. Elektrotların anot ve katot kısımlarının doğru şekilde bağlandığından emin olduktan sonra yükleme jeline 100 V, yürütme jeline 110 V akım uygulanarak elektroforez yapıldı.

3.11.1.3 Transfer işlemi

Elektroforez sonrası jelin % 4' lük yükleme kısmı uzaklaştırıldı. % 12' lik kısmı transfer çözeltisine alındı. Jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için yarı kuru sistemle immuno blotlama yapıldı. PVDF membran ve jel sandwich yapılarak transfere hazır hale getirildi ve 25 Volt ve 1 Amper 30 dakika gerçekleştirildi.

3.11.1.4 Antikor uygulaması ve görüntüleme

Proteinlerin PVDF membrane transferinden sonra membran % 2' lik BSA ile oda ısında bloklandı. Hazırlanan primer antikor ile +4 °C' de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBST ile 3 kez 5' er dakika yıkandı. Yıkamalardan sonra primer antikora uyumlu sekonder antikor eklenerek oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBST ile 3 kez 5' er dakika yıkandı.

Yıkama işleminin hemen ardından görüntüleme işlemine geçildi. Görüntüleme için Kemilüminesans substrat içeren çözelti (Santa Cruz Immuno Cruz™ Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan solüsyonlar 1:1 oranında karıştırılarak membran üzerine uygulama yapıldı. Birkaç dakika bekledikten sonra membranda belirginleşen bantların SyneGene görüntüleme sistemi kullanılarak görüntüsü alındı ve bantların analizi software ile yapıldı. Referans protein olarak GAPDH kullanıldı.

Kullanılan Primer antikorlar: GAPDH (1:1000, sc-25778), Bax (1:1000, sc-), Bcl-2 (1:5000, sc-), Kaspaz-3 (1:1000, sc-17320), Kaspaz-9 (1:2500, sc-33759)

Kullanılan sekonder antikorlar (1:3000): (HRP konjugatlı sc-2030(R), sc-2020(G), sc-516102(M))

3.11.2 RNA İzolasyonu ve RT-PCR

RNA Spin toplam RNA izolasyon kiti (Intron,cat no:17211) kullanılarak üretici firmanın önerilerine uygun olarak total RNA izole edildi. Total RNA izolasyon protokolü:

1. HeLa hücreleri 100.000 hücre/ml yoğunluğunda 6 kuyulu plakalarda, 24 saat 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kuyulara örnekler belirli oranlarda konularak inkübasyonlar yapıldı. Hücrelerin mediumları toplandı. Her bir kuyucuktaki hücreler,

kit içerisinde bulunan 350 µl RNA hücre patlatma tamponu ile kazındı ve hücre lizatları toplandı.

2. Lizatların üzerine 350 µl % 70' lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
3. Kolonlar 2 ml' lik ephendorfa yerleştirildi.
4. Çözelti spin kolona alınarak 13.000 rpm' de 30 saniye santrifüjlendi.
5. Santrifüjleme işleminden sonra kolondan çıkan sıvı uzaklaştırılarak kolona 700 µl yıkama tamponu A eklendi ve 13.000 rpm' de 30 saniye santrifüjlendi.
6. Tekrar kolondan çıkan sıvı uzaklaştırılıp 700 µl yıkama tamponu B eklendi ve 13.000 rpm' de 30 saniye santrifüjlendi.
7. Kolondan çıkan sıvı uzaklaştırıldı ve RNA-spin™ membranını kurutmak için 13.000 rpm' de 2 dakika santrifüjlendi.
8. Kolon yeni bir Ependorf tüpe alındı ve üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklendi.
9. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildikten sonra 13.000 rpm' de 1 dk santrifüjlendi.
10. Total RNA miktarları nanodropta ölçün alınarak hesaplandı.
11. Derin dondurucuda -20 °C' de saklandı.

RNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi için cDNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. İzole edilen ve kalıp olarak kullanılan RNA' lardan, revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 6. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği (1 örnek için)

RNA	50 µl
Oligo (dT) 18	1 µl
Randem hegzamer	1 µl
5X Reaction buffer	4 µl
Ribonükleaz	1 µl
10 nM Dntp mix	2 µl
Reverse transkriptaz	1 µl
Toplam	60 µl

Oligo dT, randem hegzamer ve RNA örnekleri Tablo 6' da verilen oranlarda karıştırılıp 65 °C 5 dakika inkübe edildi. Çoğaltma karışımından PCR tüplerine 8 µl dağıtıldı. Her PCR tüpünün üzerine çalışılacak RNA örneğininde içinde bulunduğu karışımdan 52 µl eklendi. Daha sonra 42 °C 60 dakika, 70 °C 5 dakika reaksiyon koşulları girilerek cDNA' lar sentezlendi. Elde

edilen cDNA miktarları nanodropta ölçüldü. Apoptoz ve nekroz mekanizmaları ilişkili genlerin ekspresyon analizi için Real-time PCR kullanıldı. Uygulama SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Real-time PCR’da Tablo 7’ de verilen BAX, Bcl-2, Kaspaz-3 ve GAPDH genleri için dizayn edilmiş primerler kullanıldı.

Tablo 7. RT- PCR' da kullanılan primerler

Primer	Sekans	Bç
BAX	F 5'-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTT-3' R 5'-TCCAATGTCCAGCCCATGAT-3'	92 bp
Bcl-2	F 5'-GACAGAAGATCATGCCGTCC-3' R 5'-GGTACCAATGGCACTTCAAG-3'	78 bp
Kaspaz-3	F 5'-CAGTGGAGGCCGACTTCTG-3' R 5'-TGGCACAAAGCGACTGAT-3'	102 bp
GAPDH	F 5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3' R 5'-CCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'	72 bp

Real-Time PCR master mix içeriği (1 örnek için):

SYBR Green Master Mix: 10 µl

F primer: 1 µl

R primer: 1 µl

Tablo 8. RT-PCR içeriği

Örnek	cDNA	Su	PCR master mix	Toplam
Örnek 1	1.97 µl	6.03 µl	12 µl	20 µl
Örnek 2	2.43 µl	5.57 µl	12 µl	20 µl
Örnek 3	2.08 µl	5.92 µl	12 µl	20 µl
Örnek 4	2.27 µl	2.27 µl	12 µl	20 µl

RT-PCR için cDNA dilüe edildi ve Sybr Green master mix kullanılarak reaksiyon kuruldu. Her bir kuyucukta Tablo 8' de verilen değerler olacak şekilde karışım hazırlandıktan sonra aşağıdaki programa uygun şekilde qRT-PCR kuruldu.

95 °C 5 dk, 95 °C 30 sn, 55°C 30 sn, 72 °C 30 sn, 72 °C 4 dk 40 döngü

3.12. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin İncelenmesi

Kaspaz-3 apoptoz için hem içsel hem de dışsal yolda etkin olan önemli bir belirteçtir. HeLa hücrelerinde Exo ve Exo-Doc'un apoptotik aktivite gösterip göstermediği ticari kit yardımıyla (Sigma CASP3C-1KT) kit protokolüne uygun olarak çalışıldı. Hücreleri 12 kuyucuklu hücre kültür platlerine ekildi ve Exo ve Exo-Doc 24 saat % 5 CO₂ 'li etüvde 37 °C' de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücre medyumları çekilen hücreler PBS ile 1 defa yıkandı ve özel patlatma tampon eklenerek hücre lizatları toplandı. Toplanan lizatlar 12.000xg de 4 °C' de 5 dakika santrifuj edildi ve üst fazda kaspaz-3 aktivitesi bakıldı. Kaspaz-3 aktivitesi işaretlenmiş substrat olan DEVD-pNAnin kırılmasıyla açığa çıkan kromofor p-nitroanilitin (pNA) spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. 96 lik Elisa playt içerisindeki kuyucuklara 50 µL örnek ve üzerine 10 mM DTT içeren 2X reaksiyon tamponu konuldu. Örnekler karıştırıldıktan sonra 5 µL 4 mM DEVD-pNA substratı eklenerek 37 °C de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasındaki renk değişimi 405 nM de elisa okuyucusunda ölçüm yapıldı. Sonuçlar, kontrole göre kıyaslanarak kat artışı şeklinde verildi (Erdoğan ve ark, 2019).

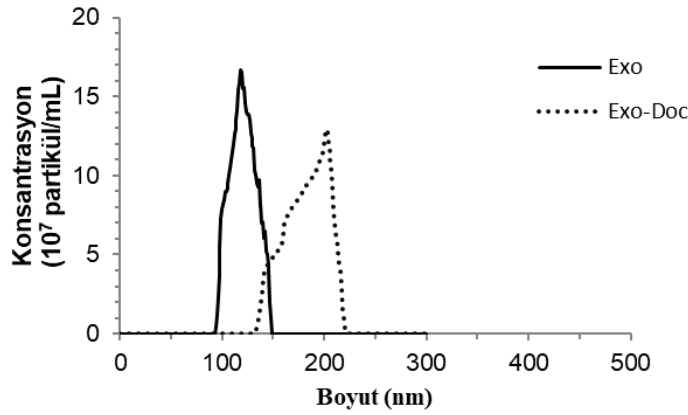
3.13. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında İstatistiksel analiz SPSS 15.0 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkların karşılaştırılması One Way Anova analizi yapılmıştır. Tüm veriler, ortalama ± standart sapma (SS) olarak verilmiş ve p <0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Eksozomların Boyut ve Karakterizasyonları

Serumsuz kültür ortamından toplanan HeLa eksozomları boyut, zeta potansiyeli ve morfolojileri ile karakterize edildi. İlaç yüklemesi yapılmayan eksozomların (Exo) boyutu 118.0 nm, elektroporasyon yöntemiyle docetaxel yüklemesi yapılan eksozomların (Exo-Doc) boyutu ise 202.9 nm ölçüldü (Şekil 17). Hazırlanan boş eksozomlar ile docetaxel yüklü eksozomlar karşılaştırıldığında partikül boyutları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 17. Eksozomların boyut büyüklükleri grafiği

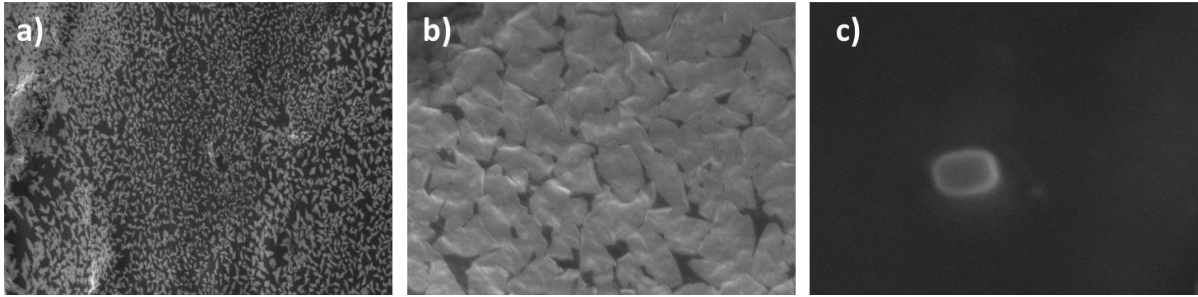
İlaç yüklemesi yapılmayan eksozomların (Exo) zeta potansiyeli -42.9 iken elektroporasyon yöntemiyle docetaxel yüklemesi yapılan eksozomların (Exo-Doc) zeta potansiyeli -11.1 olarak ölçüldü (Tablo 9).

Tablo 9. Eksozomların partikül büyüklüğü, polidispersite ve zeta potansiyel ölçümleri

	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
Exo	118.0±26.8	0.376±0.082	-42.9±3.5
Exo-Doc	202.9±21.21	0.341±0.008	-11.1±1.6

PS: Particle size, PDI: Polydispersity Index, ZP: Zeta Potential

SEM sonuçları, tüm eksozomların morfolojik olarak küresel yapıda olduğunu gösterdi.



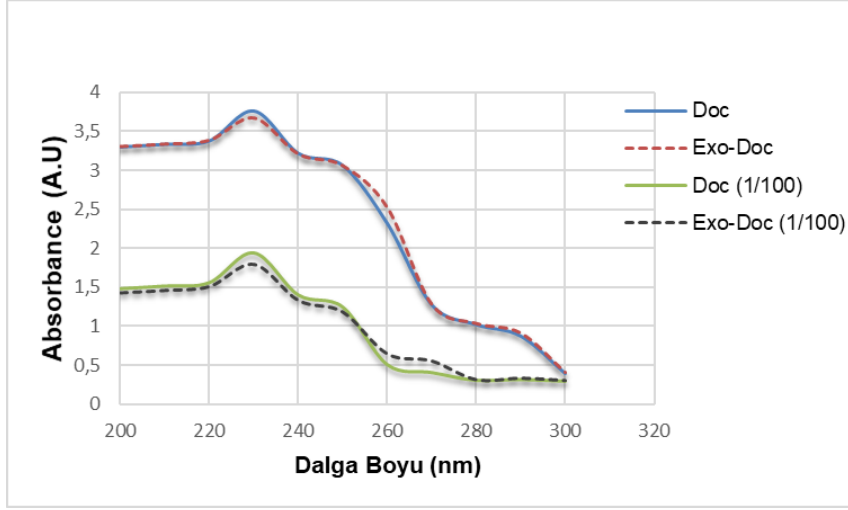
Şekil 18. Eksozomların SEM görüntüleri (a: 30 µm, b: 10 µm, c:1 µm)

4.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Eksozomlar içerisine Docetaxel yüklenmesinde % Enkapsülasyon etkinliği ve % Etkin madde yükleme kapasitesi miktarları, partikül büyüklüğü sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir. Docetaxel yükleme miktarının hesaplanmasında, UV spektrofotometrede 230 nm’ de ölçülen absorban grafiği Şekil 19’ da verilmiştir. Yapılan hesaplamalarda Tablo 10’ da yer alan değerler elde edilmiştir.

Tablo 10. % Enkapsülasyon etkinliği ve % Etkin madde yükleme kapasitesi değeri

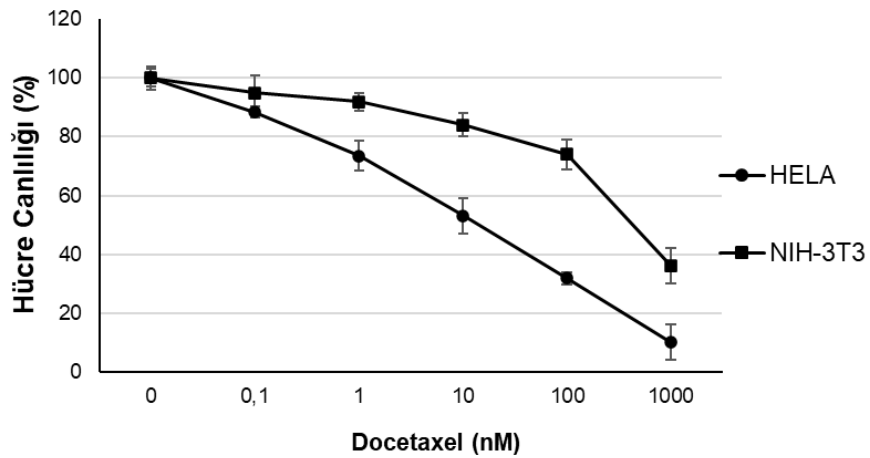
	%Enkapsülasyon etkinliği	% Etkin madde yükleme kapasitesi
Exo-Doc	65.85±12.43	36.23±5.01



Şekil 19. Docetaxel yüklem miktarlarının hesaplanmasına ilişkin grafik

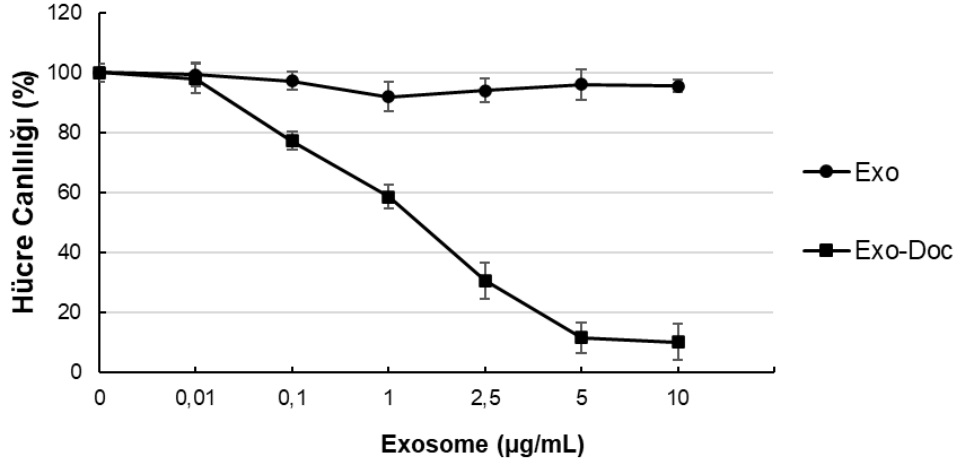
4.3. Sitotoksosite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Bölüm 3.9. ‘MTT Deneyi ile Hücre Canlılığının Saptanması’ başlığı altında anlatılan yöntemle sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır. Docetaxel çözeltisi ve docetaxel yüklü eksozom örneklerinin farklı konsantrasyonları ile kültür ortamında büyütülen kontrol HeLA ve NIH-3T3 hücreleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada HeLa ve NIH-3T3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla, boş eksozomlar çok fazla toksik etki göstermezken, Docetaxel yüklü eksozomların daha fazla toksik etki gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 20. Docetaxel'in HELA ve NIH-3T3 hücrelerinde MTT sonuçları

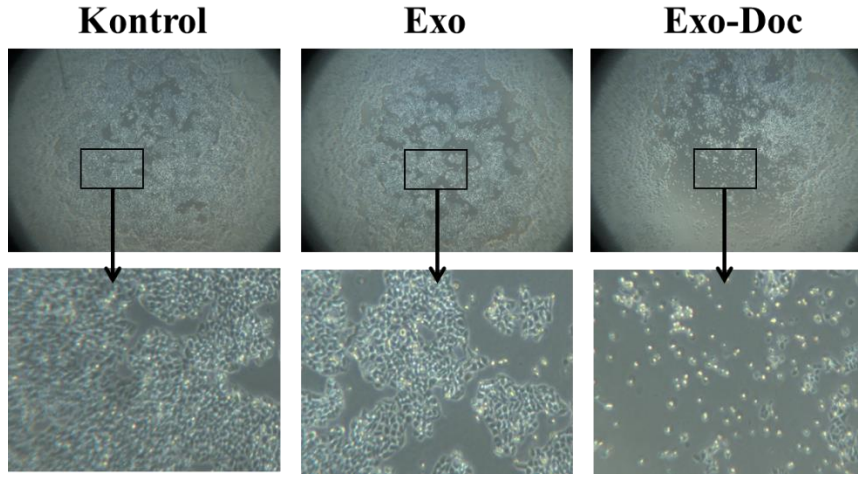
İlk olarak Docetaxel' in proliferasyona etkisi doza bağılı olarak araştırılmıştır. Bu deneyde Docetaxel' in uygulanan dozlarındaki hücreler (0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000) uygulamadan sonraki kontrol HeLa hücreleriyle kıyaslandığında özellikle 10 nM'lık konsantrasyonun canlı hücre sayısını % 50 azalttığı görülmektedir. Farklı konsantrasyonlarda denenen docetaxel çözeltisinin HeLa hattı üzerinde proliferasyonu baskılayıcı konsantrasyonu 10 nM olarak belirlendi. Hücre proliferasyon artışı 24. saat sonunda % Hücre Canlılığı oranı ile verilmiştir. 1 ve 10 nM dozlarda, 24. saat sonrasında normal hücrelerde anlamlı bir ölüm gözlenmez iken, kanser hücrelerinde yaklaşık % 60-70 oranında ölüm görülmektedir. Doz miktarı arttıkça her iki hücre grubunda da ölüm oranları artmaktadır (Şekil 20). Kanser hücrelerinde etki etmesi ve sağlıklı hücreler üzerinde etkisinin az olması nedeniyle çalışmada HeLA hücreleri ile devam edilmiştir.



Şekil 21. Exo ve Exo-Doc HELA hücrelerinde MTT sonuçları

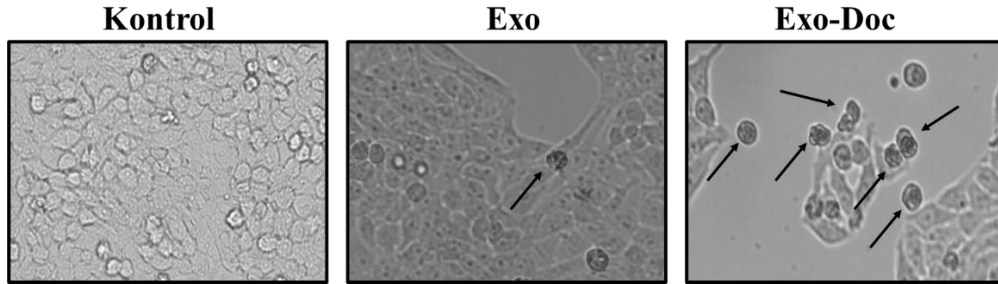
Eksozomların ve docetaxel yüklü eksozomların HeLA hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu elde edilen hücre ölüm grafiği Şekil 21' de görülmektedir. HeLa hücrelerinde 1µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda canlı hücre sayısını Exo-Doc'un % 50 ve daha fazla azalttığı görülmektedir. Aynı konsantrasyonda ilaç yükleme yapılmayan eksozomların hücre canlılığını azaltmadığı docetaxel yüklü eksozomların 24. saat sonunda HeLa hattı üzerinde proliferasyonu baskılayıcı rolü olduğu tespit edilmiştir. Exo-Doc konsantrasyonu arttıkça ölüm oranları artmaktadır.

HeLa hücreleri üzerine 1µg/ml olacak şekilde eşit miktarda konulan Exo ve Exo-Doc uygulaması invert mikroskopta kontrol edilmiştir. Hücre canlılıkları mikroskopta bütün olarak bakıldığı zaman, hücrelerin proliferasyonlarının Exo-Doc uygulaması ile azaldığı aynı zamanda hücrelerin yapışma eğilimlerinin azalarak birbirlerine yaklaşıp büyüyemediği, etkileşemediği görülmüştür (Şekil 22).



Şekil 22. HELA hücrelerinde hücre canlılığının mikroskop görüntüleri

HeLa hücrelerinin 1µg/ml konsantrasyonda Exo ve Exo-Doc uygulamasında 24 saat sonra morfolojik olarak incelenmesi invert mikroskop ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerde Exo-Doc uygulamasının HeLa hücrelerini hedefleyebildiği, hücre içerisine girerek hücrelerde apoptotik cisimcikleri oluşturdukları gözlenmiştir. Docetaxelin hücreleri öldürme yetenekleri ilaç yüklü eksozomlar aracılığı ile docetaxelin hücre içerisine girdiği ve buna bağlı olarak hücre ölümlerini artırdığı ve hücre sayılarında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 23).

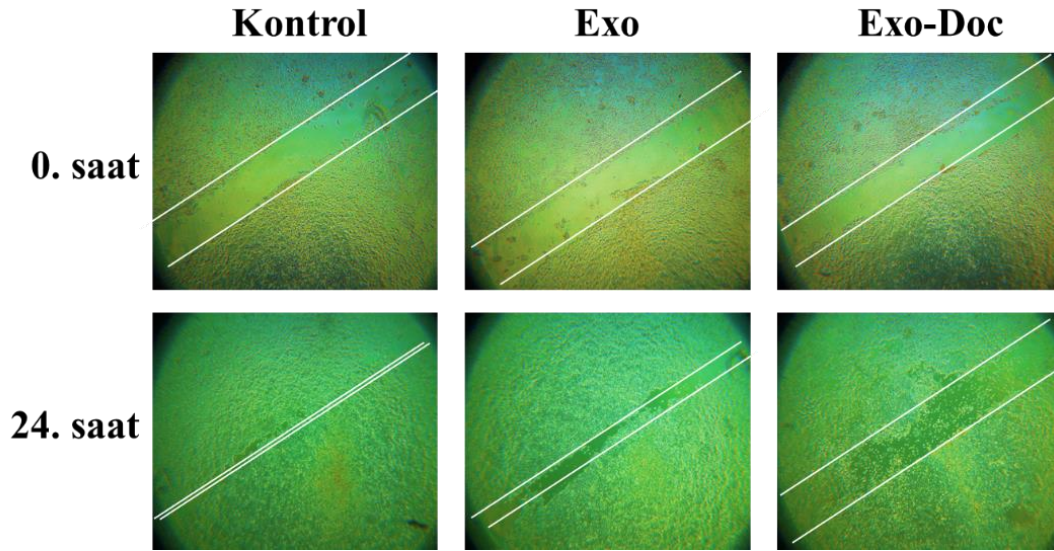


Şekil 23. Exo ve Exo-Doc uygulaması sonrası hücre ölümlerinin gösterilmesi

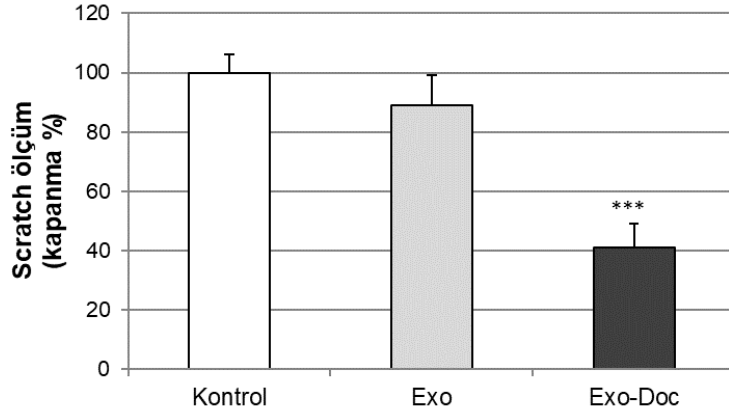
4.4. Migrasyon Deneyine İlişkin Bulgular

HeLa hücreleri yüzeyi % 80-90 oranında kapladığında, hücreler steril pipet ucuyla çizildi. Ardından kuyulara Exo ve Exo-Doc örnekleri verildi. Hücrelerin çizik öncesi, 0. ve 24 saat fotoğrafları çekildi. Hücrelerinin 0. saatindeki iki çizgi arasındaki genişlik ölçülerek referans olarak Image J programına tanıtıldı ve mesafeler hesaplandı (Şekil 24).

Docetaxel yüklü eksozom verilen hücrelerde yara kapanma hızının kontrol ve boş eksozom verilen hücelere göre daha düşük olduğu saptandı. Image J programından alınan verilere göre, Docetaxel yüklü eksozom verilen hücrelerde yara açıklığında % 40 oranında kapanma hesaplandı (Şekil 25). Bu sonuçlar Docetaxel yüklü eksozomların HeLa hücrelerinde proliferasyonu negatif yönde etkilediğini göstermektedir (***) $p < 0.001$ kontrol grubuna göre)



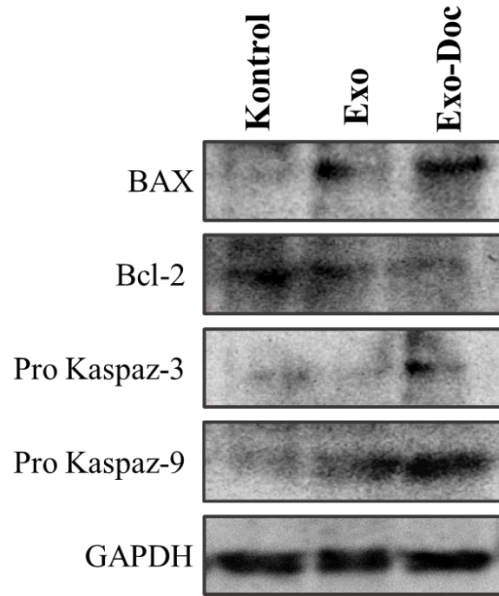
Şekil 24. HELA hücrelerinde scratch ölçümlerinin mikroskop görüntüsü



Şekil 25. HELA hücrelerinde scratch ölçümleri kapanma yüzdeleri grafiği (***) $p < 0.001$ kontrol grubuna göre)

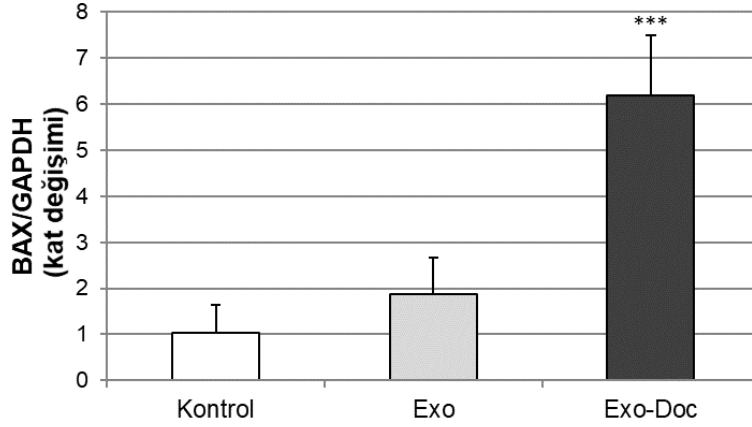
4.5. Western Blot Analizi

Apoptoz ilişkili proteinlerin seviyelerinin belirlenmesi için yapılan Western blot deneyinde Bax, Bcl-2, Pro Kaspaz-3 ve Pro Kaspaz-9 proteinleri için yapılan çalışmada aşağıdaki membran görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 26). Protein seviyesinin karşılaştırılması için referans protein olarak GAPDH kullanılmıştır.



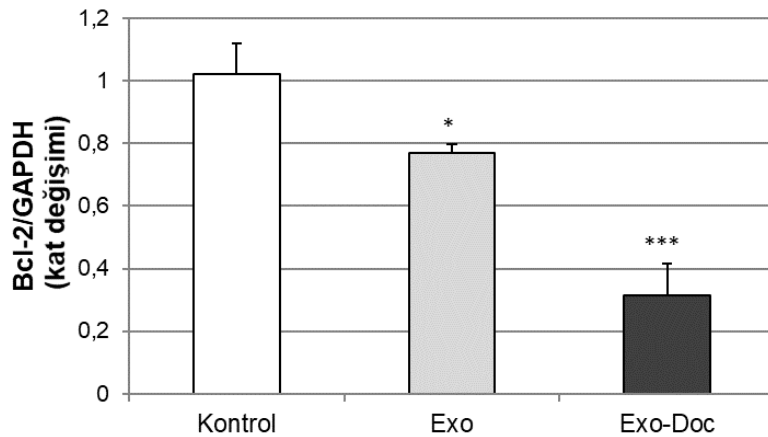
Şekil 26. HELA hücrelerinde western blot bant görüntüleri

Membran görüntüleri Image J programı ile analiz edilmiştir. Analizde her bir bantın alanı hesaplanarak bantların yoğunlukları sayısal olarak elde edilmiş ve aşağıdaki grafikler çizilmiştir (Şekil 27, 28, 29, 30).



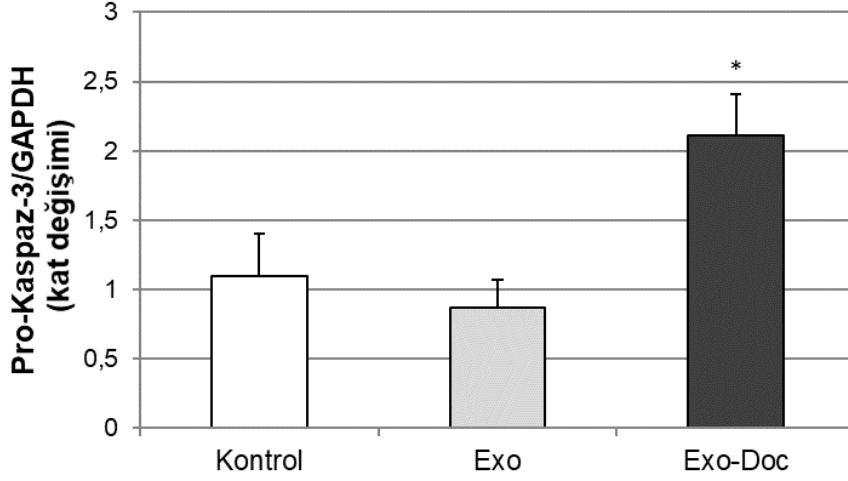
Şekil 27. HELA hücrelerinde BAX protein ekspresyon düzeylerinin densitometrik analiz grafiği (***) $p < 0.001$ kontrol grubuna göre)

Hela hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulamasında western blot analizlerinde Bax protein ekspresyon değişiklikleri Şekil 27’de yer almaktadır. BAX protein ekspresyon değişiklikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Exo grubunda değişikliğe uğramamışken Exo-Doc grubunda anlamlı derecede artış göstermiştir (***) $p < 0.001$).



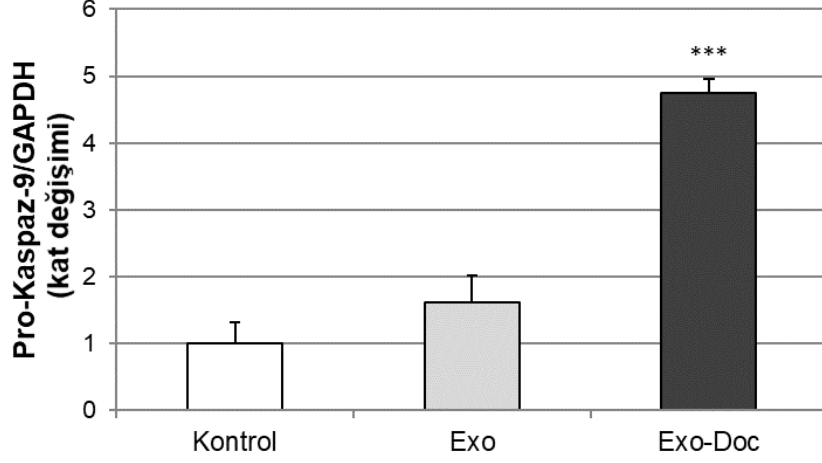
Şekil 28. HELA hücrelerinde Bcl-2protein ekspresyon düzeylerinin densitometrik analiz grafiği (***) $p < 0.001$ kontrol grubuna göre)

Hela hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulamasında western blot analizlerinde Bcl-2 protein ekspresyon değişiklikleri Şekil 28’de yer almaktadır. Bcl-2 protein ekspresyon değişiklikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Exo grubunda bir miktar azalmış ($*p<0.05$), Exo-Doc grubunda yüksek oranda azalış göstermekle birlikte istatistiksel olarak anlamı bulunmuştur ($***p<0.001$).



Şekil 29. HELA hücrelerinde Pro-Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeylerinin densitometrik analiz grafiği ($*p<0.05$ kontrol grubuna göre)

Hela hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulamasında western blot analizlerinde Pro-Kaspaz-3 protein ekspresyon değişiklikleri Şekil 29’da yer almaktadır. Pro-Kaspaz-3 protein ekspresyon değişiklikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Exo grubunda değişikliğe uğramamışken Exo-Doc grubunda anlamlı derecede artış göstermiştir ($*p<0.05$).

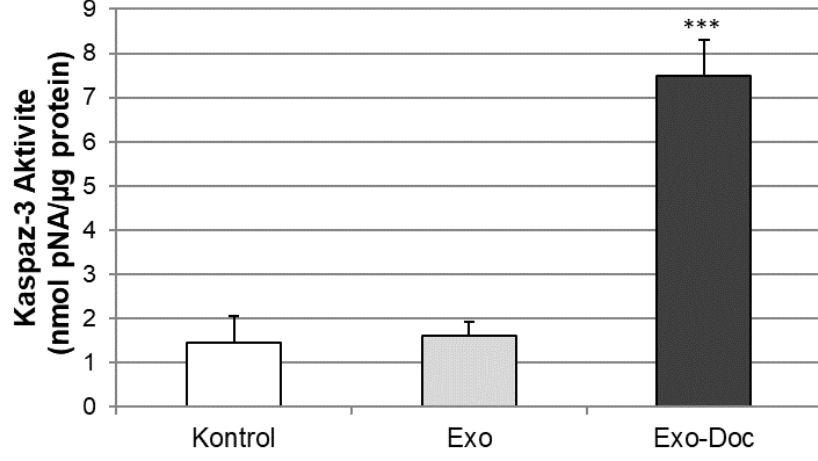


Şekil 30. HELA hücrelerinde Pro-Kaspaz-9 protein ekspresyon düzeylerinin densitometrik analiz grafiği (***) $p < 0.001$ kontrol grubuna göre)

Hela hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulamasında western blot analizlerinde Pro-Kaspaz-9 protein ekspresyon değışiklikleri Şekil 30'de yer almaktadır. Pro-Kaspaz-9 protein ekspresyon değışiklikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Exo grubunda değışikliğe uğramamışken Exo-Doc grubunda anlamlı derecede artış göstermiştir (***) $p < 0.001$).

4.6. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Sonuçları

Apoptotik yolda önemli bir enzim olan kaspaz-3 aktivite tayini ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Apoptozun hem içsel yola hem de dışsal yolda etkili olduğunun bir göstergesi olan kaspaz-3 aktivite tayini Hela hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulaması sonrası hücre lizatlarında ölçülmüştür.

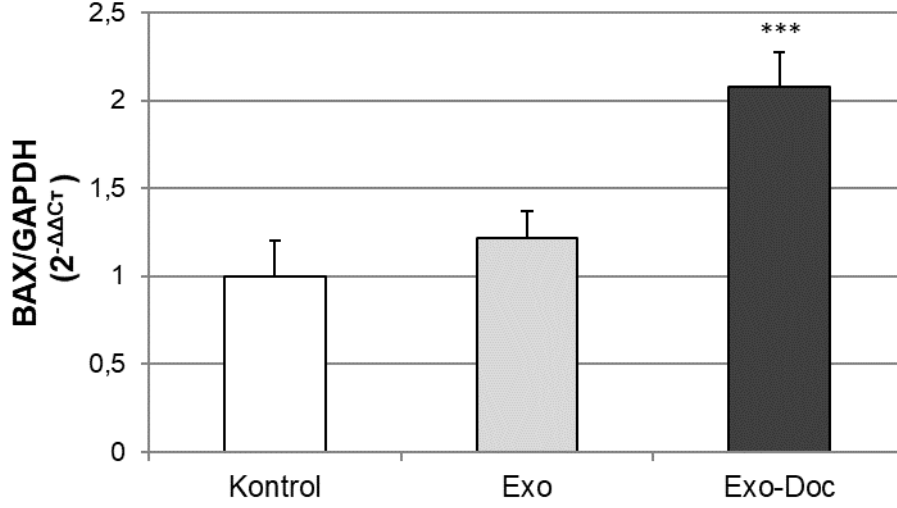


Şekil 31. HELA hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyleri (***) $p < 0.001$ kontrol grubuna göre)

Hela hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulamasında kaspaz-3 enzim ativite sonuçları Şekil 31’de yer almaktadır. Kaspaz-3 enzim aktivitesi değışiklikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Exo grubunda değışikliğe uğramamışken Exo-Doc grubunda anlamlı derecede artış göstermiştir (***) $p < 0.001$).

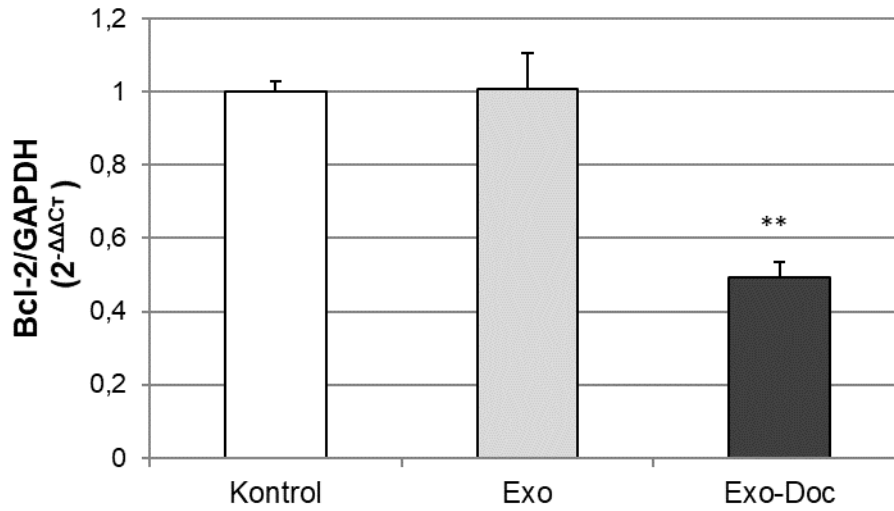
4.7. Q-PCR Bulguları

HeLa hücrelerine Exo ve Exo-Doc uygulaması sonrasında BAX, Bcl-2 ve Kaspaz-3 gen ifade seviyelerinin belirlenmesi için qPCR çalışması yapıldı. Real-Time PCR uygulamasında elde edilen amplifikasyon eğrilerinin CT’ lerinden $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplanarak aşağıdaki gen ekspresyon düzeyleri grafikleri elde edildi.



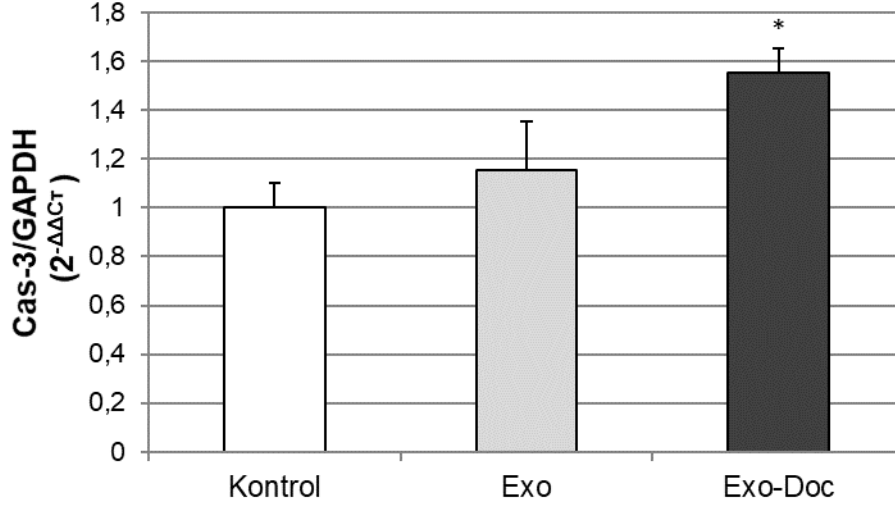
Şekil 32. HELA hücrelerinde qPCR ile BAX gen ekspresyon düzeyleri (***) $p < 0.001$ kontrol grubuna göre)

HeLa hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulamasında BAX gen ekspresyon düzeylerine ait qPCR sonuçları Şekil 32’de yer almaktadır. BAX gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Exo grubunda değişiklik olmadığı, Exo-Doc grubunda anlamlı derecede BAX gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (***) $p < 0.001$).



Şekil 33. HELA hücrelerinde qPCR ile Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri (***) $p < 0.01$ kontrol grubuna göre)

HeLa hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulamasında Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerine ait qPCR sonuçları Şekil 33'de yer almaktadır. Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Exo grubunda değişiklik olmadığı, Exo-Doc grubunda anlamlı derecede Bcl-2 gen ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir (**p<0.01).



Şekil 34. HELA hücrelerinde qPCR ile Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri (*p<0.05 kontrol grubuna göre)

Hela hücrelerinde Exo ve Exo-Doc uygulamasında Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeylerine ait qPCR sonuçları Şekil 34'de yer almaktadır. Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman Exo grubunda değişiklik olmadığı, Exo-Doc grubunda anlamlı derecede Kaspaz-3 gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (*p<0.05).

5. TARTIŞMA

Rahim ağzı kanseri, dünya çapında kadın kanser ölümlerinin dördüncü önde gelen nedenidir. Kalıcı HPV enfeksiyonu ile başlayan displastik öncül lezyonlardan aşamalı olarak rahim ağzı kanseri gelişir. Standart tedavi önceden lokal hastalığı olan hastalarda radikal cerrahi ve daha yüksek evreli pelvik ve metastatik hastalıklarda eş zamanlı sıspatin bazlı kemoterapi ile radyasyon, genel ve progresyonsuz sağkalımı iyileştirmiştir, pelvik nüksmesini ve uzak metastazları azaltmıştır. Son gelişmelere rağmen, özellikle tedavinin esas olarak palyatif kaldığı metastatik servikal kanser için daha iyi tedavi protokollerine ihtiyaç vardır. Hem tek başına hem de radyasyonla kombinasyon halinde farklı kemoterapi ilaçlarının etki mekanizmaları hala yeterince anlaşılmamıştır. Bu tümör varlığında 20'den fazla farklı tekil ajanın düşük aktiviteye sahip olduğu ve % 8-25'lik genel yanıt oranları ürettiği bildirilmiştir (Koivusalo ve Hietanen 2004).

Günümüzde orta ve ileri evre rahim ağzı kanserinin cerrahi tedavi imkânını kaçırmaması nedeniyle radyoterapi ilk seçenektir. Bununla birlikte, büyük tümörleri veya ilerlemiş servikal kanseri olan hastalar için, terapötik etkiyi iyileştirmek ve metastaz ve nüks oranını azaltmak için genellikle eşzamanlı radyoterapi ve kemoterapi almaları önerilir. Kemoterapi esas olarak tümör hücrelerinin genetik materyalini tahrip eder ve tedavi amacına ulaşmak için tümör hücrelerinin çoğalmasını engeller. Radyoterapi, kanser hücrelerini öldürme ve inhibe etme etkisiyle sonuçta tümör oluşumunu ve gelişimini engeller. Bununla birlikte, kemoterapi ve radyoterapinin tümör tedavisi üzerindeki etkinliği, bazı kemoterapötik ilaçların duyarlılaştırma etkisinden sıklıkla yararlanmıştı (He ve ark, 2015).

Son birkaç yılda, sekiz prospektif randomize faz III çalışmadan yedisi, geleneksel radyasyon tedavisine kıyasla, radyasyonla birlikte verilen kemoterapinin üstünlüğünü göstermiştir. Bir İtalyan çalışma grubu tarafından yapılan randomize bir faz III çalışması, neoadjuvan kemoterapinin ardından radikal cerrahinin, evre IB2 ve IIB serviks kanserinde geleneksel radyasyon tedavisine kıyasla bir hayatta kalma yararı olduğunu göstermiştir. Böylece rahim ağzı kanserinin tedavisinde kemoterapinin rolü kabul edilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda sıspatin uygulanmıştır. Bununla birlikte, bu ajan, renal ve gastrointestinal toksisite ve nöropati dahil olmak üzere ciddi toksisiteye sahiptir (Nagao ve ark, 2005).

Rahim ağzı kanser tedavisinde kemoterapik ilaçlar ve radyoterapinin yanı sıra yenilikçi ilaçların geliştirilmesi konusunda çalışmalarda artmaktadır. Bu anlamda rahim ağzı kanseri tedavisinde kullanılan yada farklı kanser türleri için kullanılan kemoterapik ilaçların daha düşük dozda etkilerinin olması için farklı tiplerde formülasyonlar geliştirilmektedir. Taksan grubu ilaçlarda son yıllarda farklı formülasyonlar ve farklı taşıyıcılar ile kemoterapik etkilerinin artırılması konusunda yeni çalışmalar ile gündeme gelmektedir.

Taksanlar, şu anda kapsamlı ve klinik araştırmalara tabi tutulan yeni bir anti-kanser ajanı sınıfıdır. Bu sınıfın klinik olarak mevcut iki temsilcisi, paclitaxel (Taxol®) ve docetaxeldir (Taxotere®). Genellikle taksanların sitotoksitesinin, mikrotübül demetlerinin oluşumunu teşvik etme ve sürekli mitotik tutuklamayı indüklemeye, ardından mitotik olarak tutuklanan hücrelerin apoptozunu veya kalıcı mitotik bloğu tetikleme yetenekleriyle ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Balcer-Kubiczek ve ark, 2006; Cevik ve ark 2020).

Son zamanlarda, paclitaxelin önemli aktivitesi yumurtalık, meme ve endometriyal kanser gibi diğer jinekolojik malignitelere; baş, boyun ve akciğer kanserleri gibi çeşitli skuamöz hücreli karsinomlarda gösterilmiştir. Paclitaxel ile rahim ağzı kanseri hastaları üzerinde yapılan klinik denemeler, bu bileşiği bu hastalıkta en aktif ilaçlardan biri olarak ön plana çıkarmıştır. Docetaxel, yumurtalık kanserine karşı hafif bir nörotoksositeye ve paclitaxel ile karşılaştırılabilir bir aktiviteye sahiptir. İlerlemiş veya tekrarlayan skuamöz hücreli rahim ağzı kanseri olan hastalarda, tek doz docetaxel % 13 yanıt oranına sahip olduğu gösterilmiştir. Vallejo ve ark. (2003), ilerlemiş serviks kanserinde tek doz docetaxel olarak uygulanan neoadjuvan kemoterapiye % 34 klinik yanıt oranı bildirmiştir.

Balcer-Kubiczek ve ark (2006), insan mide karsinomlarından (p53 mutanı Hs746T, p53 vahşi tip AGS), serviks (p53 doğal tip CaSki, p53 mutant HeLa) veya pankreastan (p53 mutant BxPC3 ve Capan-1) türetilen hücreler üzerinde 24 saat boyunca çeşitli dozlarda (0.1–5 nM) docetaxel ile tedavisini çalışmış olup, docetaxelin radyasyon tedavisi ile kombine etkisine bakmışlardır.

Nagao ve arkadaşları 2005 yılında yayınladıkları bir çalışmada docetaxel ve karboplatin kombinasyonunun rahim ağzı kanseri için etkili ve güvenli bir tedavi olduğunu göstermişlerdir.

Taksan grubu ilaçlar ile prostat kanser hücrelerinde yapılan bir araştırmada androjen reseptör pozitif ve negatif hücrelerde sadece mikrotübül inhibisyonu yaratmadığı aynı zamanda docetaxel, paclitaxel ve cabazitaxel'in hücreler üzerinde apoptotik etkili proteinlerde değişiklik yarattığı gösterilmiştir. Çalışmada doz ve zamana bağlı olarak hücreler üzerindeki etkilerde ilaçların farklı mekanizmalar geliştirdiği ve bu ilaçların ilaç direncinde etkili olduğu

vurgulanmıştır. Özellikle taksan grubu ilaçların farklı taşıyıcı sistemler tasarlanarak bu direnç mekanizmalarının azaltılabileceği konusunda görüşlerde bulunmaktadır (Cevik ve ark, 2020).

Günümüzde nanotaşıyıcılar ile etkin maddeler üzerine birçok araştırmalar yapılmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemlerin, etkin maddenin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttırmak, etkin maddenin salınım miktarını değiştirmek ve etkin maddeyi hedeflendirmek gibi önemli görevleri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ışığında kanser ilacı yüklenmiş nanotaşıyıcıların kullanımına rastlanmaktadır. Nanotaşıyıcıların hedeflenmesi sayesinde daha yüksek seçicilikte tedavi alternatiflerinin ortaya çıktığı görülmektedir. Kanserde hedefleme için tümöre etkin şekilde ulaşmak gerekmektedir (Tüylek, 2018).

Eksozomlar yeni ilaç taşıyıcı sistemler ve hedeflendirmede kullanılabilecek nanotaşıyıcılar sınıfına girmektedir.

Bu tez çalışmasında kanser tedavisinde etkili taksan grubu bir ilaç olan Docetaxelin, tedavide karşılaşılan zorlukları elimine etme amacı ile servikal kanser için nanotaşıyıcı bir sistem formülasyonu geliştirilmiştir. Salınımın belirli hücre tipine hedeflenebilmesi nedeniyle zararlı etkilerin azaltılması, gerek duyulan ilaç ve dozaj miktarının azaltılabilmesi amacıyla, Docetaxel eksozomlara yüklenerek HeLa hücrelerine verilmiş ve terapötik etkileri incelenmiştir.

Eksozomların vücutta kan, idrar ve anne sütü gibi birçok biyolojik sıvıda bulunması, eksozom türevi ilaç dağıtım araçlarının vücutta iyi bir şekilde tolere edildiğini göstermektedir. Bu da ve düşük bir bağışıklık tepkisi, dolaşımında daha uzun süre kalma ve daha fazla etkinliğe yol açma ile sonuçlanmıştır (Lai ve ark, 2013).

Eksozomların yüklerini hedef hücrelere vermek için plazma zarını geçtiği gösterilmiştir. Örneğin dendritik hücreden türetilmiş eksozomlar, bağışıklık tepkisini modüle etmek için peptit yüklü MHC sınıf I ve II komplekslerini diğer dendritik hücrelere aktarabilir. mRNA'ların, alıcı hücrelerde transfer edilen mRNA'nın translasyonu ile sonuçlanan eksozomlar tarafından hücreler arası transferi de rapor edilmiştir (Valadi ve ark, 2007).

Son olarak eksozomlar hücre tipine spesifik hedeflemeyi arttıran membran modifikasyonlarına uygundur. Alvarez-Erviti ve ark (2011) bir nöron-spesifik RVG kodlama dizisi ve dendritik hücrelerde bir eksozomal membran proteinini kodlayan LAMP2B'den oluşan bir füzyon geninin aşırı eksprese edilmesi ile bu modifiye edilmiş dendritik hücrelerin zarlarında RVG peptidi ile ekzosom salgıladığını gösterdi. Bu eksozomları siRNA ile yükledikten sonra, eksozomların, nöronlar, mikrogliya, oligodendrositler ve öncüllerinde siRNA hedefli genin % 60'ının kan-beyin bariyerini geçebileceğini bildirmişlerdir.

Eksozomal taşıyıcıların terapötik kargo ile yüklenmesi için birkaç farklı yaklaşım kullanılabilir. Bu yaklaşımlar arasında ebeveyn hücrelerinden izole edilmiş saf eksozomların yüklenmesi, ebeveyn hücrelerin daha sonra eksozomlardan salınan bir ilaçla yüklenmesi ve son olarak ebeveyn hücrelerin terapötik olarak aktif bileşikleri kodlayan DNA ile transfekte edilmesi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Saf eksozomlara ilaç yüklenmesi ile ilgili olarak, farklı yöntemler önerilmiştir: hidrofobik moleküllerin pasif difüzyonu, mekanik (sonikasyon gibi), elektroporasyon veya hidrofilik moleküllerin kimyasal aracılı transferi (lipofeksiyon). Çoğu durumda, lipofilik küçük moleküllerin bir eksozoma yüklenmesi için inkübasyon tercih edilmiştir. Bu nedenle, düşük moleküler antioksidanlar, kurkumin, antikanser ajanlar, Doksorubisin (Dox) ve Paclitaxel (PTX) ve model bir ilaç Rhodamine 123 oda sıcaklığında inkübasyon yoluyla eksozomlara veya eksozom benzeri veziküllere yüklenmiştir (Batrakova ve Kim, 2015).

Kemoterapötikler, miRNA ve siRNA gibi büyük moleküller, elektroporasyon yoluyla eksozomlara dahil edilebilir. Elektrik alanı, ilaçların eksozomal lümene hareket etmesini sağlayan eksozomal membranda geçici gözenekler oluşturur. Çalışmalar eksozom yüklü siRNA'ların başarılı bir şekilde verilmesini ve hedef genlerin seçici susturulmasını doğrulamıştır. DC' den türetilen eksozomlara siRNA'nın elektroporasyon ile yüklenmesi bu yönetime öncülük etmiştir (Alvarez-erviti ve ark, 2011). miRNA ile eksozomları epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) eksprese eden meme kanseri hücrelerine yüklemek için de aynı yöntem kullanılmıştır (Ohno ve ark, 2013). Biz bu tez çalışmasında HeLa hücrelerinden elde edilen eksozomlara docetaxel yüklemesini elektroporasyon yoluyla gerçekleştirdik.

İlk olarak HeLa hücrelerinden eksozomlar izole edilmiş ve elektroporasyonla Docetaxel yüklemesi yapılmıştır. Yükleme sırasında yüzeye adsorbe olan ve eksozom içerisine hapsolan ilacın partikül boyutunda artışa neden olduğu yapılan boyut analizi çalışmalarında gösterilmiştir. İlaç yüklü eksozomlar, boş eksozomlara kıyasla daha yüksek partikül boyutuna sahiptir. Zeta potansiyel ölçümleri sonucunda, boş eksozomlar ile ilaç yüklü eksozomlar kıyaslandığında zeta potansiyel değerinin negatif yönde artışı gözlenmiştir. Bunun sebebi ise Docetaxelin negatif yüke sahip olmasıdır. Elektroporasyon ile yüklemede enkapsülasyon verimlilikleri hesaplanmıştır. Eksozomlara ilaç yüklemede enkapsülasyonun başarılı olabilmesi için, yüksek enkapsülasyon etkinliği değerine sahip olmalıdır. Yapılan bu tez çalışmasında deocetaxel yüklü eksozomların % enkapsülasyon değeri 65.85 ± 12.43 , % etkin madde yükleme kapasitesi 36.23 ± 5.01 olarak hesaplanmıştır.

Eksozomların doğanın farklı proteinleri vermenin yolu olduğu da bilinmektedir. Katalaz, eksozomlara katılma zorluğunu temsil eden büyük bir proteindir. Haney ve ark (2015) katalazı

eksozomlara yüklemek için çeşitli yükleme prosedürlerini (oda sıcaklığında inkübasyon, dondurma/çözülme döngüleri, sonikasyon, ekstrüzyon ve saponin ile geçirgenleştirme) incelemiş ve terapötik etkinliklerini in vivo olarak karşılaştırmışlardır. Çalışma, test edilen yöntemler arasında saponin, sonikasyon ve ekstrüzyon ile geçirgenleştirmenin, eksozomal bütünlüğü korurken katalazın iyi yükleme verimliliğiyle sonuçlandığını göstermiştir.

Farklı bir ilaç yükleme yaklaşımı olarak, ebeveyn hücelere eksojen bileşikler yüklenebilir; bu hücreler daha sonra eksozomlar içindeki şartlandırılmış ortama salınır. Pascucci ve ark (2014) mezenkimal stromal hücrelerin (MSC) ilaçla inkübe edilmesi sonucunda, bu hücrelerden ilaç yüklü eksozomlar salgılanması sağlanmıştır. MSC'lerin aktif ilaçlarını eksozomlar aracılığıyla paketleyebildiklerini ve sunabildiklerini gösteren ilk çalışmadır. MSC modeli olarak kullanılan SR4987 hücreleri PTX ile inkübe edilmiş ve bu hücrelerin önemli miktarda PTX yüklü eksozom ürettiği bildirilmiştir.

Farklı antikanser ajanlarla inkübe edilen insan karaciğer hücre hattı HepG2 hücreleri için benzer bir sonuç bildirilmiştir. PTX, etoposid, karboplatin, irinotekan, epirubisin ve mitoksantron ile tedavi edilen HepG2 hücrelerinden salınan eksozomlar, insan pankreatik hücre hattı CFPAC-1 üzerinde güçlü anti-proliferatif aktivite göstermiştir. Uyarılmış immünojenisite ve ısı şok proteinlerine özgü doğal öldürücü hücre yanıtları göstermiştir (Lv ve ark, 2012).

Son olarak, genetiği değiştirilmiş ebeveyn hücrelerden salgılanan ilaç yüklü eksozomların izolasyonu, eksozom bazlı formülasyonlar üretmenin üçüncü bir yolu olarak önerilmiştir. Zhao ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, glial hücre hattı kaynaklı nörotropik faktörün (GDNF) aktif hedefe yönelik beyin iletimi için genetik olarak değiştirilmiş makrofajlar kullanılmıştır. GDNF makrofajlara, terapötik proteinleri kodlayan plazmid DNA ile transfekte edilmiştir ve böylece genetiği değiştirilmiş makrofajlar, GDNF içeren eksozomlar salgılamışlardır. Eksozomlarda aşırı eksprese edilmiş GDNF' nin salınması onu proteazların bozulmasına karşı korumuş, GDNF' nin hedef nöronlara transferini kolaylaştırmıştır (Zhao ve ark, 2014).

Bir başka ilginç çalışma Adeno ilişkili virüs (AAV) kapsidlerinin, immünojenikliklerini azaltmak ve gen iletimini iyileştirmek için hücre dışı veziküllere dahil edilmesine yöneliktir. Virüsler, hedef hücelere kargo ulaştırmadaki verimliliklerinden dolayı gen ve kanser terapisinde terapötik araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, bağışıklık sistemi tarafından yok edilmeye karşı hassastırlar veya ciddi bir bağışıklık tepkisine neden olabilirler. AAV vektörleri, kültürlenmiş hücelere ve hayvan modellerinde gen terapisi için kullanılan öncüllerden biridir. AAV ile enfekte olmuş hücreler AAV kapsidi içeren enfektif EV' ler

salgılamıştır. Kültürlenmiş hücrelerde, veksozomlar transdüksiyon veriminde geleneksel olarak saflaştırılmış AAV vektörlerinden daha iyi performans göstermiştir (Maguire ve ark, 2012).

İlaçların özelliklerini geliştirmenin yanı sıra, eksozomlar kan-beyin bariyeri (BBB) boyunca küçük moleküler ilaçları taşımak için de kullanılır. BBB genelinde ilaçların geçirgenliği ile ilgili problemleri çözmek için birçok nano formülasyonda eksozomlarla çalışılmıştır.

Paklitaksel ve doksorubisin gibi antikanser ilaçların eksozomlara kapsüllenmesiyle, eksozomların BBB potansiyelini gösteren ve nakil mekanizmalarını açıklayan araştırmalar yapılmıştır. Zebra balığı beyin kanseri tedavisinde, doksorubisin ve paklitaksel yüklü eksozomlar BBB' yi geçerken, tek başına verilen ilaçlar BBB' yi geçememiştir. Tek başına doksorubisine kıyasla doksorubisin yüklü eksozomlarla tedavi edilen zebra balığı beyin modelinde önemli terapötik etkinlik göstermiştir. Çalışma BBB' ye ilaç vermek için spesifik özelliklere sahip eksozomların kullanım potansiyelini göstermektedir (Yang ve ark, 2015).

Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada enflamatuar bir hastalık tedavisinde kurkumin yüklü eksozomlar kullanılmıştır. Kurkumin zerdeçalın rizomlarında bulunan doğal bir polifenoldür ve anti-enflamatuar, antineoplastik, antioksidan ve kemo-önleyici özelliklere sahiptir. Kurkuminin stabilitesini ve biyoyararlanımını arttırmak amacıyla eksozom ile bir kompleks oluşturulmuştur. Eksozomların, kurkumin gibi yüksek hidrofobik ilaçları taşıma kabiliyetini, anti-enflamatuar etkilerini arttırdığını göstermiştir (Sun ve ark, 2010).

Bu tez çalışmasında, HeLa hücre hattı ile yapılan *in vitro* sitotoksikite çalışmalarında docetaxel yüklü eksozomların, docetaxel çözeltisine ve boş eksozomlara göre daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu farkın docetaxel yüklü eksozomların, hücre membranlarından geçişinin serbest docetaxele göre daha etkin olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 10 nM konsantrasyonda, docetaxelin sitotoksik etkisi eksozomlar sayesinde serbest docetaxele oranla 5 kat daha fazladır ve bu sonuç eksozomlara yüklenerek hazırlanan nanotaşıyıcı sistemin, docetaxel için etkili bir ilaç taşıyıcı sistem olduğunu göstermektedir. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda verilen docetaxel yüklü eksozom çözeltisinin hücrelerdeki etkisini incelemek üzere mikroskoptan alınan hücre görüntüleri de bu sonuçları desteklemektedir.

Çalışmada HeLa servikal kanser hücrelerinde docetaxel yüklü eksozom verilen örneklerde migrasyon düzeylerinin azaldığını saptadık. Kontrol gruplarına göre hücrelerin daha yavaş bölündüğü ve hücrenin büyüme eğiliminin azaldığı saptandı.

Apoptotik süreçte yer alan bazı pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin varlığını saptamak amacı ile Western blot analizi yapılmış ve anti-apoptotik protein Bcl-2 ve pro-apoptotik protein Bax'ın oranı tespit edilmiştir. Docetaxel yüklü eksozom verilen hücrelerde,

pro-apoptatik BAX protein ekspresyonunda artma görülürken, anti-apoptotik Bcl-2 proteinin ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu verilerin desteklenmesi amacı ile apoptozda önemli yeri olan Pro kaspaz-3 ve Pro kaspaz-9 proteinleri ile çalışılmıştır.

Hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilim gösterir. Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra antiapoptotik protein olan Bcl-2 inaktive olur ve BAX aktifleşir. Apoptotik süreç efektör kaspazların hücre içinde diğer proteinlere bağlanmasıyla birlikte tetiklenir (Cohen, 1997). Kaspaz-9 içsel (mitokondriyal) apoptotik yolakta yer alan bir enzimdir. Apoptoza yönelen bir hücrede kaspaz-9 aktivitesinin varlığı, o hücrenin mitokondriyal yoldan apoptoza gitmiş olabileceğinin önemli bir göstergesidir. Kaspaz-9 enzimi, Kaspaz-3' ü aktifleştirir. Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasının tamamlanma fazında yer alan ve apoptozun sonlandırılmasından sorumlu kaspazlardan biridir. Kaspaz-3 hem dışsal apoptotik yolak üzerinden hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktifleşebilir. Kaspaz-3, kromatin yoğunlaşmasından, DNA' nın alt birimlerine fragmente olmasından ve hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından sorumludur (Slee ve ark, 2001). Bu nedenle bir hücrede kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesi, o hücrenin apoptoza gittiğinin en önemli kanıtlarından biridir.

HeLa hücrelerine Docetaxel yüklü eksozom uygulaması, Bax protein ifadesinin artması, apoptotik süreci tetikleyen kaspaz-9 ve kaspaz-3 ifadesinin arttırması ile sonuçlanmıştır. Kaspaz-3 enzim aktivitesi sonuçları diğer ekspresyon ifadesi sonuçlarıyla uyumludur. Bax/Bcl-2 oranı, pro kaspaz-3, pro kaspaz-9 ifadesindeki artış ve kaspaz-3 enzim aktivitesi sonuçlarıyla, docetaxel yüklü eksozomların HeLa hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağlı şekilde apoptozu indüklediği kanıtlanmıştır.

Hepatoselüler kanser hücrelerinden izole edilen eksozomlar ve biyoyumlu polimerleri kullanarak doxorubicin yüklenen DOX@E-PSiNPs taşıyıcı sistemin özellikle kanser kök hücreleri hedef aldığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada C57BL/6 fareler kullanılarak geliştirilen karaciğer ve melanoma kanserlerinde eksozom aracılı DOX@E-PSiNP ile taşınan kemoterapik ajanın hücre ölümünü tetiklediği ve aynı zamanda otofajik proteinleri harekete geçirerek kanser için ümit verici bir sistem olduğu bildirilmiştir (Yong ve ark, 2019).

Literatürdeki çalışmalar incelendiği zaman eksozomların farklı hücre tedavilerde etkin olduğu ve ilaç taşıyıcısı olarak güncel araştırmalarda yer aldığı görülmektedir. Literatürdeki yapılan çalışmalar ile bu tez çalışmasında elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiği zaman docetaxel yüklü eksozomların HeLa hücrelerinde hücre apoptozunu tetiklediği tespit edilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kanser tedavisinde kullanılan ve yeni jenerasyon bir kemoterapi ajanı olan docetaxel'in HeLa hücrelerinden salınan eksozomlara yüklenmesi ile yeni bir taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu taşıyıcı sistem hücrenin kendi eksozomlarını kullanarak tanınmasını sağlamakta ve kanserde ilaç direnci geliştiren ajanların hücre içerisinde daha düşük dozlarda etkilerini sağladığını göstermiştir. Bu geliştirilen sistem rahim ağzı kanseri tedavisinde yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilmesine ve eksozom gibi farklı taşıyıcı sistemler ile klinikte uygulanabilecek ajanların geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 2013, 113(1), 1–11.

Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Woo MJAA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(4), 341–345.

Antimisiaris SG, Mourtas S, Marazioti A. Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 218

Atkin-Smith GK, Poon IKH. Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. *Trends in Cell Biology*, 2017, 27(2), 151–162.

Ayala-mar S, Donoso-quezada J, Gallo-villanueva, RC, Perez-gonzalez VH, González-valdez J. Recent advances and challenges in the recovery and purification of cellular exosomes. *Electrophoresis*. 2019, 40, 3036–3049.

Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key molecular events in cervical cancer development. *Medicina (Lithuania)*, 2019, 55(7).

Balcer-Kubiczek E, K, Attarpour M, Jiang J, Kennedy A, S, Suntharalingam M. Cytotoxicity of Docetaxel Used as a Single Agent and in Combination with Radiation in Human Gastric, Cervical and Pancreatic Cancer Cells. *Chemotherapy*, 2006, 52, 231-240.

Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta S., Foinquinos A, Holzmann A, Thum T. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2136–2146.

Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases.

Pharmacology and Therapeutics, 2017, 174, 63–78.

Barra F, Lorusso D, Leone Roberti Maggiore U, Ditto A, Bogani G, Raspagliesi F, Ferrero S. Investigational drugs for the treatment of cervical cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2017, 26(4), 389–402.

Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2015, 219, 396–405.

Battistelli M, & Falcieri E. Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology*, 2020, 9(1).

Becker A, Thakur BK., Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 2016, 30(6), 836–848.

Bu H, He D, He X, Wang K. Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy. *ChemBioChem*, 2018, 20(4), 451–461.

Bu N, Wu H, Sun B, Zhang G, Zhan S, Zhang R, Zhou L. Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8⁺ cytotoxic T cells in patients with glioma. Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8⁺ cytotoxic T cells in patients with glioma. *Journal of NeuroOncology*. 2011, 104(3), 659-667.

Bucki R, Bachelot-Loza C, Zachowski A, Giraud F, Sulpice JC. Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry*, 1998, 37(44), 15383–15391.

Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*, 2005, 17(7), 879-887.

Cevik Ö, Acidereli H, Turut FA, Yıldırım Ş, Acilan C. Cabazitaxel exhibits more favorable molecular changes compared to other taxanes in androgen-independent prostate cancer cells. *Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology* , 2020, 34 (9), e22542

Cevik, O, Turut FA, Acidereli H, Yildirim S. Cyclosporine-A induces apoptosis in human prostate cancer cells PC3 and DU145 via downregulation of COX-2 and upregulation of TGF β , *Turkish Journal of Biochemistry*, 2019, 44(1), 47-54.

Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination - Review of Current Perspectives. *Journal of Oncology*, 2019, 3257939.

Chen C, Skog J, Hsu CH, Lessard RT, Balaj L, Wurdinger T, Carter BS, Breakefield XO, Toner MID. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab on a chip*, 2010, 10(4), 505–511.

Chen S, Lv M, Fang S, Ye W, Gao Y, Xu Y. Poly(I:C) enhanced anti-cervical cancer immunities induced by dendritic cells-derived exosomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113, 1182–1187.

Cho S, Jo W, Heo Y, Kang JY, Kwak R, Park J. Isolation of extracellular vesicle from blood plasma using electrophoretic migration through porous membrane. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2016, 233, 289–297.

Chung HC, Ros W, Delord JP, Perets R, Italiano A, Shapira-Frommer R, Manzuk L, Piha-Paul SA, Xu L, Zeigenfuss S, Pruitt SK, Leary A. Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Cervical Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2019, 10, 37(17), 1470-1478.

Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *The Lancet*, 2019, 393(10167), 169–182.

Cohen AC, Roane BM, Leath CA. Novel Therapeutics for Recurrent Cervical Cancer: Moving Towards Personalized Therapy. *Drugs*, 2020, 80(3), 217–227.

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2014, 30(1), 255–289.

D'Souza A, Roman LD, Saura C, Braña I, Shapiro GI, Passalacqua R. Neratinib in patients with HER2-mutant, metastatic cervical cancer: findings from the Phase 2 SUMMIT trial. *Gynecologic Oncology*, 2019,154, 11.

Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, Li G. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Therapy*. 2008 April, 16(4), 782-90.

Davies RT, Kim J, Jang SC, Choi EJ, Gho YS, Park J. Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. *Lab Chip*. 2012 Dec 21, 12(24), 5202-10.

De Villiers EM., Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004, 324(1), 17–27.

Denzer K, Kleijmeer, MJ, Heijnen HFG, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: From internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(19), 3365–3374.

Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine*, 2013, 8(9), 1509–1528.

Dilsiz N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. *Future Science OA*, 2020, April 6(4), FSO465.

Escudier B, Dorval T, Chaput N, André F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulaire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Zitvogel L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of translational medicine*, 2005, 3(1), 10.

Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, Librelotto DRN, Gasparri ML, Bishayee A, Daglia M. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1), 328–334.

Février B, Raposo, G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 16(4), 415–421.

Formana D, Martel C, Lacey CJ, Soerjomatarama I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Franceschi S. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, 2012, November 20,30 (SUPPL.5), F12–F23.

Gerald M. COHEN; Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem Journal*. August 1997, 326(1), 1–16.

Ghidoni R, Benussi L, Binetti G. Exosomes: The Trojan horses of neurodegeneration. *Medical Hypotheses*, 2008, 70(6), 1226–1227.

Guo W, Gao Y, Li N, Shao F, Wang C. Exosomes : New players in cancer (Review). *Oncol Reports*. 2017 August, 38(2), 665-675.

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

Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, Batrakova EV. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson’s disease therapy. *Journal of Controlled Release*, 2015, 207(6), 18–30.

He D, Duan C, Chen J, Lai L, Chen J, Chen D. The safety and efficacy of the preoperative neoadjuvant chemotherapy for patients with cervical cancer: a systematic review and meta analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2015, 8(9), 14693–14700.

Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in Medical Virology*, 2006, 16(2), 83–97.

Hemler M. E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular*

Cell Biology, 2005, 6(10), 801–811.

Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural History of Dysplasia of the Uterine Cervix. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91(3), 252–258.

Hu Q, Su H, Li J, Lyon C, Tang W, Wan M, Hu TY. Clinical applications of exosome membrane proteins. *Precision Clinical Medicine*, 2020,3(1), 54–66.

Kalluri R. The Biology and Function of Urine Exosomes in Bladder Cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 2016, 4(2010), 2362.

Kang H, Kim J, Park J. Methods to isolate extracellular vesicles for diagnosis. *Micro and Nano Systems Letters*, 2017, 5(1).

Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, Malm T. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2016, 1862(3), 403–410.

Kırbaş OK, Bozkurt BT, Asutay AB, Mat B. Optimized Isolation of Extracellular Vesicles From Various Organic Sources Using Aqueous Two-Phase System. *Science Reports*, 2019, 9, 19159

Kibria G, Ramos EK, Wan Y, Gius DR, Liu H, States U. Exosomes as a Drug Delivery System in Cancer Therapy: Potential and Challenges. *Molecular Pharmaceutics* 2018, 15 (9), 3625-3633.

Kim MS, Haney MJ, Zhao Y, Mahajan V, Deygen I, Klyachko NL, Inskoe E, Piroyan A, Sokolsky M, Okolie O, Hingtgen SD, Kabanov AV, Batrakova EV. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine*. 2016 Apr, 12(3), 655-664.

Koh YQ, Tan CJ, Toh YL, Sze SK, Ho HK, Limoli CL, Chan A. Role of exosomes in cancer-related cognitive impairment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8).

Koivusalo R, Hietanen S. The cytotoxicity of chemotherapy drugs varies in cervical cancer cells depending on the p53 status. *Cancer Biology Therapy*, 2004 Nov, 3(11), 1177-83.

Kooijmans SAA, Vader P, Van Dommelen SM, Van Solinge WW, Schiffelers RM Exosome mimetics: A novel class of drug delivery systems. *International Journal of Nanomedicine*, 2012 7, 1525–1541.

Lai RC, Yeo RWY, Tan KH, Lim SK. Exosomes for drug delivery - A novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(5), 543–551.

Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Record M. Mast cell- and dendritic cell-derived display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochemical Journal*, 2004, 380(1), 161–171.

Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 2017, Jan 26;7(3):789-804.

Lim W, Kim HS. Exosomes as Therapeutic Vehicles for Cancer. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2019, 16(3), 213–223.

Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(2), 362–372.

Lu Z, Zuo B, Jing R, Gao X, Rao Q, Liu Z, Qi H, Guo H, Yin H. Dendritic cell-derived exosomes elicit tumor regression in autochthonous hepatocellular carcinoma mouse models. *Journal of Hepatology*. 2017 October,67(4), 739-748.

Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers Chen H, Yuan H, Sun D. Engineering exosomes as refined biological nanoplateforms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sinica* 2017, 38, 754–763.

Lv LH, Wan Y, Le Lin Y, Zhang W, Yang M, Li GN, Min J. Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 2012,

287(19), 15874–15885.

Maguire CA, Balaj L, Sivaraman S, Crommentuijn MHW, Ericsson M, Mincheva-Nilsson L, Skog J. Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Molecular Therapy*, 2012, 20(5), 960–971.

Mahaweni NM, Kaijen-Lambers ME, Dekkers J, Aerts JG, Hegmans JP. Tumour-derived exosomes as antigen delivery carriers in dendritic cell-based immunotherapy for malignant mesothelioma. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013, October 24, 2.

Mangino G, Vincenza Chiantore M, Iuliano M, Capriotti L, Accardi L, Di Bonito P, Romeo G. Role of Extracellular Vesicles in Human Papillomavirus-Induced Tumorigenesis. *Current Perspectives in Human Papillomavirus*, 2019, 1–21.

Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology*, 2018, 28(8), R435–R444.

Melo SA, Sugimoto H, Connell JTO, Kato N, Vidal A, Qiu L, Kalluri R. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *National Institutes of Health Public Access*. 2015, 26(5), 707–721.

Meng W, He C, Hao Y, Wang L, Li L, Zhu G. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. *Drug delivery*, 2020, 27(1), 585–598.

Mignot G, Roux S, They C, Ségura E, Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2006, Apr-Jun, 10(2), 376-88.

Monk BJ, Mas Lopez L, Zarba JJ, Oaknin A, Tarpin C, Termrungruanglert W, Alber JA, Ding J, Stutts MW, Pandite LN. Phase II, open-label study of pazopanib or lapatinib monotherapy compared with pazopanib plus lapatinib combination therapy in patients with advanced and recurrent cervical cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2010 Aug 1;28(22):3562-9.

Monk BJ. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 2014, 370(8), 734–743.

Monk BJ, Sill MW, McMeekin DS, Cohn DE, Ramondetta LM, Boardman CH, Cella D. Phase III trial of four cisplatin-containing doublet combinations in stage IVB, recurrent, or persistent cervical carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(28), 4649–4655.

Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, Lyerly HK. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005 Feb 21;23(1):9.

Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2014, 3(1), 1–14.

Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, D'Souza-Schorey C. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*, 2009, 19(22), 1875–1885.

Nagao S, Fujiwara K, Oda T, Ishikawa H, Koike H, Tanaka H, Kohno I. Combination chemotherapy of docetaxel and carboplatin in advanced or recurrent cervix cancer. A pilot study. *Gynecologic Oncology*, 2005, Mar, 96(3), 805-9.

Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Zöller M. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Research*, 2010, 70(4), 1668–1678.

Ohno SI, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microrna to breast cancer cells. *Molecular Therapy*, 2013, 21(1), 185–191.

Pascucci L, Coccè V, Bonomi A, Ami D, Ceccarelli P, Ciusani E, Pessina A. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor

growth: A new approach for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2014, 192, 262–270.

Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, Alberts DS. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, 18(8), 1606–1613.

Rao Q, Zuo B, Lu Z, Gao X, You A, Wu C, Du Z, Yin H. Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro. *Hepatology*. 2016, 64, 456-472.

Qu M, Lin Q, Huang L, Fu Y, Wang L, He S, Fu Y, Yang S, Zhang Z, Zhang L, Sun X. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease. *Journal of Control Release*. 2018 Oct 10, 287, 156-166.

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding CV, Melief CJM, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 183(3), 1161–1172.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 2013, 200(4), 373–383.

Record M, Silvente-Poirot S, Poirot M, Wakelam MJO. Extracellular vesicles: Lipids as key components of their biogenesis and functions. *Journal of Lipid Research*, 2018, 59(8), 1316–1324.

Reddy VS, Madala SK, Trinath J, Reddy GB. Extracellular small heat shock proteins: exosomal biogenesis and function. *Cell Stress and Chaperones*, 2018, 23(3), 441-454.

Ren G, Wang Y, Yuan S, Wang B. Dendritic cells loaded with HeLa derived exosomes simulate an antitumor immune response. *Oncology Letters*. 2018, 15, 6636-6640.

Shen J, Zhu X, Fei J, Shi P, Yu S, Zhou J. Advances of exosome in the development of ovarian cancer and its diagnostic and therapeutic prospect. *OncoTargets and Therapy*, 2018,

11, 2831–2841.

Shin H, Han C, Labuz JM, Kim J, Kim J, Cho S, Park J. High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system. *Nature Publishing Group*, 2015, 1–11.

Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2018, 47, 2–13.

Slater TF, Sawyer B, Sträuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 1963, 77(C), 383–393.

Slee EA, Adrain C, Martin, SJ, Executioner caspases-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (10), 7320-7326.

Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, Gaffney DK. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*, 2017, 123(13), 2404–2412.

Shtam TA, Kovalev RA, Varfolomeeva EY, Makarov EM, Kil YV, Filatov MV. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro. *Cell Communication and Signaling* 2013, 11, 1186–96.

Srivastava A, Amreddy N, Pareek V, Chinnappan M, Ahmed R, Mehta M, Ramesh R. Progress in extracellular vesicle biology and their application in cancer medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2020, January, 1–20.

Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 2001, 89(2), 205–212.

Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, Zhang HG. A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy*, 2010, 18(9), 1606–1614.

Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *METHODS*, 2015 Oct 1, 87,3-10.

Tewari KS, Sill MW, Long HJ, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, Thaker PH, Salani R, Brady WE, Lankes HA, Cohn DE, Mutch DG, Fracasso PM. A phase I trial of paclitaxel, cisplatin, and veliparib in the treatment of persistent or recurrent carcinoma of the cervix: an NRG Oncology Study (NCT01281852). *Annals of Oncology*, 2017, 28(3), 505–511.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 2006, 30(1), 3.22.1-3.22.29.

Thigpen JT, Blessing JA, DiSaia PJ, Fowler WC, Hatch KD. A randomized comparison of a rapid versus prolonged (24 hr) infusion of cisplatin in therapy of squamous cell carcinoma of the uterine cervix: A gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology*, 1989, 32(2), 198–202.

Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, Wei J, Nie G. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*. 2014 Fe, 35(7), 2383-90.

Trajkovic K. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 2008, 320(5873), 179.

Turut FA, Acidereli H, Cevik O. Suppression of MicroRNA-144 Promotes CXCR4 and CXCL12 Expression and Downregulates Apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *BioRxiv* 2020, 04,17, 042382.

Tüylek Z. İlaç taşıyıcı nanosistemler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2018, 24(3), 274–282.

Vaccarella S, Franceschi S, Bray F. The incremental benefits of implementing effective cervical cancer screening. *International Journal of Cancer*, 2016, 138(1), 254–255.

Vakhshiteh F, Atyabi F, Ostad SN. Mesenchymal stem cell exosomes: A two-edged sword

in cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 2019, 14, 2847–2859.

Valadi H, Ekström K, Bossios AS, Jöstrand, M, Lee, JJ, Lötvall JO. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 2007, 9, 654–659.

Vallejo CT, Machiavelli MR, Perez JE, Romero AO, Bologna F, Vicente H. Docetaxel as neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced cervical carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2003, 26, 477 – 82.

Van Dommelen SM, Vader P, Lakhal S, Kooijmans SAA, Van Solinge WW, Wood MJA, Schiffelers RM. Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161(2), 635–644.

Wahlgren J, Karlson TDL, Brisslert M, Sani FV, Telemo E, Sunnerhagen P, et al. Plasma exosomes deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Journal Nucleic Acids Research* 2012, 40 e130.

Walker JM. Gradient SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: Walker J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. 2002, 69-72.

Wang N, Xie L. Diagnostic and therapeutic applications of tumor-associated exosomes. *Precision Radiation Oncology*, 2017, 1(1), 34–39.

Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Physiology & Behavior*, 2016 (C. 176, ss. 103–141).

Whitney CW, Sause W, Bundy BN, Malfetano JH, Hannigan EV, Fowler WC, Liao SY. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: A Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, 1999, 17(5), 1339–1348.

WEB_1. 2020. <http://www.exocarta.org> (29.11.2010)

WEB_2. 2020. Dünya Sağlık Örgütü [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer) (29.11.2010)

WEB_3. 2020 Dünya Sağlık Örgütü Ulusal Kanser Araştırmaları <https://gco.iarc.fr/today/home> (05.01.2021)

Yang D, Zhang W, Zhang H, Zhang F, Chen L, Ma L, Larcher LM, Chen S, Liu N, Zhao Q, Tran PHL, Chen C, Veedu RN, Wang T. Theranostics Progress , opportunity , and perspective on exosome isolation—efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 2020 Feb 19, 10(8), 3684-3707.

Yang F, Liao X, Tian Y, Li G. Exosome separation using microfluidic systems : size-based , immunoaffinity-based and dynamic methodologies. *Biotechnol Journal*, 2017 April, 12(4), 1600699.

Yang T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R, Bai S. Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio. *Pharmaceutical Research*, 2015, 32(6), 2003–2014.

Yong T, Zhang X, Bie N, Zhang H, Zhang X, Li F, Hakeem A, Hu J, Gan L, Santos HA, Yang X. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nature Communications*, 2019, 10, 3838.

Zhang Y, Luo CL, He BC, Zhang JM, Cheng G, Wu XH. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: A novel vaccine for renal cell carcinoma. *International Journal of Oncology*. 2010, 36, 133-140.

Zhang M, Zang X, Wang M, Li Z, Qiao M, Hu H, Chen D. Exosome-based nanocarriers as bio-inspired and versatile vehicles for drug delivery: recent advances and challenges. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(15), 2421–2433.

Zhao Y, Haney MJ, Gupta R, Bohnsack JP, He Z, Kabanov AV, Batrakova EV. GDNF-transfected macrophages produce potent neuroprotective effects in parkinson's disease mouse model. *Plos One*, 2014, 9(9), 1–11.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : CENİK, Melike
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Kuşadası / 16.09.1992
E-mail : melikeren1@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora		
Y. Lisans		
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2015

BURSLAR ve ÖDÜLLER

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2017-2019	Çapa Çevre Analiz Laboratuvarı	Biyolog
2017	Egetest Çevre Ölçüm Ve Kalibrasyon Hizmetleri	Biyolog
2016	SAI International Analiz Laboratuvarı	Biyolog

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

2. PROJELER

Pisum sativum' da ağır metal toksisitesinin araştırılması, 2014, Lisans Bitirme Projesi

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler