



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**EKSOZOMLARIN KOLŞİSİN İLE BİRLİKTE
ETKİSİNİN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA
MİKROTÜBÜLLER ÜZERİNDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Derin KUMCUOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı Adı

İzmir
2024

i

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**EKSOZOMLARIN KOLŞİSİN İLE BİRLİKTE
ETKİSİNİN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA
MİKROTÜBÜLLER ÜZERİNDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Derin KUMCUOĞLU

Danışman(lar) : **Prof. Dr. Afig BERDELİ**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı Adı
Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

**İzmir
2024**

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.

Afif BERDELİ

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Yüksek Lisans Tezinin Kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Meme kanseri dünya çapında bütün kadınları etkileyen, ölümlle sonuçlanan kanser türüdür. Günümüzde biyolojinin, nanoteknolojinin ve mühendisliğin birleşmesiyle çeşitli yeni tedavi yöntemleri sunulmaktadır. Nispeten yeni bir yaklaşım olan farklı hastalıklarda kullanılan ilaçları kanser tedavsinde kullanma yöntemi üzerindne yola çıkarak bu tez çalışması tasarlanmıştır.

Tez çalışma konumun belirlenmesinde, çalışmanın hazırlanma sürecinden her aşamasına kadar bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanlarını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Afig Berdeli ve birlikte çalıştığım Dr. Ayten SEFERLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

İzmir, 01.07.2024

Derin KUMCUOĞLU

ÖZET

**EKSOZOMLARIN KOLŞİSİN İLE BİRLİKTE ETKİSİNİN MEME
KANSERİ HÜCRE HATTINDA MİKROTÜBÜLLER ÜZERİNDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

KUMCUĞLU, Derin

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Afig BERDELİ

Temmuz 2024, 69 sayfa

Meme kanseri kadınlarda en sık teşhis edilen ve en fazla ölümlle sonuçlanan kanserdir. Tüm ökaryotik hücrelerin hücre iskeletinin temelini oluşturan mikrotübüller, dinamik bir yapıya sahip α - ve β -tübülün heterodimerlerinden oluşmaktadır. Hücre içi taşıma ve mitoz gibi birçok hücreysel olayda yer almalarından dolayı, özellikle meme kanser tedavisinde antimitotik ajanlar sıkça kullanılmaktadır. Biyoaktif doğal bir alkaloid ajanı olan kolşisin, ağrıyı tedavi etmek ve doku şişkinliğini azaltmak için kullanılan anti-inflamatuar ilaçtır. Kolşisinin terapötik etki mekanizması, mikrotübül düzeneğini bozarak hücre bölünmesini engellemektedir. Kolşisinin toksisitesi ve dar terapötik indeksi nedeniyle kanser tedavisinde klinik uygulamaları kabul edilmemiştir. Eksozomlar, ökaryotik hücreler tarafından hücre dışı mikroçevreye salgılanan ve tüm vücut sıvılarından elde edilebilen doğal nanoparçacıklardır. Bu tez çalışmasında mikrotübül inhibitörü olan kolşisinin, koruyucu özellik sergileyebilen eksozomlar ile birlikte verilerek tübülün genleri üzerinden meme kanseride terapötik etkileri araştırılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda kolşisinin meme kanseri hücre hattında sitotoksik etkisinin eksozomlarla birlikte verildiğinde azaldığı, tübülün gen ifadelerini arttırdığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tübülün genlerinin ekspresyonlarına bakılarak, eksozomların kolşisinin meme kanseri hücreleri üzerindeki toksisitesine karşı koruyucu özellik gösterebiliyor olabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler; Eksozom, Kolşisin, Meme kanseri, MCF-7 hücre hattı, Mikrotübüller, α -tübülün, β -tübülün

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECT OF EXOSOMES TOGETHER WITH COLCHICINE ON MICROTUBULES IN BREAST CANCER CELL LINE

KUMCUĞLU, Derin

MSc in Department of Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Afig BERDELİ

July 2024, 69 pages

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women and the leading cause of death. Microtubules form the basis of the cytoskeleton of all eukaryotic cells, which consist of α - and β -tubulin heterodimers with a dynamic structure. Antimitotic agents are frequently used in breast cancer treatment, since they are involved in many cellular events such as intracellular transport and mitosis. A bioactive natural alkaloid agent colchicine is an anti-inflammatory drug used to treat pain and reduce tissue swelling. The therapeutic mechanism of action of colchicine is to prevent cell division by disrupting the microtubule mechanism. Because of its toxicity and narrow therapeutic index, its clinical applications in cancer treatment have not been accepted. Exosomes are natural nanoparticles secreted by eukaryotic cells into the extracellular microenvironment and can be obtained from all body fluids. In this study, the therapeutic effects of colchicine treatment together with exosomes that can exhibit protective properties, on breast cancer were investigated through tubulin genes.

As a result of the study, it was determined that the cytotoxic effect of colchicine on the breast cancer cell line decreased when given with exosomes and increased tubulin gene expressions. According to the results obtained by evaluating the expression of tubulin genes, it was revealed that exosomes may have protective properties against the toxicity of colchicine on breast cancer cells.

Key Words; Exosome, Colchicine, Breast cancer, MCF-7 cell line, Microtubules, α -tubulin, β -tubulin

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
KISALTMALAR LİSTERİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.1. Mikrotübüller.....	5
2.3. Kolşisin.....	6
2.3.1. Keşfi ve Kullanım Alanı	6
2.3.2. Yapısı	7
2.3.3. Etki Mekanizması	8
2.4. Ekstrasellüler Vesiküller	9
2.4.1. Eksozomlar	10
2.4.2. Hücreler Arası İletişim.....	11
2.4.3. Yapısı ve Bileşenler	12
2.4.3.1. Sakkaritler	14
2.4.3.2. Lipidler.....	14
2.4.3.3. Proteinler.....	15
2.4.3.4. Nükleik Asitler.....	17
2.4.4. Biyogenez	18
2.4.5. İzolasyon Yöntemleri.....	20
2.4.5.1. Ultrasantrifüj Esaslı İzolasyon Teknikleri	20
2.4.5.1.1. Diferansiyel Ultrasantrifüjleme	21
2.4.5.1.2. Yoğunluk Gradyan Ultrasantrifüjleme	21
2.4.5.2. Ultrafiltrasyon.....	21
2.4.5.3. Boyutu Dışlama Kromatografisi	22

2.4.5.4. İmmünoafinite Kromatografisi	23
2.4.5.5. Polimer Esaslı Çöktürme ile Ayırma	23
2.4.5.6. Mikroakışkan Esaslı Teknolojiler	24
2.4.5.7. Yeni Yaklaşımlar	24
2.4.5.8. Karakterizasyon Yöntemleri	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1. Araç ve Gereçler	26
3.1.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri	26
3.2. Yöntem	28
3.2.1. MCF-7 Hücre Hattı Kültürü	28
3.2.1.1. Hücre Çözdürmesi	28
3.2.1.2. Pasajlama	28
3.2.1.3. Hücre Sayımı	29
3.2.1.4. Hücre Dondurması	30
3.2.2. Kolşinin IC ₅₀ değerinin MTT Testi ile Tespit Edilmesi	31
3.2.3. Eksozom, Kolşisin ve MCF-7 Hücrelerinin Birlikte Kültürü	33
3.2.4. RNA İzolasyonu	34
3.2.4.1. NanoDrop ile RNA Saflığının Kontrolü	37
3.2.5. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile RNA'dan cDNA Sentezi	37
3.2.5.1. Jel Elektroforez ile cDNA Kontrolü	39
3.2.6. RT-PCR ile Gen Ekspresyonu İncelemesi	41
3.2.6.1. Plaka Hazırlama	41
3.2.6.2. Termal Döngü	42
4. BULGULAR	45
4.1. Kolşisinin meme kanseri MCF-7 hücrelerinin çoğalması üzerinde etkisi	45
4.2. Kolşisinin MCF-7 hücreleri üzerindeki IC ₅₀ Değerleri	46
4.3. Kolşisin ve eksozomların meme kanseri MCF-7 hücrelerinin üzerinde etkisi	47
4.4. RNA eldesini saflığı ve cDNA Sentezi	48
4.5. Kantitatif-PCR (qPCR) Analizi	48
5. TARTIŞMA	50

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKÇA.....	56
TEŞEKKÜR.....	70
ÖZGEÇMİŞ	71



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Eksozom içeriği.	13
Tablo 2. Çalışmada kullanılan malzemeler.	26
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar.	27
Tablo 4. Bir örnek için cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği.	38
Tablo 5. cDNA sentezi için uygulanan PCR parametreleri.	38
Tablo 6. Bir örnek için RT-PCR için kullanılan reaksiyon içeriği.	41
Tablo 7. RT-PCR içeriği	41
Tablo 8. RT- PCR' da kullanılan primerler.	42
Tablo 9. Bir örnek için RT-PCR için kullanılan reaksiyon içeriği.	42
Tablo 10. Farklı konsantrasyonlarda kolşisin ile 24 ve 48 saat boyunca tedavi edilen meme kanseri MCF-7 hücrelerinden elde edilen MTT tahlil sonuçları (OY: optik yoğunluk, SS: standart sapma).....	45
Tablo 11. Kantitatif-PCR (qPCR) sonucu grupların elde edilen ortalama Ct değerleri.	49
Tablo 12. Meme kanseri tedavisinde kullanılan antimitotik ajanlar.	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Mikrotübül yapısı.....	5
Şekil 2. Kolşisinin yapısı.	8
Şekil 3. Kolşisin, tübülün heterodimeri üzerindeki kolşisin bağlanma bölgesinden, A ve C halkası tübüline, B halkası tübülün bağlanarak polimerizasyonu engellemektedir.	9
Şekil 4. Eksozom yapısı.	12
Şekil 5. Eksozom biyogenezi.	18
Şekil 6. MCF-7 hücrelerini mikroskop görüntüsü.	29
Şekil 7. MCF-7 hücrelerinin tripan mavisi boyaması ile sayımı.	30
Şekil 8. MTT testi ile MCF-7 hücrelerine farklı dozlarda kolşin uygulanması. Üst üçlü grup 48 saat, alt üçlü grup 24 saatlik inkübasyon.	32
Şekil 9. MTT plağının mikropak okuyucusuna yüklenmesi.	32
Şekil 10. Eksozom, kolşisin ve MCF-7 Hücrelerinin birlikte kültür edildiği plaklar.	33
Şekil 11. TRIzol reaktifi eklenmiş hücreler.	35
Şekil 12. Kloroform sonrası faz ayrımı.	36
Şekil 13. RNA çökeltisi.	36
Şekil 14. NanoDrop cihazında RNA saflığının kontrolü.	37
Şekil 15. Veriti 96 kuyucuklu Thermal Cycler cihazında cDNA sentezi.	39
Şekil 16. Jel elektroforezinde yürütülen cDNA örnekleri.	40
Şekil 17. Step One Plus Real-Time PCR System cihazına plakanın yerleştirilmesi.	43
Şekil 18. Amplifikasyon parametreleri	44
Şekil 19. PCR amplifikasyonunun yürütülmesi.	44
Şekil 20. Farklı konsantrasyonlardaki kolşisinin meme kanseri MCF-7 hücrelerinin çoğalması üzerindeki inhibisyon etkisi.	46
Şekil 21. Tedaviden sonra MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığının mikroskop görüntüleri	47
Şekil 22. Jel elektroforezi sonrası cDNA fragman bantlarının UV ışığı altında görüntüleri.	48
Şekil 23. Fold Change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) değerlerinin sonuçları.	49

KISALTMALAR LİSTERİ

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ALIX	ALG-2 İle Etkileşime Giren Protein X
ATP	Adenozin Trifosfat
BBB	Kan-Beyin Bariyeri
BRCA1	Breast Cancer 1 Geni
cDNA	Ters Kopyalanmış Tamamlayıcı DNA
c-Kit	Mast/Kök Hücre Büyüme Faktörü Reseptörü
ctDNA	Dolaşan Tümör DNA'sı
DLS	Dinamik Işık Saçılımını
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testine
ERM	Ezrin-Rodiksin-Moesin
ESCRT	Taşıma İçin Gerekli Endozomal Ayırma Kompleksleri
EV	Ekstrasellüler Veziküller
FasL	İlk Apoptoz Sinyali (FAS) Ligandı
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Gıda Ve İlaç İdaresi
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GDP	Guanozin Difosfat
GPCR	G Proteini -Bağlı Reseptörler
GTP	Guanozin Trifosfat
HDF	Hidrostatik Filtrasyon Diyalizi
HER-2	Human Epidermal Growth Factor-2
HSP	Isı Şoku Proteinleri

IC50	Yarı-Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ICAM-1	Hücreler Arası Yapışma Molekülü-1
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
ILV	İntralüminal Veziküller
M.Ö.	Milattan Önce
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 Hücre Hattı
mDNA	Mitokondriyal DNA
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı RNA
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
MVB	Multiveziküler Cisimler
MWCO	Moleküler Ağırlık Kesimleri
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
nPES	Nanoplasmonla Güçlendirilmiş Saçılma
NTA	Nanopartikül İzleme Analizini
OY	Optik Yoğunluk
PA	Fosfatidik Asit
PC	Fosfatidilkolin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	Fosfatidiletanolamin
PEG	Polietilen Glikol
PI	Fosfatidilinositol
PS	Fosfatidilserin
qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakika Başına Devir
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
siRNA	Sinyale Müdahale Eden RNA
SRP	Yüzey Plazmon Rezonansını
SS	Standart Sapma

TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü -B
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TRAIL	TNF İle İlişkili Apoptoz İndükleyici β Ligandı
TRPS	Ayarlanabilir Dirençli Darbe Algılamayı
TSG101	Tümör Baskılayıcı Gen 101 Proteini
TUBA1B	Tubulin Alpha 1b
TUBB	Tubulin Beta Class I
VEGFR-2	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü Tip-2



1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda genetiğe, ağırlığa, yaşa ve beslenme alışkanlıklarına bağlı olabilen, en sık teşhis edilen kanser olup, kanserden ölümlerin önde gelen nedeni olan malign tümördür (Bhushan *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2016). Tedaviler arasında ameliyat, hormonal tedavi, immünoterapi, kemoterapi, radyoterapi ve gen tedavileri yer almaktadır (Al-Mahmood *et al.*, 2018). Kanser tedavisinde kullanılan mevcut kemoterapi veya kombine ilaç tedavileri, hastalığı iyileştirmekten ziyade tümör ilerlemesini yavaşlatmayı ve hastanın hayatta kalma süresini uzatmayı amaçlamaktadır. Bu nedenle kanser tedavisi için etkili, uygun maliyetli ve daha düşük yan etkilere sahip yeni teknolojilerin araştırılması sıklıkla gündeme gelmektedir.

Mikrotübüller, ökaryotik hücrelerde bulunan, hücre bölünmesi, hücre içi taşıma, hücre göçü, hücre şeklinin korunması ve mitoz gibi olaylarda görev alan hücre iskeletinin temel bileşenleridir. Hızla birleşip ayrılabilen α - ve β -tübülün heterodimerlerinden oluşan boru şeklinde, dinamik polimerler yapıya sahiplerdir (Liu *et al.*, 2013). Kanser tedavisi için mikrotübüllerin hedeflenmesi, birçok hücreyel olaya dahil olmaları nedeniyle onları kanser tedavisinde çekici bir hedef haline getirmektedir. Mikrotübülü hedef alan antimitotik ajanlar, tübülünler üzerindeki farklı bağlanma bölgelerini hedefleyerek tübülünün polimerizasyonunu ya inhibe eder ya da teşvik eder (Parker *et al.*, 2014; Cirillo *et al.*, 2017). Alkaloidler, mikrotübül dinamiklerini baskıladıkları için güncel kanser tedavi yöntemlerinde tercih edilmektedir (Loh *et al.*, 2021).

Kolşisin, eski bir şifalı bitki olan *Colchicum autumnale*'den izole edilmiş ve saflaştırılmış bir alkaloid ajandır. Ailesel Akdeniz Ateşi, akut gut, ve Behçet hastalığında ağrıyı tedavi etmek ve doku şişkinliğini azaltmak için klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan anti-inflamatuar ilaçtır (Zhang *et al.*, 2022; Zhou and Giannakakou, 2005; Slobodnick *et al.*, 2017). Kolşisinin terapötik etki mekanizması, tübülün heterodimerine bağlanarak konformasyonu bozar, polimerizasyonu inhibe eder ve bu sayede hücre bölünmesini engellemektedir (Islam, & Iskander, 2004). Kolşisin, düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında mikrotübül büyümesini baskılar, yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında ise mikrotübüllerin

polimerizasyonunu engeller (Leung *et al.*, 2015; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Sivakumar, 2013). Yüksek dozlarda normal dokularda ciddi toksisiteye neden olduğu bilindiğinden kanser tedavilerinde kullanımı sınırlıdır. Ancak kolşisinin malignite üzerinde, kanser hücresi göçünü ve olası metastazının inhibe etmesi, anjiyogenezin önlenmesi ve apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanan mitokondriye adenozin trifosfat (ATP) akışının sınırlandırılması gibi etkileri olduğu bildirilmiştir (Leung *et al.*, 2015; Charpentier *et al.*, 2014; Bhattacharyya *et al.*, 2008).

Mikrotübüller, antikanser tedavisi için önemli bir hedef olmasına rağmen, dar terapötik indeksi, olumsuz ilaç etkileşimleri ve toksisitesi nedeniyle kolşisinin klinik uygulamaları kabul edilmemiştir (Cury *et al.*, 2019; Sivakumar, 2013; Jordan and Wilson, 2004). Nanoteknoloji, kanser kemoterapötik ajanları gibi yüksek toksik potansiyele sahip ilaçlara, ilaç hedeflendirme ve taşıma yoluyla birçok avantaj sunar. Günümüzde çeşitli nanoparçacıklar geliştirilmiş olup, en çok tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerden ikisi lipozomlar ve polimerik nanopartiküllerdir ve bu malzemelere terapötik ajanlar eklenerek tasarlanır (Patra *et al.*, 2018; Ventola, 2012). Nanoparçacıklar, sahip oldukları 1 ila 100 nm arasında değişen boyutlarıyla, ilaçların doğrudan hedef bölgeye iletilmesine yardımcı olur, daha uzun dolaşım yarı ömürleri ve ilaç geçirgenliği sağlayarak birçok avantaj sunarlar (Patra *et al.*, 2018; Ventola, 2012; Loh *et al.*, 2021). Eksozomlar ise, boyutları 30 ila 150 nm arasında değişen bir tür lipit bazlı nanoparçacıklardır. Eksozomlar, hücreler tarafından salgılanan en küçük veziküllerdir. Normal fizyolojik ve patolojik koşullar altında multivesiküler cisimlerden (MVB'ler) üretilirler ve plazma zarı ile kaynaştıktan sonra hücre dışına salgılanırlar (Yin *et al.*, 2019). Üretildikleri ana hücreyle aynı yapıya sahip eksozomlar, yapısında bulundurduğu proteinler, metabolitler, enzimler ve nükleik asitlerin iletilmesi ile hücreler arasında haberciler olarak hizmet edebilir ve alıcı hücrelerin biyolojik tepkisini etkili bir şekilde değiştirebilirler (Kim *et al.*, 2020; Kalluri and LeBleu, 2020).

Son zamanlarda eksozomlar, ya kendi başlarına koruyucu nanopartiküller olarak ya da ilaç yüklenen nanotaşıyıcılar olarak, terapötik madde yetileri araştırılmaktadır. Eksozomların lipit, protein ve nükleik asit bileşimi, biyoyararlanımı artırabileceği, yenileyici özellikleri sağlayabileceği ve olumsuz reaksiyonları en aza indirebileceği

gösterilmiştir (Kalluri and LeBleu, 2020; Dutta and Paul, 2022). Ayrıca, eksozom aracılı ilaç hedeflendirmesi, düşük immünojenisite, düşük toksisite, en aza indirilmiş yan etkiler, dokularda uzun süreli birikim ve hücrelere doğrudan teslim gibi avantajlar sunmaktadır (Antimisialis et al., 2018; Liang et al., 2021; Sancho-Albero et al., 2020). Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), kendini yenileme yeteneğine sahip olan ve aynı zamanda çok soylu farklılaşma sergileyen multipotent hematopoietik olmayan hücrelerdir. MSC'ler inflamasyonu hafifletmek, vaskülarizasyonu indüklemek, proliferasyonu teşvik etmek, koruyucu ve yenileyici özellikler sağlamaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin en verimli eksozom kaynaklarından biri olduğu bilinmektedir ve MSC'lerden salgılanan eksozomlar türetildikleri hücrelerin biyolojik işlevlerini göstermektedir (Birtwistle, 2021).

Mikrotübül dinamiklerinin manipülasyonu, mitozdaki hücre döngüsünü etkilediği ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Meme kanseri tedavisinde, tübülün polimerizasyonunun dinamik dengesini değiştiren, paklitaksel, dosetaksel ve benzeri antimitotik ajanlar kullanılmaktadır (Alli E. et al., 2002). Bu sebeple MCF-7 meme kanseri hücre hattı, kolisinin mikrotübüller üzerindeki etkinliğinin rahatça gözlemlenebileceği bir kanser hücre hattıdır. Eksozomların potansiyel koruyucu özellikleriyle kolşisinin sitotoksik etkisini azaltarak, kanser tedavisinde teröpatik penceresi araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanser ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olup, heterojen ve karmaşık bir hastalıktır. Epidemiyolojik çalışmalar, yaşın, genetiğin, ağırlığın ve beslenme alışkanlıklarının meme kanseri riskiyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Bhushan *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2016).

Diğer bütün kanser türlerinde olduğu gibi erken teşhisi ve etkili tedavisi, olumlu prognoz için çok önemlidir. Tanı konulduğunda tümör boyutları küçük olan hastaların hayatta kalma oranı önemli ölçüde daha yüksektir ve kanserin ölümcül olma olasılığı da önemli ölçüde azalmaktadır. Tedavi yöntemleri arasında ameliyat ile doku alınması, hormonal tedavi, immünoterapi, kemoterapi, radyoterapi ve gen tedavileri yer almaktadır (Bhushan *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2016).

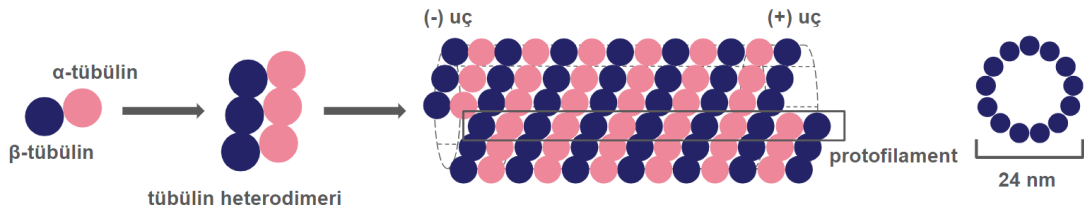
İnvaziv meme karsinomunun birçok farklı histolojik kökeni ve moleküler alt tipi vardır. Luminal A meme kanseri düşük dereceli, östrojen ve progesteron reseptör pozitif ancak HER-2 için negatiftir. Diğer kanserlerle karşılaştırıldığında mükemmel bir prognozla yavaş çoğalma eğilimindedir. Luminal B meme kanseri, progesteron reseptörü negatif, östrojen reseptörü ve HER-2 pozitifdir. Luminal B kanser alt tipi, daha hızlı proliferasyon oranıyla ilişkilidir ve Luminal A meme kanserine kıyasla daha agresif olma eğilimindedir, bu da prognozunu biraz daha kötü hale getirir. HER2 ile zenginleştirilmiş meme kanseri, östrojen ve progesteron reseptörü için negatif ancak HER-2 pozitifdir. Bu alt tip, lüminal kanserlere göre daha hızlı çoğalma eğilimindedir. Bazal benzeri meme kanseri, üçlü negatif yani progesteron reseptörü, östrojen reseptörü ve HER-2 negatiftir. BRCA1 gen mutasyonlarına sahip kadınların bu kanser türünü geliştirme olasılığı daha yüksektir. Normal benzeri meme kanseri, luminal A kanseriyle aynı östrojen ve progesteron reseptör pozitif ancak HER-2 için negatiftir. Ancak normal meme kanserinin prognozu luminal A kanserinden biraz daha kötüdür (Bhushan *et al.*, 2021; Al-Mahmood *et al.*, 2018).

2.1. Mikrotübüller

Mikrotübüller, oldukça dinamik, uzun, ipliksi bir yapıya sahip, ökaryotik hücrelerin hücre iskeletinin temel bileşenleridir. Vezikül taşınması, hücre sinyali, hücre bölünmesi, hücre şeklinin ve polaritesinin korunması dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde rol oynarlar. Ayrıca, mitoz sırasında kromozomların ayrılması ve hareketi için mikrotübüller gereklidir, çünkü bunlar kromozomal hareketliliğin düzenlenmesine yardımcı olan iç iplikler oluştururlar (Liu *et al.*, 2013; Jordan and Wilson, 2004).

Mikrotübüller, mikrotübül yapısını oluşturmak için polimerleşerek küresel proteinler olan α - ve β -tubulin heterodimerlerinden oluşmaktadır. α -tubulin alt biriminin tipik olarak mikrotübülün eksi ucunda bulunduğu, β -tubulin alt biriminin ise mikrotübülün artı ucunda yer aldığı polar bir yapıya sahiptirler. Bu tübülün heterodimerleri, mikrotübüllerin yapı taşları olan protofilamentleri oluşturmak için baştan kuyruğa doğru düzenlenirler. Silindirik tüp yapısını oluşturmak için on üç protofilament birbirine paralel olarak hizalanır ve yaklaşık 25 nm çapında sarmal bir düzende dizilirler (Liu *et al.*, 2013; Jordan and Wilson, 2004).

Şekil 1. Mikrotübül yapısı.



Mikrotübüller dinamik kararsızlık sergilerler ve artı uçta hızlı polimerizasyon ve depolimerizasyona uğrarlar. Dinamik yapıları ve düzenleyici rolleri, mikrotübüllerin çeşitli hücresel işlevlere katılmak üzere hızla yeniden organize olmasına olanak tanır ve bu da onları hücre fizyolojisi için gerekli kılar. Bu dinamik davranış, uygun

kromozom hareketi ve ayrışması için hızlı dinamiklerin gerekli olduğu hücrel işlevler, özellikle mitoz için gereklidir (Liu *et al.*, 2013; Jordan and Wilson, 2004).

Mikrotübül oluşumu sırasında GTP (guanozin trifosfat), mikrotübül yapısının düzenlenmesini ve dinamiklerini düzenlemede çok önemli bir rol oynamaktadır. Mikrotübül birleşme sürecinde GTP, mikrotübülün büyüyen ucu ucuna eklenen tübülün heterodimerlerinin β -tubulin alt birimlerine bağlanır. Tübülün dimerleri polimerleştikçe büyüyen ucu uçtaki GTP'ye bağlı tübülün alt birimleri, mikrotübül yapısını stabilize eden bir "GTP başlığı" oluşturur. GTP başlığı, mikrotübülün depolimerizasyonunu önlemeye yardımcı olur ve dinamik stabilitesini ve bütünlüğünü korur. GTP'ye bağlı tübülün alt birimleri mikrotübül yapısına eklendikçe GTP, GDP'ye (guanozin difosfat) hidrolize edilir. GTP bağlanması, GDP'ye hidroliz ve GDP'ye bağlı tübülün alt birimlerinin sonuç olarak salınımı arasındaki denge, mikrotübüllerin dinamik kararsızlığını düzenler. Bu dinamik davranış, mikrotübüllerin büyüme ve parçalanma aşamaları arasında hızla geçiş yapmasına olanak tanır ve ardından tübülün alt birimlerinde konformasyonel değişikliklere yol açmaktadır (Knossow *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2016; Amos, 2011).

2.3. Kolşisin

2.3.1. Keşfi ve Kullanım Alanı

Kolşisin, orijinal olarak zambak (Liliaceae) familyasına ait *Colchicum autumnale* L. bitkisinin (çayır safranı) ve *Gloriosa superba* L. soğanlarından elde edilen en eski tıbbi ilaçlardan biridir (Sivakumar, 2013; Graening and Schmalz, 2004). Bitkisel bir ilaç olarak geçmişi en azından M.Ö. 1500 Mısır el yazmalarına kadar uzanmaktadır ve Çin'de binlerce yıldır ağrıyı tedavi etmek ve doku şişmesini azaltmak için kullanıldığı bilinmektedir (Zhang *et al.*, 2022). Aktif farmakolojik bileşen ilk olarak 1820'de izole edilmiştir ve bugün hala kullanılan aktif bileşen 1833'te saflaştırılarak kolşisin olarak adlandırılmıştır (Ben-Chetrit E. 2019). Ailesel Akdeniz Ateşi, akut gut atağı, perikardit, primer biliyer siroz, sedef hastalığı, Paget hastalığı, skleroderma ve Behçet hastalığında, şiddetli artrit ağrısını tedavi etmek ve eklemdeki doku şişliğini ve sertliğini azaltmak için klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan anti-inflamatuar bir ilaçtır (Zhang *et al.*, 2022; Zhou and Giannakakou, 2005; Slobodnick

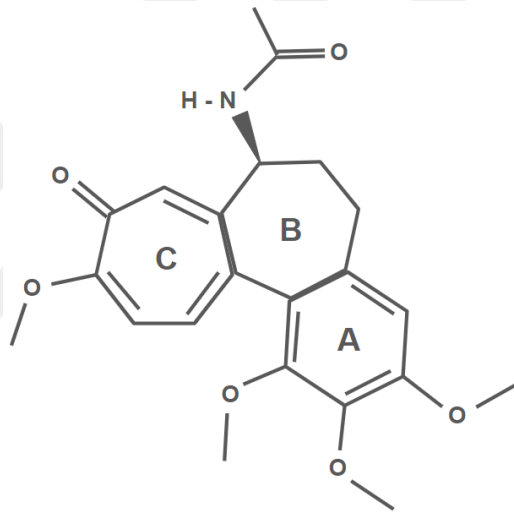
et al., 2017; Dubey *et al.*, 2017). Colcrys VR isimli ilaç, ailesel Akdeniz ateşi ve akut gut tedavisi için 2009 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Dubey *et al.*, 2017; Yang, 2010).

2.3.2. Yapısı

Kolşisin, $C_{22}H_{25}NO_6$ kimyasal formülüne sahip, trisiklik, yağda çözünebilen bir alkaloiddir ve 399.437 g/mol molekül ağırlığına sahiptir (Sivakumar, 2013; Ben-Chetrit E. 2019). Kolşisinin ana yapısı üç heksamerik halkadan oluşmaktadır. Kolşisinin A ve C halkalarının β -tübüline bağlandığı ve tübüline yüksek afiniteli bağlanma için gerekli olan molekülün ana yapı iskelesi oluşturduğu düşünülmektedir (Graening and Schmalz, 2004). B halkası, C7'deki yan zincirin α -tübülün ile etkileşime girmesiyle tübüline bağlanmada rol almaktadır, ancak bağlanma aktivitesi için gerekli değildir (Bhattacharyya *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2009). A halkası bir trimetoksi benzen halkasından oluşmaktadır, C halkası ile birlikte yüksek afiniteli tübülün bağlanması için gereklidir ve anti-tübülün aktivitesi için temeldir. Metil grubunun boyutu önemli bir rol oynamaktadır, 1-metoksi grubu molekülün doğru konformasyonunu ayarlama da önemlidir, oysa 3-metoksi grubu bağlanma yeteneği için önemlidir. Kolşisin ve analoglarının anti-kanser ajanları olarak bağlanma afinitesi ve etkinliği, A halkasında yapılan modifikasyonlardan büyük ölçüde etkilenebilmektedir. (Bhattacharyya *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2009). C halkası bir metoksi tropolon halkasıdır ve kolşisin ile tübülün arasındaki etkileşimler için çok önemlidir. Fotokimyasal ayrışmadan etkilenecek, lümikolşisinler olarak bilinen bileşikler sentezleyerek tübüline bağlanma yeteneği azalabilmektedir. (Bhattacharyya *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2009). B halkası, C-7 konumunda bir asetamid bulunan yedi üyeli bir halkadır, A ve C halkalarını bağlamaktadır ve kolşisin-tübülün bağlanmasının kinetik özelliklerinin modüle edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. C-7 pozisyonundaki farklı yan zincirler veya modifikasyonlar, kolşisin ve kolşisin analoglarının spesifik tübülün izoformlarına karşı bağlanma afinitesini ve etkinliğini etkileyebilmektedir. Pek çok çalışma, modifiye B halkalı kolşisin analoglarının antimitotik aktiviteyi koruduğunu ve kolşisin-tübülün bağlanmasının kinetik özelliklerini modüle ederek hız, aktivasyon

enerjisi, tersinirlik ve ilaç-tübülün kompleksinin kuantum verimi gibi parametreleri etkilediğini göstermiştir (Bhattacharyya *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2009). Kolşisin ve kolşisin bölgesi bağlayıcı maddeler, hücrelerdeki mikrotübüllerin özelliklerini ve fonksiyonlarını anlamak için prob olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır ve bitkilerde metafazda kromozomları ayırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlangıçta tübülün, kolşisine olan yüksek afinitesine dayanarak saflaştırılmıştır (Bhattacharyya *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

Şekil 2. Kolşisinin yapısı.

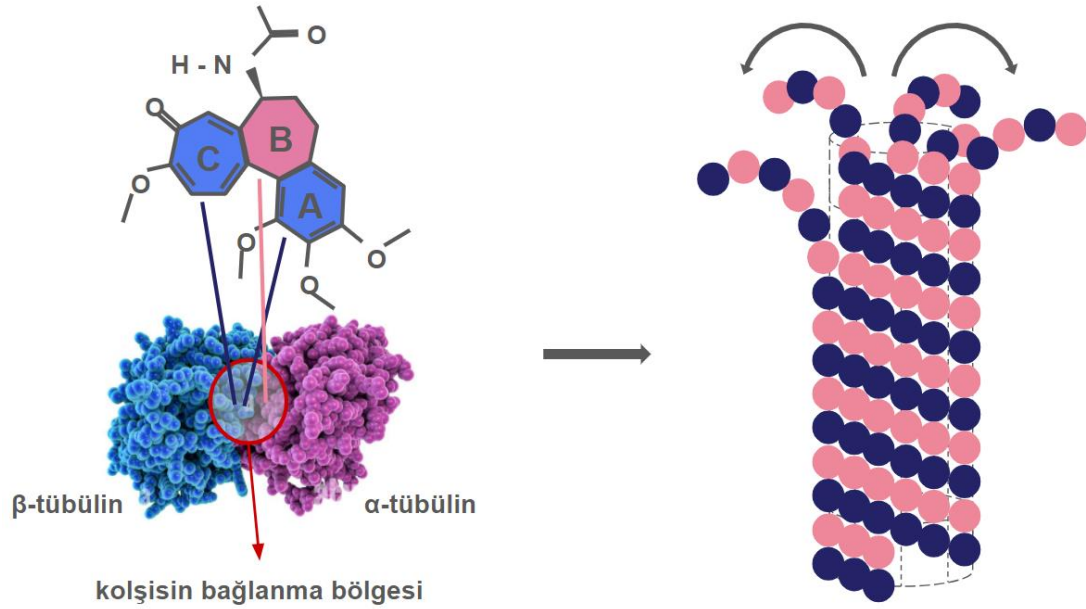


2.3.3. Etki Mekanizması

Kolşisin, protein üzerinde “kolşisin bağlanma bölgesi” adı verilen spesifik bağlanma bölgelerinden tübülün ile zayıf geri dönüşümlü bağlanarak bir tübülün-kolşisin kompleksi oluşturur. Kolşisin A Halkası trimetoksifenil, Cys241 ve Cys356 ile çevrelenen β -tübülünün hidrojen cebine bağlanarak gömülür ve sabitleyici bir çapa görevi görerek mikrotübül bağlanmasını engellemektedir (Islam, and Iskander, 2004) Kolşisin C Halkası metoksitropolon ise, Thr179 ve Val181 çevresinde α -tubulin ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. Kolşisin tübülün heterodimeri ile etkileşime, β -tübülünün S8 ve S9 iplikçikleriyle, T7 halkasıyla, H7 ve H8 sarmallarıyla, aynı zamanda komşu α -alt biriminin T5 halkasıyla etkileşime girer (Islam, and Iskander,

2004; McLoughlin and O'Boyle, 2020; Bhattacharyya *et al.*, 2007; Ravelli *et al.*, 2004). Kolşisin bağlanması üzerine, β -alt ünitesinin H7 sarmalı, Arg390 çevresinde lokal olarak açılır ve yaklaşık 12 derece dönerek tübülün alt üniteleri arasındaki uzunlamasına arayüzde çıkıntı yapmasına neden olur (Peng *et al.*, 2014; Sackett and Varma, 1993; Bhattacharyya *et al.*, 2007). Bu intradimer bükülmesi yapının düz bir konformasyondan kavisli bir konformasyona kaymasına neden olur, bu sayede kolşisin ile α -tubulin arasında sterik bir çatışma yaratarak montaj için gerekli temasları engeller ve yapının sarmal büyümesini bozar (Spasevska *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2012).

Şekil 3. Kolşisin, tübülün heterodimeri üzerindeki kolşisin bağlanma bölgesinden, A ve C halkası tübülüne, B halkası tübülün bağlanarak polimerizasyonu engellemektedir.



2.4. Ekstrasellüler Vesiküller

Ekstrasellüler veziküller (EV'ler), hücrelerden doğal olarak salgılanan, lipidler, nükleik asitler, proteinler, reseptörler ve efektör moleküllerinden oluşan farklı hücresel kargo tiplerini taşımaktan sorumlu nanoparçacıklardır. EV'lerin hücre içi kökenleri, salınım yolağı, fonksiyon, biyogenez, boyut ve içeriğine göre ayrıldığı üç farklı tipi vardır: apoptotik cisimler (apoptozomlar), mikroveziküller ve eksozomlar (Ha *et al.*, 2016; Abels and Breakefield, 2016; Dutta and Paul, 2022; Jafari *et al.*,

2021; Rezaie *et al.*, 2017). Apoptotik cisimler veya apoptozomlar, çapı 500 nm ila 5000 nm arasında değişen boyutlara sahiptir. Apoptozun geç aşamasında hücrel fragmentasyon yoluyla üretilirler ve içerikleri makrofajlar tarafından yutulur. Mikroveziküller ektozomlar, dökülme veziküller, mikropartiküller, plazma membran türevi vezikülleri ve ekzo-veikülleri içermektedir. Çapı 50 nm ila 1000 nm arasında değişen boyutlara sahiptir. Plazma membranından doğrudan dışa doğru tomurcuklanma ve fisyonla oluşarak kargolarını belirlenen alıcı hücreye teslim etmektedirler. Eksozomlar multivesiküler cisimlerden (MVBS) oluşmaktadırlar ve 30 nm ila 150 nm çapındaki boyutları onları hücreler tarafından salgılanan en küçük veziküller yapmaktadır. Erken endozomların plazma membranının içe doğru tomurcuklanmasıyla üretilir ve salınırlar (Ha *et al.*, 2016; Abels and Breakefield, 2016; Dutta and Paul, 2022; Jafari *et al.*, 2021; Théry, *et al.*, 2001). Mikroveziküller ve apoptotik cisimler değişken, heterojen şekillere sahiptir, oysa ki eksozomlar düzgün bir şekil sergilemektedir ve transmisyon elektron mikroskopisi altında sferoid olarak görünür (Zhang *et al.*, 2019; Rezaie *et al.*, 2017).

2.4.1. Eksozomlar

Eksozomlar, ökaryotik hücreler tarafından hücre dışı mikroçevreye salgılanan ve tüm vücut sıvılarında bulunan çift katmanlı lipit katmanlı nanoveziküllerdir (Liu *et al.*, 2019; Dutta and Paul, 2022; Fu *et al.*, 2020). Eksozomlar ilk olarak 1987'de Johnstone tarafından retikülositler tarafından üretilen membrandan türetilen keseciklere atıfta bulunarak tanımlandı (Johnstone *et al.*, 1987; Jafari *et al.*, 2021). İlk keşfedildiklerinde başlarda eksozomlar hakkında çok fazla bilgi mevcut olmadığından, istenmeyen hücrel bileşenleri, hücrel atıkları ve döküntüleri ortadan kaldırakla görevli çöp torbaları olarak kabul edilirdi (Jafari Kooijmans *et al.*, 2016; Xitong and Xiaorong, 2015). Eksozom salgısının retikülositler, B ve T lenfositleri, trombositler, mast hücreleri, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi hematopoietik hücrelerden kaynaklandığı betimlenmektedir. Ayrıca epitel hücreleri, Schwann hücreleri, astrositler, nöronlar, oligodendrositler, melanositler, mezotelyoma hücreleri, adipositler, fibroblastlar, tümör hücreleri ve mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) gibi hematopoietik kökenli olmayan hücreler tarafından da üretilir (Ha *et al.*, 2016 ; Jafari *et al.*, 2021; Frydrychowicz *et al.*, 2014)

Eksozomların meni, kan (serum veya plazma), anne sütü, idrar, amniyotik sıvı, tükürük, beyin omurilik sıvısı, burun salgıları, bronkoalveolar lavaj, safra, sinovyal sıvı gibi çok sayıda biyolojik sıvıda mevcut olduğu bilinmektedir (Jafari *et al.*, 2021; Kooijmans *et al.*, 2016; Jan *et al.*, 2021 ; Rezaie *et al.*, 2017).

2.4.2. Hücreler Arası İletişim

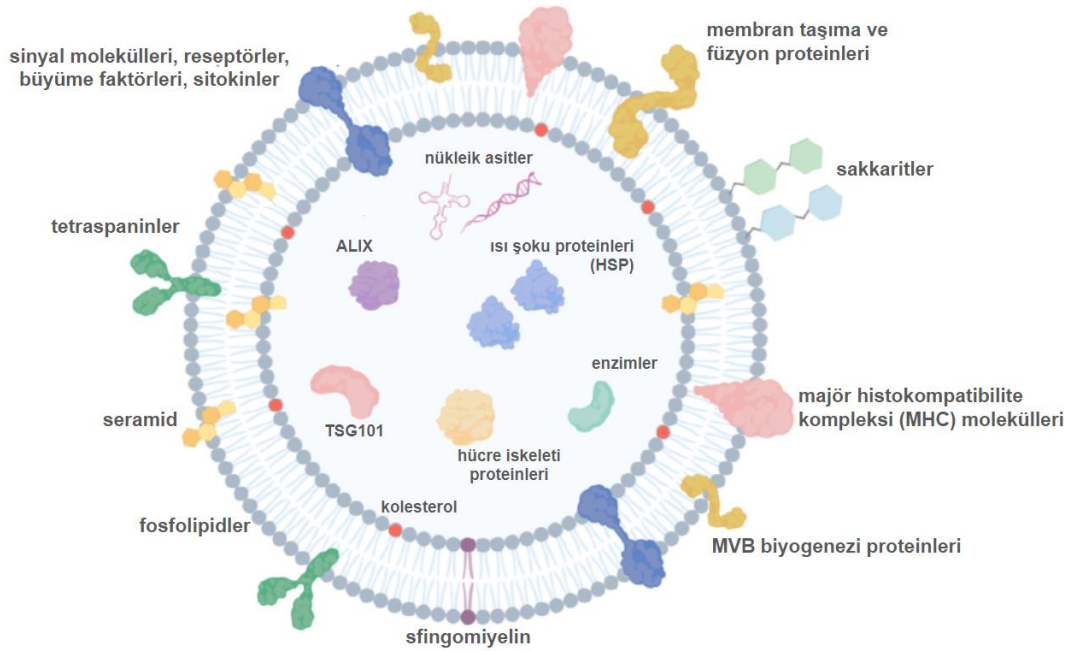
Şu anda, doğal olarak genetik materyallerin ve sinyal moleküllerini taşıyarak uzun mesafeli hücre-hücre iletişimini sağladığı kabul edilmektedir. Kısa mesafelerdeki hücreler arası iletişim, temasa bağlı bir şekilde, bağlayıcı yapı olan boşluk kavşakları ile gerçekleşmektedir. Boşluk kavşakları, komşu hücreler arasında küçük moleküllerin ulaşımını kolaylaştıran konnexin oligomerlerinden oluşmaktadır. Dolaylı hücresel iletişim, salgılanan çözünür faktörleri taşıyan EVler, özellikle eksozomlar aracılığıyla ana hücreden uzaktaki hedef hücelere taşınmasıyla sağlanmaktadır (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012; Zhang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020). Eksozomların taşıdığı biyomoleküller, enzimler, yüzey reseptör proteinleri, sinyal proteinleri, RNA'lar, DNA'lar, lipitler ve alıcı hücelerde spesifik sinyal yollarını müdahale edebilen metabolitleri içermektedir (Patil *et al.*, 2020; Jafari *et al.*, 2021; Berumen Sánchez *et al.*, 2021). Hücresel emilim için, hücresel alımlara aracılık etmek için eksozomal proteinler hedef hücre zarındaki yüzeye bağlı ligand reseptörleri ile etkileşime girerek birleşir. Doğrudan içeriklerini alıcı hücrelerin sitoplazmasına iletmektedir, bu sayede hedef hücre yatay genetik transfer yoluyla epigenetik olarak yeniden programlanır. Göreceli olarak daha küçük boyutları, eksozomların mononükleer fagosit sistemi tarafından temizlenmeden başarılı bir şekilde geçmesine izin verdiğinden, dolaşım sürelerini uzatır, daha stabil bir şekilde kalmalarına izin verir, kan-beyin bariyerini geçebilmelerini sağlar ve ayrıca hücreler arası iletişimde üstünlüklerini göstermektedir (Zhang *et al.*, 2019; Xitong and Xiaorong, 2015; Jafari *et al.*, 2021; Kooijmans *et al.*, 2016). Eksozomların inflamatuvar ve immün yanıtlarda, gelişimde, üremede ve hamilelikte, doku onarımında, patojen yayılmasında, programlanmış hücre ölümünde ve kan pıhtılaşmasında rolleri vardır. Bu nedenle, tümör hücresi proliferasyonunu, anjiyogenezi, hücre dışı matris bozulmasını ve bağışıklık tepkilerinin düzensizliğini

uyararak kanser, otoimmün bozukluklar, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıkların patogenezinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynarlar (Fu *et al.*, 2020; Vlassov *et al.*, 2012; Kalluri and LeBleu, 2020; Berumen Sánchez *et al.*, 2021).

2.4.3. Yapısı ve Bileşenler

Eksozomlar, yaklaşık 30 ila 150 nm çapında küresel nanoveziküllerdir ve bir hücrenin tipik topolojisine benzeyen bir yapıya sahiptirler. Karmaşık yapıları, özellikle biyogenez sırasında ortaya çıkan ana hücreden kalıtsal olarak alınır ve protein bileşimleri de buna göre değişmektedir. Eksozom zarı, bir sakkarit tabakasıyla çevrelenmiş bir çift katlı lipid katmanından oluşmaktadır ve tetraspaninler, MHC proteinleri, yapışma molekülleri ve sinyal proteinleri içermektedir. Hücre içeriğinde nükleik asitler, membran taşıma ve füzyon molekülleri, MVB ile ilişkili proteinler, hücre iskeleti proteinleri, ısı şoku proteinleri ve enzimler bulunmaktadır. Eksozomların protein içeriği, türetildikleri ana hücreyle aynı olduğu için ona bağlı değişmektedir (Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Gurung *et al.*, 2021 ; Ha *et al.*, 2016).

Şekil 4. Eksozom yapısı.



Tablo 1. Eksozom içeriği.

Bileşenler	İçerik
Sakkaritler	α -2,6 sialik asit (sialoglikoprotein)
	karmaşık N-bağlantılı glikanlar
	poli-N-asetil-laktozamin
Lipidler	Kolesterol
	Seramidler
	Sfingomiyelin
	Gangliosid GM3
	Fosfatidilserin (PS)
	Fosfatidilkolin (PC)
	Fosfatidiletanolamin (PE)
	Fosfatidilinositol (PI)
Proteinler	Fosfatidik asit (PA)
	Tetraspaninler
	Majör histokompatibilite kompleksi molekülleri
	Sinyal molekülleri
	Adezyon proteinleri
	Membrane transport and fusion
	MVB biyogenezi proteinleri
	Hücre iskeleti proteinleri
	Isı şoku proteinleri
	Enzimler
Nükleik Asitler	mRNA
	miRNA
	kodlayıcı olmayan RNA
	siRNA
	tek ve çift sarmallı DNA
	genomic ve mitokondriyal DNA
	dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA)
	ters kopyalanmış tamamlayıcı DNA (cDNA)

2.4.3.1. Sakkaritler

Sakkaritler, hücre dışı ortamlarıyla iletişimde önemli bir rol oynar ve hücreye özgü tanıma noktaları olarak hizmet eder. Eksozomun en dış yüzeyi, yüzey proteinlerine ve belirli dış yaprakçık lipitlerine bağlı bir glikan kalkanıyla kaplıdır. Bu kalkan, yüksek mannoz kalıntıları, a-2,6 sialik asit, kompleks N-bağlı glikanlar ve poli-N-asetil-laktozamin içerir (Carlsson *et al.*, 2020 ; Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Batista *et al.*, 2012; Jafari *et al.*, 2021; Escrevente *et al.*, 2013; Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

2.4.3.2. Lipidler

Glikan kalkanının altında, eksozom membranında dağılmış olarak bulunan membran lipidleri sfingomiyelin, gangliosid GM3, kolesterol ve fosfolipidlerden oluşmaktadır. Ancak bu lipitlerin eksozomal membranlardaki sıklığı, hangi hücreden üretildiklerine bağlı olarak değişebilir (Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Gurung *et al.*, 2021; Donoso-Quezada *et al.*, 2021). Çift katmanlı lipit katmanının çoğu, özellikle de dış yaprakçık, sfingomiyelin ve seramid dahil sfingolipidlerden oluşur. Seramidler eksozom salgılanmasında ve kargo sınıflandırmasında görev almaktadırlar. Seramid ve GM3 arasında bulunan bu bağlantılar hücre zarının kavislenmesine katkıda bulunduğu ve lipitlerin yanal dağılımını etkilediği için eksozom sertliğinden sorumludur. Kolesteroler membranda en çok bulunan lipittir. Her iki membran kamanını, lipitlerin polar olmayan kuyruklarından birbirine bağlayarak stabilize etmektedir. Ayrıca, ESCRT mekanizması yoluyla eksozom salgılanmasında görev aldığı bilinmektedir (Donoso-Quezada *et al.*, 2021; Skotland *et al.*, 2017; Sonnino *et al.*, 2006; Trajkovic *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2017). Geri kalan lipit sınıfı olan fosfolipidlerin esas olarak iç yaprakçıkta mevcut olduğu tespit edilmiştir. Fosfatidilkolin (PC), fosfatidilserin (PS), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinositoller (PI'ler), fosfatidik asit (PA) gibi bu fosfolipidler, eksozom oluşumunda ve yapısında görev almaktadırlar. Ayrıca, PS'nin özellikle sinyal verme ve alımda rol aldığı bilinmektedir (Ha *et al.*, 2016; Llorente *et al.*, 2013; Skotland *et al.*, 2017; Gurung *et al.*, 2021; Gu *et al.*, 2017).

2.4.3.3. Proteinler

Eksozomlar tetraspaninler CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 ve CD82 ile oldukça zenginleştirilmiştir. Kendi katalitik aktivitelerini içermezler, bunun yerine protein trafiğini kolaylaştırmak, membran bütünlüğünü korumak, hücre göçüne ve füzyonuna aracılık etmek, sinyal iletimini düzenlemek ve diğer membran proteinlerinin oligomerizasyonunu düzenlemek gibi birkaç hücresel fonksiyonda kritik roller oynarlar (Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Ha *et al.*, 2016; Frydrychowicz *et al.*, 2014; Gurung *et al.*, 2021; Patil *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2019; Escola *et al.*, 1998; SABD *et al.*, 2023).

Antijen sunan hücrelerden salgılanan eksozomlar, immünolojik yanıt oluşturmak için Majör histokompatibilite kompleksi (MHC) molekülleri MHC Sınıf I, MHC Sınıf II ve tetraspanin CD86 içerirken, diğer hücre tiplerinden salınan eksozomlar bu proteinlerden yoksundur (Frydrychowicz *et al.*, 2014; Gurung *et al.*, 2021; Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Théry *et al.*, 2001).

Eksozomlar, hedef hücrelerinin yüzeyindeki spesifik reseptörlerle etkileşime girer ve bir dizi biyolojik süreci düzenleyebilen sinyal yollarını indükleyen, yüzeye bağlı veya membran içinde entegre olan sinyal molekülleri, reseptörler, büyüme faktörleri ve sitokinler bulundurmaktadır. GTPaz HRas, Ras ile ilişkili protein, furloss, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz, Src homoloji 2 alan fosfataz, GDP ayrışma inhibitörü, syntenin-1, 14-3-3 proteinleri, transforme edici protein RhoA gibi bazı sinyal proteinlerini içermektedirler. Aynı zamanda, dönüştürücü büyüme faktörü - β (TGF- β), tümör nekroz faktörü (TNF), TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici β ligandı (TRAIL), ilk apoptoz sinyali (FAS) ligandı (FasL), interlekin-6 (IL-6), ve interlekin-1 β (IL-1 β) gibi büyüme faktörlerini ve sitokinleri de içermektedirler. Son olarak, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), mast/kök hücre büyüme faktörü reseptörü (c-Kit), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü tip-2 (VEGFR-2), insülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü, T hücresi reseptörü, G proteini -bağlı reseptörler (GPCR'ler), Notch reseptörleri ve transferrin reseptörü gibi reseptörleri içermektedirler (Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Gurung *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019; Urbanelli *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2020). Hücre yapışma molekülleri

integrinler α/β , hücreler arası yapışma molekülü-1 (ICAM-1) ve laktadherin, ECM ve diğer hedef hücrelerle hücresel bağlanmayı ve etkileşimi mümkün kılmaktadır. Ayrıca hücre şekli, çoğalması, farklılaşması, dinamikleri ve gen ifadesi dahil olmak üzere çeşitli süreçleri düzenlemek için harici sinyalleri iletebilmektedirler (Ha *et al.*, 2016; Frydrychowicz *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2020; Gurung *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2023).

Eksozomlar, endozomal kökenleri nedeniyle ALG-2 ile etkileşime giren protein X (ALIX) ve tümör baskılayıcı gen 101 proteini (TSG101) gibi endozoma özgü proteinleri doğal olarak taşımaktadır. Bir iskele proteini olan ALIX, taşıma için gerekli endozomal ayırma kompleksleri proteinlerine (ESCRT'ler), özellikle de alt birimlerinden biri olan TSG101'e bağlanır. Diğer proteinlerle birlikte, MVB biyogenezi, sitokinez, nükleer zarfın yeniden kapatılması, otofaji ve virüs tomurcuklanması gibi çok çeşitli yollarda birlikte işlev görmektedirler (Conde-Vancells *et al.*, 2008; Subra *et al.*, 2010; Carlsson *et al.*, 2020; Frydrychowicz *et al.*, 2014; Gurung *et al.*, 2021; Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

Eksozomun iç korteksi, diğer proteinleri birbirine ve lipitlere bağlayan hücre iskeleti proteinleri ezrin-rodiksin-moesin (ERM protein ailesi), aktin, miyozin, kofilin, tübülünler ve vimentin açısından zengindir. Ayrıca hücre hareketi, taşıma, yerleştirme ve füzyon gibi düzenleyici süreçler sırasında güç sağlar ve dinamik desteği artırır (Frydrychowicz *et al.*, 2014; Gurung *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019; Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2023).

İç eksozom zarı ayrıca ısı şoku proteinleri (HSP) olarak bilinen moleküler şaperonlar açısından da zengindir. Hücresel proteostazı korumak ve hücreleri stres faktörlerinden korumak için toplanmış ve yanlış katlanmış proteinlere düzeltmek üzere bağlanırlar. Eksozomların β -kristalinler, HSP20, HSP27, HSP60, HSP84, HSP90 ve özellikle HSP70 dahil olmak üzere çeşitli üyelerle mevcut olduğu bildirilmektedir (Frydrychowicz *et al.*, 2014; Jafari *et al.*, 2021; Gurung *et al.*, 2021; Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2022).

Eksozomlar ayrıca RNA düzenleyici enzimler, lipazlar, proteazlar, glikosiltransferazlar, glikosidazlar, matris parçalayıcı metaloproteinazlar ve peroksidazlar, piruvat, lipid kinazlar gibi metabolik enzimler içermektedirler. Bu enzimlerin eksozom yüzeyine lokalize olabileceği ve enzimatik aktivitelerini ECM'yi parçalayarak, büyüme faktörlerini serbest bırakarak ve hücre yapışmasını ve istilasını değiştirerek gösterebildiği rapor edilmiştir (Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Frydrychowicz *et al.*, 2014; Sanderson *et al.*, 2017).

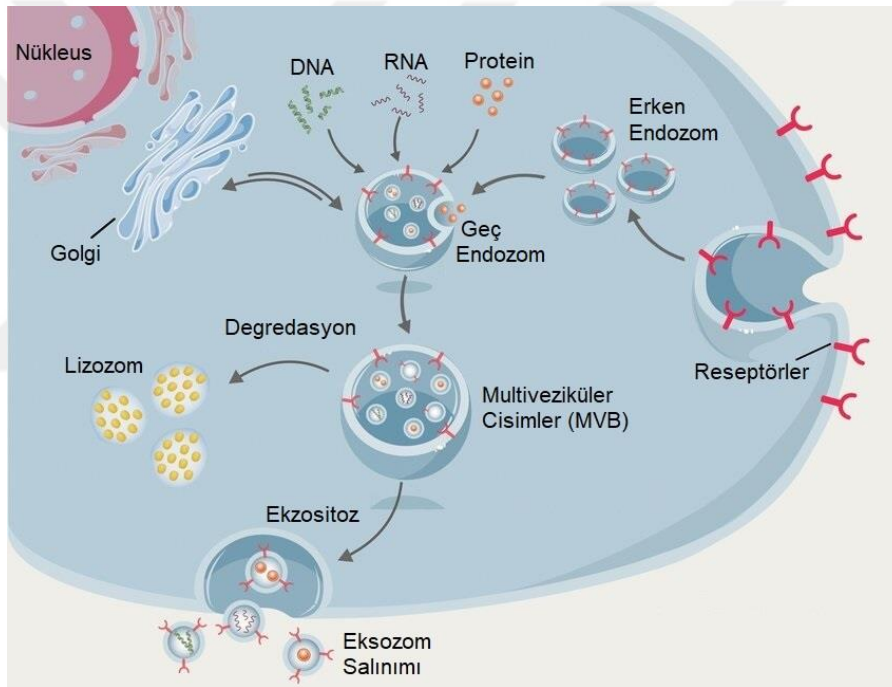
2.4.3.4. Nükleik Asitler

Eksozomlar, bir dizi hücre içi proteini sergilemenin yanı sıra, doğal olarak, hücreleri spesifik olarak hedefleyebilen ve genetik değişiklikleri ortaya çıkarabilen DNA ve RNA gibi nükleik asitleri içerir. (Patil *et al.*, 2020; Jan *et al.*, 2021; Pegtel and Gould, *et al.*, 2019). Eksozom içinde bulunan mesajcı RNA (mRNA) genetik bilginin aktarımı yoluyla gen düzenlemesinin aracılığı yapar. Mikro RNA (miRNA) ise, hedeflenen mRNA üzerindeki tamamlayıcı dizilere bağlanma, ardından hem transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu hem de gen susturulmasını düzenlemede görev alır. Eksozomlar ayrıca kodlayıcı olmayan RNA'lara sahiptir; bunlardan kısa olanları geni düzenler ve uzun kodlayıcı olmayan RNA'lar ise kanserin ilerlemesinde rol oynar. Eksozomlar ayrıca ilgilenilen genleri bozmak için kullanılan siRNA'yı sabit tutabilme özelliğine sahip olduğu için, gen tedavisinde hedeflenen hücrelere vermek için terapötik araç olarak kullanılabilirler (Patil *et al.*, 2020; Pegtel and Gould, *et al.*, 2019). Eksozomlar ayrıca tek sarmallı DNA, çift sarmallı DNA, genomik DNA, mitokondriyal DNA (mDNA), dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA) ve ters kopyalanmış tamamlayıcı DNA'ları (cDNA) içerir. Eksozomal DNA'nın, ana hücrenin özdeş bir kopyası olması nedeniyle tüm genom dizisini ortaya çıkardığı bilinmektedir. DNA ve RNA gibi eksozom nükleik asit içeriklerinin ana hücreden alıcı hücrelere transferi bir dizi epigenetik düzenlemeyi tetikler, anjiyogenez, kök hücre yenilenmesini ve genişlemesine de aracılık eder. Ayrıca kanserin ilerlemesinde, metastazında da önemli rolleri vardır ve viral enfeksiyonların, kanser teşhisinin veya kemoterapötik direncin yararlı göstergeleri olabilirler (Patil *et al.*, 2020; Pegtel and Gould, *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2024; Dehbashi Behbahani *et al.*, 2016).

2.4.4. Biyogenez

Eksozom üretimi aktif veya pasif olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Aktif eksozom üretimi, taşıma makineleri için gerekli olan endozomal ayırma kompleksi (ESCRT) olarak adlandırılan bir protein kompleksini ve eksozom salınımını sağlamak için çoklu kesecikli cisimlerin (MVB'ler) plazma zarı ile füzyonu sayesinde gerçekleşmektedir. Pasif eksozom oluşumu, ESCRT'den bağımsız olarak lipidlerin, tetraspaninlerin ve ısı şoku proteinlerinin katılımını sayesinde gerçekleşmektedir (Gurung *et al.*, 2021; Ha *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Frydrychowicz *et al.*, 2014).

Şekil 5. Eksozom biyogenez.



ESCRT'ye bağımlı eksozom biyogenez süreci tipik olarak plazma zarının içe doğru tomurcuklanması yoluyla erken endozomların (endositik veziküller) oluşumuyla başlamaktadır. Erken endozomlar, proteinler ve lipidler gibi hücre dışı materyalleri endositoz yoluyla içselleştiren, membrana bağlı keseciklerdir. Erken endozomlar, multivesiküler cisimler (MVB'ler) olarak da bilinen geç endozomlara olgunlaşmaktadırlar. Bu olgunlaşma süreci sırasında, endozomal membranın içe doğru tomurcuklanması yoluyla MVB'ler içinde intralüminal veziküller (ILV'ler)

oluşturulur. Kargonun ILV'lere seçici olarak ayrıştırılması, eksozom biyogenezinin önemli bir adımıdır. ESCRT mekanizması (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III ve Vps4), zarın yeniden şekillenmesini katalize eden, endozomal membranın belirli alanlarındaki molekülleri sitozolden uzakta tanıyan ve yutan çoklu protein komplekslerinden oluşmaktadır. ESCRT-0 kompleksi, ubikuitinlenmiş membran proteinlerini tanıyarak ve onlara bağlanarak MVB yolağını başlatır. ESCRT-I, ESCRT-II kompleksleri ve TSG101 ve ALIX gibi ESCRT-I ile ilişkili proteinler, seçici kargo ayrıştırılmasını kolaylaştırarak, oluşan keseciğin tomurcuklanan boynunun stabilize edilmesine katkıda bulunmaktadır. ESCRT-III kompleksi, membran deformasyonu ve vezikül kesilmesinin sonucu ILV'lerin salınmasına yol açan biyogenezin son adımlarından sorumludur. Bu işlemler, eksozomlara olgunlaşan MVB'lerin içinde, lipidler, proteinler, RNA ve sinyal molekülleri gibi spesifik biyomoleküllerin ILV'lere kapsüllenmesi kapsüllenmesiyle sonuçlanır. ESCRT'den bağımsız eksozom biyogenezi, hücrel stres ve apoptoz sırasında seramidin üretilmesine dayanmaktadır (Gurung *et al.*, 2021; Ha *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Frydrychowicz *et al.*, 2014).

Bu yolak, eksozomların oluşumunu ve salınmasını kolaylaştırmak için lipidler, tetraspaninler veya ısı şoku proteinleri gibi molekülleri kullanmaktadır. Biyoaktif bir sfingolipid olan seramid, sfingomiyelinaz enzimi ile hidroliz yoluyla üretilmektedir. Seramid membran dinamiklerine katkıda bulunur ve seviyeleri eksozom salgısını etkileyebilir. Seramidlerin koni şeklindeki yapısı, endozomal membranın içe doğru tomurcuklanmasına yol açan spontan negatif eğriligi desteklemektedir. Ek olarak seramid, tetraspaninler, hücre iskeleti proteinleri, flotilinler, ısı şoku proteinleri, Rab GTPazları gibi proteinlerle etkileşime girerek vezikül ulaşımı, füzyonu ve eksozomların hücrelerden salınmasında rol oynayabilir. Bu sayede, ESCRT'den bağımsız bir mekanizma aracılığıyla eksozomların seçici kargoları kapsüllemesini ve stabilitesini etkileyebilmektedirler (Gurung *et al.*, 2021; Ha *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Frydrychowicz *et al.*, 2014).

Son olarak, MVB'ler belirli kargo içeren ILV'lerle yüklendikten sonra iki yolu izleyebilirler. Ya degradasyon için lizozomlarla birleşebilirler ya da plazma zarı ile

birleşerek ILV'leri eksozomlar olarak hücre dışı boşluğa salabilirler. Bu eksozomlar daha sonra komşu veya uzaktaki hücreler tarafından alınabilir, hücreler arası iletişimi kolaylaştırır ve kapsüllenmiş moleküllerin taşınmasını sağlamaktadırlar (Gurung *et al.*, 2021; Ha *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Frydrychowicz *et al.*, 2014).

2.4.5. İzolasyon Yöntemleri

Eksozomlar, hücrelerden ve karmaşık vücut sıvıları yoluyla dağıtılan nano boyutlu hücre dışı veziküllerdir. Eksozomların terapötik kullanımı, eksozomların çok küçük olması, özellikle hücre dışı veziküllerden, hücre kalıntılardan ve diğer moleküler bileşenlerden spesifik olarak saflaştırmak zor olması nedeniyle uygun miktar ve kalitede eksozomları izole edilebilmesi için çeşitli metodolojilerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Çeşitli kaynaklardan elde edilmesi amaçlanan örnekler için tek bir yöntemle sınırlandırılması pratik olmadığından, yüksek verimlilikle ayırma, yüksek geri kazanım oranı ve saflıkta elde etmek için farklı yöntemler uygulanmaktadır. Mevcut eksozom izolasyon protokolleri boyut, şekil, yoğunluk, ve moleküler ağırlık gibi fiziksel özelliklere veya hidrofobiklik ve proteinlerle yüzey etkileşimleri gibi kimyasal özelliklere dayanmaktadır. Ultrasantrifüjleme, gradyan yoğunluk ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon, boyut dışlama kromatografisi, polimer esaslı çökeltme, antikora bağlı manyetik boncuklar üzerinde immünoafinite kromatografisi ve bir çip üzerinde mikroakışkan teknolojiler dahil olmak üzere bilinen yedi eksozom ayırma stratejisi sınıfı vardır (Yang *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2020; Birtwistle 2021; Gurunathan *et al.*, 2019; Saad *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2018; Patil *et al.*, 2020).

2.4.5.1. Ultrasantrifüj Esaslı İzolasyon Teknikleri

Ultrasantrifüjleme tekniği, parçacıkların boyutuna ve çözeltinin viskozitesine göre ayrılan birden fazla santrifüjleme adımından oluşan bir döngüye dayanmaktadır. Hücrelerin, proteinlerin ve hücre dışı veziküllerin (EV'ler) alt popülasyonların arasındaki boyut farkı, santrifüj yöntemleriyle ayrılmasını ve izole edilmesini sağlamaktadır. Diferansiyel ultrasantrifüjleme ve gradyan yoğunluklu ultrasantrifüjleme olarak iki tür alt sınıflandırması bulunmaktadır (Carlsson *et al.*, 2020; Saad *et al.*, 2021; Gurunathan *et al.*, 2019).

2.4.5.1.1. Diferansiyel Ultrasantrifüjleme

Diferansiyel ultrasantrifüjleme, artan hızda ardışık santrifüjlemeyle sedimentasyon hızına dayanmaktadır. Hücre kalıntılarını gidermek ve hücreleri ayırmak için düşük hızlı santrifüjleme ile başlar, ardından 100.000 x g'ye kadar yüksek hızlı santrifüjleme ile çökelmiş eksozomlar, büyük hücre dışı veziküller, apoptotik cisimler ve mikropartiküllerden ayrıştırılarak toplanır. Bununla birlikte, düşük bir ayırma saflığına sahip olan bu yöntemin yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme ile üstesinden gelinebilmektedir (Birtwistle 2021; Saad *et al.*, 2021; Patil *et al.*, 2020).

2.4.5.1.2. Yoğunluk Gradyan Ultrasantrifüjleme

Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme yönteminde, parçacıkların kendisiyle benzer yoğunluktaki ortamdaki konumlandırılmasına dayanmaktadır. Bu işlemde numune içindeki parçacıkların yoğunluklarına göre aşağıdan yukarıya doğru kademeli olarak azalan yoğunluklarla konum aldıkları farklı jeller veya yoğunlukları değişen çözeltiler kullanılmaktadır. İlgilenilen numune yoğunluk gradyan ortamının üstüne eklenir ve ardından 100.000 x g'ye kadar uzatılmış santrifüjleme yapılır.

Eksozomlar, apoptotik cisimler ve protein agregatları da dahil olmak üzere hücre dışı bileşenlerin, izodensite konumlarına kademeli olarak yerleşmesiyle elde edilmektedir. Ultrasantrifüjleme altın yöntem olarak kabul edilen en yaygın kullanıma sahip olmasına rağmen, zaman alıcıdır, yoğun emek gerektirir ve büyük ölçüde alete bağımlıdır. Ayrıca bu işlem sırasında çok sayıda eksozom kaybolabilir ve verimi tehlikeye atabilir (Birtwistle 2021; Yang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2018).

2.4.5.2. Ultrafiltrasyon

Ultrafiltrasyon, parçacıkları boyut ve moleküler ağırlığa göre izole eden bir membran ile ayırma tekniğidir. Eksozomlar, farklı moleküler ağırlık kesimleri (MWCO) ile yarı geçirgen membranlar veya nano-membrandan itilerek makromoleküllerden ayrılabilir. Farklı filtre boyutlarına sahip membranlar birkaç adımda kullanılmaktadır.

İlk filtreleme, hücre artıkları, apoptotik cisimler ve mikropartiküllerin çoğunluğu dahil olmak üzere 200 nm'den büyük bileşenleri elemek için gözenek boyutları 0,8 µm, 0,45 µm veya 0,22 µm olan membranlarda tutmaktadır. Ardından bir mikrofiltre, 100 nm'ye kadar olan parçacıkların özellikle eksozomların geçmesine izin vererek altta elde edilmesini sağlar (Patil *et al.*, 2020; Saad *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2020; Gurunathan *et al.*, 2019).

Ultrafiltrasyon, ultrasantrifüjlemeden çok daha hızlıdır, özel veya pahalı ekipman gerektirmez, yüksek verim üretir ve ayrıca sıklıkla diğer eksozom izolasyon tekniklerinin tamamlayıcısı olarak da kullanılabilir. Bu yöntemin uygulanmasındaki en göze çarpan zorluklar, veziküllerin filtreyi tıkaması, kuvvetle itilmesi nedeniyle büyük veziküllerin deformasyonu ve parçalanması veya ortaya çıkan çözeltide eksozomun boyutuna ve moleküler ağırlığına benzer şekilde başka proteinlerinde bulunmasıdır (Gurunathan *et al.*, 2019; Saad *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020).

2.4.5.3. Boyutu Dışlama Kromatografisi

Boyutu dışlama kromatografisi tekniği, parçacıkların boyutlarına göre gözenekli sabit faz jelde pasif yerçekimine bağlı akışına dayanmaktadır. Daha büyük moleküller jel gözeneklerine giremediklerinden ilk aşamada elüsyona tabi tutulmaktadır, ve bu da küçük hidrodinamik yarıçapa sahip daha küçük moleküllerin jel gözeneklerden akıp geçmesine izin vermektedir. Eksozomlar 40-200 nm arasında bir çapa sahip olduğundan, gözeneklerden geçerler ve böylece kolonda tutulurlar (Carlsson *et al.*, 2020; Saad *et al.*, 2021; Gurunathan *et al.*, 2019; Patil *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020).

Bu teknik, çeşitli sıvı türleriyle uyumlu minimum hacimler kullanılır ve genellikle ekstra bir ön işlem adımı gerektirmez, zaman ve işçilikten tasarruf sağlar, minimum örnek kaybı ve yüksek verim sağlamaktadır. Vesiküllerin şeklini ve bütünlüğünü korumasına rağmen, eksozomlarla karşılaştırılabilir boyutlara sahip ve aynı boyut

dağılımında görülebilen lipoproteinler ve protein agregatları gibi kirletici maddeleri de içerebilir (Yu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020).

2.4.5.4. İmmünoafinite Kromatografisi

İmmünoafinite kromatografisi yöntemi, eksozom membranları üzerindeki çeşitli antijen proteinleri ve bunların antikorları arasındaki spesifik etkileşimlere dayanmaktadır. İlk olarak, immünomanyetik boncuklar eksozom ile ilişkili reseptör moleküllerine karşı antikorlarla kaplanır ve daha sonra katı bir yüzey üzerine sabitlenmiş bu antikor boncukları, eksozomları ekstrakte etmek için numune ile inkübe edilir. Eksozom eldesi için esas olarak Rab5, CD81, CD63, CD9, CD82, Annexin ve ALIX gibi transmembran proteinlerine karşı antikorlar kullanılmaktadır (Yang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2018; Gurunathan *et al.*, 2019).

Bu yöntem, büyük başlangıç numune hacimleriyle kullanılabilir, geniş bir yüzeyde neredeyse homojen bir işlem sunmasından dolayı yüksek yakalama verimliliği ve hassasiyetine izin verir, ve yüksek saflık ve daha az zaman tüketimi sağlamaktadır. İmmünoafinite bazlı eksozom izolasyonu basit bir prosedür sağlasa da, eksozomları antikorlardan ayırmak için kullanılan nötr olmayan pH ve fizyolojik olmayan elüsyon tamponları, toplanan eksozomların biyolojik fonksiyonunda geri dönüşü olmayan hasara neden olabilir (Patil *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2020).

2.4.5.5. Polimer Esaslı Çöktürme ile Ayırma

Polimer bazlı çöktürme yöntemi, hidrofobik bir mikro ortam oluşturmak için su molekülleri ve eksozomları çevreleyen diğer suda çözünür bileşiklerle etkileşime giren yüksek derecede hidrofilik polimerlere dayanır ve bu sayede eksozomların çökmesi sağlanmaktadır. Çeşitli hidrofilik polimerler arasında, toksik olmayan bir polimer olan Polietilen Glikol (PEG), eksozom çöktürmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı prensibe sahip benzer reaktifleri kullanan çeşitli popüler ticari izolasyon kitleri bulunmaktadır. PEG molekülü, n sayıda etilen glikol tekrarına sahip iki uçtan oluşmaktadır; R1 ucu, eksozom yüzeyine bağlanır ve R2 uç terminali ise

başka bağlantı için kullanılabilir. Reaktif numunelere eklendikten ve inkübasyona izin verildikten sonra, santrifüjlemenin ardından ağ benzeri polimerik yapıya sahip bir topak halinde oluşur ve çökelti ile nano boyutlu eksozomlar toplanır (Yang *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2020; Saad *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2018).

Bu eksozom çökeltme yöntemi herhangi bir pahalı veya özel ekipman gerektirmez, büyük hazırlama hacimlerine kolayca ölçeklenebilir ve bu yöntemle ekstrakte edilen eksozomların boyutu oldukça tekdüzedir ve yüksek verimli ürün eldesi sağlar. Bu yöntemin dezavantajı, protein agregatları ve hücre kalıntıları gibi belirli kirlenici maddelerin saflaştırılması için ön işlem gerektirmesi ve aynı zamanda, eksozomlarla birlikte çökelti olarak bulunabilen polimerik malzemeleri de içerebilmesidir (Gurunathan *et al.*, 2019; Saad *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020 ; Yu *et al.*, 2018; Carlsson *et al.*, 2020).

2.4.5.6. Mikroakışkan Esaslı Teknolojiler

Eksozomların hem fizyokimyasal hem de biyokimyasal özelliklerinin mikro ölçekte keşfedilmesi ve mikrofabrikasyon teknolojilerindeki dramatik ilerlemeler, daha verimli eksozom izolasyonu için laboratuvarda çip üzerinde mikroakışkan sistemler geliştirmek için değerli bir fırsat sunmuştur. Bir mikroakışkan çip genellikle bir giriş, bir ayırma bölgesi ve bir çıkıştan oluşur. Giriş kısmına biyolojik sıvı eklenir, ayırma bölgelerinde eksozomlar fiziksel ve biyokimyasal özelliklerine göre ayrıştırılır ve çıkıştan toplanır (Yang *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2020). Bu minyatür mikroakışkan cihazları, minimal hacimlerdeki vücut sıvılarından hızlı eksozom ekstraksiyonuna ek olarak yerinde teşhis için gerçek zamanlı eksozom karakterizasyonu sağlamaktadır (Yang *et al.*, 2020).

2.4.5.7. Yeni Yaklaşımlar

Eksozomların hem fiziksel hem de biyokimyasal özelliklerinden yararlanılarak, çok daha yüksek verim ve saflık elde etmek amacıyla mevcut prosedürlerin değiştirilmesi, iyileştirilmesi veya entegre edilmesi yoluyla yeni teknikler geliştirilmektedir. Yaygın olarak bilinen bu izolasyon yöntemlerinin yanı sıra, son

zamanlarda geleneksel yöntemlerdeki düşük verim ve saflık, yüksek maliyet, standardizasyon zorlukları ve zaman alıcı olması gibi bazı zorlukların üstesinden gelmek için yeni teknolojiler ortaya çıkmıştır (Gurunathan *et al.*, 2019; Carlsson *et al.*, 2020).

İzolasyon için geliştirilen yeni yöntemler düşük hidrostatik basınçla itiş kullanan hidrostatik filtrasyon diyalizi (HFD) sistemi, genellikle CD9 biyobelirteci ile kullanılan kütle spektrometrik immünoanalizi, eksozomların yüksek elektrik alan bölgelerine doğru çekilmesiyle çalışan dielektroforetik ayırma yöntemi, enzim bağlantılı immünosorbent testine (ELISA) benzer, antikolar kullanan nanoplasmonla güçlendirilmiş saçılma (nPES) yöntemi, boyut dışlama prensipleri üzerine inşa edilmiş entegre çift filtrasyonlu mikroakışkan cihazı gibi teknolojiler kullanılmaktadır (Saad *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2018; Patil *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2018).

2.4.5.8. Karakterizasyon Yöntemleri

Eksosomlar, terapötik uygulamalardan önce boyut aralığı, yapı ve yüzey proteinleriyle birlikte eksozomal özellikleri ve işlevleri doğrulamak için kapsamlı bir şekilde karakterize edilmesi gerekir. Saflaştırılmış eksozomların karakterizasyon analizleri için güncel olarak kullanılan çeşitli teknikler esas olarak eksozomların boyutuna, konsantrasyonuna, morfolojisine ve kargo içeriğine odaklanmaktadır. Boyut ve konsantrasyon belirlemek için, Dinamik Işık Saçılımını (DLS), Nanopartikül İzleme Analizini (NTA), Yüzey Plazmon Rezonansını (SPR), Ayarlanabilir Dirençli Darbe Algılamayı (TRPS) yöntemleri kullanılmaktadır. Morfoloji ve boyutu tespit etmek için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) yöntemleri kullanılmaktadır. Lipidomik, proteomik ve genomik analizler halinde sınıflandırılan kargo bileşimlerini tanımlamaya yönelik yöntemler arasında akış sitometrisi, western blotlama, ELISA, PCR, kütle spektroskopisi, Raman spektroskopisi ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) yöntemleri bulunmaktadır (Patil *et al.*, 2020; Saad *et al.*, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

Tablo 2. Çalışmada kullanılan malzemeler.

Kullanılan Malzeme	Marka
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco™, ThermoFisher, ABD
L-Glutamine (200 mM)	Gibco™, ThermoFisher, ABD
Fetal Bovine Serum, qualified (FBS),	Gibco™, ThermoFisher, ABD
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), no glucose,	Gibco™, ThermoFisher, ABD
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), no calcium, no magnesium,	Gibco™, ThermoFisher, ABD
Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red	Gibco™, ThermoFisher, ABD
Trypan Blue Solution, 0.4%,	Gibco™, ThermoFisher, ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, ABD
Colchicine, ≥95% (HPLC), powder	Sigma-Aldrich, ABD
CytoSelect™ MTT Cell Proliferation Assay	Cell Biolabs, ABD
TRIZOL™ Reagent	Invitrogen™, ThermoFisher, ABD
Kloroform	Sigma-Aldrich, ABD
İzopropanol	Sigma-Aldrich, ABD
Etanol	Sigma-Aldrich, ABD
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit,	Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD
UltraPure™ TBE Buffer,	Invitrogen™, ThermoFisher, ABD
UltraPure™ Agarose	Invitrogen™, ThermoFisher, ABD
RedSafe™	iNtRon Biotechnology, Kore
6X Loading Dye Solution (XB)	iNtRon Biotechnology, Kore
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific™, ABD
TaqMan® Universal Master Mix II, with	Applied Biosystems™,

UNG	ThermoFisher, ABD
TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM), Human TUBB (Tubulin Beta Class I), Hs00744842_sH	Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD
TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM), Human TUBA1B (Tubulin Alpha 1B), Hs00742828_s	Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD
TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM), Human GAPDH (Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase), Hs99999905_m1	Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka
Buzdolabı ve -80C derin dondurucular	
Laminar Kabin Biyogüvenlik class II	Nüve
CO ₂ İnkübatör	Nüve
Neubauer Improved	Isolab, Germany
Eynergy HTX Multimode Reader	BioTek, ABD
NF 800R Santrifüj	Nüve
MS-100 Thermo-Shaker	Allsheng Instruments Co., Hangzhou
NanoDrop™ Lite Spektrofotometre	Thermo Scientific™, ABD
Veriti 96 kuyucuklu Thermal Cyclor	Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD
Step One Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. MCF-7 Hücre Hattı Kültürü

Çalışmada Ege Üniversitesi Çocuk Hastanesi Moleküler Tıp Laboratuvarı stoklarında bulunan, Prof. Dr. Afig BERDELİ'ye ait insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücreleri kullanıldı. Hücre kültürü için öncelikle, %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin antibiyotik içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) medyumunu ile besi ortamı hazırlandı.

3.2.1.1. Hücre Çözdürmesi

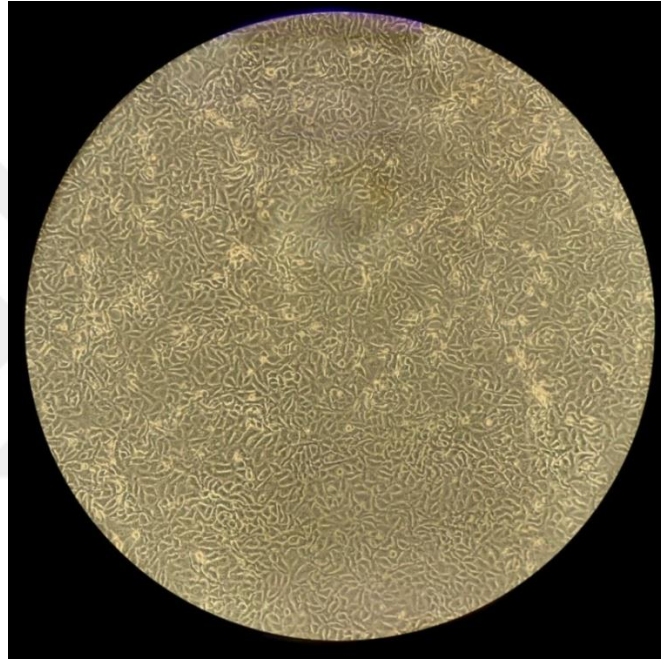
İlk olarak Ege Üniversitesi Çocuk Hastanesi Moleküler Tıp Laboratuvar stoklarında bulunan, -80°C dolabında kriyojenik tüpler içinde saklanan MCF-7 hücreleri -20°C'ye alındı. Hücreler 10 dakika bekletildikten sonra, 37°C deki sıcak su banyosunda 1-2 dakika çözülmesi için inkübe edildi. Su banyosundan sonra, dimetil sülfoksitten (DMSO) arındırmak için önceden ısıtılmış büyüme ortamı kullanarak, çözülmüş hücreler nazikçe seyreltildi ve bir falkona aktarıldı. Ardından 500 RPM, 4°C'de, 15 dakika santrifüj edildi ve çökmüş hücre peletini bozmadan süpernatant aseptik olarak atık kutusuna boşaltıldı. Son olarak hücreler büyüme ortamıyla yavaşça yeniden süspanse edildi, yapışmaları için T75 kültür flaskına aktarıldı ve 37 °C'de, %5 CO₂ içeren % 95 nemlendirilmiş inkübatörde çoğaltıldı. Günlük olarak mikroskop takibi yapılan hücrelerin büyüme ortamları gerektiğinde değiştirildi veya hücreler %75-80 doluluk oranına ulaştığında pasaj yapıldı.

3.2.1.2. Pasajlama

Pasajlama işlemine başlarken, öncelikle hücre kültürü ortamını dikkatlice başaltıp, flask tabanında yapışık halde bulunan hücreleri rahatsız etmeden birikintilerden temizlemek için kalsiyum ve magnezyum içermeyen dengeli bir tuz çözeltisi olan Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) ile nazikçe yıkama yapıldı. Hücre katmanını ve flask yüzeyini kaplayacak kadar Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red, (Gibco™, ThermoFisher, ABD) eklendi, 3 dakika 37 °C'de inkübe edildi ve yüzeyden kaldırmayı hızlandırmak için şişenin kenarlarına dikkatlice vuruldu.

Sonrasında, eklenen tripsin miktarının iki katı kadar FBS içeren büyüme ortamı eklenerek tripsinin etkinliği bastırıldı. Hücreler, 15 mL'lik bir tüpe aktarıldı ve 1200 RPM'de, 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Son olarak süpernatant, çökmüş hücre peletini dağıtmadan aseptik olarak atık kutusuna boşaltıldı ve hücre peleti büyüme ortamı eklenerek nazikçe pipetleme ile homojenize edildi. Hücreler yeterli miktarda çoğaltıldıktan sonra önce sayıldı, ardından tedavi için 6 kuyucuklu plakalara ekim yapıldı.

Şekil 6. MCF-7 hücrelerini mikroskop görüntüsü.



3.2.1.3. Hücre Sayımı

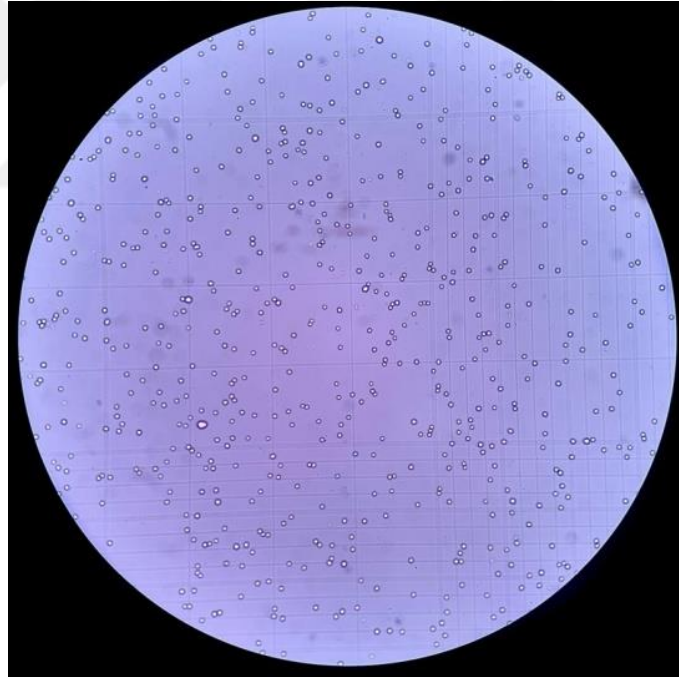
Tripan mavisi testi, ölü hücreleri maviye boyayarak canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırmak için kullanılır.

Hücre peleti homojenize bir şekilde dilüte edildikten sonra, 1:1 oranında 50 µL hücre süspansiyonu ile 50 µL Trypan Blue Solution, 0.4%, (Gibco™, ThermoFisher, ABD) bir mikrotüp içinde karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Alkol ile sterilize edilmiş Neubauer (Isolab, Almanya) sayım labna 10 µl hücre süspansiyonu olmak üzere lamel altındaki her iki odacığa yavaşça yükleme

yapıldı. Hemasitometre daha sonra ışık mikroskopunun zeminine yerleştirildi ve çizgileri, 10X objektif ile düşük güçte odaklanarak sayım gerçekleştirildi. Bu boyama, plazma zarının parçalanması nedeniyle ölü hücrelere karşı geçirgendir, bu yüzden ölü hücreler tripan mavisi ile boyanırken ancak canlı hücrelerde herhangi bir boyanma gözlemlenmemektedir. Yalnızca boyanmamış canlı hücreler, 16 kareli dört dış sayım alanında sayıldı. Daha sonra, orijinal örnekteki hücre numaralarını elde etmek için birkaç hesaplama yapılmıştır. Her 16 köşe karesi setinden ortalama hücre sayısı alındı, ardından tripan mavisi ilavesinden 1:2 seyreltmeyi düzeltmek için 2 ile çarpıldı, 10.000 ile çarpıldı ve 5 ml'lik orijinal numune hacmi ile çarpıldı.

$$\frac{\text{Numunedeki toplam hücre sayısı}}{\text{hücre sayısı}} = (\text{ort hücre sayısı}) \times (\text{seyreltme faktörü}) \times (10^4) \times (\text{toplam numune hacmi})$$

Şekil 7. MCF-7 hücrelerinin tripan mavisi boyaması ile sayımı.



3.2.1.4. Hücre Dondurması

Hücre kültürü boyuca belirli aralıklarda stoğa alınmak üzere donduruldu. Öncelikle %20 FBS içeren büyüme ortamı ve %5 DMSO ile donduma ortamı hazırlanıp

kullanılınca kadar 4°C'de saklandı. Hücre pasajlamanın takibinde, süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti, mL başına 1×10^6 hücre yoğunluğunda hücre süspansiyonu oluşturmak için soğuk dondurma ortamıyla yeniden süspanse edildi. Hücrelerin 1 mL'lik kısımlarını kriyojenik tüplere aktarıldı. İlk olarak 4°C'de 5 dakika, ardından -20°C'de 20 dakika bekletildikten sonra uzun süreli muhafaza edilmesi için kriyojenik tüpler -80°C'ye kaldırıldı.

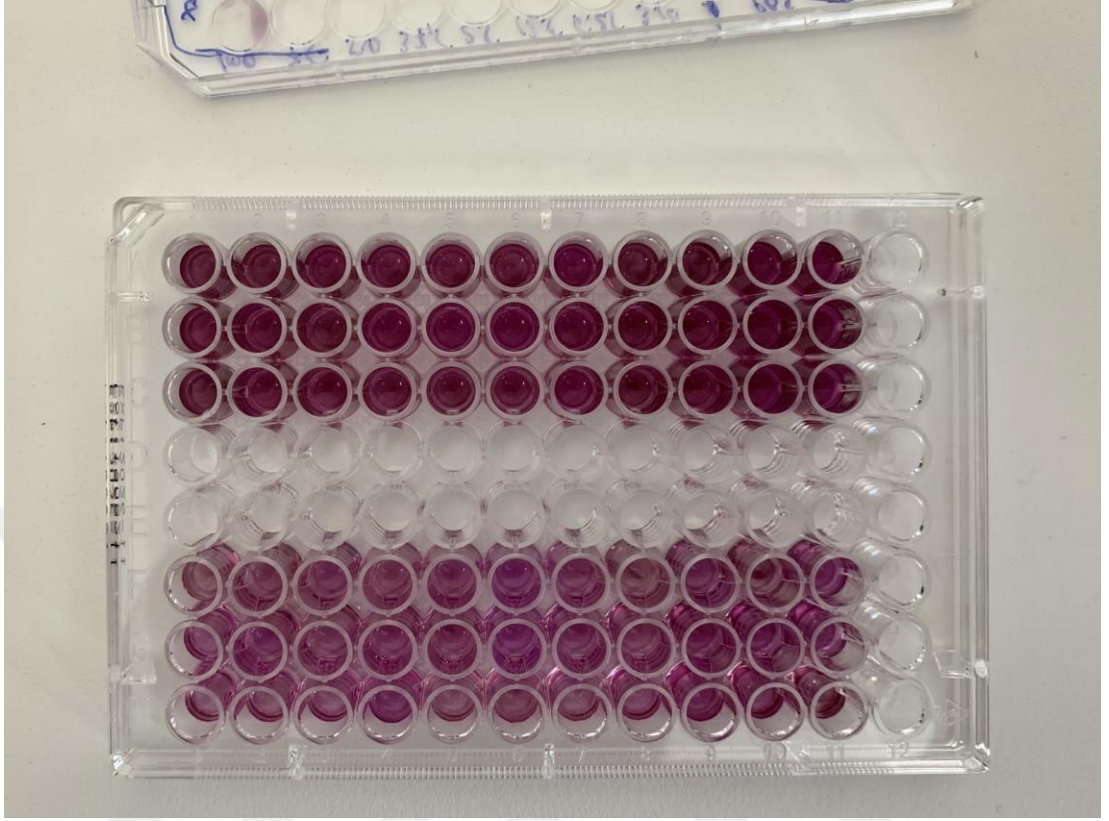
3.2.2. Kolşisin IC50 değerinin MTT Testi ile Tespit Edilmesi

Kolşisinin, MCF-7 hücre hattındaki terapötik dozunu belirlemek için, MTT canlılık testi ile seçilen dozlardaki kolşisin ilacının yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) değeri hesaplanmıştır ve dozlar 3 tekrarda gözlemlenmiştir.

Çalışma öncesi, 5 mL MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 1x), ve 5 mg/mL DPBS birleştirilerek aktive edilmiş MTT solüsyonu hazırlandı. 10 mg/ml toz kolşisin (C-975, Sigma-Aldrich, ABD) PBS içerisinde çözdürüldü. Farklı kolşisin konsantrasyonları %1, %3,125, %6,25, %12,5, %25, %37,5, %50, %75 ve %100 PBS içerisinde hazırlandı.

MCF-7 hücreleri, 1×10^5 hücre/ml yoğunluğunda 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve yapışmaları için 24 saat, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren % 95 nemlendirilmiş ortamda inkübe edildi. Ertesi gün, büyüme ortamı içinde belirlenen 10 kolşisin dozları ile hücreler tedavi edildi. Hücreler çeşitli ilaç dozlarıyla birlikte 24 ve 48 saat, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren % 95 nemlendirilmiş ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 100 µL toplam hacimde, %10 oranında MTT solüsyonuna sahip büyüme ortamı eklendi ve 2 saat, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren % 95 nemlendirilmiş ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası formazan kristallerini çözdürmek için 100 µL DMSO eklendi, üzeri alüminyum folyo ile kapatıldı ve 15 dakika çalkalandı. Sonuç için, 570 nm ve 690 nm absorbans değerleri arasında Eynergy HTX Multimode Reader (BioTek, ABD) mikropalak okuyucusunda okutuldu.

Şekil 8. MTT testi ile MCF-7 hücrelerine farklı dozlarda kolşin uygulanması. Üst üçlü grup 48 saat, alt üçlü grup 24 saatlik inkübasyon.



Şekil 9. MTT plağının mikropalak okuyucusuna yüklenmesi.

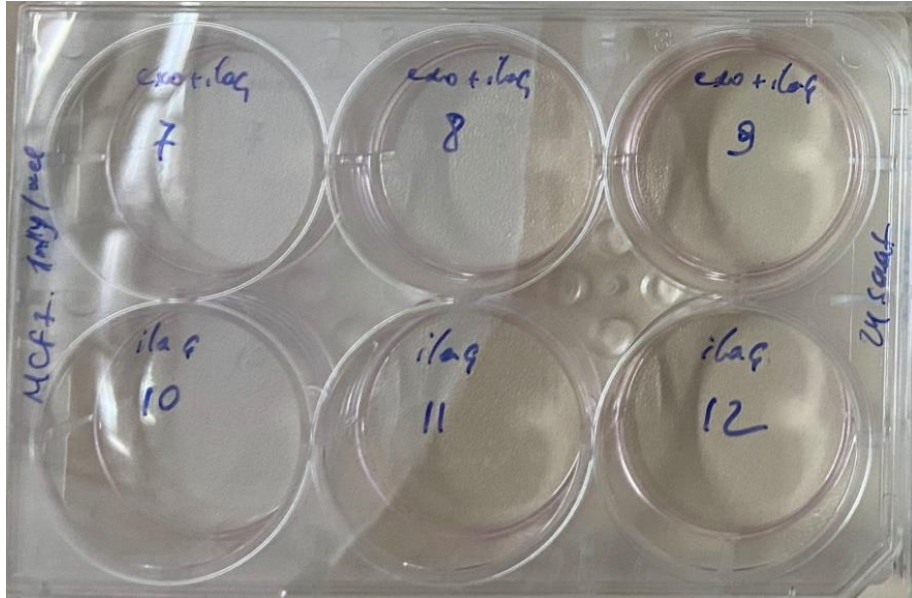


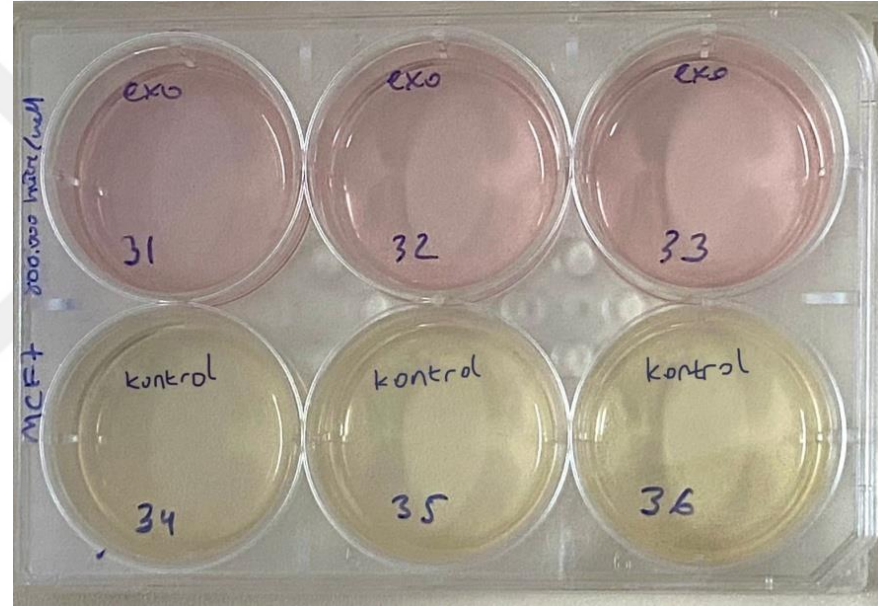
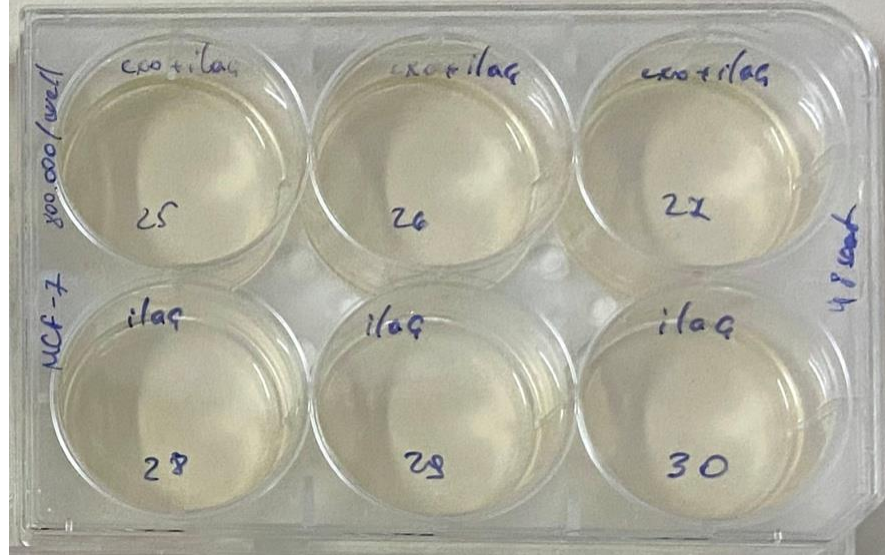
3.2.3. Eksozom, Kolşisin ve MCF-7 Hücrelerinin Birlikte Kültürü

Öncelikle, 6 kuyucuklu plağın kuyucuk başına 2 mL büyüme ortamında 1×10^6 hücre yoğunluğunda olacak şekilde MCF-7 hücreleri ekilendi ve %90 yoğunluğa gelmesi için 48 saat, 37 °C'de, %5 CO₂'de inkübe edildi. Ardından, IC₅₀ testi ile tespit edilen değerlerde 3 tekrarlı tedavi grupları tasarlandı. Bu çalışmada Ege Üniversitesi Çocuk Hastanesi Moleküler Tıp Laboratuvarı stoklarında bulunan, Prof. Dr. Afig BERDELİ'ye ait mezankimal kök hücrelerden izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmış hazır eksozomlar kullanılmıştır.

İlaçsız kontrol grubu, sadece 6,5 µg/ml konsantrasyonlu kolşisin grubu, yalnızca kolşisinle aynı miktarda 6,5 µg/ml eksozom grubu, ve 6,5 µg/ml hem eksozom hem kolşisin grupları oluşturuldu. Hücreler, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren % 95 nemlendirilmiş inkübatörde 24 ve 48 saat tedavi edildi, sonrasında RNA izolasyonu ile devam edildi.

Şekil 10. Eksozom, kolşisin ve MCF-7 Hücrelerinin birlikte kültür edildiği plaklar.



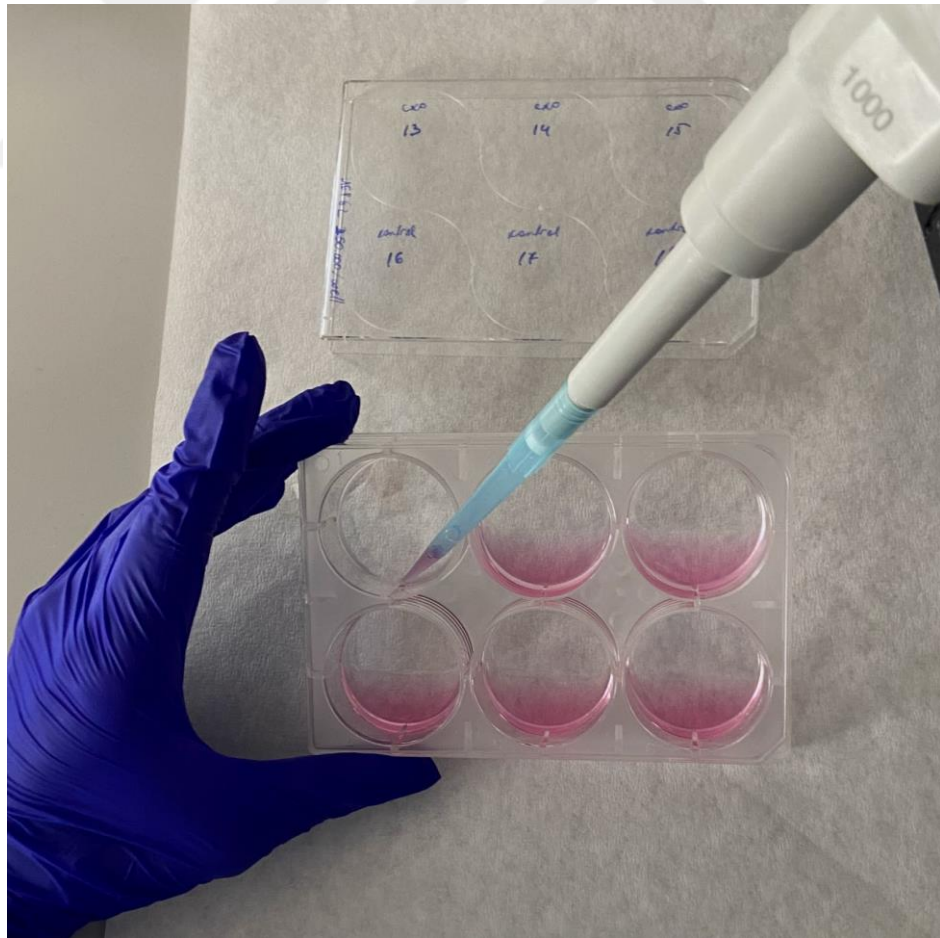


3.2.4. RNA İzolasyonu

İlk olarak, büyüme ortamı kuyucklardan uzaklaştırılmıştır ve 500 μ L PBS ile bir kere yıkama yapılmıştır. Ardından, hücrelerin üzerine 1 mL TRIzol™ reaktifi, (Invitrogen™, ThermoFisher, ABD) eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Her kuyucuktaki hücreler teker teker mikrotüplere aktarıldı ve üzerine 200 μ L, -20°C kloroform eklendi, ardından 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon sonrası 14000 RPM, 15 dakika, +4°C’de santrifüj edildi. RNA

içeren şeffaf üst tabaka, dikkatlice çekilerek yeni mikrotüplere aktarıldı ve üzerine aktarılan süpernatantla eşit hacimde, yaklaşık 400 µL, -20°C izopropanol eklendi. Ardından RNA moleküllerini çöktürmek için oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 14000 RPM, 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi, süpernatant RNA topağını dağıtmadan dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir RNA topağının üzerine 500 µL, -20°C'de %70'lik etanol eklendi, 10 dakika bekletildi ve ardından 14000 RPM, 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüjasyonun ardından süpernatant dikkatlice çekildi ve etanol 37°C'de, 20 dakika, 200 RPM, termal çalkalayıcıda MS-100 Thermo-Shaker (Allsheng Instruments Co., Hangzhou) kurutuldu. Kurutma sonrası RNA pelleti, 40 µL RNaz içermeyen su eklenerek yavaşça homojenize edildi ve ardından 70°C'de 5 dakika boyunca tekrar termal çalkalayıcıda çözündürüldü. Son olarak 1,25 µL RNaz inhibitörü eklendi ve sonraki prosedüre kadar muhafaza edilmesi için -20°C'ye kaldırıldı.

Şekil 11. TRIzol reaktifi eklenmiş hücreler.



Şekil 12. Kloroform sonrası faz ayrımı.



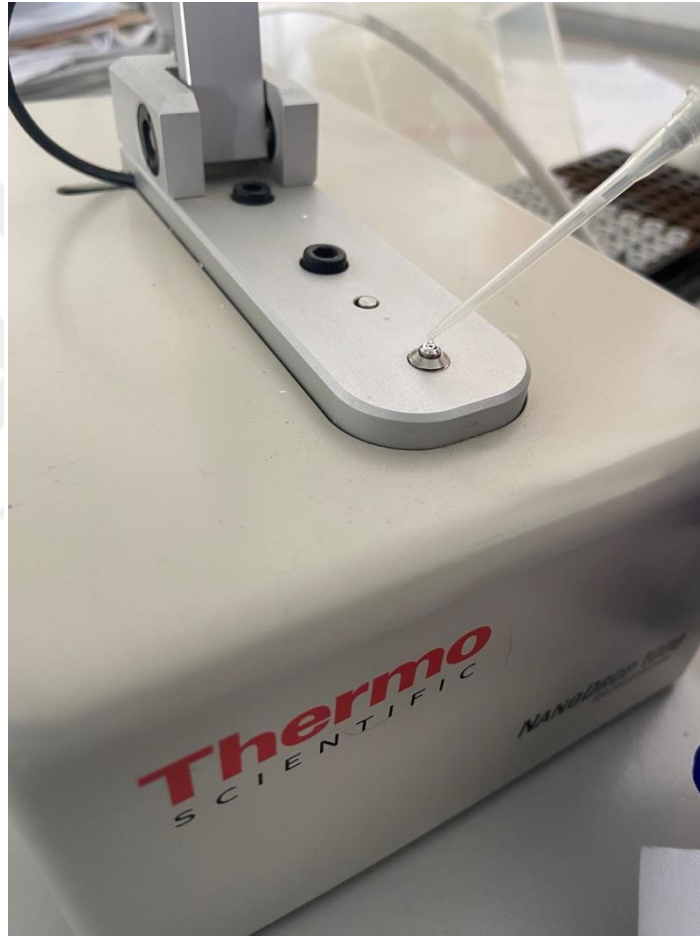
Şekil 13. RNA çökeltisi.



3.2.4.1. NanoDrop ile RNA Saflığının Kontrolü

RNA'nın saflığı, NanoDrop™ Lite Spektrofotometre (Thermo Scientific™, ABD) kullanılarak belirlendi, hemen ardından cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA konsantrasyonları A260/A280 oranına göre hesaplandı. Kaliteli bir cDNA eldesi için yüksek saflıkta RNA ile çalışılmalıdır.

Şekil 14. NanoDrop cihazında RNA saflığının kontrolü.



3.2.5. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile RNA'dan cDNA Sentezi

RNA saflık ölçümünün ardından, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific) ile ters transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA eldesi gerçekleştirildi.

Öncelikle, 2 µL Random Primer, 2 µL RT Buffer, 1 µL dNTP mix, 1 µL Ribolock RNaz inhibitörü, 1,5 µL Multiscribe Reversaid ve 2,5 µL nükleaz içermeyen su ile PCR ana karışımı hazırlandı. Daha sonra karışım, 96 kuyucuklu bir reaksiyon plakasının her bir kuyucuğuna 7,5 µL dağıtıldı. Ardından kuyucuklara karışımın üzerine, 10 µL seyreltilmiş RNA eklendi.

Tablo 4. Bir örnek için cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği.

Bileşenler	Hacimler
10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	1.0 µL
10X RT Random Primers	2.0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.5 µL
RNaz İnhibitör	1.0 µL
RNA	10.0 µL
Nükleaz içermeyen su (H ₂ O)	2.5 µL
Toplam	20.0 µL

Daha sonra cDNA eldesi için, Veriti 96 kuyucuklu Thermal Cyler (Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD) cihazında, 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika, 85°C'de 5 dakika, ve 4°C bekleme süresi amplifikasyon parametreleri ile 1 döngü reaksiyon programında yürütüldü. PCR ürünleri uzun süreli olarak -20°C'de saklandı.

Tablo 5. cDNA sentezi için uygulanan PCR parametreleri.

Ayarlar	1.Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Isı	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

Şekil 15. Veriti 96 kuyucuklu Thermal Cycler cihazında cDNA sentezi.



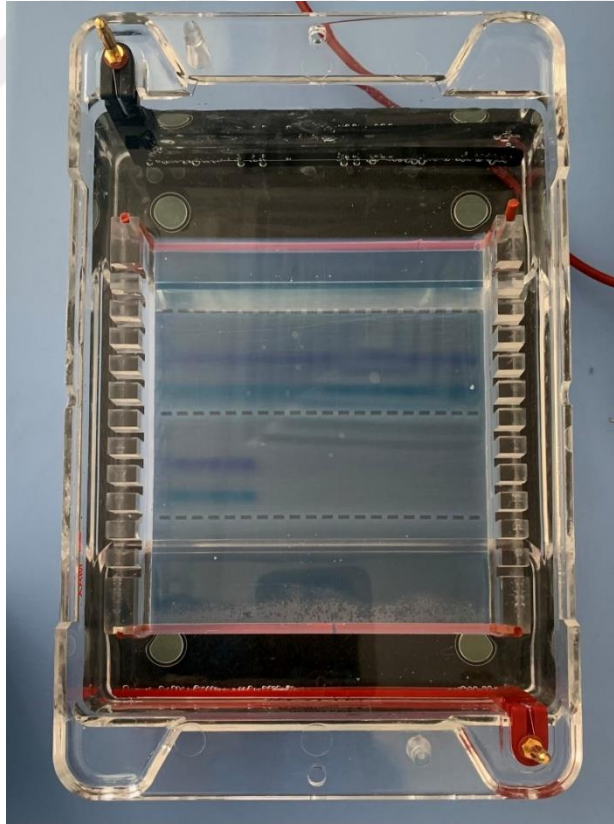
3.2.5.1. Jel Elektroforez ile cDNA Kontrolü

cDNA sentezi sonucu elde edilen fragmanlarının varlığını ve yaklaşık konsantrasyonunu belirlemek için jel elektroforezinde yürütülmüştür.

Çalışma öncesi UltraPure™ TBE Buffer, 10X (Thermo Scientific™, ABD) tamponu distile su ile 1X olacak şekilde seyreltilti. Öncelikle yürütme tamponu, 100 ml 1X Buffer içinde 0,2 gr toz agaroz (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) çözündürülerek %2'lik agaroz jel karışımı hazırlandı. Eritilmiş jel karışımın içine, etidyum bromüre

göre daha az tehlikeli bir alternatif olan ve oldukça hassas DNA görüntüleme boyası 5 µl RedSafe™ (iNtRon Biotechnology, Korea) eklendi. Agaroz jel, tarak yerleştirilmiş jel tepsisine, hava kabarcığı oluşturmada yavaşça döküldü oda sıcaklığında yaklaşık 45 dakika katılaşması için bırakıldı. Katılaştıran agaroz jel, elektroforez ünitesine yerleştirildi ve üzeri kaplanana kadar yürütme tamponu TBE Buffer ile dolduruldu. Ardından, ilk kuyucuğa bir moleküler ağırlık merdiveni 3 µL yükleme boyası (6X Loading Dye Solution (XB) ,iNtRon Biotechnology, Korea) ve 3 µL DNA merdiveni (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific™, ABD) yüklendi. Geri kalan kuyucuklara 3 µL yükleme boyası (6X Loading Dye Solution (XB) ,iNtRon Biotechnology, Korea) ve 3 µL cDNA örnekleri yüklendi. Ürünler yüklendikten sonra tankın ağzı kapatılır ve güç kaynağına bağlandı. Bantlar belirgin bir şekilde ilerleyene kadar jel elektroforezi 110 V elektrik akımında yaklaşık 40 dakika boyunca yürütüldü. Son olarak jeldeki cDNA fragman bantları UV ışığı altında görüntüldü.

Şekil 16. Jel elektroforezinde yürütülen cDNA örnekleri.



3.2.6. RT-PCR ile Gen Ekspresyonu İncelemesi

Bir dimer oluşturan ve mikrotübül yapısal bileşeni olarak görev yapan alfa ve beta tübülini kodlayan genlerin mRNA seviyelerini araştırmak için RNA izolasyonundan sonra, UNG (Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD) ile TaqMan® Universal Master Mix II kullanılarak ters transkripsiyon gerçekleştirildi ve housekeeping geni olarak GAPDH kullanıldı.

3.2.6.1. Plaka Hazırlama

96 kuyucuklu plağa 12,5 µL TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD), 1 µL Primer Probe ve su ile seyreltilmiş 9 µL cDNA'lar kuyucuklara son hacim 20 µL olacak şekilde dağıtıldı, ardında Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD) cihazında yürütüldü.

Tablo 6. Bir örnek için RT-PCR için kullanılan reaksiyon içeriği.

Bileşenler	Hacimler
TaqMan® Universal Master Mix II	10.0 µL
TaqMan® Gene Expression Assay (GAPDH / TUBB / TUBA1B)	1.0 µL
cDNA ve su	9.0 µL
Toplam	20.0 µL

Tablo 7. RT-PCR içeriği

Örnekler	cDNA	H ₂ O	PCR ana karışımı	Toplam
Örnek 1	1,92 µL	7,08 µL	12,0 µL	20 µL
Örnek 2	1,93 µL	7,07 µL	12,0 µL	20 µL
Örnek 3	1,94 µL	7,06 µL	12,0 µL	20 µL
Örnek 4	1,89 µL	7,11 µL	12,0 µL	20 µL
Örnek 5	1,91 µL	7,09 µL	12,0 µL	20 µL
Örnek 6	1,92 µL	7,08 µL	12,0 µL	20 µL

Tablo 8. RT- PCR' da kullanılan primerler.

Gen Sembolu	Gen Adı	NCBI Referans Sekans	Amplikon Uzunluğu	Assay ID (ThermoFisher, ABD)
GAPDH	gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	NM_001289746.2	122 bp	Hs99999905_m1
TUBB	tübülün beta class I	NM_001293212	134 bp	Hs00742828_s
TUBA1B	tübülün alfa 1b	NM_006082.2	110 bp	Hs00744842_sH

3.2.6.2. Termal Döngü

qPCR amplifikasyonu Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, ThermoFisher, ABD) cihazında, UNG inkübasyonu için 50°C'de 2 dakika, Taq Polimeraz aktivasyonu için 95°C'de 10 dakika sonrasında, 95°C'de 15 saniye denatürasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma ve uzama amplifikasyon parametreleri ile 40 döngü reaksiyon programında yürütüldü.

Tablo 9. Bir örnek için RT-PCR için kullanılan reaksiyon içeriği.

Termal Döngü Parametreleri	UNG Inkübasyonu	Polimeraz Aktivasyonu	PCR 40 Cycles	
	Bekleme	Bekleme	Denatürasyon	Uzama
Isı	50°C	95°C	95°C	60°C
Süre	2 dakika	10 dakika	15 saniye	1 dakika

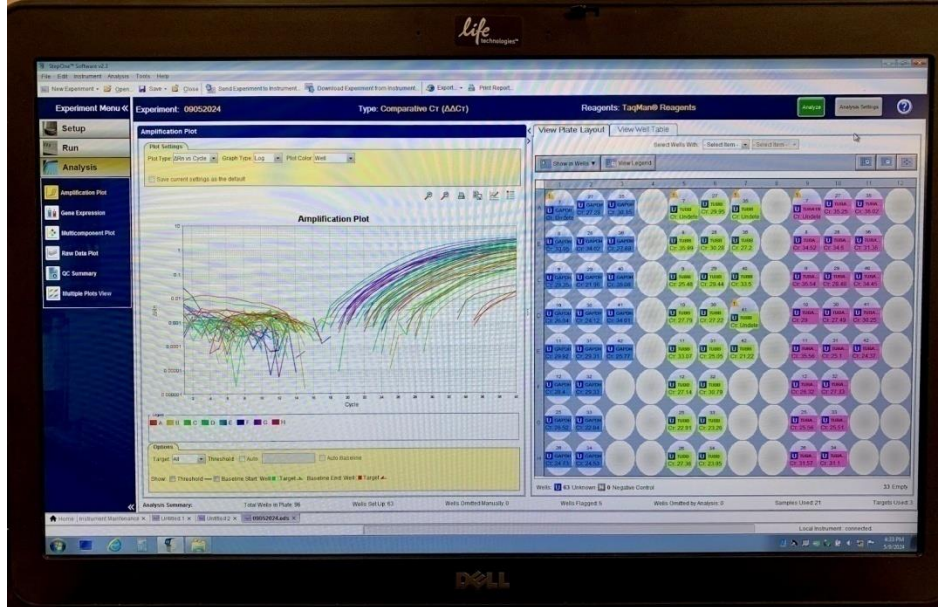
Şekil 17. Step One Plus Real-Time PCR System cihazına plakanın yerleştirilmesi.



Şekil 18. Amplifikasyon parametreleri



Şekil 19. PCR amplifikasyonunun yürütülmesi.



4. BULGULAR

4.1. Kolşisinin meme kanseri MCF-7 hücrelerinin çoğalması üzerinde etkisi

MTT testi ile farklı konsantrasyonlardaki kolşisinin meme kanseri MCF-7 hücrelerinin çoğalması üzerindeki önleyici etkileri Tablo 10'da gösterilmektedir.

Daha uzun süre ilaca maruz kalan hücrelerin hücre canlılığında daha hızlı bir azalma olduğu gösterilmiştir. Kolşisinin inhibisyon etkisinin artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte giderek arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, kolşisinin meme kanseri MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır ve farklı dozlar ile zaman etkisi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmektedir.

Tablo 10. Farklı konsantrasyonlarda kolşisin ile 24 ve 48 saat boyunca tedavi edilen meme kanseri MCF-7 hücrelerinden elde edilen MTT tahlil sonuçları (OY: optik yoğunluk, SS: standart sapma)

İlaç dozları (µg/ml)	24 saat		48 saat	
	OY değeri (ortalama ± SS)	Inhibisyon Oranı (%)	OY değeri (ortalama ± SS)	Inhibisyon Oranı (%)
kontrol	0,715 ± 0,083	0,000	1,455 ± 0,291	0,000
0	0,593 ± 0,171	17,057	1,087 ± 0,125	25,309
1	0,576 ± 0,068	19,434	0,838 ± 0,157	42,383
0,3125	0,521 ± 0,055	27,158	0,818 ± 0,196	43,803
0,625	0,503 ± 0,036	29,745	0,774 ± 0,085	46,787
1,25	0,501 ± 0,019	29,955	0,770 ± 0,004	47,079
2,5	0,479 ± 0,063	32,995	0,742 ± 0,221	49,026
3,75	0,383 ± 0,291	46,522	0,730 ± 0,076	49,851
5	0,361 ± 0,361	49,528	0,729 ± 0,013	49,897
7	0,352 ± 0,369	50,786	0,680 ± 0,047	53,299
10	0,341 ± 0,456	52,324	0,554 ± 0,731	61,907

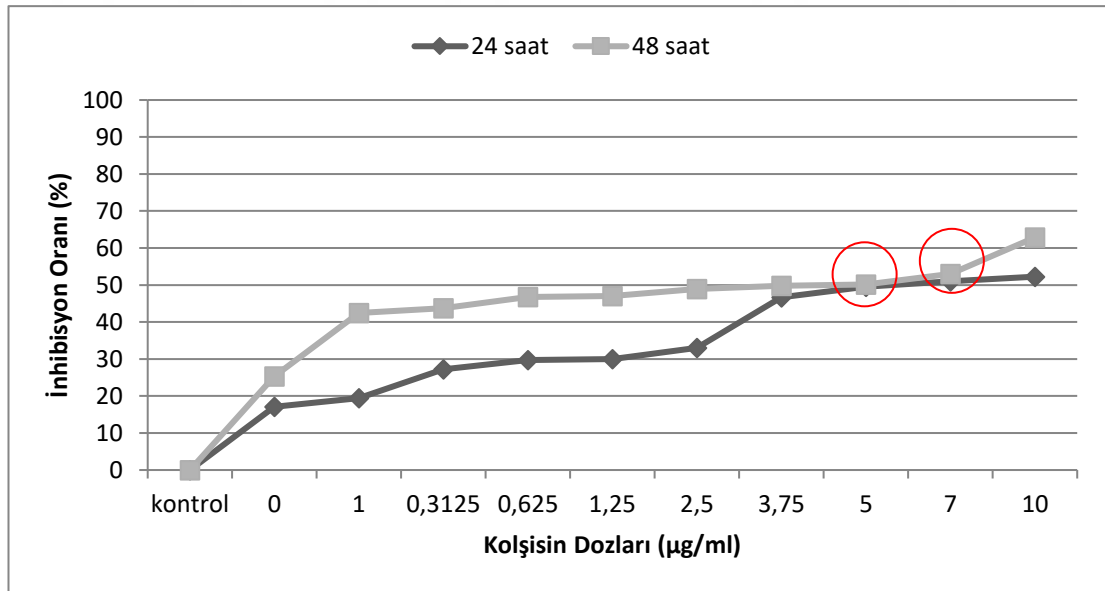
4.2. Kolşisinin MCF-7 hücreleri üzerindeki IC₅₀ Değerleri

MTT testi sonucu mikropakta okunan değerleri üzerinden, her grubun yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri aşağıdaki inhibisyon oranı formülüyle hesaplandı.

$$\text{İnhibisyon oranı (\%)} = \frac{\text{Kontrol grubunun OY değeri} - \text{Örnek grubun OY değeri}}{\text{Kontrol grubunun OY değeri}} \times 100$$

MTT testi sonucu elde edilen IC₅₀ eğrisi Şekil 14'te gösterilmektedir. Kolşisinin dozlarıyla 48 saatlik inkübasyon sonucu MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığının 24 saatlik inkübasyona göre daha erken azalttığı gösterilmiştir. Her iki tedavi sürecinde de 5 µg/ml ve 7 µg/ml dozlarında uygulanan kolşisinin yaklaşık %50 oranında hücreleri öldürdüğü tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak, 6,5 µg/ml kolşisin dozunun hem 24 hem 48 saatlik tedavi sürecinde yarı inhibitör aktivitesi gösterdiği sonucuna varılmıştır.

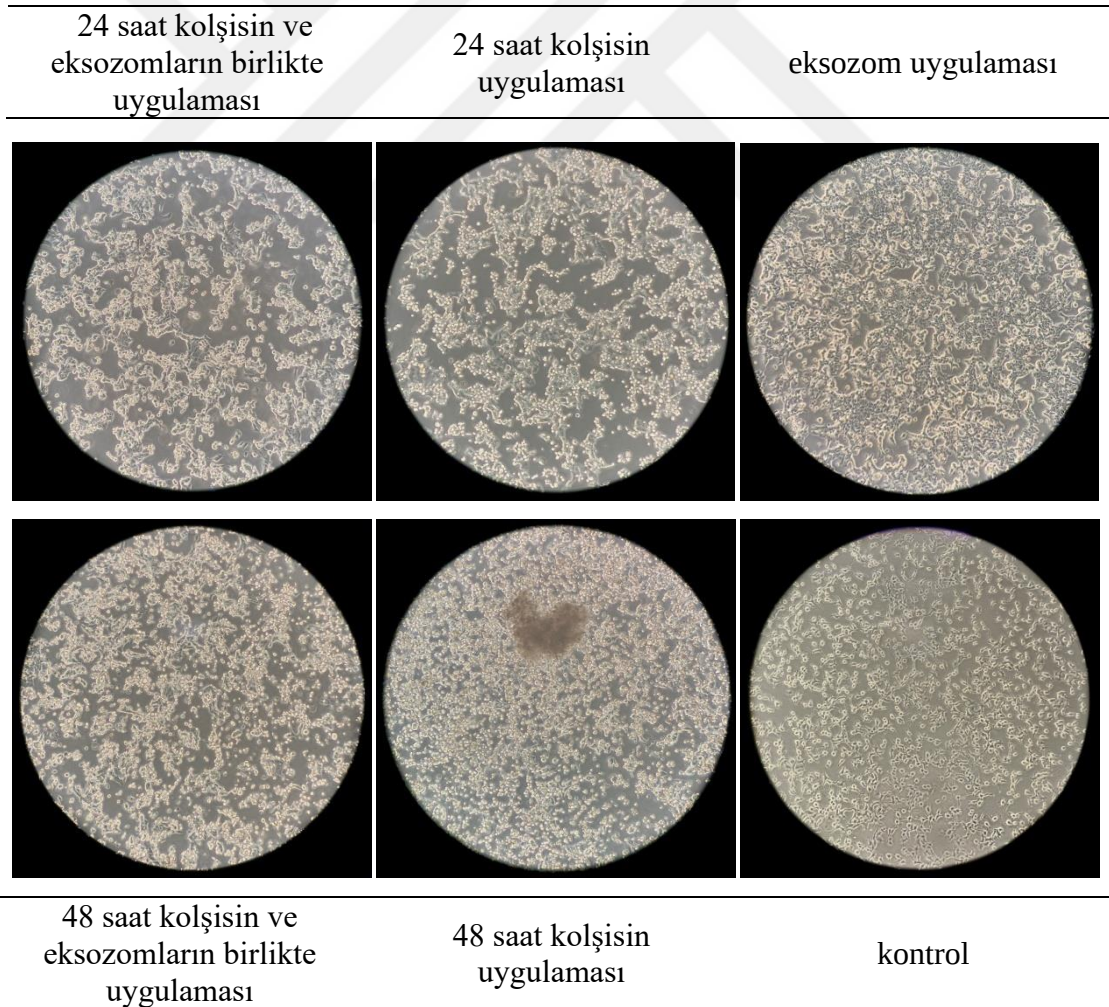
Şekil 20. Farklı konsantrasyonlardaki kolşisinin meme kanseri MCF-7 hücrelerinin çoğalması üzerindeki inhibisyon etkisi.



4.3. Kolşisin ve eksozomların meme kanseri MCF-7 hücrelerinin üzerinde etkisi

Eksozomların ve kolşisinin MCF-7 hücreleri üzerinde farklı saatlerde uygulanması sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 15’te verilmektedir. Eksozom ve kolşisinin birlikte verildiği hücrelerin yalnızca ilaç verilen hücrelere göre daha az ölü hücre kümeleri oluşturduğu gözlemlenmiştir. Özellikle 48 saat tedavi gruplarında sadece ilaç tedavisi yapılan hücrelerde eksozomlarla birlikte verilen kolşisine göre daha az ölü hücre kümeleri oluşturduğu tespit edilmiştir. Eksozom ve ilaç tedavilerinde 48 saat sonunda hücrelerin 24 saatlik tedavi gören hücrelere karşı daha fazla ölüp kalktığı görülmektedir. Sadece eksozom tedavisi yapılan hücrelerde eksozomların hücrelerinde üzerine yerleştiği ve hücre canlılığının kolşisin verilen hücrelere göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Şekil 21. Tedaviden sonra MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığının mikroskop görüntüleri

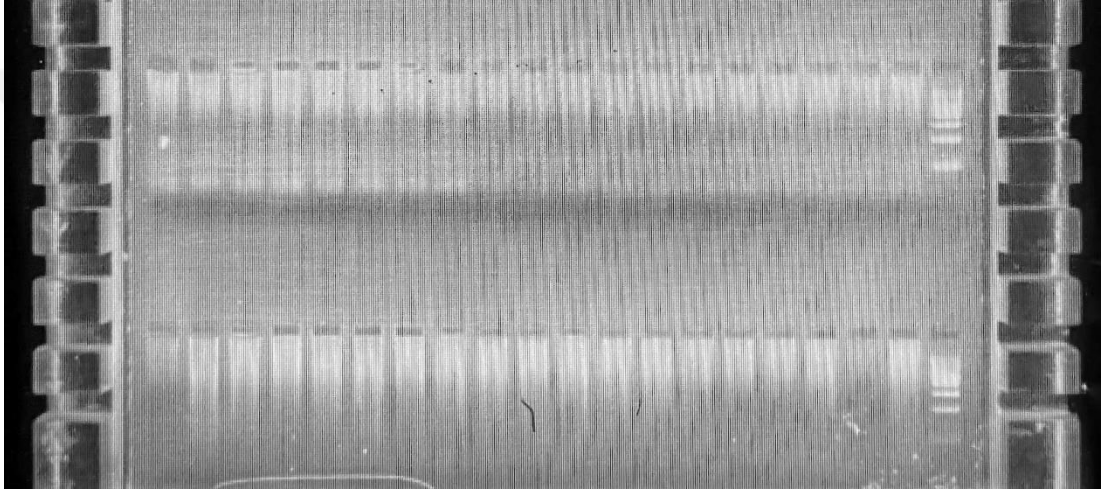


4.4. RNA eldesini saflığı ve cDNA Sentezi

İzole edilmiş toplam RNA kalitesi, 1,92'lik (1,80 - 2,04 aralığı) ortalama A260/A280 oranıyla doğrulandı. Genel olarak kabul edilebilir RNA kalite oranının 1,8'den büyük olması beklenir.

cDNA senteziyle elde edilen ürünlerinin özgülüğü yüksek çözünürlüklü jel elektroforezi ile görüntülendi ve istenilen uzunlukta tek ürün oldukları belirlendi.

Şekil 22. Jel elektroforezi sonrası cDNA fragman bantlarının UV ışığı altında görüntüleri.



4.5. Kantitatif-PCR (qPCR) Analizi

Çalışmada 24 ve 48 saatlik uygulamalarda 3 kontrol ve 15 deney grubunda TUBB ve TUBA1B genlerinin ekspresyonu incelendi, housekeeping gen olarak GAPDH geni kullanıldı.

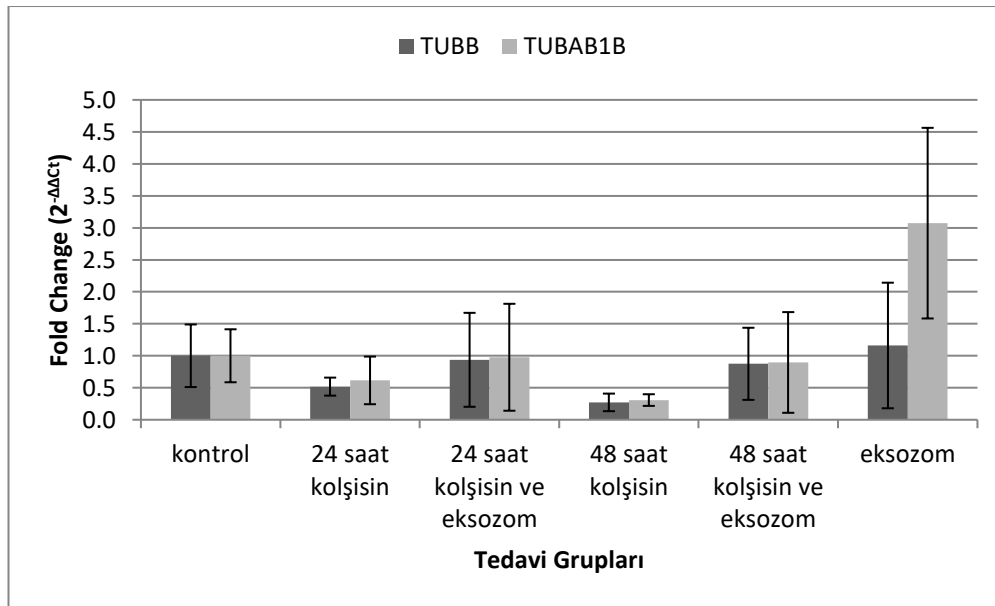
TUBB ekspresyonu ortalaması (Ct) kontrol grubunda 33,123, 24 saat ilaç grubunda 33,334, 24 saat kolşisin ve eksozom 34,682, 48 saat ilaç grubunda 33,646, 48 saat kolşisin ve eksozom grubunda 32,407, yalnızca eksozom grubunda 32,034 olarak saptandı. TUBA1B ekspresyonu ortalaması (Ct) ise kontrol grubunda 34,024, 24 saat ilaç grubunda 34,626, 24 saat kolşisin ve eksozom grubunda 36,951, 48 saat ilaç grubunda 34,192, 48 saat kolşisin ve eksozom grubunda 34,461, yalnızca eksozom grubunda 31,646 olarak saptandı.

Tablo 11. Kantitatif-PCR (qPCR) sonucu grupların elde edilen ortalama Ct değerleri.

Çalışma Grubu	GAPDH	TUBB	TUBA1B
kontrol	21,289 ± 1,316	33,123 ± 2,681	34,024 ± 2,546
24 saat kolşisin	20,888 ± 0,898	33,334 ± 3,255	34,626 ± 2,561
24 saat kolşisin ve eksozom	21,697 ± 0,308	34,682 ± 1,541	36,951 ± 2,672
48 saat kolşisin	20,031 ± 1,722	33,646 ± 1,525	34,192 ± 2,848
48 saat kolşisin ve eksozom	20,178 ± 0,402	32,407 ± 0,557	34,461 ± 2,145
eksozom	20,493 ± 1,428	33,034 ± 1,878	31,646 ± 0,626

Sadece eksozom uygulaması yapılan gruplarda her iki gen ekspresyonunun en çok olduğu görülmüştür. İlaç tedavisi yapılan çalışma gruplarında TUBA1B geninin TUBB genine göre daha fazla ifade edildiği gösterilmiştir. Eksozomlarla birlikte verilen 24 saatlik ilaç tedavisinin, 48 saatlik tedaviye göre her iki tübülün geninde daha fazla ifade edildiği gösterilmektedir. 24 saatlik çalışma gruplarında gen ekspresyonları, 48 saatlik çalışma gruplarına göre daha fazla görülmüştür. 24 saatlik gruplarda, tubulin genlerinin ekspresyonunun eksozomlarla birlikte yapılan ilaç tedavisinde, yalnızca kolşisin tedavisine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. 48 saatlik gruplarda da aynı oranla karşılaşılmıştır.

Şekil 23. Fold Change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) değerlerinin sonuçları.



5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık teşhis edilen kanser olup, dünya çapında kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olan malign tümördür. Epidemiyolojik çalışmalar, yaşın, genetiğin, ağırlığın, yaşın ve beslenme alışkanlıklarının meme kanseri riskiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. İnsan epitelyal büyüme reseptörü tip 2 (HER-2), luminal A, luminal B, normal-benzeri ve bazal benzeri olmak üzere 5 biyolojik alt tipten oluşur (Bhushan *et al.*, 2021; Al-Mahmood *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2016). Tedaviler arasında ameliyat, hormonal tedavi, immünoterapi, kemoterapi, radyoterapi ve gen tedavileri yer almaktadır. Mikrotübül hücre iskeleti hücrenin önemli bir bileşenidir ve meme kanseri tedavisi için önemli bir hedeftir (Al-Mahmood *et al.*, 2018; Rodrigues-Ferreira *et al.*, 2023).

Mikrotübüller, ökaryotik hücrelerde bulunan ve önemli hücresel süreçlerde önemli rol oynayan dinamik, boru şeklinde yapılardır. Mikrotübüller hücre bölünmesi, hücre içi taşıma, hücre göçü, hücre şeklinin korunması ve hareketlilik gibi olaylarda görev alan hücre iskeletinin temel bileşenleridir. Mikrotübüller, hızla birleşip ayrılabilen α - ve β -tübülinlerden oluşan tübülün heterodimerlerinden oluşan dinamik polimerlerdir. Dinamik yapıları ve düzenleyici rolleri, mikrotübüllerin çeşitli hücresel işlevlere katılmak üzere hızlı bir şekilde yeniden organize olmasına ve onları hücre fizyolojisi için temel haline getirmesine olanak tanımaktadır. Hücre bölünmesi sırasında mikrotübüller, kromozomların ayrılması ve bunların mitoz sırasında kardeş hücrelere doğru şekilde dağıtılmasını sağlamak için gerekli olan bir yapı olan iğ iplikleri oluşturmaktadır (Liu *et al.*, 2013; Jordan and Wilson, 2004; Dong *et al.*, 2016). Bu işlev, mikrotübülleri antikanser tedavisi için çekici bir hedef haline getirmektedir. Mikrotübül hedefleyici ajanlar yıllardır antikanser ilaçları olarak klinik olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçlar tübülünler üzerindeki farklı bağlanma bölgelerini hedefleyerek ya tübülünin polimerizasyonunu inhibe eder ya da teşvik ederler. Mikrotübül polimerizasyonu üzerindeki etkilerine göre antimitotik ajanlar iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Mikrotübül stabilizasyonunu bozan vinka alkaloidleri ve kolşisin gibi ajanlar, tübülün üzerindeki vinka alanına veya kolşisin alanına bağlanarak tübülün polimerizasyonunu inhibe eder. Kolşisin tübülün heterodimerinin ortasından hem α tübülün hem β -tübüline bağlanmaktadır. Mikrotübül stabilize edici

ajanlar taksan, paklitaksel, dosetaksel ve epotilonlar, mikrotübülün iç yüzeyinde bulunan β -tubulin üzerindeki örtüşen taksoid bağlanma bölgesine bağlanarak tübülün polimerizasyonunu uyarır. Bu antimitotik ajanların tübül üzerindeki bağlanma bölgeleri arasında taksoid bağlanma bölgesi, vinka bölgesi ve kolşisin bölgesi yer almaktadır (Liu *et al.*, 2013; Dong M. *et al.*, 2016). Bu bileşikler antimitotik ajanlar olarak bilinir ve taksanlar, paklitaksel (Taxol), vinkristin, kolşisin, dosetaksel (Taxoter), iksabepilon (Ixempra), kabazitaksel ve navelbin (Vinorelbin) içermektedir (van Vuuren *et al.*, 2015; Oba and Ito, 2018; Tommasi *et al.*, 2007). Taksan sınıfından paklitakselin (Taxol®), mitotik kayma nedeniyle mitoz geçirmeyen MCF-7 hücrelerinde otofajiyi inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bir epotilon analogu olan ixabepilone (Ixempra®) bileşiği, taksanlara dirençli metastatik veya lokal olarak ilerlemiş meme kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere 2007 yılında ABD tarafından onaylanmıştır (van Vuuren *et al.*, 2015). Taksan dirençli MCF-7 hücreleri, daha düşük kolşisin konsantrasyonlarıyla apoptozu indüklemiştir ancak terapötik değeri, düşük terapötik özelliği nedeniyle sınırlanmıştır (Wang *et al.*, 2017).

Tablo 12. Meme kanseri tedavisinde kullanılan antimitotik ajanlar.

Mikrotübül stabilizasyonunu bozan ajanlar		Mikrotübül stabilize edici ajanlar	
Vinka Alkaloidleri	Vinblastin	Taksanlar	Paklitaksel
	Vindesin		Dosetaksel
	Vinorelbin		Kabazitaksel
	Vinkristin		
	Vinflunin		
	Eribulin		
Kolşisin	Kolşisin	Epotilonlar	İksabepilon

MCF-7 meme kanseri hücre hattı lüminal A tipidir. Bir çalışmada, α -tubulin izoformları TUBA1C ve TUBA1B ve β -tubulin izoformu TUBB'nin MCF-7 hücre hattında en yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur (Nami and Wang, 2018). Bu sebepten dolayı çalışmada TUBA1B ve TUBB gen ifadelerine bakılmıştır.

Alkaloitler, mikrotübül dinamiklerini baskılayarak proliferasyonu ve apoptozdan kaçma yeteneklerinin üstesinden gelerek kanser hücrelerini yok ederek antikanser aktivitesi göstermektedir (Loh LS *et al.*, 2021). Orijinal olarak *Colchicum autumnale* bitkisinden elde edilen alkaloit olan kolşisin, Ailesel Akdeniz Ateşi, akut gut ve Behçet hastalığı gibi hastalıkların şiddetli eklem ağrılarını ve şişliğini tedavi etmek için kullanılan anti-inflamatuvar bir ilaçtır. Etki mekanizması, tübüline bağlanarak uçlardan mikrotübül polimerizasyonunu inhibe eder, hücre döngüsünü durdurur ve sonuçta hücre bölünmesini engelleyerek hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu özellik, kolşisini mikrotübül fonksiyonu ve dinamiklerini incelemek için hem araştırma hem de klinik ortamlarda önemli bir bileşik haline getirmiştir (Islam, M., & Iskander, M. 2004). Kolşisin, düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında mikrotübül büyümesini baskıladığı, yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında ise mikrotübüllerin polimerizasyonunu engellediği bilinmektedir (Leung *et al.*, 2015; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Sivakumar, 2013). Kolşisinin antimitotik etkileri yeteri kadar bilinmekte olsa da, dar terapötik penceresi ve etkili dozlarda önemli toksisitesi antikanser tedavisinde kullanım potansiyelini sınırlamaktadır. kolşisinin malignite üzerinde, kanser hücresi göçünü ve olası metastazının inhibe etmesi, anjiyogenezin önlenmesi ve apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanan mitokondriye adenozin trifosfat (ATP) akışının sınırlandırılması gibi etkileri olduğu bildirilmiştir (Leung *et al.*, 2015; Charpentier *et al.*, 2014; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2013). Bu sorunu aşmak için kolşisin analogları gibi birçok doğal ürünün, tübülün üzerindeki kolşisin bağlanma bölgesi ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Sivakumar, 2013).

Eksozomlar, ökaryotik hücreler tarafından hücre dışı mikroçevreye salgılanan ve tüm vücut sıvılarından elde edilebilen çift katmanlı lipit katmanlı nanoveziküllerdir. Boyutları 30 ila 150 nm arasında değişebilmektedir ve doğal olarak genetik materyal, sinyal molekülleri, metabolitler gibi materyalleri taşıyarak hücreler arası iletişim sağlamaktadırlar. Eksozomlar, türetildikleri hücrelerin nano versiyonları olup, onların aynı biyolojik fonksiyonlarını sergileyebilmektedirler. Bu eksozomlar peptit, protein ve RNA gibi aktif biyomoleküllerin taşınması yoluyla koruyucu ve yenileyici özellikler sağlarlar (Dutta and Paul, 2022; Jafari *et al.*, 2021; Dehkordi *et al.* 2022; Dong *et al.*, 2020).

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), kendini yenileme yeteneğine sahip olan ve aynı zamanda çok soylu farklılaşma sergileyen multipotent hematopoietik olmayan hücrelerdir. Mezenkimal kök hücrelerin en verimli eksozom kaynaklarından biri olduğu bilinmektedir. MSC'lerden salgılanan eksozomlar, inflamasyonu hafifletmek, vaskülarizasyonu indüklemek ve proliferasyonu ve göçü teşvik etmek dahil olmak üzere türetildikleri hücrelerin biyolojik işlevleri gösterir (Nikfarjam *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2022).

Bu çalışmada kolşisinin sitotoksik etkilerine karşı koruyucu etki gösterme potansiyeline sahip doğal nanoparçacıklar olan eksozomların kullanılması önerilmiştir. Mezankimal kök hücrelerden türetilen eksozomların kanser hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı için kolşisinin teröpatik alanını değiştirip kullanılabilir konuma getirdiği düşünülmektedir.

Nanoteknoloji, 1 ila 100 nm arası nanoölçeklere sahip malzemelerin, atomik veya moleküler düzeyde manipüle edilen, teşhis araçları olarak hizmet etmek veya terapötik ajanları belirli hedef bölgelere kontrollü bir şekilde iletmek için kullanıldığı, hızla gelişen bir bilimdir. Genetik, proteomik, moleküler ve hücresel biyoloji, malzeme bilimi ve biyomühendislikteki ilerlemelerin tümü gelişmekte olan nanotıp alanına katkıda bulunmaktadır (Patra *et al.*, 2018).

Kemoterapötik ve immünoterapötik ilaçlar da dahil olmak üzere anti-kanser ilaçlarının geleneksel yöntemler kullanılarak uygulanması, toksisiteler, tatmin edici olmayan terapötik etkinlik ve ilaç direnci gibi çeşitli farmakolojik sorunlara yol açmaktadır. Aynı şekilde, potansiyel antikanser alkaloidlerinin uygulanması, kanser hücrelerine spesifik olmamalarından, gelişigüzel doku dağılımından ve doz sınırlayıcı yan etkilerinden dolayı sınırlandırılmıştır. Nanoteknolojinin kullanılması, ilaçların biyolojik engelleri aşmasına ve olumsuz yan etkilerin üstesinden gelmesine olanak tanımaktadır (Patra *et al.*, 2018; Ventola, 2012; Loh *et al.*, 2021).

Yaygın kemoterapötik ilaçlar vücutta hızla çoğalan tüm hücreleri hedef alır ve tedavinin neden olduğu sitotoksosite nedeniyle ciddi olumsuz etkilere yol açmaktadır. Nanoparçacıklar için genellikle organik, inorganik, polimerik nanoyapılar, lipozomlar, metal bazlı malzemeler kullanır ve bu malzemelere terapötik ajanlar eklenerek tasarlanır (Patra et al., 2018; Ventola, 2012). Günümüzde bu çeşitli nanoparçacıklararasından en çok tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerden ikisi lipozomlar ve polimerik nanopartiküllerdir. Bir lipozom, fosfolipid membranlı, özgün bir ortamda çeşitli boyutlarda ve şekillerde kendi kendine birleşebilen sentetik bir veziküldür. Polimerik nanopartiküller, ilaç moleküllerinin tutulmasına, kapsüllenmesine veya bağlanmasına yardımcı olan ilaç dağıtım sistemleridir (Ha et al., 2016; Patra et al., 2018; Loh et al., 2021).

İdeal doğal yapıları ve fiziksel özellikleri nedeniyle eksozomlar klinik kullanım için umut verici bir nanotaşıyıcı olarak ortaya çıkmıştır. Eksozomlar, kargo materyalini hem komşu hem de uzaktaki hedef hücrelere doğrudan hücre zarıyla kaynaşarak içeriğini iletebilmektedir (Dutta and Paul, 2022). Sonuç olarak, eksozomal kargo içeriklerinin kritik incelemesi, bir dizi hastalığın tespiti ve tedavisi için yeni fırsatlar sunacaktır. Eksozomlar, küçük boyutları, dolaşımdaki yarılanma ömrünün uzun olması, hücre dışı sıvılarda uzun mesafeler kat edebilme ve hücresel kargoyu hedef hücrelere yüksek verimlilikle taşıma yetenekleri sayesinde doğal ilaç taşıma araçları olarak tercih edilmeye başladı. Aynı zamanda güçlü biyouyumlulukları, düşük immünojenite özellikleri ve kan-beyin bariyeri (BBB) gibi önemli biyolojik bariyerlerden geçme yetenekleri onları ilaç dağıtımı için umut verici bir araç haline getiriyor (Ha et al., 2016; Jafari et al., 2021; Zou Z. et al., 2023). Eksozomlar içine başarıyla yüklenen paklitaksel, doksorubisin, kurkumin, selastrol ve β -Elemen dahil olmak üzere çeşitli anti-kanser ilaçları ve ürünleri şu anda klinik denemelerden geçmektedir (Kim et al., 2016; Song et al., 2021; Dutta and Paul, 2022).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde kolşisinin toksisitesine karşı eksozomların koruyucu özelliği, β -tübülin geni TUBB ve α -tübülin geni TUBA1B ekspresyonları üzerinden araştırıldı.

Hücrelere sadece eksozom uygulaması yapıldığında her iki gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Eksozomlarla birlikte verilen 24 saatlik ilaç tedavisinin, 48 saatlik tedaviye kıyasla her iki tübülin geninde daha fazla ifade edildiği saptanmıştır. Hem 24 saatlik hem de 48 saatlik gruplarda, yalnızca kolşisin tedavisine kıyasla eksozomlarla birlikte yapılan ilaç tedavisinde tübülin genlerinin ekspresyonları daha yüksek görülmüştür.

Sonuç olarak eksozomların kolşisinin meme kanseri hücreleri üzerindeki toksisitesine karşı koruyucu özellik gösterdiğini tübülin genlerinin ekspresyonlarına bakılarak tespit edilmiştir. Bu çalıştırmaı geliştirmek için bir kaç saatlik eksozom ön-tedavisi yapılabilir veya eksozomların taşıyıcı özelliklerini kullanarak eksozom içine yüklenmiş kolşisin tedavisi uygulanması önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Abels, E. R., and Breakefield, X. O.,** 2016, Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Alli, E., Bash-Babula, J., Yang, J., M., Hait, W., N.,** 2002, Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer, *Cancer Res.* Dec 1;62(23):6864-9.
- Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, O.B., Minko, T.,** 2018, Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 8, 1483–1507. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3>
- Amos, L. A.,** 2011, What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(9), 916–926. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.09.014>
- Antimisiaris, S., G., Mourtas, S., & Marazioti, A.,** 2018, Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery, *Pharmaceutics*. Nov 6;10(4):218. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040218>
- Batista, B. S., Eng, W. S., Pilobello, K. T., Hendricks-Muñoz, K. D., Mahal, L. K.,** 2011, Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J Proteome Res.* Oct 7;10(10):4624-33. doi: 10.1021/pr200434y
- Ben-Chetrit, E.,** 2019, Colchicine. In: Hashkes, P., Laxer, R., Simon, A. (eds) Textbook of Autoinflammation. *Springer, Cham*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98605-0_40
- Berumen Sánchez, G., Bunn, K. E., Pua, H. H., Rafat, M.,** 2021, Extracellular vesicles: mediators of intercellular communication in tissue injury and disease. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00787-y>

- Bhandary, L., Martin, S., S.,** 2014, Curcumin targets breast cancer stem-like cells with microtentacles that persist in mammospheres and promote reattachment, *Cancer Res.* 15;74(4):1250-60. <https://doi.org/10.1158%2F0008-5472.CAN-13-1778>
- Bhattacharyya, B., Panda, D., Gupta, S., Banerjee, M.,** 2008, Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin, *Medicinal Research Reviews*, 28(1), 155–183. <https://doi.org/10.1002/med.20097>
- Bhushan, A., Gonsalves, A., Menon, J. U.,** 2021, Current state of breast cancer diagnosis, treatment, and theranostics. *Pharmaceutics*, 13(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050723>
- Birtwistle, L., Chen, X. M., Pollock, C.,** 2021, Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles to the rescue of renal injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126596>
- Carlsson, K., Dahlberg, H., Glansk, M., Karlsson, E., Larsson, S., Lundberg, S.,** 2020, Exosomes and lipid nanoparticles - the future of targeted drug delivery
Client : Cytiva Client representative : Jon Kapla Supervisor : Karin Stensjö.
- Chen, J., Liu, T., Dong, X., Hu, Y.,** 2009, Recent Development and SAR Analysis of Colchicine Binding Site Inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(10), 1174–1190. <https://doi.org/10.2174/138955709789055234>
- Cirillo, L., Gotta, M., & Meraldi, P.,** 2017, The elephant in the room: The role of microtubules in cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1002). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57127-0_5
- Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Elortza, F., Lu, S. C., Mato, J. M., Falcon-Perez, J. M.,** 2008, Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of proteome research* 7: 5157–5166. <https://doi.org/10.1021/pr8004887>

- Cury, N. M., Mühlethaler, T., Laranjeira, A. B. A., Canevarolo, R. R., Zenatti, P. P., Lucena-Agell, D., Barasoain, I., Song, C., Sun, D., Dovat, S., Yunes, R. A., Prota, A. E., Steinmetz, M. O., Díaz, J. F., Yunes, J. A.,** 2019, Structural Basis of Colchicine-Site targeting Acylhydrazones active against Multidrug-Resistant Acute Lymphoblastic Leukemia, *IScience*, 21, 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.003>
- Dehbashi Behbahani, G., Khani, S., Mahmoodzadeh Hosseini, H., Abbaszadeh-Goudarzi, K., Nazeri, S.,** 2016, The role of exosomes contents on genetic and epigenetic alterations of recipient cancer cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(10), 1031–1039. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2016.7725>
- Dehkordi, N. R., Dehkordi, N. R., Farjoo, M. H.,** 2022, Therapeutic properties of stem cell-derived exosomes in ischemic heart disease. *European Journal of Pharmacology*, 920(October 2021), 174839. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174839>
- Dong, M., Liu, F., Zhou, H., Zhai, S., Yan, B.,** 2016, Novel natural product-and privileged scaffold-based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. *Molecules*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/molecules21101375>
- Dong, P., Zhang, Y., Yan, D. Y., Wang, Y., Xu, X., Zhao, Y. C., Xiao, T. T.,** 2020, Protective Effects of Human Milk-Derived Exosomes on Intestinal Stem Cells Damaged by Oxidative Stress. *Cell Transplantation*, 29, 1–8. <https://doi.org/10.1177/0963689720912690>
- Donoso-Quezada, J., Ayala-Mar, S., González-Valdez, J.,** 2021, The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications. *Traffic*, 22(7), 204–220. <https://doi.org/10.1111/tra.12803>
- Dubey, K. K., Kumar, P., Labrou, N. E., Shukla, P.,** 2017, Biotherapeutic potential and mechanisms of action of colchicine. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(8), 1038–1047. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1303804>

- Dutta, A., and Paul, S.,** 2022, Advancement in exosome-based cancer therapeutics: A new era in cancer treatment. *Frontiers in Nanotechnology*, 4(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnano.2022.939197>
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., Geuze, H. J.,** 1998, Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20121–20127. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20121>
- Escrevente, C., Grammel, N., Kandzia, S., Zeiser, J., Tranfield, E. M., Conradt, H. S., Costa, J.,** 2013, Sialoglycoproteins and N-Glycans from Secreted Exosomes of Ovarian Carcinoma Cells. *PLoS ONE*, 8(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078631>
- Frydrychowicz, M., Kolecka-Bednarczyk, A., Madejczyk, M., Yasar, S., Dworacki, G.,** 2015, Exosomes-structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 81(1), 2–10. <https://doi.org/10.1111/sji.12247>
- Fu, S., Wang, Y., Xia, X., Zheng, J. C.,** 2020, Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery. *NanoImpact*, 20, 100261. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100261>
- Graening, T., and Schmalz, H. G.,** 2004, Total syntheses of colchicine in comparison: A journey through 50 years of synthetic organic chemistry. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(25), 3230–3256. <https://doi.org/10.1002/anie.200300615>
- Gu, R. X., Ingólfsson, H. I., De Vries, A. H., Marrink, S. J., Tieleman, D. P.,** 2017, Ganglioside-Lipid and Ganglioside-Protein Interactions Revealed by Coarse-Grained and Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 121(15), 3262–3275. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b07142>

- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., Kim, J. H.,** 2019, Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., Baruteau, J.,** 2021, The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>
- Ha, D., Yang, N., Nadithe, V.,** 2016, Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>
- Han, X., Deng, S., Wang, N., Liu, Y., Yang, X.,** 2016, Inhibitory effects and molecular mechanisms of Tetrahydrocurcumin against human breast cancer MCF-7 cells. *Food and Nutrition Research*, 60, 1–11. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.30616>
- Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., Liu, Q.,** 2022, Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, 3(3), 1–39. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
- Hu, J. C., Zheng, C. X., Sui, B. D., Liu, W. J., Jin, Y.,** 2022, Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel and potential remedy for cutaneous wound healing and regeneration. *World Journal of Stem Cells*, 14(5), 318–329. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i5.318>
- Islam, M., and Iskander, M.,** 2012, Microtubulin Binding Sites as Target for Developing Anticancer Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4(10), 1077–1104. <https://doi.org/10.2174/1389557043402946>

- Jafari, A., Babajani, A., Abdollahpour-Alitappeh, M., Ahmadi, N., Rezaei-Tavirani, M.,** 2021, Exosomes and cancer: from molecular mechanisms to clinical applications. *Medical Oncology*, 38(4), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01491-0>
- Jan, A. T., Rahman, S., Badierah, R., Lee, E. J., Mattar, E. H., Redwan, E. M., Choi, I.,** 2021, Expedition into exosome biology: A perspective of progress from discovery to therapeutic development. *Cancers*, 13(5), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers13051157>
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., Turbide, C.,** 1987, Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412–9420. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48095-7)
- Jordan, M. A., and Wilson, L.,** 2004, Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. Apr;4(4):253-65. <https://doi.org/10.1038/nr1317>
- Jung, H. H., Kim, J. Y., Lim, J. E., Im, Y. H.,** 2020, Cytokine profiling in serum-derived exosomes isolated by different methods. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70584-z>
- Kalluri, R., and Lebleu, V. S.,** 2020, The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*. Feb 7;367(6478):eaau6977. <https://doi.org/10.1126%2Fscience.aau6977>
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. V., Batrakova, E. V.,** 2016, Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(3), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>

- Kim, Y. K., Choi, Y., Nam, G. H., Kim, I. S.,** 2020, Functionalized exosome harboring bioactive molecules for cancer therapy, *Cancer Letters*, 489, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.036>
- Knossow, M., Campanacci, V., Khodja, L. A., Gigant, B.,** 2020, The Mechanism of Tubulin Assembly into Microtubules: Insights from Structural Studies. *IScience*, 23(9), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101511>
- Kooijmans, S. A. A., Schiffelers, R. M., Zarovni, N., Vago, R.,** 2016, Modulation of tissue tropism and biological activity of exosomes and other extracellular vesicles: New nanotools for cancer treatment. *Pharmacological Research*, 111, 487–500. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.006>
- Kumar, A., Sharma, P. R., Mondhe, D. M.,** 2016, Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: An overview. *Anti-Cancer Drugs*, 28(3), 250–262. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000464>
- Kumar, M. A., Baba, S. K., Sadida, H. Q., Marzooqi, S. Al, Jerobin, J., Altemani, F. H., Algehainy, N., Alanazi, M. A., Abou-Samra, A. B., Kumar, R., Al-Shabeeb Akil, A. S., Macha, M. A., Mir, R., Bhat, A. A.,** 2024, Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1>
- Leung, Y. Y., Yao Hui, L. L., Kraus, V. B.,** 2015, Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(3), 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.06.013>
- Liang, Y., Duan, L., Lu, J., Xia, J.,** 2021, Theranostics Engineering exosomes for targeted drug delivery, *Theranostics*, 11(7):3183-3195. <https://doi.org/10.7150/thno.52570>
- Lin, W., Fang, J., Wei, S., He, G., Liu, J., Li, X., Peng, X., Li, D., Yang, S., Li, X., Yang, L., Li, H.,** 2023, Extracellular vesicle-cell adhesion molecules in

tumours: biofunctions and clinical applications. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01236-8>

Lin, Z. Y., Wu, C. C., Chuang, Y. H., Chuang, W. L., 2013, Anti-cancer mechanisms of clinically acceptable colchicine concentrations on hepatocellular carcinoma. *Life Sciences*, 93(8), 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.07.002>

Liu, Y. M., Chen, H. L., Lee, H. Y., Liou, J. P., 2013, Tubulin inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(1), 69–88. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.859247>

Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., Sandvig, K., 2013, Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(7), 1302–1309. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.04.011>

Loh JS, Tan LKS, Lee WL, Ming LC, How CW, Foo JB, Kifli N, Goh BH, Ong YS., 2021, Do Lipid-based Nanoparticles Hold Promise for Advancing the Clinical Translation of Anticancer Alkaloids? *Cancers*, 13(21):5346. <https://doi.org/10.3390/cancers13215346>

Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W., Miller, D. D., 2012, An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharmaceutical Research*, 29(11), 2943–2971. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0828-z>

McLoughlin, E. C., and O’Boyle, N. M., 2020, Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: A review. *Pharmaceuticals*, 13(1), 1–43. <https://doi.org/10.3390/ph13010008>

Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F., 2012, Intercellular communication: Diverse structures for exchange of genetic information. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), 328–335. <https://doi.org/10.1038/nrm3335>

- Nami, B., and Wang, Z.,** 2018, Genetics and expression profile of the Tubulin gene superfamily in breast cancer subtypes and its relation to taxane resistance. *Cancers*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cancers10080274>
- Nikfarjam, S., Rezaie, J., Zolbanin, N. M., Jafari, R,** 2020, Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02622-3>
- Oba, T., and Ito, K. I.,** 2018, Combination of two anti-tubulin agents, eribulin and paclitaxel, enhances anti-tumor effects on triple-negative breast cancer through mesenchymal-epithelial transition. *Oncotarget*, 9(33), 22986–23002. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25184>
- Parker, A. L., Kavallaris, M., McCarroll, J. A.,** 2014, Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4 JUN(June), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00153>
- Patil, S. M., Sawant, S. S., Kunda, N. K.,** 2020, Exosomes as drug delivery systems: A brief overview and progress update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 154(July), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.07.026>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H. S.,** 2018, Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects, *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Pegtel, D. M., and Gould, S. J.,** 2019, Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 88(1), 487–514. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902>
- Peng, L. X., Hsu, M. T., Bonomi, M., Agard, D. A., Jacobson, M. P.,** 2014, The Free Energy Profile of Tubulin Straight-Bent Conformational Changes, with

Implications for Microtubule Assembly and Drug Discovery. *PLoS Computational Biology*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003464>

Ravelli, R. B. G., Gigant, B., Curmi, P. A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., Knossow, M., 2004, Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, 428(6979), 198–202. <https://doi.org/10.1038/nature02393>

Rezaie, J., Ajezi, S., Avci, r. B., Karimipour, M., Geranmayeh, M. H., Nourazarian, A., Sokullu, E., Rezaabakhsh, A., Rahbarghazi, R., 2018, Exosomes and their Application in Biomedical Field: Difficulties and Advantages. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 3372–3393. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0582-7>

Rodrigues-Ferreira, S., Morin, M., Guichaoua, G., Moindjie, H., Haykal, M. M., Collier, O., Stoven, V., Nahmias, C., 2023, A Network of 17 Microtubule-Related Genes Highlights Functional Deregulations in Breast Cancer. *Cancers*, 15(19), 1–14. <https://doi.org/10.3390/cancers15194870>

Saad, M. G., Beyenal, H., Dong, W. J., 2021, Exosomes as Powerful Engines in Cancer: Isolation, Characterization and Detection Techniques. *Biosensors*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/bios11120518>

Sackett, D. L., and Varma, J. K., 1993, Molecular mechanism of colchicine action: induced local unfolding of beta-tubulin. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi00212a023>

Sancho-Albero, M., Medel- Martínez, A., Martín-Duque, A. M., 2020, Use of exosomes as vectors to carry advanced therapies, *RSC Adv*, 23975–23987. <https://doi.org/10.1039/d0ra02414g>

Sanderson, R. D., Bandari, S. K., Vlodavsky, I., 2019, Proteases and glycosidases on the surface of exosomes: Newly discovered mechanisms for extracellular

remodeling. *Matrix Biology*, 75–76, 160–169.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.007>

Sivakumar, G., 2013, Colchicine Semisynthetics: Chemotherapeutics for Cancer? *Current Medicinal Chemistry*, 20(7), 892–898.
<https://doi.org/10.2174/0929867311320070005>

Skotland, T., Sandvig, K., Llorente, A., 2017, Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, 30–41.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>

Slobodnick, A., Shah, B., Pillinger, M. H., Krasnokutsky, S., 2015, Colchicine: Old and New. *American Journal of Medicine*, 128(5), 461–470.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.12.010>

Song, H., Liu, B., Dong, B., Xu, J., Zhou, H., Na, S., Liu, Y., Pan, Y., Chen, F., Li, L., Wang, J., 2021, Exosome-Based Delivery of Natural Products in Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(March), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.650426>

Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., Prinetti, A., 2007, Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwl052>

Spasevska, I., Ayoub, A. T., Winter, P., Preto, J., Wong, G. K. S., Dumontet, C., Tuszynski, J. A., 2017, Modeling the *Colchicum autumnale* tubulin and a comparison of its interaction with colchicine to human tubulin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081676>

Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Record, M., 2010, Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>

- Susa KJ., Andrew C. Kruse AC., Blacklow SC.,** 2023, Tetraspanins: structure, dynamics, and principles of partner-protein recognition. *Trends in Cell Biology*, Volume 34, Issue 6, 509 – 522. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.09.003>
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., Amigorena, S.,** 2001, Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7309–7318. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309>
- Tommasi, S., Mangia, A., Lacalamita, R., Bellizzi, A., Fedele, V., Chiriatti, A., Thomssen, C., Kendzierski, N., Latorre, A., Lorusso, V., Schittulli, F., Zito, F., Kavallaris, M., Paradiso, A.,** 2007, Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: The role of β -tubulins. *International Journal of Cancer*, 120(10), 2078–2085. <https://doi.org/10.1002/ijc.22557>
- Trajkovic, K.,** 2008, Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes (Science (1244)). *Science*, 320(5873), 179. <https://doi.org/10.1126/science.320.5873.179>
- Urbanelli, L., Magini, A., Buratta, S., Brozzi, A., Sagini, K., Polchi, A., Tancini, B., Emiliani, C.,** 2013, Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes*, 4(2), 152–170. <https://doi.org/10.3390/genes4020152>
- Van Vuuren, R. J., Visagie, M. H., Theron, A. E., Joubert, A. M.,** 2015, Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(6), 1101–1112. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2903-8>
- Ventola, C., L., Bharali, D., J., Mousa, S., A.,** 2010, The Nanomedicine Revolution: Part 1: Emerging Concepts. *Pharmacy and Therapeutics. Pharmacology & Therapeutics*, 128(9), 512–525. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725810001506>

- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R.,** 2012, Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(7), 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>
- Wang, R. C., Chen, X., Parissenti, A. M., Joy, A. A., Tuszynski, J., Brindley, D. N., Wang, Z.,** 2017, Sensitivity of docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells to microtubule-destabilizing agents including vinca alkaloids and colchicine-site binding agents. *PLoS ONE*, 12(8), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182400>
- Xitong, D., and Xiaorong, Z.,** 2016, Targeted therapeutic delivery using engineered exosomes and its applications in cardiovascular diseases. *Gene*, 575(2), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.067>
- Xu, M., Ji, J., Jin, D., Wu, Y., Wu, T., Lin, R., Zhu, S., Jiang, F., Ji, Y., Bao, B., Li, M., Xu, W., Xiao, M.,** 2023, The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes and Diseases*, 10(5), 1894–1907. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.03.021>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O.,** 2015, Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(2015), 1–60. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yang, D., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, F., Chen, L., Ma, L., Larcher, L. M., Chen, S., Liu, N., Zhao, Q., Tran, P. H. L., Chen, C., Veedu, R. N., Wang, T.,** 2020, Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - Efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 10(8), 3684–3707. <https://doi.org/10.7150/thno.41580>

- Yang, L. P. H.**, 2010, Oral Colchicine (Colcrys®). *Drugs*, 70(12), 1603–1613.
<https://doi.org/10.2165/11205470-0000000000-000000>
- Yin, K., Wang, S., Zhao, R., C.**, 2019, Exosomes from mesenchymal stem / stromal cells: a new therapeutic paradigm, *Biomark Res.* Apr 4;7:8.
<https://doi.org/10.1186/s13578-019-0159-x>
- Yu, L. L., Zhu, J., Liu, J. X., Jiang, F., Ni, W. K., Qu, L. S., Ni, R. Z., Lu, C. H., Xiao, M. B.**, 2018, A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3634563>
- Zhang, F. shun, He, Q. ze, Qin, C. H., Little, P. J., Weng, J. ping, Xu, S. wen.**, 2022, Therapeutic potential of colchicine in cardiovascular medicine: a pharmacological review, *Acta Pharmacologica Sinica*, 43(9), 2173–2190.
<https://doi.org/10.1038/s41401-021-00835-w>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H.**, 2019, Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*, 9(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhou, J., and Giannakakou, P.**, 2005, Targeting microtubules for cancer chemotherapy, *Current Medicinal Chemistr -Anti-Cancer Agents*, 5(1), 65–71.
<https://doi.org/10.2174/1568011053352569>
- Zou, Z., Li, H., Xu, G., Hu, Y., Zhang, W., Tian, K.**, 2023, Current Knowledge and Future Perspectives of Exosomes as Nanocarriers in Diagnosis and Treatment of Diseases. *International Journal of Nanomedicine*, 18(August), 4751–4778. <https://doi.org/10.2147/IJN.S417422>

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve tez çalışma sürecim boyunca yardımlarını esirgemeyen, her konuda bilgi ve deneyimleri ile destek olan değerli tez danışman hocam Prof.Dr. Afig BERDELİ'ye, çalışma sürecim boyunca yardımlarını eksik etmeyen Dr. Ayten SEFERLİ'ye, ve Ecenaz NAMLI'ya, tüm eğitim ve öğretim boyunca maddi ve manevi, her zaman ve her koşulda yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman ayırmayan sevgili anneme, babama ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

01/07/2024

Derin KUMCUOĞLU

İmzası

ÖZGEÇMİŞ

- MEV Koleji Özel Güzelbahçe Lisesi (2013-2016)
- İzmir Ekonomi Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü (2017-2021)
- Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2019-2024)

