

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAKROFAJ TÜREVLİ EKSOZOMLARIN GLİOBLASTOMA HÜCRESEL
DAVRANIŞLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
İNCELENMESİ

Dilara KURT

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MAKROFAJ TÜREVLİ EKSOZOMLARIN GLİOBLASTOMA HÜCRESEL DAVRANIŞLARINA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Dilara KURT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri
Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Burak DERKUŞ

Bu çalışmada, M0, M1 ve M2 polarize makrofaj türevli eksozomlar glioblastoma hücrelerinde moleküler düzeyde yarattığı farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Eksozomlar, polarize makrofaj hücrelerinden izole edilmiş ve nano-yapıları TEM ile, protein miktarı kantitatif olarak BCA testi ile belirlenmiştir. M0, M1 ve M2 makrofajlarının U87 glioblastoma hücreleri ile kültürlenmesi ve eksozomların dolaylı etkisini araştırmak için eş-kültür sistemleri kurulmuştur. Eksozomların glioblastoma hücreleri üzerindeki doğrudan etkisi, U87 hücrelerine eksozomların direkt uygulanması yolu ile doğrulanmıştır. Eş-kültür deneylerinde hipotezin ispatı amacıyla bir optimizasyon süreci gerçekleştirilmiştir. Eksozomal sistem kurulurken iki farklı eksozom konsantrasyonu (10 ve 100 µg/mL) denenmiş ve daha yüksek konsantrasyonun (100 µg/mL) etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Makrofaj fenotipinin glioblastoma hücrelerinin saldırganlığını ve kanser ilerlemesini etkilediği yapılan analizlerle doğrulanmıştır. Makrofaj eksozomlarının yüksek konsantrasyonda U87 hücreleri üzerinde canlılık ve çoğalma açısından olumsuz etkilerinin olmadığı canlı/ölü testi ve XTT testi ile doğrulanmıştır. Eksozom aracılı kanser hücresi davranışları, immünofloresan boyama ve gen ekspresyon çalışmaları gerçekleştirilerek kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bağışıklık sistemi üyesi makrofajların eksozomlarının in vitro yara iyileşme potansiyeli (scratch assay) ve anti-kanser ilaç direnci üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, M0 makrofaj eksozomlarının immün yanıtlarda dualiteye sahip olduğu tespit edilirken, M1 makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücrelerinin metastazını baskıladığı ve M2 makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücrelerinin ilerlemesine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak, makrofaj eksozomların immünomodülatör özellikleri sayesinde terapötik hedefler için yeni stratejiler sunacağı düşünülmektedir.

Şubat 2023, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Eksozom, Makrofaj, Glioblastoma, Eş-Kültür, Metastaz

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF MACROPHAGE-DERIVED EXOSOMES ON GLIOBLASTOMA CELLULAR BEHAVIOURS IN MOLECULAR LEVEL

Dilara KURT

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Burak DERKUS

In this study, it was aimed to investigate the differences that arise from M0, M1, and M2 polarized macrophage-derived exosomes at the molecular level in glioblastoma cells. Exosomes were isolated from polarized macrophage cells and their nanostructures were determined by TEM and the amount of protein was quantitatively determined by BCA assay. Co-culture systems were established to culture M0, M1, and M2 macrophages with U87 glioblastoma cells and to investigate the indirect effect of exosomes. Subsequently, exosomes were induced directly into U87 cells and direct effects were evaluated. An optimization process was carried out to prove the hypothesis in co-culture experiments. For the established exosomal system, two different concentrations of exosomes (10 and 100 µg/mL) were tested and the high concentration (100 µg/mL) was optimized for further experiments. It was confirmed by analyzes that the macrophage phenotype affects the aggressiveness of glioblastoma cells and cancer progression. It was confirmed by live/dead test and XTT test that macrophage exosomes in high concentration do not have negative effect on U87 cells in terms of viability and proliferation. Exosome-mediated cancer cell behavior was extensively studied by performing immunofluorescence staining and gene expression studies. The effects of exosomes of immune system member macrophages on in vitro wound healing potential (scratch assay) and anti-cancer drug resistance were investigated. According to the findings, it was observed that M0 macrophage exosomes have duality in immune response while M1 macrophage exosomes suppress the metastasis of glioblastoma cells, and M2 macrophage exosomes contribute to the progression of glioblastoma cells. Consequently, it is thought that macrophage exosomes will offer new strategies for therapeutic targets through their immunomodulatory properties.

February 2023, 69 pages

Key Words: Exosome, Macrophage, Glioblastoma, Co-culture, Metastasis

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana yol gösteren, denemelerin başarısızlık olmadığını öğreten ve hep motive eden danışman hocam Doç. Dr. Burak Derkuş'a, sorularımı her zaman özveriyle yanıtlayan Doç. Dr. Sedat Odabaş'a ve kıymetli hocam Prof. Dr. Emel Emregül'e, lisans öğrenimimden bu yana samimiyetini hep hissettiğim Doç. Dr. Aysuhan Ozansoy'a, emekli hocalarımdan, hayal etmenin mühim olduğuna inandırarak benim ben olmamda emeği geçen Prof. Dr. Sebla Dinçer'e, temel değişmezler üzerinden yaşam ve kimya bağını kurmama vesile olan Prof. Dr. Zeynel Kılıç'a, yalnız hissettirmeyen ve ekip olma bilincini kazandığım tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Yüksek lisans öğrenimimde maddi destekleri için TÜBİTAK BİDEB'e,

Canım annem ve canım babama, en iyi arkadaşım Muhlis'e ve varlığıyla bana neşe olan biricik kedim Feruş Bey'e,

Bu vesileyle en içten şekilde teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Dilara KURT
Ankara, Şubat 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Kanser Oluşumu ve Progresyonu	3
2.2 Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Kanserleri ve Gliomalar	3
2.3 Glioblastoma	4
2.3.1 Glioblastoma tümör mikroçevresi	5
2.4 Kanser-İmmünite İlişkisi.....	6
2.5 Bağışıklık Sistemi Hücreleri ve Glioblastoma	7
2.5.1 Nötrofiller.....	8
2.5.2 T lenfositler	8
2.5.3 B lenfositler	8
2.5.4 Mast hücreleri.....	9
2.5.5 Dendritik hücreler.....	9
2.5.6 Doğal öldürücü hücreler.....	9
2.5.7 Makrofaj hücreleri.....	10
2.6 Hücre Dışı Veziküller ve Eksozomlar	11
2.6.1 Eksozomların kökeni ve karakteristik özellikleri	12
2.6.2 İmmün hücre eksozomları.....	13
2.6.3 Eksozomların kullanım alanları	14
3. KAYNAK ÖZETLERİ	16
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
4.1 Materyal	19
4.2 Yöntem	20
4.2.1 In vitro hücre kültürü çalışmaları	1
4.2.1.1 Hücre kültürü	21
4.2.1.2 Makrofaj polarizasyonu	21
4.2.2 Makrofaj hücre proliferasyonu'nun XTT testi ile incelenmesi	22

4.2.3 Makrofaj ve glioblastoma hücrelerinin eş-kültürasyonu	22
4.2.3.1 Canlı/ölü testi: Eş-kültürasyonun canlılığa etkisi	23
4.2.3.2 Eş-kültürasyonun glioblastoma hücrelerinin metastatik davranışına etkisinin immünfloresan boyama ile incelenmesi	23
4.2.3.3 RT-qPCR: Makrofajlarla eş-kültürasyonun glioblastoma onkogenik gen ekspresyonlarına etkisinin incelenmesi	24
4.2.4 Eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu	25
4.2.5 Glioblastoma hücrelerine M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomların uygulanması... ..	26
4.2.5.1 XTT testi: Makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücre proliferasyonuna etkisi.....	26
4.2.5.2 Apoptoz/Nekroz testi.....	27
4.2.5.3 İmmünofloresan boyama: Makrofaj eksozomlarının glioblastoma üzerinde metastatik etkilerinin incelenmesi	27
4.2.5.4 RT-qPCR: M0, M1, M2 makrofaj türevli eksozomların glioblastoma hücrelerinde gen ekspresyon seviyesinde yarattığı farklılıkların incelenmesi	28
4.2.6 M0, M1, M2 Makrofaj eksozomlarının glioblastomada in vitro yara iyileştirme (scratch assay) potansiyelinin incelenmesi	28
4.2.7 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarının glioblastomada anti-kanser ilaç direncine etkileri.....	29
5. BULGULAR	30
5.1.1 Makrofajların polarizasyonu ve karakterizasyonu	30
5.1.2 Makrofaj polarizasyonunun RT-qPCR ile incelenmesi.....	31
5.1.3 Polarize makrofaj hücrelerinin çoğalma kapasitelerinin XTT ile incelenmesi	32
5.1.4 Eş-kültürasyonun hücre canlılıklarına etkisinin canlı/ölü testi ile incelenmesi	33
5.1.5 M0, M1, M2 makrofajlarla eş-kültürlenmiş glioblastoma hücrelerine GFAP ve Vimentin ifadenmesi	35
5.1.6 M0, M1, M2 makrofaj eş-kültürünün glioblastoma kanser progresyonuna etkilerinin gen ekspresyon seviyesinde incelenmesi	36
5.1.7 Eş-kültür yönünün hücre metastazına etkisinin incelenmesi	38
5.2 Eksozom Karakterizasyonu	40
5.3 M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomların glioblastoma hücresel morfolojisindeki etkileri	41
5.3.1 M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomların glioblastoma hücrelerinde metastatik süreçlere etkilerinin immünfloresan mikroskopisi ile incelenmesi	41

5.3.2 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücre canlılığına etkilerinin incelenmesi	43
5.3.3 Makrofaj eksozomlarının glioblastoma progresyonuna ilişkin etkilerinin gen ekspresyon bulguları	44
5.3.4 Apoptoz-nekroz testi: Makrofaj eksozomları ile indüklenen glioblastoma hücrelerinin ölüm yollarına etkisinin mikroskopik olarak incelenmesi ..	46
5.3.5 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücreleri üzerinde in vitro yara iyileştirme potansiyelinin incelenmesi	47
5.3.6 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücreleri üzerinde anti-kanser ilaç direncine etkilerinin incelenmesi.....	48
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	50
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	69

KISALTMALAR DİZİNİ

2B	İki boyut
3B	Üç boyut
TAN	Tümör-ilişkili Nötrofil
TAM	Tümör-ilişkili Makrofaj
CAF	Kanser-ilişkili Fibroblast
CNS	Merkezi sinir sistemi
GBM	Glioblastoma Multiform
pGBM	Primer Glioblastoma
sGBM	Sekonder Glioblastoma
TP53	Transformation-related protein 53
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
PTEN	Fosfataz ve tensin homoloğu
TME	Tümör mikroçevresi
GSC	Glioblastoma kök hücresi
ECM	Hücre dışı matris
IL-10	İnterlökin-10
IFN- γ	İnterferon-gama
Treg	Düzenleyici T hücresi
Breg	Düzenleyici B hücresi
Beff	Efektör B hücreleri
Th	Tip1- T-helper
MMP	Matris metalloproteinaz
TAMC	Tümörle ilişkili Mast Hücreleri
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
SCF	Kök hücre faktörü
NK	Doğal öldürücü hücre
DC	Dendritik hücre
STAT3	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
MVE	Multiveziküler cisimcikler
BBB	Kan-beyin bariyeri
miRNA	mikro RNA
mRNA	mesajcı RNA
Alix	Programlanmış hücre ölümü 6 etkileşimli protein
Tsg101	Tümör duyarlılık geni 101
PBMC	Periferik kan mononükleer hücresi
CCL	Kemokin ligandı
PD-L1	Programlanmış ölüm ligand 1
TMZ	Temozolomid
PDCD4	Programlanmış hücre ölümü proteini 4

SRY	Sex-determining region Y protein
DOX	Doksorubisin
P/S	Penisilin/Streptomisin
FBS	Fetal sığır serumu
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
PFA	Paraformaldehit
BSA	Sığır serum albümin
GFAP	Glial fibril asidik protein
cDNA	Komplement DNA
RT-qPCR	Ters transkripsiyon kantitatif gerçek zamanlı PCR
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
LPS	Lipopolisakkarit
BCA	Bisinkoninik asit
TEM	Geçirimli elektron mikroskop
PBS	Phosphate-buffered saline
DMEM-HG	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose
Ethd-1	Ethidium homodimer-1
7-AAD	7-Aminoactinomisin D
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
DMSO	Dimetil sülfoksit
E-CAD	E-cadherin
N-CAD	N-cadherin
CASP-3	Kaspaz-3
SNAIL	Zinc finger protein SNAI1
RIPK-1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
MET	Mezenkimal-epitelyal geçiş

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Glioblastoma Tümör Mikroçevresi (Simon vd. 2020).....	5
Şekil 2.2 Kanser-İmmunité Döngüsü.....	6
Şekil 2.3 Makrofajların Fenotip Farklılaşması	11
Şekil 2.4 Eksozom oluşumu.....	12
Şekil 5.1 Polarize edilen M1 ve M2 tip makrofajların M0'a kıyasla kültür sürecindeki yapısal değişikliklere ait görüntüleri (A) M0 makrofaj, B) M1 makrofaj, C) M2 makrofaj, ölçek çubuğu:200µm.	30
Şekil 5.2 İki kez polarize edilmiş (A) M1 makrofaj hücreleri ve (B) M2 makrofaj hücrelerinde kültür süresince gözlenen yapısal değişiklikler (ölçek çubuğu:100µm)	31
Şekil 5.3 Polarize edilen makrofaj hücre belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri	32
Şekil 5.4 Polarize edilen makrofaj hücrelerinin 2.gün ve 4.gün için XTT yöntemi ile belirlenen hücre çoğalma oranları.....	33
Şekil 5.5 Makrofaj hücreleriyle eş-kültürü sonucunda U87 hücrelerinin 4. günde canlılık boyamasına ait floresan görüntüleri. (Ölçek çubuğu: 200 µm).....	34
Şekil 5.6 Makrofaj hücreleriyle eş-kültür edilen U87 hücrelerinin morfolojik bulguları (Ölçek çubuğu: 200 µm)	35
Şekil 5.7 Makrofaj hücreleriyle eş-kültür edilen U87 hücrelerinin immüno floresan boyaması görüntüleri. GFAP ve Vimentin boyaması (Ölçek çubuğu 100 µm).....	36
Şekil 5.8 Makrofaj hücreleriyle eş-kültür edilen U87 hücrelerinin A) EMT B) metastaz C) apoptoz ilişkili gen ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri ...	38
Şekil 5.9 Eş-kültür yönünün değiştirilmesiyle elde edilen A) morfolojik ve B) gen ifadeleri	39
Şekil 5.10 Şekil Makrofajlardan izole edilen eksozomların A) TEM görüntüleri ve B) BCA testi sonuçlarına göre protein miktarı.....	40
Şekil 5.11 Makrofaj eksozom konsantrasyonunun U87 hücre kültürüne etkileri (ölçek çubuğu: 200 µm).....	41
Şekil 5.12 Eksozom konsantrasyonunun EMT ile ilişkilendirilmesine yönelik yapılan immüno floresan çalışmasına ait görüntüler.....	43
Şekil 5.13 Makrofaj eksozomlarıyla indüklenen U87 hücrelerinin XTT testine ait grafiğı	44
Şekil 5.14 Eksozomlar ile indüklenen U87 hücrelerinin A) EMT, B) metastaz ilişkili RT-qPCR gen ekspresyon seviyeleri.....	45
Şekil 5.15 Eksozomlar ile indüklenen U87 hücrelerine ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri (ölçek çubuğu: 200 µm).....	46

Şekil 5.16 Glioblastoma yara iyileşmesinde makrofaj eksozomlarının etkileri	
A) yara alanlarının görüntüleri ve B) yara alanı hesabı.....	48
Şekil 5.17 Eksozomlar ile indüklenen U87-MG hücrelerinin anti-kanser ilaç uygulamasıyla hücresel canlılıklarının zamana bağlı incelenmesi:	
A) XTT bulguları, B) invert faz/kontrast görüntüleri, ölçek çubuğu: 500 μ m).....	49



1. GİRİŞ

Glioblastoma multiform (GBM) en sık görülen agresif primer beyin tümörüdür (Louis vd. 2016). Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi işlemler gibi çeşitli tedavi seçenekleri mevcut olsa da glioblastomanın invazif doğası sebebiyle kötü prognoz ve düşük sağkalım oranı ile ilişkilendirilmektedir. Glioblastoma ve immün mikroçevresine yönelik araştırmalar yapılarak bu mortalitenin değişme imkânı sağlanabilir.

Glioblastoma kanserinin, oluşum ve ilerleme süreci farklılıklarına sebep olan ve hücrel kaderi belirlemedeki etmenlerden biri, tümör mikroçevresindeki bileşenler ve reaksiyonlar bütünüdür. Tümör mikroçevresi yalnız kanser hücrelerini değil, hücre dışı matris ve bağışıklık hücreleri gibi çeşitli bileşenleri içermektedir. Bu bileşenlerin her biri kanser için önemli birer kilit noktadır. Özellikle bu mikroçevrede bulunan bağışıklık hücreleri, sahip oldukları plastisite yeteneğiyle bulunduğu ortamda farklı fonksiyonlar gösterebilir. Değişen fenotiplere göre, immün-baskılayıcı bir çevre oluşumuna izin vererek tümör destekleyici bir davranış gösterebildiği gibi immün-gözetim kuvvetli ve baskın gelebilir. Genellikle immün-baskılayıcı bir mikroçevreye sahip olduğu ile bilinen glioblastoma, tümörde yerleşik mikrogliya ve periferik makrofajların önemli ölçüde infiltrasyonu ile karakterize edilmektedir (Prionisti vd. 2019).

Tümör mikroçevresinde hücreler birbirleriyle karmaşık bir sistem aracılığıyla iletişim kurmaktadır. Bu sistemin önemli bir parçası eksozomlardır. Eksozomlar, taşıdıkları biyomoleküller ile fizyolojik ve patolojik senaryolarda rol alan hücre-hücre iletişim araçları olarak bilinirler (Maia vd. 2018). Ortaya çıkan kanıtlar, eksozomların çoğalma, büyüme, anjiyogenez, immüno-modülasyon, enfeksiyon, metastaz, yeniden programlama ve yeniden modelleme dahil olmak üzere bir dizi hücrel süreçte önemli roller oynadığını göstermektedir (Rezaie vd. 2022).

Bu çalışmada, eksozomların işlevselliğinden yararlanarak glioblastoma kanser hücrelerinin davranışlarına etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Bu amaçla birlikte, bağışıklık sisteminin önemli bir üyesi olan makrofaj hücreleri karşısında gösterdiği davranışlarını incelemek için öncelikli olarak eş-kültür sistemi kurularak U87

hücrelerinin davranışları moleküler seviyede araştırılmıştır. Bununla birlikte makrofaj hücre eksozomlarının U87 hücre davranışlarına etkilerinin incelenmesi kanser araştırmalarında eksozomların önemine vurgu yaparken farklı bir bakış açısı sağlamıştır. Ayrıca makrofaj kökenli eksozomların hastalık patolojisindeki çeşitli işlevlerini incelemek için birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, az sayıda çalışma, ayrıntılı biyolojik rollerini kapsamlı bir şekilde özetlemiştir (Wang vd. 2020).

Bu tez çalışması kapsamında, immun hücre eksozomlarının, hücre proliferasyonuna, metastatik ve invazif tepkilerini değerlendirmek için glioblastoma multiform hücreleri (U87-MG) kullanılmış olup, meydana gelen genetik ve fenotipik değişiklikler kapsamlı şekilde incelenmiştir. Çalışmadaki ana motivasyon, makrofaj hücrelerinin, glioblastomadaki prognostik değerini araştırmaktır. Bununla birlikte, klinikte makrofajları hedef alan birçok ilaç test edilmektedir ancak yalnızca birkaçı glioblastoma üzerinde test edilmektedir (Grégoire vd. 2020). Glioblastomadaki bağışıklık manzarası, klinikte etkinlik eksikliği olduğundan daha fazla araştırılması gereken bir konudur. Mevcut çalışmaların limitlerinden yola çıkılarak bu konsept ile, glioblastoma kanser hücrelerinde görülen her türlü bulgu, eksozomları ön planda tutarak gelecek ilaç çalışmalarına bir strateji imkânı sağlayacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser Oluşumu ve Progresyonu

Hücrelerin aşırı ve anormal proliferasyonu ile karakterize edilen patolojik bozukluk tümör olarak adlandırılır. Tümör hücrelerinin büyümesi, orijin bölgesiyle sınırlı kalarak, normal fiziksel özellik gösterdiklerinde iyi huylu tümörler olarak kabul edilirler. Bunun aksine, anormal özelliklere sahip olduğunda ve kontrolsüz bir şekilde büyüyebildiğinde, kanserli hücreler yani kötü huylu tümör olduğu kabul edilir (Sinha, 2018).

Kanser, tümörjenez veya onkogeneze olarak da bilinen bir süreçle bir organizmanın genleri ve çevresi arasındaki etkileşimleri içeren çok aşamalı ve çok faktörlü moleküler olaylar nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Karidio vd. 2021). Bu süreçte, kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olan bir dizi mutasyon gerçekleştiğinden, hücre fonksiyonları ve metabolizma davranışında da değişiklikler meydana gelmektedir. Hücreler ölümsüzlük özelliği, bağışıklık sisteminden kaçma kabiliyeti ve farklı mikroçevrelere istila edebilme özelliği kazanırlar (Harrington, 2016). Kanser hücrelerinin, bulundukları bölgeden ikincil hatta üçüncül başka doku veya organlara ulaşması ile metastaz durumu ortaya çıkmaktadır. Çevre dokulara nüfuz etme yeteneğini kazandıktan sonra ise, bu hareketli hücreler bazal membrandan ve hücre dışı matristen geçerken invazyon süreci başlatırlar ve lenfatik veya vasküler dolaşıma girerken intravazasyona ilerler. Metastatik hücreler daha sonra ekstrasvazyon sürecine girip dolaşım sistemi boyunca ilerlerler (Martin vd. 2013).

2.2 Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Kanserleri ve Gliomalar

Dünya çapında, her yıl yaklaşık 238.000 yeni beyin ve diğer merkezi sinir sistemi tümörü vakası teşhis edilmektedir (del Burgo vd. 2014).

MSS tümörleri, çocuklarda ve yetişkinlerde en sık görülen ikinci neoplazm türü olup, önde gelen bir ölüm nedenidir (Lambrou, 2022).

MSS tümörleri, invaziv olmayan ve cerrahi tedavi imkânı olan pilositik astrositomlardan, yetişkinlerde yaygın intraparakimal beyin tümörü olan ve oldukça invaziv olan glioblastoma multiforme'ye kadar uzanır (Nabors vd. 2020). Tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %33'ü, yetişkinlerdeki toplam MSS kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturan gliomalardır (Hanif vd. 2017). Glioma, astrositler, oligodendrositler ve ependimal hücreler dahil olmak üzere beyindeki nöronları çevreleyen ve destekleyen glial hücrelerden kaynaklanan beyin ve omurilik tümörleri sınıfındandır (Roda vd. 2022).

Glial tümörlerin, Dünya Sağlık Örgütü'nün bilinen en genel sınıflandırması ile düşük dereceli (derece I ve II) ve yüksek dereceli (derece III ve IV) olarak belirlenmiştir (Stoyanov vd. 2018). Derece I lezyonlar iyi huyludur ve görece yavaş proliferasyon gösterir ve çocuklarda en sık görülen pilositik astrositomu içerir. Astrositom, oligodendroglioma ve oligoastrositom dahil olmak üzere II. derece tümörler de yavaş büyüme hızına sahiptir, ancak pilositik astrositomların aksine, normal beyin parankim dokusunda yaygın olarak büyür ve malign ilerleme meyili gösterir. Derece III tümörler, daha yüksek bir hücresel yoğunluk ve bol miktarda atipi ve mitotik hücre varlığı ile karakterize edilen anaplastik astrositom, anaplastik oligodendroglioma ve anaplastik oligoastrositomu içerir. Derece IV tümörler ise en malign ve sık görülen gliomalar olup glioblastoma ve gliosarkomu içerir (Jiang vd. 2012).

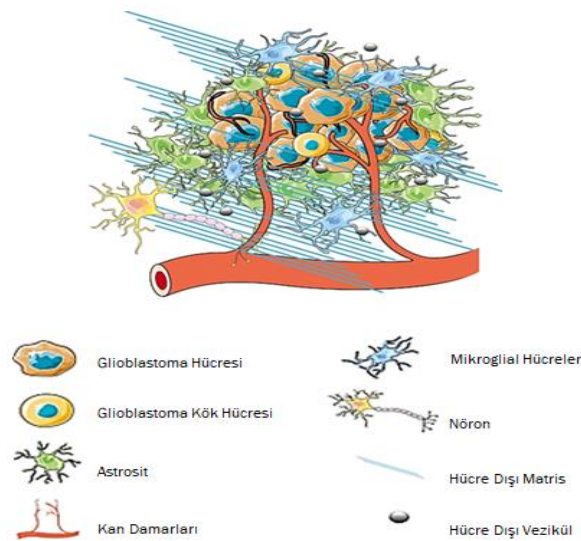
2.3 Glioblastoma

Glioblastoma (GBM), yaygın infiltrasyonu ile karakterize edilen agresif klinik seyri olan, birincil beyin tümörlerinden biridir (Birzu vd. 2020). Nükleer atipi, yüksek mitotik aktivite ve mikrovasküler proliferasyon ile hücresel pleomorfizm, GBM'nin diğer düşük dereceli gliomalardan ayrılmasını sağlayan özelliklerindendir (Roda vd. 2022). GBM ve astrositom aynı öncü hücreyi köken aldığından ve bazı astrositom vakaları zamanla GBM'ye ilerleme gösterebildiğinden bir ayrım gereği duyulmuştur. Klinik olarak GBM, hızla ilerleyen ve öncü lezyonların bulunmadığı birincil glioblastoma (pGBM) ve yaygın astrositom (derece II) veya anaplastik astrositom (derece III) olarak ilerleyen ikincil glioblastoma (sGBM) olarak ikiye ayrılmıştır (Li vd. 2015).

Klinik seyrinde, pGBM son derece agresif bir ilerleme gösterirken, sGBM daha yavaş ilerleme ve daha iyi bir prognoza sahiptir (Scherer, 1940). Yapılan çalışmalarda, birincil ve ikincil glioblastomaların farklı genetik yollara sahip olduğu gösterilmiştir (Ohgaki vd. 2007). TP53 mutasyonlarının birincil glioblastomalarda yaygın olmadığı fakat ikincil glioblastomalarda yüksek etkili olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, birincil glioblastomalarda EGF reseptörü aşırı ekspresyonu gözlenirken, ikincil glioblastomalarda nadir ifadenme gösterir. Birincil glioblastomalarda görülen tipik genetik etkiler, EGFR amplifikasyonu, PTEN mutasyonu ve kromozom 10'un tam kaybıdır. İkincil glioblastomalarda ise daha sık görülen genetik değişiklikler, TP53 mutasyonları ve 19q kaybıdır (Ohgaki vd. 2013). Anatomik lokalizasyonda sGBM'nin %68'i frontal lobda yer alırken, pGBM yaygın olarak beyin merkez yarım küresinde bulunmaktadır (Li vd. 2015).

2.3.1 Glioblastoma tümör mikroçevresi

Glioblastomanın tümör mikroçevresinde (TME), damar endotel hücreleri, immün hücreler, glioma kök benzeri hücreler (GSC'ler) ve astrositlerin yanı sıra hücre dışı matris (ECM) gibi hücresel olmayan bileşenler de bulunmaktadır (Simon vd. 2020). GBM'nin seyrinin araştırılmasında, tümör mikroçevresi-immünite ilişkisi göz önüne alınarak daha fazla incelenmeye başlanmıştır.

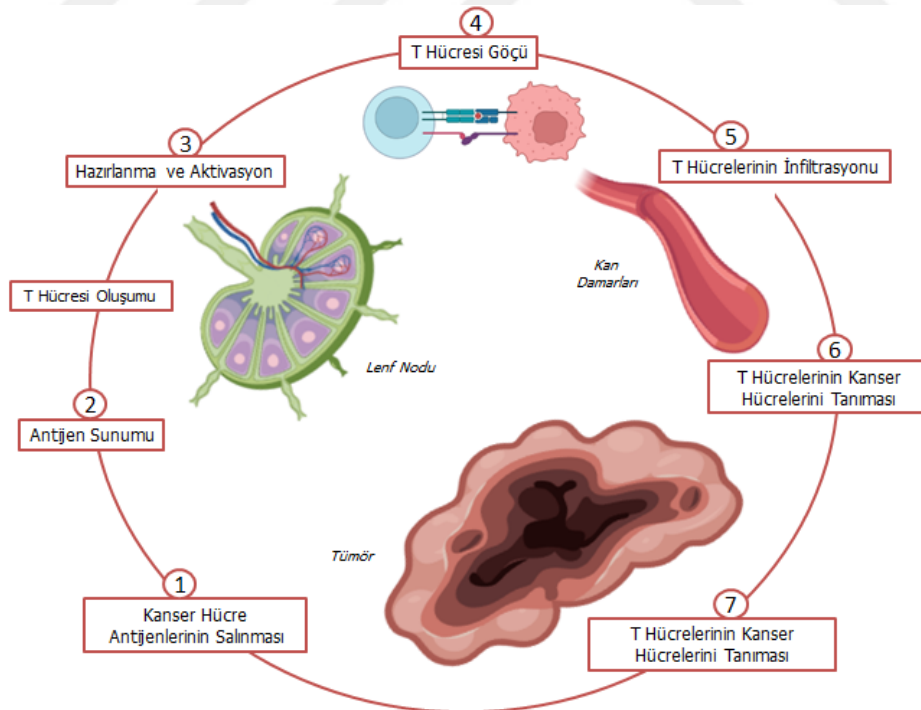


Şekil 2.1 Glioblastoma Tümör Mikroçevresi (Simon vd. 2020)

Yüksek intratumoral heterojeniye ek olarak, GBM mikroçevresindeki başlıca neoplastik olmayan hücre popülasyonu, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler) adı verilen doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri bulunmaktadır (Chen ve Hambardzumyan, 2018). Güncel araştırmalarda terapötik olarak TAM'leri hedefleme olasılıkları tartışılarak immün mikroçevrenin önemi vurgulanmaktadır.

2.4 Kanser-İmmünite İlişkisi

Onkojenik süreçlerde, tümöre karşı çeşitli bağışıklık tepkileri meydana gelmektedir. Kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu ve proto-onkogenler aracılığı ile onkojenik sinyal yollarının aktivasyonu, kanser progresyonu için kilit süreçlerdendir. İmmün aktivasyon için gerekli olan immünolojik tehlike sinyallerinin azlığı, immün-baskılayıcı faktörlerin artan konsantrasyonu ve immün-baskılayıcı hücrelerin tümör mikroçevresinde birikmesi, immün regülasyonun kanserin ilerlemesinde aktif bir rolü olduğunu göstermektedir (Yu vd. 2007).



Şekil 2.2 Kanser-İmmünite Döngüsü

Kansere karşı bağışıklığın oluşturulması, kendi kendine ilerleyebilen ve T hücresi yanıtlarının değerlendirildiği ve bağışıklık uyarıcı faktörlerin söz konusu olduğu döngüsel bir süreçtir. Bu döngü, kanser hücresinden antijenlerin salınmasıyla başlayan ve kanser hücrelerinin öldürülmesiyle biten yedi ana aşamaya ayrılır (Chen vd. 2013). Bu döngü, bağışıklık yanıtını baskılayan, bağışıklık düzenleyici geri bildirim mekanizmalarının da oluşabildiği negatif faktörlerle de gerçekleşebilir.

Kanser immünolojisindeki temel paradokslardan biri, spesifik immün sürveyans sistemlerinin tümörjenezin erken evrelerinde çalışmasının yanında, yerleşik tümörlerde immün toleransı indüklemesidir (Pardoll, 2003). Tolerans durumunda, kemokinler ve immün-baskılayıcı sitokinler, düzenleyici immün hücreler ve immün sistemin fonksiyonlarını kontrol eden “bağışıklık kontrol noktası” olarak adlandırılan birçok mekanizma açığa çıkmaktadır (Mehdizadeh vd. 2021).

Bağışıklık sistemi ve kanser arasındaki dengeye göre, bağışıklık sistemi kanser hücrelerini yabancı istilacılar olarak tanımlayabileceği gibi, tanıdık kabul ederek tolerans durumu da oluşturabilmektedir. Bağışıklık eylemlerinin bu ikili rolüne kanser bağışıklık düzenlemesi denir (Dunn vd. 2002). Bağışıklık hücrelerinin kanser sürecinde vereceği yanıt tümör mikroçevresinin kompozisyonuna oldukça bağlıdır. Kansere yol açan hücresel değişiklikler, tümör mikroçevresinde bulunan lokal sitokin ekspresyonu gibi çeşitli değişikliklere neden olmaktadır (Dranoff, 2004).

2.5 Bağışıklık sistemi hücreleri ve Glioblastoma

Bağışıklık sisteminin GBM'nin düzenlenmesindeki rolünün anlaşılabilmesi için, hücre fonksiyonlarının, tümör mikroçevresindeki hücre-hücre etkileşimleri ile sinyal yollarının ve hücresel bileşimin etkisinin incelenmesi önemlidir. GBM mikro ortamının bağışıklık profili, miyeloid hücreler, glioblastoma ile ilişkili makrofajlar ve mikrogliya, T-lenfositler, NK hücreleri, granülositler, dendritik hücreler vb. önemli ölçüde değişmiş hücreleri içermektedir (Ma vd. 2021).

2.5.1 Nötrofiller

Bağıışıklık sistemindeki en bol lökositlerden biri olan nötrofiller, anjiyogenez, immünsüpresyon ve kanser metastazını teşvik etme gibi birçok mekanizma ile kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır (Wu vd. 2020). Bir çalışmada, nötrofillerin insan gliomasında infiltre olduğunu bildirilmiştir. Nötrofiller ve beyin tümörleri üzerine yapılan çoğu çalışma, bu hücrelerin anti-anjiyojenik tedaviye ve vaskülarizasyona (yüksek dereceli gliomanın ayırt edici özelliği) yanıt üzerindeki etkisine odaklanmıştır (Lin vd. 2021). Klinik öncesi çalışmalar, nötrofillerin glioblastomanın ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermiştir.

2.5.2 T lenfositler

GBM hücreleri tarafından endojen inhibisyon, yukarı regüle edilmiş immünsüpresif kontrol noktaları, çok sayıda immünsüpresif hücrenin infiltrasyonu nedeniyle T hücrelerinin migrasyonunu bozarak etki etmesini engellemektedirler (Wang vd. 2021). CD8+T hücre aktivasyonunun desteklenmesi GBM'nin ilerlemesini azaltarak tedavi noktası gibi görünmektedir. CD4+T hücreleri, Th2, Th17 ve Treg vasıtasıyla kanser ilerlemesinde belirli işlevleri değiştirebilmektedir. Treg'ler immun-baskılayıcı sitokinler salgımlarken, Th2'ler, kanser hücrelerinin bağışıklıktan kaçma sürecine yardımcı olurlar (Burkholder vd. 2014).

2.5.3 B lenfositler

T hücrelerinin beyin ve periferik tümörlerin temizlenmesindeki rolü kapsamlı bir şekilde çalışılmış olmasına rağmen, B hücrelerinin antitümör bağışıklığına katılımı tam olarak anlaşılamamıştır (Candolfi vd. 2011). B hücresi infiltrasyonu, MMP-1 ve MMP-13 ekspresyonunu artırarak hücre dışı matriste fibriler kolajenin bozulmasını indükleyerek kanser hücrelerinin istilasını teşvik ettiği kanıtlanmıştır (Ou vd. 2015). Bunun yanında, tümör bağışıklığı göz önüne alındığında B hücrelerinin rolleri değişiklikler gösterebilir; tümörjenez destekleyici etkisinin olabileceği gibi, bazı durumlarda da antitümöral

aktiviteye de sahip olabilirler.

2.5.4 Mast hücreleri

Diğer bağışıklık sistemi hücreleri gibi mast hücreleri de çeşitli durumlarda kanser destekleyici ya da kanser baskılayıcı özellikler gösterebilmektedir. Tümör çevresinde bulunan TAMC'ler, proteazlar, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), kök hücre faktörü (SCF) gibi mitojenik faktörlerin salgılanması yoluyla normal stroma-epitel iletişimini bozabilir (Theoharides vd. 2004). Bununla beraber kanser hücrelerinin immun sistem gözetiminden kaçmasını destekleyecek Treg hücreleri ile iş birliği yaparak T ve NK hücrelerinin anti-tümöral fonksiyonlarını daha da baskılayabilir (Gorzalczany vd. 2019).

Yapılan araştırmalarda mast hücrelerinin, glioma derecesine bağlı çeşitli sinyallere yanıt olarak fare ve insan gliomalarına sızarak faaliyet gösterdiği bildirilmiştir. Glioblastoma dahil olmak üzere diğer glioma ve beyin tümörlerinde tespit edilmesine rağmen mast hücresi-glioma hücre etkileşiminin arkasındaki mekanizmalar tanımlanmayı beklemektedir (Polyzoidis vd. 2015).

2.5.5 Dendritik hücreler

Dendritik hücreler (DC'ler) yoluyla immünoterapi, son yıllarda anti-tümör bağışıklığını artırmak için potansiyel bir strateji olarak dikkat çekmektedir. Antijen işleyen ve sunan hücreler olarak bilinen DC'ler, anti-tümör bağışıklık tepkilerinin başlatılmasında kilit bir rol oynamaktadır. GBM'deki klinik öncesi çalışmalar, murin modellerinde DC aktivitesinin uyarılmasıyla uzun süreli tümör sağkalımını ve immünolojik hafızayı göstermiştir (Srivastava vd. 2019).

2.5.6 Doğal öldürücü hücreler

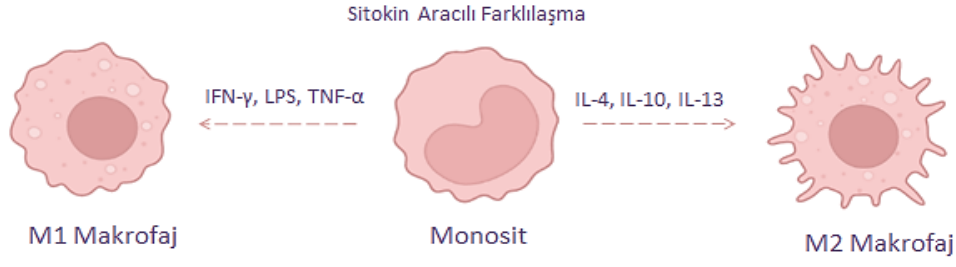
Doğal öldürücü (NK) hücreler, bir antitümör yanıtı oluşturma yeteneğine sahip efektör

lenfositlerdir (Terrén vd. 2022). Kanser hücreleri, NK hücrelerinden kaçmak amacıyla çeşitli stratejiler geliştirir. Buna karşın TME'de, NK hücre fonksiyonu sadece baskılayıcı sitokinler tarafından bozulmakla kalmaz, aynı zamanda hipoksi, beslenme eksikliği ve olumsuz asidik koşulları indükleyen laktat gibi uygunsuz metabolik koşullardan da etkilenebilmektedir (Wu vd. 2020). NK hücre bazlı tedavi, glioblastomaların tedavisinde umut verici bir immünoterapötik stratejidir, çünkü bu hücreler tedaviye dirençli glioblastoma kök benzeri hücreleri seçip parçalayabilmektedir. Ayrıca, glioblastoma dokularındaki peri-vasküler bölgelerde NK hücresi lokalizasyonu ve bunların tümörosferlerdeki bu hücrelere yakın temasları, glioblastoma tümörlerine sızma ve hedefleme yeteneklerini gösterir (Breznik vd. 2022).

2.5.7 Makrofaj hücreleri

Makrofajlar (M0), kemik iliğindeki monositlerden türetilen, bulunduğu mikroçevreye göre farklı fenotipler sergileyebilen immun sistem hücreleridir. Vücudun spesifik ve spesifik olmayan bağışıklığında rol oynarlar. Spesifik olmayan bağışıklıkta, M0'ın biyolojik fonksiyonları, ölü hücreleri, hücre kalıntıları uzaklaştırmayı ve tanınma için antijenleri sunmayı içerirken, spesifik immünitede sitokinler salgılayarak immünomodülatör fonksiyonlar gösterirler (Xing vd. 2021). Makrofajlar, beyin TME'sine sızan başlıca bağışıklık hücreleridir (Graeber vd. 2002).

Genellikle, klasik olarak aktifleşen makrofajlar (M1), proinflamatuvar özellik gösterirler. Proinflamatuvar sitokin üretiminin yanında, konak savunması ve tümör hücresi öldürme işlevleriyle bilinirler (Aras vd. 2017). M1 fenotif makrofajlar, tehlike sinyallerine karşı erken inflamasyon sırasında görev alarak popülasyonunu daha sonra doku onarımında ve yenilenmesinde kullanmak üzere M2 benzeri makrofajlara farklılaşabilirler (Wang vd. 2020).



Şekil 2.3 Makrofajların fenotip farklılaşması

Bununla beraber, alternatif olarak etkinleştirilen makrofajlar (M2), anti-inflamatuar özellik gösterirler (Orecchioni vd. 2019). Anti-inflamatuar yanıtlar, IL-10 ve TGF- β gibi moleküller salgılanarak sağlanır (Chen vd. 2019). M2 fenotipe indüklenmiş makrofajlar tümör mikroçevresinde bulunan tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler) ile ortak bir fenotipe sahip olduğu bildirilmektedir (Costa vd. 2021). Son araştırmalar, TAM'lerin tümör immünosüpresif mikroçevre oluşturmaya katkısı ve tümör ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yan vd. 2022).

Makrofajlar ve tümörler arasındaki karmaşık ilişkinin çözülme çabası birçok immünoterapötik yaklaşıma zemin hazırlamaktadır. Bununla birlikte, glioblastoma ilişkili makrofajlar, küçük hücre dışı veziküller yoluyla GSC'lerde bir pronöral-mezenkimal geçişi tetikleyerek progresyona katkı sağladığı gösterilmiştir (Ma vd. 2021).

2.6 Hücre Dışı Veziküller ve Eksozomlar

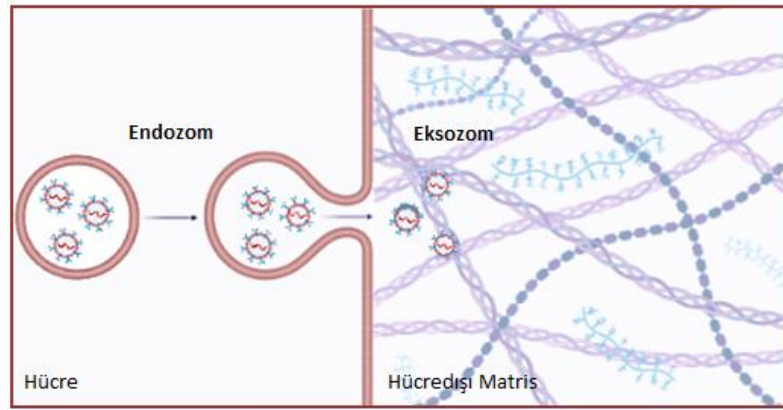
Hücre dışı veziküller, endozomal sistemden köken alan ya da plazma zarından dökülen eksozomları ve mikro vezikülleri içeren hücre kaynaklı membranöz yapıların heterojen bir grubudur (Van Niel vd. 2018). Biyolojik sıvılarda bulunan bu kesecikler, hücrelerin bir çeşit atıkları olarak adlandırıldıysa da günümüzde oldukça zengin biyomoleküler içeriklere sahip oldukları ve birçok fizyolojik, patolojik süreçlerde yer aldıkları gösterilmiştir.

Eksozomlar, yaklaşık 40–200 nm çapa sahip olan ve hücreler tarafından salınan küresel lipid çift katmanlı nano-veziküllerdir (Zhan vd. 2020). Eksozomlar, boyut, şekil,

yoğunluk ve protein bileşenlerine göre ayırt edilebilirler (Brinton vd. 2015). Eksozomlar hem normal hem de kanser hücreleri tarafından üretilir ve çoğu vücut sıvısında bulunur (Zhang vd. 2018).

2.6.1 Eksozomların kökeni ve karakteristik özellikleri

Eksozom biyogenezi, endozomal sistem içinde başlar (Hessvik vd. 2018). Plazma zarının istilasıyla başlayan eksozom biyogenezinde önce endositik veziküller üretilir. Çoklu endositik veziküllerin füzyonu, erken endozomların oluşumuna yol açar. Golgi kompleksinin yardımıyla, multivesiküler cisimler (MVB'ler) olarak bilinen geç endozomlara evrilir ve olgunlaşırlar. İçte doğru zar tomurcuklanması, MVB'lerde bulunan intralüminal veziküllerin oluşumuyla sonuçlanır. MVB'ler plazma zarıyla birleşerek intralüminal vezikülleri endozomal sıralama kompleksiyle hücre dışı boşluğa salabilir ya da lizozomlar veya otofagozomlarla birleşerek degradasyona yol açabilirler. Taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi, MVB oluşumu ve MVB'lerde protein sıralamasının altında yatan en iyi açıklanan mekanizmadır (Xing vd. 2020).



Şekil 2.4 Eksozom oluşumu

Eksozomlar, diğer hücre dışı veziküller gibi küreseldir ve daha düşük kaldırma yoğunluğuna sahiptir (Van vd. 2003). Eksozomlar, çift katmanlı zarları ve nano ölçekli boyutları nedeniyle üstün dolaşım kararlılığı, fizikokimyasal kararlılık ve kan-beyin bariyeri (BBB) nüfuz etme yeteneğine sahiptir (Lin vd. 2020).

İçerdiği biyomoleküller, köken aldıkları hücre türüne ve hücrelerin mevcut durumlarına (farklılaşmış, uyarılmış, stresli) göre değişkenlik gösterebilir. EXOCARTA veri tabanına göre, farklı hücre tiplerinin eksozomlarından 41.860 protein, 2838 miRNA, 3408 mRNA ve 1116 lipid tanımlanmıştır (Zhang vd. 2020). Eksozomlar tarafından taşınan biyomoleküller arasında, tetraspaninler (CD63, CD9 ve CD81), endozomla ilişkili proteinler (Alix ve Tsg101) ve antijenik peptit bağlayıcı proteinler yaygın olarak bulunan eksozomal proteinlerdir (Gurung vd. 2021). Bunun yanısıra taşıdığı genetik materyaller ve lipid türevleri, eksozom formasyonunda, sekresyonunda, yapı korunmasında önem teşkil eder.

2.6.2 İmmün hücre eksozomları

Bağışıklık hücreleri diğer hücreler gibi eksozom salgılayabilir veya alabilir. Bağışıklık hücresi kaynaklı eksozomların biyogenezi, salgılanması ve alımı, hücre içi proteinler ve hücre dışı uyaranlar tarafından düzenlenir (Yan ve Jiang, 2020). Bağışıklık sistemi hücrelerinden türetilen eksozomlar, çeşitli genlerin transkripsiyonunu arttırmak ve azaltmak ve sitokin üretimini düzenlemek gibi farklı tepkileri indükler (Hazrati vd. 2022). Bağışıklık hücrelerinden türetilen eksozomlar, doğal ve adaptif bağışıklık arasındaki karışmaya aracılık edebilir ve kanserin ilerlemesini ve metastazını düzenleyebilir (Yan ve Jiang, 2020). Bu eksozomların tümör hücrelerine karşı ikili rolleriyle; baskılayıcı veya aktif bağışıklık tepkilerini indükleyebilir.

Plastisitenin gösterilebildiği bir ortamda dentritik hücreler aktive edildiğinde IL-10 üretirler. Bu hücrelerden üretilen eksozomlar otoimmün yanıtları ve hem doğal hem de adaptif bağışıklık hücrelerinin aktivitesini baskılar (Kim vd. 2006). Bununla birlikte, tümör mikroçevresinde bulunan miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücrelerden türetilen eksozomların, tümör ortamındaki makrofajlar ve T hücreleri gibi bağışıklık sistemi hücrelerini baskılayabildiğini göstermektedir (Hazrati vd. 2022).

Yüzeylerinde, antijen sunumu, immün aktivasyon ve kanserli hücrelerin öldürülmesine fırsat veren çeşitli antijenleri ifade edebilen immün hücre eksozomlarının, immüno modülatör özellikleri bulunmaktadır. Ek olarak, immün hücreden köken alan eksozomlar,

iyi biyouyumlulukları, düşük immünojenisitetleri ve yüksek yükleme kapasiteleri nedeniyle etkili antitümör tedavisinde bir ilaç verme platformu olarak büyük ilgi görmektedir (Zhao vd. 2022).

2.6.3 Eksozomların kullanım alanları

Hastalık progresyonu ve diyagnostik açıdan önemli bilgiler sunan eksozomlar, geniş spektrumda araştırma alanına sahiptir. Bu bağlamda, endotel hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar ve keratinositler gibi hücrelerden köken alan eksozomlar, yara iyileşme sürecinde önemli hücresel fonksiyonların geri kazanılmasını destekler. Böylece immunolojik süreçlerde meydana gelebilecek inflamatuvar yanıtların kontrol edilmesine olanak sağlayabilir. Buna yönelik yapılan bir çalışmada kullanılan eksozomlar, iltihabı önleyerek ve kolajen birikimini teşvik ederek diyabetik yara iyileşmesini desteklemiştir (Li vd. 2022).

Eksozomlar, küçük ya da makromoleküller ile terapötik kargo görevi görerek, ilaç dağıtım araçları olarak kullanılmaktadır (Kandimalla vd. 2022). Normal dokularda düşük toksisite, yüksek biyo-yararlanma ve ilaç direncini aşarak anti-kanser ilaçların seçici olarak yüklenebilmesi gibi avantajlarından dolayı ilaç taşınımında tercih edilmektedir. İlaç dağıtım platformları ve terapötik hedeflerinin yanında, aşı geliştirmede aracı olarak kullanılabilirler.

Eksozomların kanser araştırmalarında kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar artan bir hızda devam etmektedir. Kanserden türetilen eksozomlar, tümör mikroçevresinde bulunan protein, nükleik asit gibi biyomolekülleriyle hücreler arası etkileşimleri artırarak kanserin ilerlemesine katkıda bulunurlar. Bunun aksine, tümör ölümü hedeflenerek, immun sistem hücrelerinden köken alan eksozomların kullanımı da kanser progresyonu inhibisyonundan sorumlu tutulabilir. Yapılan bir çalışmaya göre, efektör T hücrelerinden türetilen eksozomlar, orijinal hücrelerinin sitotoksik aktivitesine sahip olduğundan tümör hücresi lizisine neden olduğu tespit edilmiştir (Gao vd. 2018).

Eksozomların çoğunlukla mesajlarını ilettikten sonra tüketildiği bildirilmiştir (Ebnoether ve Muller, 2020). İletişim sistemini çalışır durumda tutmak ve özellikle bağışıklık sistemi üzerinde sürekli bir etkiye sahip olmak için, tümör hücreleri sürekli olarak tümör kaynaklı eksozomlar üretir (Benecke vd. 2021).

Eksozomlar hastalık sürecinin bir parçası olduğundan, parental hücre metabolitlerini temsil etme yetenekleri ve patolojik süreçlerdeki kritik rolleri sayesinde, farklı kanser türleri ve diğer hastalıklar için umut verici biyobelirteçler olarak kabul edilir (Boriachek vd. 2018). Biyolojik sıvılardaki stabilitesi sayesinde sıvı biyopsi yöntemi kullanılarak moleküler profillemesi gerçekleştirilebilir (Eylem vd. 2020). Minimal invaziv teşhis veya invaziv olmayan teşhis sayesinde geleneksel doku, iğne biyopsilerine alternatif olarak kabul edilir (Vlassov vd. 2012). Eksozomlar, sıvı biyopsi yöntemiyle erken evre kanser teşhisi ve beraberinde hücre spesifik immunoterapiyi destekleyerek, kanser terapileri önünde yeni bir kapı açmaktadır.

3. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser hücreleri ve bağışıklık sistem hücrelerinin birbirlerini etkileme biçimlerini, birbirleri üzerinde gösterdikleri değişiklik rolleri anlayabilmek için çeşitli kültür modelleri geliştirilmektedir. Gelişen teknoloji ve tecrübeyle beraber, hücre eksozomlarının da katkısı, bu modelleri daha kompleks bir alana ve bir adım daha öteye taşımaktadır. Eksozom iş birliği ile immunité ve kanser ilişkisini detaylı inceleyen referans model çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Yang vd. (2020) çalışmalarında, glioma üzerinde eksozomal mikroRNA-21'in rolüne odaklanmıştır. Bu amaçla, M2 kemik iliği kaynaklı makrofajlardan kaynaklı eksozomlar kullanılmıştır. Yapılan deney sonuçlarında, glioma hücrelerinde miR-21'in tüketilmesi ve PEG3'ün eski haline getirilmesi, glioma hücrelerinin hızlandırılmış apoptozunun yanında büyümeyi ve istilayı baskılamıştır. Ayrıca CD8+T proliferasyonunu, hücre sitotoksik aktivitesini ve IFN- γ seviyesini artırarak U87 hücre aktivitesini azaltmıştır.

Son yıllarda kanser araştırmalarında oldukça vurgulanan eksozomlar, tümör mikroçevresinde sahip olduğu fonksiyonel özellikleriyle, hücreler arası iletişim habercileri olarak bilinmektedir (Zhao vd. 2022). Ayrıca merkezi sinir sisteminde ve bağışıklık sisteminde, maligniteler arasında dinamik bir iletişime aracılık edebilir. Bu bağlamda, Gabrusiewicz vd. (2018) tarafından, glioblastoma kaynaklı kök hücre (GSC'ler) eksozomlarının immün baskılamayı indüklemesi hakkında bir çalışma yayımlanmıştır. GSC'den türetilen eksozomlar, monosit sitoplazmasını geçerek aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine neden olur ve monositleri, programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1) ekspresyonu dahil olmak üzere immün baskılayıcı M2 fenotipine doğru saptırır. Yapılan kütle spektrometresi analizi, GSC'den türetilen eksozomların, bu immün baskılayıcı anahtara işlevsel olarak aracılık eden, sinyal transdüserinin üyeleri ve transkripsiyon 3 (STAT3) yolunun aktivatörü gibi çeşitli bileşenler içerdiği gösterilmiştir. Western blot analizi, GSC eksozom ile tedavi edilmiş monositlerde PD-L1 ekspresyonunun baskın olarak STAT3'ün artan fosforilasyonu ile korele olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu veriler, GBM tarafından salınan faktörler ile ilişkili olarak, GSC'den türetilen eksozomların immünosupresif mikro ortamın güçlü modölatörleri olduğu

gösterilmiştir.

İmmün bileşen eksozomlarının, kanser üzerine etkilerinin araştırılması giderek ilgi duyulan bir konu haline gelmektedir. Terapötik hedef noktaları belirlenerek ilaç direncinin aşılması için çok sayıda çalışmalar yapılmaktadır. Chuang vd. (2019), yaptıkları bir çalışmada klinik GBM örneklerini analiz etmiş ve GBM ile ilişkili makrofajların, oncomiR-21 ile zenginleştirilmiş eksozomları salgıladığını tespit etmişlerdir. GBM ile ilişkili makrofajlardan türetilmiş eksozomların ve GBM hücre dizilerinin eş-kültürü, PDCD4 ve SRY'yi aktive ederek, glioblastoma hücrelerinin temozolomide (TMZ) karşı direncini arttırmıştır. Pakritinib tedavisi uygulandığında ise, GBM tümörigenezi baskılanmıştır; daha da önemlisi, M2 sitokinlerini salgılamada belirgin bir şekilde azalma ve GBM ile ilişkili makrofajların tarafından salgılanan miR-21 ile zenginleştirilmiş eksozomlarda azalma meydana gelmiştir. Sonrasında pakritinib ile TMZ kombinasyonu tedavisinin, hücrelerde ilaç direncini ve M2 polarizasyonunu yendiği görülmüştür. Özetle, klinik ortamlarda TMZ'ye dirençli glioblastoma tedavisi için pakritinib'in benimsenmesinde daha ileri araştırmalar garanti edilmiştir.

Eksozom aracılı kanser araştırmalarına bir diğer atıf, Xu vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmadır. Bu çalışmanın çıkış noktası, glioma türevli eksozomların immünosüpresif mikroçevre oluşumunu teşvik ettiği mekanizmaların belirsiz olmasıdır. Burada, glioma türevli eksozomların otofaji, TAM'lerin polarizasyonu ve glioma ilerlemesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hipoksik glioma türevli eksozomların, normoksik glioma türevli eksozomlara kıyasla, in vitro ve in vivo olarak glioma proliferasyonunu ve göçünü destekleyen otofajiyi ve M2 benzeri makrofaj polarizasyonunu belirgin şekilde kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Western blot ve qRT-PCR analizleri, IL-6 ve miR-155-3p'nin hipoksik glioma türevli eksozomlarda yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir. Sonuçlara göre, hipoksi ve gliomanın otofajiyi ve M2 benzeri makrofaj polarizasyonunu eksozomlar yoluyla etkilediği ve immün baskılayıcı mikroçevreyi destekleyici bir mekanizmayı açıklığa kavuşturmuştur.

İmmün hücre eksozomlarının inflamatuvar tepkilerinin kanser üzerinde araştırıldığı, gelecek çalışmalara ilham olabilecek, yenilikçi nanoplatformlar, eksozomlar ile

sağlanabilmektedir. Wang vd. (2021) tarafından yapılan nötrofil eksozomları ve glioma tedavisi çalışması, yenilikçi bir ilaç dağıtım sistemini de vurgulamıştır. BBB-geçiş kabiliyeti ile teşvik edilen, glioma tedavisi için yüklü doksorubisin (DOX) ilacını vermek için kurulmuş bu nötrofil eksozomları sisteminin hem in vitro transwell sisteminde hem de in vivo üzerinde kemotaktik bir fonksiyon sağladığı ve tümör büyümesini baskıladığı doğrulanmıştır.

Yapılan bu çalışmalarla beraber, tümör-stroma etkileşimlerini anlamak için in vivo taklidinde bir standarda yaklaşmak gerekmektedir. Literatür verilerine bakılarak, stromal bileşenlerin varlığı ile hücre davranışlarının ciddi şekilde etkilendiği anlaşılmıştır. Özellikle eksozom deneyleriyle, birebir etkilenen kanser hücreleri, morfolojik ve gen ekspresyon bakımından ciddi farklar göstermektedir. Bu tez çalışmasının sonunda, eksozom ve kanser platformundaki moleküler değerlendirmelere ek olarak, ilaç etkilerini de incelemek amaçlanmıştır.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

Hücre kültürü çalışmaları süresince kullanılan steril kültür kapları (Wuxi NEST Biotechnology, Çin), besiyeri DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose), L-glutamin, penisilin/streptomisin (P/S), fetal sıgır serumu (FBS) kullanılmıştır. Bununla birlikte, hücre pasajlanması için DPBS (Biological Industries) ve tripsin/EDTA çözeltisi (Sartorius) kullanılmıştır. Hücre deneyleri, laminar akım ile sirkülasyon sağlayan steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür ortamı için %5 CO₂, %95 nem ve 37°C sıcaklık ortamındaki bir inkübatör (Panasonic, Japonya) kullanılmıştır.

Makrofaj polarizasyonu için LPS (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyogüvenlik Anabilim Dalı, Türkiye), IFN- γ (Sigma), IL-10 (Peprtech Inc, ABD) kullanılmıştır. Eş-kültür deneylerinde kullanılan transwell sistemleri Thermo Fischer firmasından temin edilmiştir. Eksozom izolasyonunda sırasıyla süzme için 45 μ m'lik filtreler (Jet Biofil, Çin), kademeli santrifüj (Hettich, Almanya) cihazı ve ultrasantrifüj cihazı (HITACHI Himac CP100WX, Tayvan) kullanılmıştır. Toplanan eksozomların protein miktarı için BCA protein kit (Thermo Fischer, ABD) kullanılmıştır. Eksozomların varlığını görselleştirmek amacıyla TEM görüntülemesi (Jeol jem, Japonya) yapılmıştır. Görüntüleme öncesi eksozom örneklerini hazırlamak için grid (Agar Scientific, İngiltere) temin edilmiştir. Bunun yanında, glutaraldehit (Sigma, ABD) ve kontrast yaratması amacıyla uranil asetat boyası (Sigma, ABD) kullanılmıştır.

Hücre proliferasyonu, XTT [2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid] hücre proliferasyon kiti (Biological Industries, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Absorbans değerlerini okumak için UV-spektrofotometre (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher) cihazı kullanılmıştır. Hücre canlılığının nitel analizi için kalsein-AM (Molecular Probes, Thermo Fisher, UK) boyası, ölü hücreleri gösteren etidyum homodimer-1 (Molecular Probes, Thermo Fisher) ve hücre çekirdek boyası DAPI boyaları kullanılmıştır. Hücre ölümünü detaylı incelemek amacıyla apoptoz-nekroz kiti (ab176749, abcam) kullanılmıştır. Hücreler Leica DMIL (Almanya)

floresan mikroskopuyla görüntülenmiştir.

İmmünofloresan boyama prosesi için paraformaldehit (PFA, Sigma), Triton X-100 (Sigma) ve sığır serum albümin (BSA, Sigma) kullanılmıştır. Birincil antikor olarak GFAP (Glial Fibriler Asidik Protein) ve Vimentin (Santa Cruz, ABD), ikincil antikor olarak Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, ABD) kullanılmıştır.

Gen ekspresyon çalışmasında ise RNA izolasyonu için RNA izolasyon kiti (GeneAll® Hybrid-R™, Kore) ve tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için iScript™ cDNA sentez kiti (Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) için kullanılan primerler Oligomer Biyoteknoloji (Türkiye) firmasından temin edilmiş olup, reaksiyon termal döngüleyici (Bio-Rad CFX96 cihazı, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon analizinde kullanılan primerler, metastaz ile ilgili MMP-2 ve MMP-9, EMT-ilişkili olarak E-CAD, N-CAD, GFAP, VIMENTIN, SNAIL, apoptoz ile ilgili olarak CASP-3 ve P53 kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 *In vitro* hücre kültürü çalışmaları

Bu bölümde, Raw264.7 (makrofaj hücre hattı) hücrelerinin polarizasyon aşamasında ve U87MG (glioblastoma hücre hattı) hücrelerinin kültür sürecinde izlenen prosedür hakkında bilgi verilmiştir. Raw264.7 ve U87MG hücrelerinin eş-kültür süreci, canlılık ve çoğalma testleri, immünofloresan boyaması, gen ekspresyon çalışmaları protokolleri sunulmuştur. Benzer şekilde çalışmanın ileri aşamaları MMP2 primer sequence eş-kültür sistemleri yerine konvansiyonel mikro-plakalarda eksozom uygulanması şeklinde devam etmektedir. Buna ek olarak, eksozom indüklü *in vitro* yara iyileşme testleri ve ilaç çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.2.1.1 Hücre kültürü

U87MG ve Raw264.7 hücreleri %1 L-glutamin, %1 P/S ve %10 FBS içeren DMEM-HG içerisinde 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Hücreler bağıl bolluğa gelinceye kadar belli zamanlarda (2-3 gün arayla) taze besiyeri değişimi yapılarak kültüre devam edilmiştir. Yaklaşık %80 bağıl bolluğa ulaşan glioblastoma hücreleri kaldırılıp deneyde kullanılmış ve pasajlanmıştır. Hücre kaldırma işleminde öncelikle tripsini inaktive edecek serumu uzaklaştırmak amacıyla 5-10 mL DPBS yıkaması yapılmıştır. Ardından %0,25 olacak şekilde tripsin/EDTA çözeltisi eklenerek 37°C’de 4 dakika inkübe edilmiştir. Hücrelerin kalkmasıyla beraber üzerlerine 4 mL serumlu besiyeri eklenmiş ve tripsin aktivasyonu durdurulmuştur. Süspanse olan hücreler besiyeriyle beirlikte toplanarak 1200 devir/dakika ve 4 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pelet 1 mL besiyerinde çözdürülmüştür. Bu adımdan sonra hemositometre aracılığıyla hücre sayımı yapılmıştır. İstenen yoğunlukta hücre sayısı için gerekli hesaplamalar yapılarak kuyucuklara ekim gerçekleştirilmiştir. Ekim yapıldıktan sonra besiyeri ilavesiyle inkübasyona bırakılmıştır. Glioblastoma hücrelerine benzer şekilde, düzenli olarak atık vasatı toplanan ve bağıl bolluğa ulaşan makrofaj hücreleri, deneylerde kullanılmak üzere çoğaltılmış ve pasajlanmıştır. Makrofaj hücrelerinin atık vasatı eksozom izolasyonu için toplandıktan sonra, yaklaşık 5 mL kendi besiyeri eklenerek, bir kazıyıcı aracılığıyla hücreler kaldırılmıştır. Benzer şekilde toplanıp, santrifüj aşaması gerçekleştirilmiş ve sayım yapılarak istenen oranda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.

4.2.1.2 Makrofaj polarizasyonu

Makrofaj hücreleri çoğaltılıp M1 ve M2 olmak üzere iki ayrı fenotipe indüklenmiştir. Bu indükleme esnasında, literatür bilgilerinden yararlanılarak spesifik sitokinler kullanılmıştır. M1 indüksiyonu için hücre ekiminden 1 gün sonra bulunduğu kültür kabına uygun hacimde polarizasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltide, LPS için 200 ng/mL ve IFN- γ için 50 ng/mL oranları kullanılmış olup, hücre besiyerinde hazırlanmıştır. Ardından indüksiyon gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, M2 polarizasyonu için, hücre besiyerinde IL-10 çözeltisi (20 ng/mL) hazırlanmış ve hücrelere

uygulanmıştır. Bununla birlikte, polarizasyon sayısı birden fazla olabileceğinden iki gün arayla iki kere sitokin uygulaması yapılarak etkileri incelenmiştir. Polarize olan makrofaj hücreleri, 4.2.1.1'deki yöntem ile aynı şekilde kültür edilmiş, atık vasatı toplanmış ve ilgili deneylerde kullanılmıştır.

4.2.2 Makrofaj hücre proliferasyonu'nun XTT testi ile incelenmesi

M0, M1 ve M2 fenotipteki makrofaj hücrelerinin çoğalma kapasitelerinin zamana göre (2. gün ve 5. gün) değişimi XTT testi ile gözlemlenmiştir. 3 tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plaka içerisine 10 bin hücre/kuyucuk olacak şekilde makrofaj hücreleri ekilmiştir. Örnekler 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman noktalarında kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve sonra örneklerle 100 µl taze besiyeri ilave edilmiştir. Reaksiyon çözeltisi, 5 mL XTT reaktifine 0,1 mL aktivasyon çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır. Her kuyucuğa kuyucuk hacminin yarısı kadar (50 µL) hazırlanan reaksiyon karışımından eklenerek 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası spektrofotometre cihazı ile 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alınmıştır.

4.2.3 Makrofaj ve glioblastoma hücrelerinin eş-kültürasyonu

Glioblastoma hücreleri (300.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde) 24-kuyucuklu bir plakaya ekilmiştir. M0 (polarize edilmemiş), M1 ve M2 (polarize edilmiş) makrofaj hücreleri (150.000 hücre/insört) ise ayrı bir 24-kuyucuklu plakaya yerleştirilen insörtlerin içerisine ekilmiştir. Hücreler yapıştıktan 1 gün sonra insörtler alınarak glioblastoma hücrelerinin ekili olduğu plakada ilgili kuyucuklara yerleştirilmiştir. Eş-kültür, birleştirme gerçekleştikten sonra başlatılmış ve hücrelerin yapışma durumları kontrol edilerek 3 gün süreyle kültür gerçekleştirilmiştir. Eş-kültürün yönünün hücre davranışına etkisini değerlendirmek amacıyla aynı proseste hücrelerin eş-kültür düzeneğindeki yerleri değiştirilerek ayrı bir deney daha kurulmuştur.

Bu deneyde ise insört içerisine glioblastoma hücreleri ve kuyucuk içerisine makrofaj

hücreleri ekilmiştir. Daha sonra birbirlerini etkileme davranışlarını değerlendirmek için çeşitli moleküler yöntemler kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.1 Canlı/ölü testi: Eş-kültürasyonun canlılığa etkisi

Glioblastoma-makrofaj hücrelerinin eş-kültürünün glioblastoma canlılığına etkilerinin incelenmesi amacıyla 2. gün için canlı/ölü testi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücreler 2 tekrarlı olacak şekilde 24-kuyucuklu plaka içerisine (30.000 hücre/kuyucuk) ekilmiş ve bilinen inkübatör şartlarında inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman noktasında örneklerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır ve DPBS ile yıkama yapılmıştır. Canlı hücreleri boyamak için 4 µM Kalsein-AM ve ölü hücreleri boyamak için 10 µM Ethd-1 reaktifleri DPBS içerisinde hazırlanarak örneklerin olduğu kuyucuklara eklenmiş ve 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından floresan mikroskop aracılığıyla canlı hücreler 488 nm dalga boyunda ve ölü hücreler 527 nm dalga boyunda gözlemlenmiştir.

4.2.3.2 Eş-kültürasyonun glioblastoma hücrelerinin metastatik davranışına etkisinin immüno Floresan boyama ile incelenmesi

Eş-kültürü gerçekleştirilen glioblastoma hücreleri üzerinde M0, M1, M2 makrofaj hücrelerinin metastatik etkilerini görsel olarak inceleyebilmek amacıyla antijen-antikor aracılı immüno Floresan boyama yöntemi kullanılarak Floresan mikroskop ile inceleme yapılmıştır. Bölüm 4.2.3.'te tarif edildiği üzere, ayrı kültür plakalarına ekilen glioblastoma ve üç farklı fenotipteki makrofaj (M0, M1, M2) hücreleri 24-kuyucuklu bir plaka içerisinde birleştirilerek eş-kültürü başlatılmıştır. Ardından standart inkübatör şartlarında 4 gün süresince inkübe edilmiştir. Kültür süreci sonlandırıldıktan sonra, insörtlükler uzaklaştırılarak örnekler immüno Floresan boyaması için hazırlanmıştır.

Bu amaçla, ilk olarak örnekler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak DPBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından %4 PFA ilave edilerek 15 dakika inkübasyona bırakılarak hücre sabitlemesi sağlanmıştır. Sabitleme işleminden sonra DPBS yıkaması yapılarak PFA ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin akabinde %0,1 Triton X-100 ilave edilmiş ve bir süre inkübe edilmiştir. Antikor ilavesinden önce %0,1 BSA çözeltisi eklenerek, oda

sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Son aşamada birincil antikorlar (GFAP ve Vimentin) hacimce 1:200 olacak şekilde DPBS içerisinde hazırlanarak ilgili kuyucuklara eklenmiştir. Örnekler 4°C'de bir gün inkübe edilmiş ve ardından birincil antikorlar ortamdan uzaklaştırılarak ikincil antikorlar (anti-fare Alexa Fluor 488) hacimce 1:1000 oranında belli bir seyreltmeyle kuyucuklara ilave edilmiştir. 45 dakika odası sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilen örnekler, DAPI boyası eklendikten sonra floresan mikroskop altında incelenmiştir.

4.2.3.3 RT-qPCR: Makrofajlarla eş-kültürasyonun glioblastoma onkogenik gen ekspresyonlarına etkisinin incelenmesi

Makrofaj hücrelerinin glioblastoma hücreleri ile eş-kültürünün glioblastoma kanser hücrelerinde metastaz, EMT gibi süreçlerde yaratacağı fonksiyonel değişiklikleri saptamak amacıyla RT-qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, 24-kuyucuklu plakada yöntem 4.2.3'te verildiği şekilde iki tekrarlı olarak 4 gün süreyle eş-kültür gerçekleştirilmiştir.

Ardından, örneklerden kit protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işleminde önce örnekler, RiboEx reaktifi ile muamele edilerek homojenize edilmiştir ve ependorflara toplanarak 12,000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak RiboEx miktarının 1/5 'i kadar kloroform ilave edilmiş ve pipetlenerek homojen hale getirilmiştir. Bu işlemten sonra tekrar 12,000xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Ortaya çıkan şeffaf süpernatant yeni ependorflara aktarılarak, aktarılan miktar ile aynı olacak şekilde RBI reaktifi eklenmiştir. Bu adımdan sonra, kit içerisinde bulunan mini spin kolonlara aktarılan örnekler 10,000xg'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Daha sonra sırasıyla SWI ve RNW tamponu ile yıkama yapılmıştır.

Son aşamada, nükleaz içermeyen su ilavesi ile RNA'ların kolonda bulunan membranlardan süzülerek toplanması sağlanmıştır. Toplanan RNA örneklerinin konsantrasyonları, NanoDrop aracılığıyla spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonlarından yola çıkılarak cDNA sentezi için

kullanılacak miktarlar hesaplanmıştır. Sentezin gerçekleşmesi için kit içerisinde mevcut olan reaksiyonu gerçekleştirecek çözeltiden (5x iScript Reaction Mix) eklenmiştir ve kit protokülü izlenerek, termal döngüleyici cihazında cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezinin ardından RT-qPCR tekniği kullanılarak, metastaz belirteçleri MMP2 ve MMP9, EMT belirteçleri E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, Snail ve apoptoz belirteçleri caspase-3 ve p53 genlerindeki değişiklikler analiz edilmiştir.

4.2.4 Eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu

Eksozomların izolasyonu için %70-95 arası bağıl bolluğa gelen makrofaj hücrelerinden atık vasatlar toplanmıştır. Yeterli atık vasat miktarına ulaşıncaya, oda sıcaklığında çözülerek 0.22 mikrometrelik filtreler ile süzölmüştür. Ardından kademeli santrifüj için falkonlara aktarılmış ve 2000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant yeni bir falkona aktarılarak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant tekrardan yeni falkonlara aktararak ultrasantrifüj edilinceye kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Ultrasantrifüj işlemi için örnekler, santrifüj tüplerine eşit ağırlıklarda paylaştırılmış ve ardından cihaza yerleştirilmiştir. 120.000g'de santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Eksozom peleti 50 µL PBS ile çözödürölmüş ve steril bir ependorfa alınmıştır. İzole edilen eksozom örnekleri -20°C'de muhafa edilmiştir.

BCA Testi

Eksozom çözöltisi içerisindeki total protein miktarını belirlemek için, BCA testi yapılmıştır. Protein konsantrasyonu için seri seyreltme ile BSA kullanılarak, protokole uygun standart çözöltüler hazırlanmıştır. Bununla birlikte kit içerisinde bulunan A reaktifi ve B reaktifinden 50:1 oranında bir çalışma solösyonu hazırlanmıştır. 96-kuyucuklu bir plakaya örnekler ve standart çözöltüler eklenmiş ve sonrasında çalışma solösyonu ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika kadar inkübasyonu sağlanmış ve 562 nm'de spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Numune konsantrasyonundan kör çıkarılarak absorbans değöerleri elde edilmiştir. Standartlara karşılık gelen absorbans grafiğı çizilmiş ve regresyon denklemi oluşturulmuştur. Örnek absorbans değöerleri, denklemden bulunarak protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

TEM Görüntülemesi

Eksozom örnekleri görüntülemeye hazırlanması için hacimce 1:3 oranında seyreltilmiştir. Örnekler grid üzerine 10 µL hacimde eklenmiş olup, ardından sabitlemek için %5 glutaraldehit ve hücre membranını boyayarak kontrast yaratması için %1 uranil asetat çözeltisi ilave edilmiştir. Yıkama işleminden sonra grid kurumaya bırakılmıştır. Geçirimli elektron mikroskobu ile görüntüleme yapılmış ve eksozomların varlığı doğrulanmıştır.

4.2.5 Glioblastoma hücrelerine M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomların uygulanması

M0, M1 ve M2 makrofaj hücrelerinden toplanan atık vasatlar ile bölüm 4.2.1'de belirtildiği şekilde eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından BCA testi yapılarak eksozomların protein miktarları belirlenmiştir. Eksozom konsantrasyonunu, kanser hücrelerinin metastatik, apoptotik davranışlarına etkisini değerlendirmek amacıyla 10 µg/mL ve 100 µg/mL olacak şekilde iki farklı konsantrasyon belirlenmiştir.

Bu amaçla, 24-kuyucuklu bir plakaya 200.000 hücre/kuyucuk olarak glioblastoma hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin yapışmasını takiben 1 gün sonra besiyerleri içerisinde hazırlanan ve yukarıda konsantrasyonları belirtilen eksozom çözeltileri hazırlanmıştır. Kuyucuklarda varolan besiyeri uzaklaştırılarak eksozom içerikli taze besiyeri ilave edilmiştir. Ardından %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıkta kültür işlemleri 3 ve 5. gün deneyleri için sürdürülmüştür.

4.2.5.1 XTT testi: Makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücre proliferasyonuna etkisi

Bölüm 4.2.5'te verildiği üzere glioblastoma hücrelerine, M0, M1 ve M2 makrofaj eksozomları uygulanmıştır. İki ayrı zaman noktasında proliferasyonu incelemek amacıyla iki ayrı 96-kuyucuklu plakaya 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde U87MG hücreleri ekilmiş ve 1 gün sonra 100 µg/mL konsantrasyona sahip olacak şekilde makrofaj eksozomlarından hesaplanan miktarda uygulanmıştır. Bu amaçla, eksozom içerikli besiyeri, hücrelerin olduğu kuyucuklara eklenmiş ve standart inkübatör şartlarında

belirlenen iki farklı zaman noktası (2.gün ve 5.gün) için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sona erdiğinde XTT kit protokolü uygulanarak spektrofotometrede ölçümler alınmıştır.

4.2.5.2 Apoptoz/Nekroz testi

M0, M1, M2 makrofaj türevli eksozomların glioblastoma hücrelerinde apoptotik/nekrotik etkilerini değerlendirmek amacıyla apoptoz/nekroz testi gerçekleştirilmiştir. 48-kuyucuklu plaka içerisine U87MG hücreleri (30.000 hücre/kuyucuk) ekildikten 1 gün sonra eksozom uygulamaları daha önce belirtildiği gibi yapılmış ve 4 gün süreyle kültürasyon devam ettirilmiştir. Apoptotik ve nekrotik hücreleri görüntülemek için kuyucuk başına tampon içerisinde hacimce 1:100 ve 1:200 olacak şekilde Apoxin yeşil indikatörü ve 7-AAD (7-aminoaktinomisin-D) ilave edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonra hücreler floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

4.2.5.3 İmmünofloresan boyama: Makrofaj eksozomlarının glioblastoma üzerinde metastatik etkilerinin incelenmesi

M0, M1, M2 makrofaj türevli eksozomların glioblastoma hücreleri üzerinde metastatik etkilerin ileri düzeyde incelenebilmesi için immünofloresan boyama çalışması yapılmıştır. Bu doğrultuda, eksozom konsantrasyonunun etkisini değerlendirmek amacıyla 10 µg/mL ve 100 µg/mL olmak üzere iki eksozom konsantrasyonu kullanılmıştır. 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 24-kuyucuklu bir plakaya glioblastoma hücreleri ekilmiş ve 1 gün sonra belirlenen eksozom konsantrasyonları besiyeri içerisinde hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır. İnkübasyon 4 gün süreyle sürdürülmüştür. İnkübasyon sona erdikten sonra immünofloresan protokolü GFAP ve Vimentin ifadenmelerinin görüntülenebilmesi için uygulanmıştır. 1 gün sonra ise ikincil antikor (anti-fare IgG) eklenmiş ve floresan mikroskopta görüntüleme yapılmıştır.

4.2.5.4 RT-qPCR: M0, M1, M2 makrofaj türevli eksozomların glioblastoma hücrelerinde gen ekspresyon seviyesinde yarattığı farklılıkların incelenmesi

Bölüm 4.2.5'te gerçekleştirilen protokol aynı şekilde izlenerek, 24-kuyucuklu bir plakaya iki tekrarlı ve 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde U87MG hücreleri ekilmiştir. Önceki çalışmalar neticesinde uygulanacak eksozom konsantrasyonu 100 µg/mL olarak belirlenmiş ve hücre ekiminden 1 gün sonra eksozom uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Eksozom uygulaması yapıldığı günden itibaren 4 gün süreyle %5 CO₂, %95 nem ve 37°C sıcaklık koşullarında inkübe edilmiştir.

Belirlenen zaman noktasına gelindiğinde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplanan RNA örneklerinin konsantrasyonu belirlendikten sonra ilgili hesaplamalar yapılarak, cDNA sentezinde kullanılmış ve -80°C buzdolabına kaldırılmıştır. cDNA sentezinden sonra, gen ekspresyonundaki değişiklikleri saptayabilmek amacıyla metastaz, EMT, apoptoz/nekroz ilişkili primerler kullanılarak RT-qPCR kit protokolü takip edilerek analiz gerçekleştirilmiştir.

4.2.6 M0, M1, M2 Makrofaj eksozomlarının glioblastomada *in vitro* yara iyileştirme (scratch assay) potansiyelinin incelenmesi

M0, M1, M2 makrofaj türevli eksozomların U87-MG hücrelerinin migrasyonuna etkilerinin incelenmesi amacıyla *in vitro* yara kapanması tahlili gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma aynı zamanda eksozomların kanser hücre metastazına olan etkileri hakkında da fikir verebilecektir. Bu amaçla U87-MG hücreleri 24-kuyucuklu bir plakaya iki tekrarlı olarak 200.000 hücre/kuyucuk ekilmiştir. Ardından 3 gün boyunca hücreler inkübasyonda bırakılarak kuyucuk içerisinde istenen bolluğa gelmesi amaçlanmıştır. İnkübasyon süresi sona erdiğinde hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmıştır. Yara açma işlemi için bir pipet ucu kullanılarak kuyucuklarda boydan boya çizgi çekilmiştir. Yara oluşturulduktan sonra makrofaj eksozomları 100 µg/mL konsantrasyonda besiyeri içerisinde kuyucuklara eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince meydana gelen değişiklikleri gözlemlemek amacıyla periyodik zaman noktaları (0, 12, 24, 48 ve 72. saat) belirlenmiş ve invert faz/kontrast mikroskopunda fotoğraflanmıştır. Zamanla meydana gelen görsel değişiklikleri kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla

Image-J kullanılmış ve yara kapanma alanları hesaplanarak %yara iyileşmesi olarak verilmiştir.

4.2.7 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarının glioblastomada anti-kanser ilaç direncine etkileri

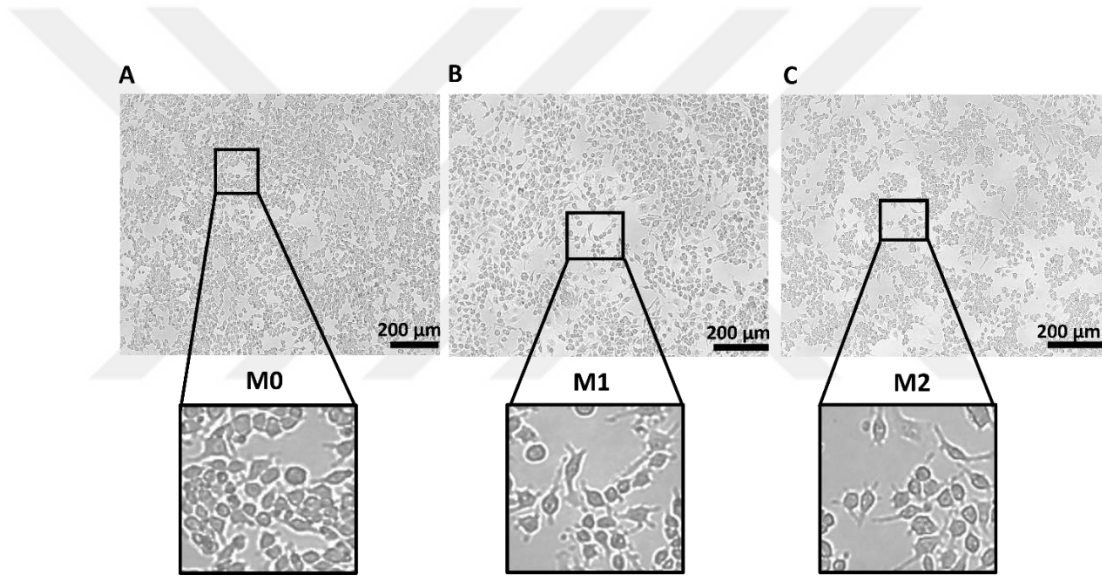
Glioblastoma hücrelerinin anti-kanser ilaç (5-Fluorourasil) karşısında çoğalmalarını incelemek amacıyla 24 ve 72 saat olmak üzere iki farklı zaman noktasında 10 µM ilaç dozu belirlenerek iki defa eksozom uygulaması yapılmıştır. İlaç deneyleri, 96-kuyucuklu bir plakada üç tekrarlı ve 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde başlatılmış ve ilaç uygulaması ikinci kez eksozom indüklemesinden hemen sonra gerçekleştirilmiştir. Belirlenen zaman noktaları boyunca inkübatörde bırakılan hücreler, bölüm 4.2.5.1'deki basamaklar izlenerek XTT testi ile çoğalmaları nicel olarak belirlenmiştir.

5. BULGULAR

5.1 *In vitro* Hücre Kültürü Bulguları

5.1.1 Makrofajların polarizasyonu ve karakterizasyonu

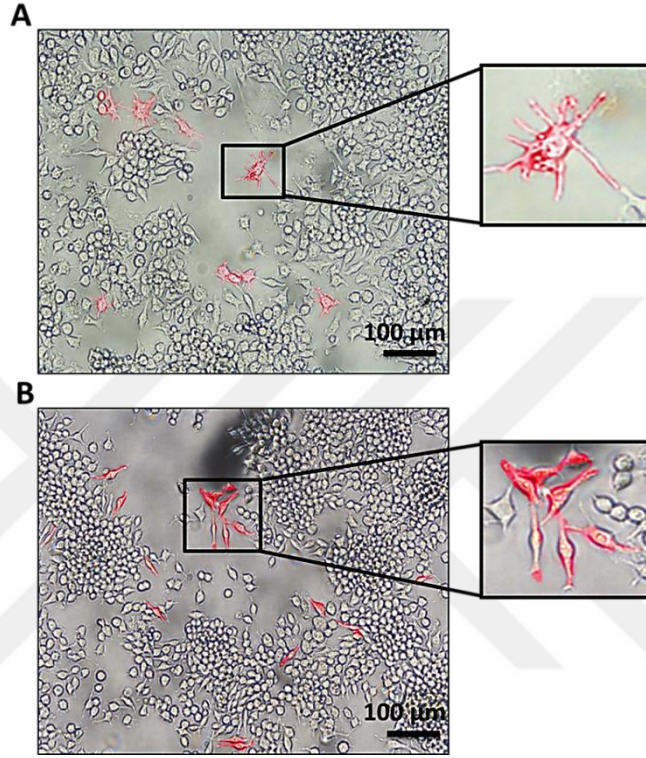
Kültür süresince M0 makrofajlar çoğaltılarak, M1 ve M2 fenotip gösterecek şekilde polarize edilirken, morfolojilerinin incelemesi invert faz-kontrast mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1 LPS ve IFN- γ ile indüklenen M1 ve IL-10 ile indüklenen M2 makrofajların M0'a kıyasla kültür sürecindeki morfolojik değişikliklere ait görüntüleri: (A) M0 makrofaj, B) M1 makrofaj, C) M2 makrofaj, ölçek çubuğu: 200 μ m.

Makrofajların morfolojik açıdan yuvarlak veya oval şekle sahip olduğu bilinmektedir (Doshi ve Mitragotri 2010). Makrofajların fenotipik polarizasyonu, kullanılan sitokinler aracılığıyla *in vitro* ortamda M1 fenotip ve M2 fenotipe farklılaştırılabilirken *in vivo* ortamda lokal mikroçevresine göre düzenlenmektedir. Şekil 5.1'de M1 makrofajların morfolojilerinde dendritik yapılar görülmüştür. M2 hücreleri ise M1 hücreleri ile karşılaştırıldığında uzamış morfolojiler sergilemişlerdir. İkinci kez yapılan indüksiyon işlemlerinden sonra devam eden kültür sürecinde M2 makrofajlarda belirgin fibroblastik-

morfoloji benzeri yapılar gözlenmiştir (Şekil 5.2). Genel olarak 2. indüksiyon uygulamasından sonra hücre morfolojilerinin 1. indüksiyona kıyasla net bir değişme gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sebeple, ileri deney ve analizler iki aşamalı indüksiyon işlemlerinden sonra gerçekleştirilmiştir.

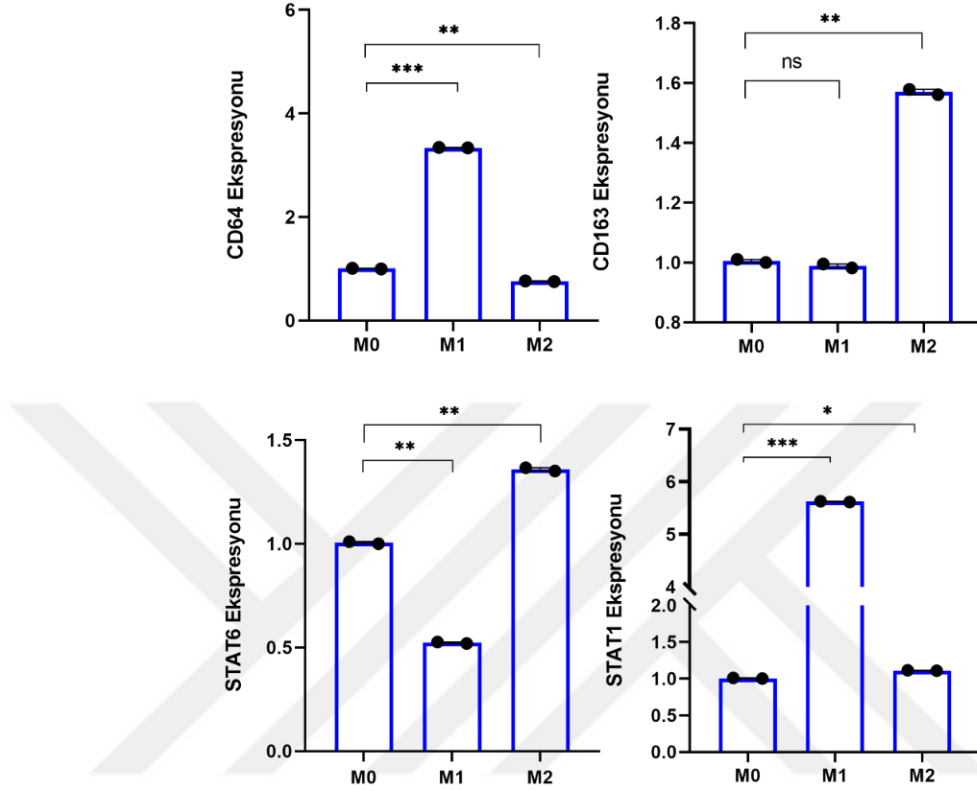


Şekil 5.2 İki kez indüklenmiş (A) M1 makrofaj hücreleri ve (B) M2 makrofaj hücrelerinde kültür süresince gözlenen morfolojik değişiklikler, ölçek çubuğu: 100 µm

5.1.2 Makrofaj polarizasyonunun RT-qPCR ile incelenmesi

M0 makrofajların LPS ve IFN- γ ile M1 fenotipe ve IL-10 ile M2 fenotipe indüksiyonunun başarısı, spesifik yüzey belirteç ekspresyonlarının qRT-PCR ile incelenmesiyle doğrulanmıştır. Bu amaçla makrofajlar için spesifik olarak STAT1, STAT6, CD64 ve CD163 analizi yapılmıştır. M1 makrofaj için belirleyici olan STAT1 ekspresyonunda M0'a kıyasla 5,5 katlık bir artış gözlenirken CD64 ekspresyonu ise M0'a kıyasla yaklaşık 3,3 kat yüksek gözlenmiştir (Şekil 5.3). M2 makrofajlarda belirleyici olan STAT6 ve CD163 ise M0 grubuna kıyasla yüksek oranda ifadenmiştir (Şekil 5.3).

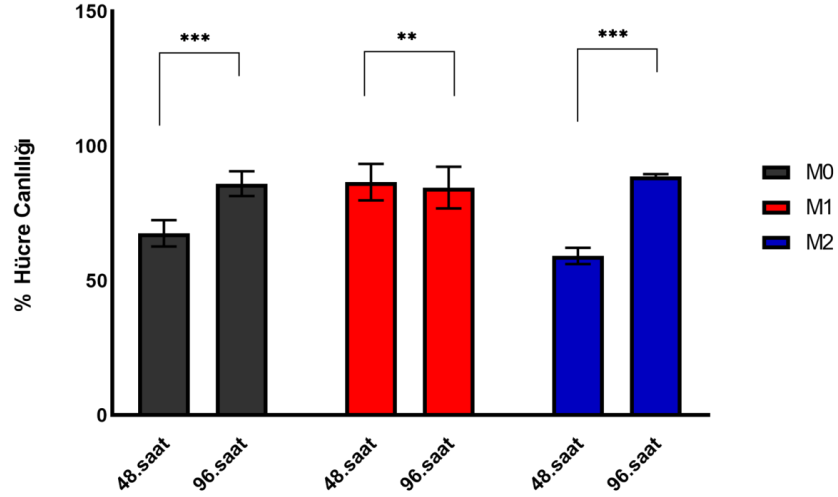
Yapılan gen ekspresyon analizlerinde gruplar arasındaki farklılık ve anlamlılıkları ANOVA testi kullanılarak tespit edilmiş ve grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 5.3 Makrofaj indüksiyonlarının karakterizasyonunda STAT1/CD64 (M1 fenotip) ve STAT6/CD163 (M2 fenotip) gen ekspresyon grafikleri

5.1.3 Polarize makrofaj hücrelerinin çoğalma kapasitelerinin XTT ile incelenmesi

Makrofaj hücrelerinin (M0, M1 ve M2) canlılık durumları ve zamana bağlı (48. saat ve 96. saat) proliferasyon kapasiteleri gerçekleştirilen XTT testi ile incelenmiştir. Yapılan analiz sonucunda, polarizasyon etkisinin makrofaj hücrelerinde canlılık üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadığı görülmüştür (Şekil 5.4).

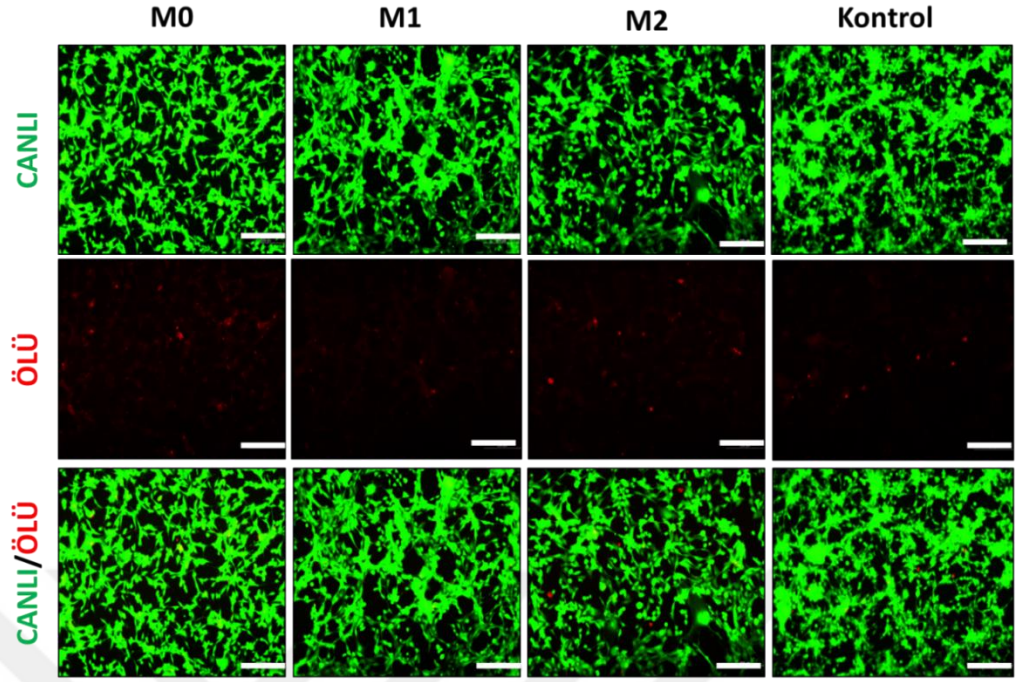


Şekil 5.4 Polarize edilen makrofaj hücrelerinin 2.gün ve 4.gün için XTT yöntemi ile belirlenen hücre çoğalma oranları

Metabolik aktivitelerinin bir ifadesi olarak yapılan bu analizde, M1 makrofaj hücreleri 48. saatte maksimum proliferasyon göstermiştir. Bunun yanı sıra, M0 ve M2 hücrelerinde canlılık 48. saate kıyasla 96. saatte anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır.

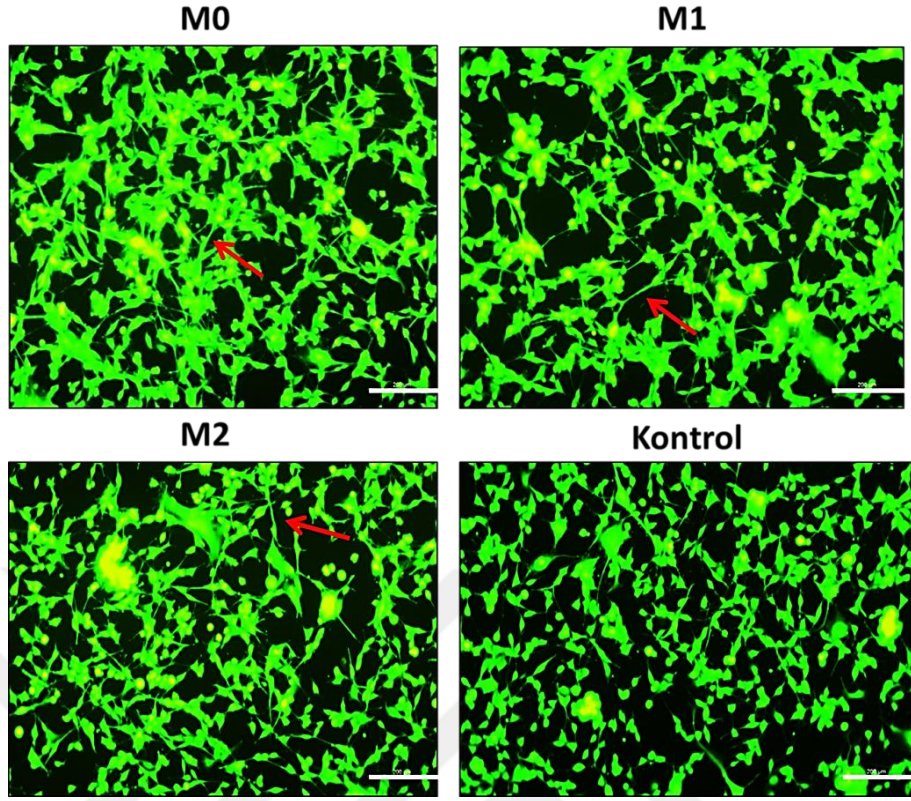
5.1.4 Eş-kültürasyonun hücre canlılıklarına etkisinin canlı/ölü testi ile incelenmesi

Polarize edilen makrofaj hücreleriyle eş-kültür edilen glioblastoma hücreleri üzerinde meydana gelen olası sitotoksosite ve canlılık durumlarını incelemek amacıyla bir zaman noktası belirlenerek canlı/ölü boyama testi gerçekleştirilmiştir. Burada canlı hücreler Kalsein-AM ile yeşil floresan ışıma yaparken, ölü hücreler Ethd-1 boyaması ile kırmızı floresan şeklinde temsil edilmiştir. Şekil 5.5'te 4 gün boyunca gerçekleştirilen eş-kültür deneyinden elde edilen boyama bulguları sunulmuştur. M0, M1 ve M2 makrofajlarla eş-kültürlenmiş glioblastoma hücrelerinin olağan şekilde çoğalmasına devam ettiği, kontrole kıyasla olumsuz bir etkinin olmadığı gözlenmiştir. Ek olarak floresan mikroskop altında canlı/ölü testi gerçekleştirilirken, glioblastoma hücreleri üzerinde bazı morfolojik değişiklikler saptanmıştır.



Şekil 5.5 M0, M1, M2 makrofajlarla eş-kültürlenmiş U87-MG hücrelerinin 4. günde canlı/ölü boyamasına ait floresan görüntüleri, ölçek çubuğu: 200 μ m.

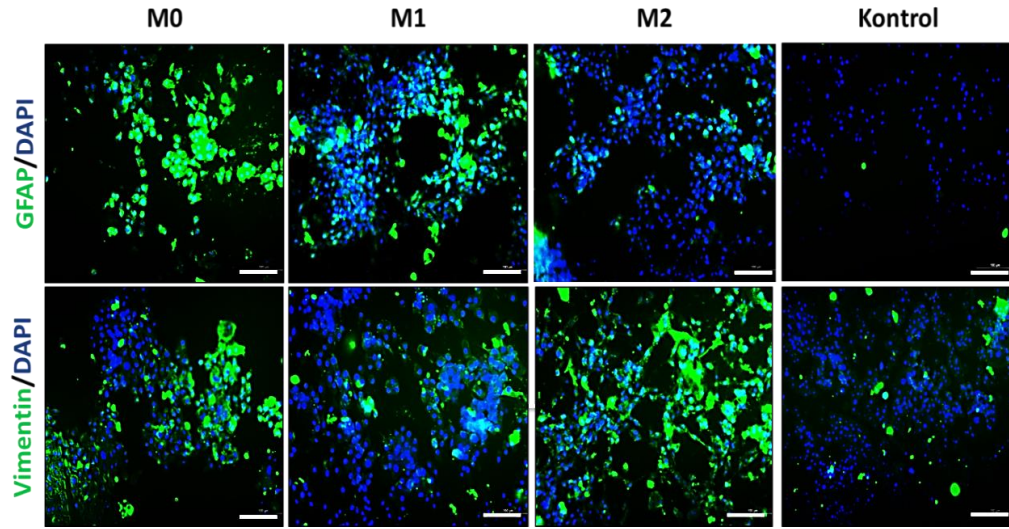
Kontrol grubu olarak kullanılan ve makrofajlar ile eş-kültürlenmemiş glioblastoma hücrelerinin mikrogliya formlarının yanında çoğunlukla küresel hatlara sahip olduğu görülmüştür (Şekil 5.6). Makrofaj hücreleriyle eş-kültürü gerçekleştirilen glioblastoma hücrelerinde (M0, M1 ve M2 gruplarında) ise artan hücre-hücre etkileşimleri ve uzayan morfolojiler dikkat çekmiştir (Şekil 5.6). Hücre-hücre bağlantıları ve kümelenmeler kırmızı oklarla belirtilmiştir.



Şekil 5.6 M0, M1, M2 makrofajlarla eş-kültürlenmiş U87-MG hücrelerinin morfolojik bulguları, ölçek çubuğu: 200 μ m.

5.1.5 M0, M1, M2 makrofajlarla eş-kültürlenmiş glioblastoma hücrelerine GFAP ve Vimentin ifadenmesi

4. derece astrositom olduğu bilinen glioblastoma hücreleri üzerinde GFAP ekspresyonunun değerlendirilmesiyle, makrofaj hücrelerinin eş-kültür sisteminde yarattığı metastatik etkilere immüno Floresan boyama ile bakılmıştır. GFAP ve Vimentin EMT-ile ilgili bilgi vermesi amacıyla kullanılmış primerlerdi.



Şekil 5.7 Makrofaj hücreleriyle eş-kültür edilen U87-MG hücrelerinin immüno Floresan boyaması görüntüleri: GFAP ve Vimentin boyaması, ölçek çubuğu: 100 µm.

Elde edilen bulgulara göre M0 ve M1 makrofajlar ile eş-kültürlenmiş U87-MG hücrelerinde kontrole kıyasla ileri düzeyde GFAP ifadenmesi görülmüştür (Şekil 5.7). Bununla birlikte beklendiği üzere, M2 makrofajlar ile eş-kültürlenmiş U87-MG hücreleri üzerinde olumlu bir ifade gözlenmemiştir ve glioblastomanın malignitesini artıran M2 makrofajlar sebebiyle GFAP ekspresyonunun azalmasıyla sonuçlanmıştır (Şekil 5.7).

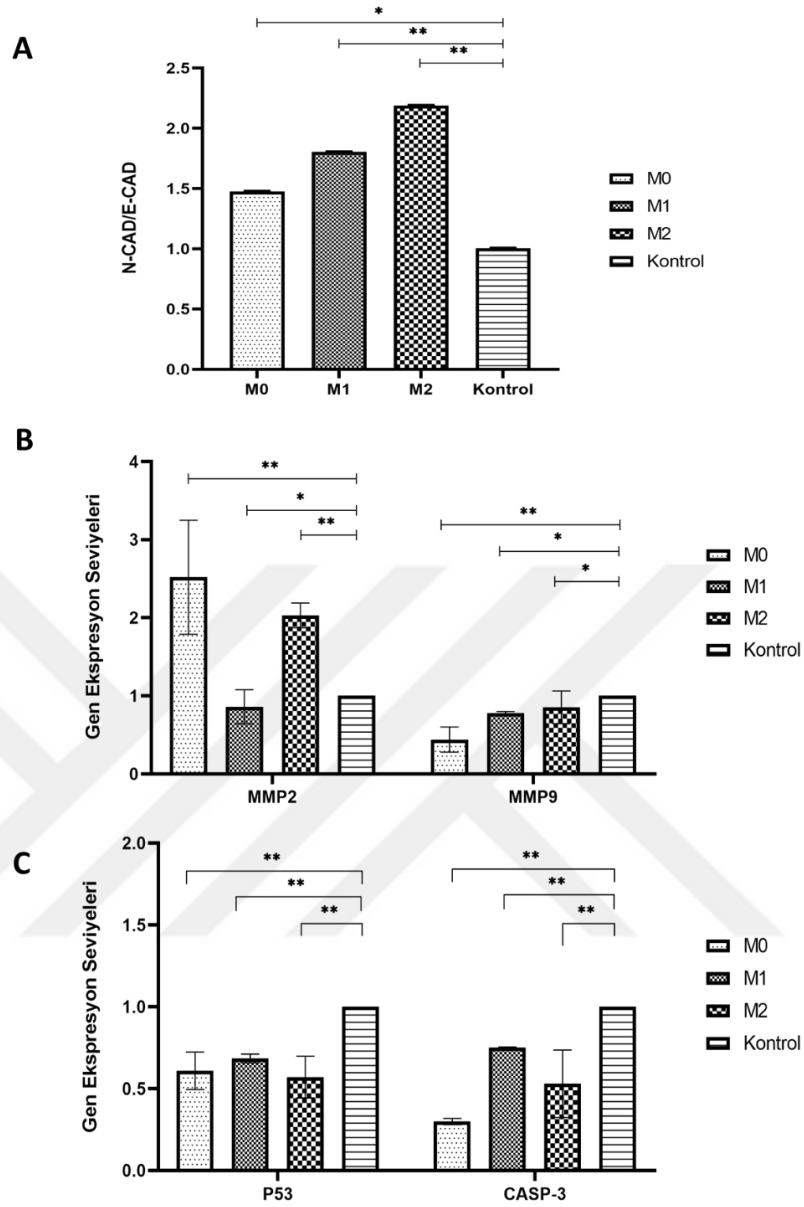
GFAP'nin yanı sıra, makrofajların glioblastoma üzerindeki metastatik etkilerinin daha iyi karakterize edilmesi amacıyla bir mezenkimal fenotip belirteci olan Vimentin antikoru kullanılarak immüno Floresan boyaması yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, M2 makrofajlar ile kültürlenen glioblastoma hücrelerinin, kontrole kıyasla mezenkimal fenotipte bir artış göstermesiyle birlikte güçlü vimentin ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 5.7). Anti-tümörjenik etki gösterdiği bilinen M1 makrofaj grubunda ise zayıf bir ekspresyon gözlenmiştir. Sonuç olarak, yapılan immüno Floresan çalışması makrofajların ve makrofaj fenotiplerinin glioblastoma hücrelerinde metastatik süreçlerde etkili olduğunu, M2-fenotipin metastazı arttırdığı tespit edilmiştir.

5.1.6 M0, M1, M2 makrofaj eş-kültürünün glioblastoma kanser progresyonuna etkilerinin gen ekspresyon seviyesinde incelenmesi

Makrofaj hücreleriyle gerçekleştirilen eş-kültür, glioblastoma hücrelerinde başta

epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olmak ezere çeşitli genotipik ve fenotipik değişikler ile metastazı tetikleyebilmektedir. Kurulan eş-kültür sisteminde fenotip kaymasının glioblastoma davranışlarına etkileri E-CAD ve N-CAD ekspresyonlarına bakılarak incelenmiştir. Polarize edilmiş makrofaj hücrelerinin olduğu eş-kültür deneyinde M2 grubu kontrole kıyasla glioblastoma hücreleri üzerinde mezenkimal karakteri artırmış ve EMT durumuna katkı sağlamıştır (şekil 5.8.A). Bunun yanında, M1 makrofaj hücrelerinin de glioblastoma hücreleri üzerinde mezenkimal karaktere 1,8 kat artış ile yatkınlık meydana getirdiği görülmüştür. M2 makrofajlar, N-CAD/E-CAD oranında 2,2 katlık bir artışa neden olmuştur. Bunun yanısıra M0 grubu makrofaj hücreleri polarizasyona uğramadığı için aynı oranda kalmıştır (şekil 5.8.A). Eş-kültür sistemi aracılığıyla ortamdaki makrofaj hücrelerinin varlığının glioblastomanın invazif davranışlarını desteklediği yönünde bir sonuç elde edilmiştir.

M0, M1 ve M2 makrofajların glioblastoma hücreleri üzerinde metastatik davranışlarını ne denli uyaracağını anlamak amacıyla gerçekleştirilen eş-kültür deneyinde, EMT ilişkili genlerin ifadelerinde bazı değişikliklere sebep olduğu gibi metastatik gen ifadelerinde de farklılıklar meydana getirmiştir. Eş-kültür edilen U87-MG hücrelerinin metastatik davranışları MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonları ile incelenmiştir. Elde edilen verilere göre M1 grubunun glioblastoma hücrelerinde MMP2 ifadelenmesini 1,2 kat geri yönde regüle ettiği tespit edilmiştir. Bunun aksine hem M0 grubu hem de M2 makrofajların kontrole kıyasla glioblastoma hücreleri üzerinde metastaza katkı sağladığı ve MMP2'yi ileri yönde 2 kat regüle ettiği görülmüştür (şekil 5.8.B). Ayrıca M0, M1 ve M2 makrofajların glioblastoma ile eş-kültüründe, metastaz mekanizmasının MMP9 aracılı metastatik yoldan ilerlemediği görülmüştür. Ek olarak makrofaj hücreleriyle birlikte kültürlenen U87-MG hücrelerinin, hücre ölüm mekanizmalarının incelenmesi amacıyla apoptoz için belirlenen P53 ve CASP-3 gen ekspresyonlarına bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre apoptozun kontrol grubuna kıyasla bütün makrofaj gruplarında baskılandığı tespit edilmiştir (şekil 5.18.C).

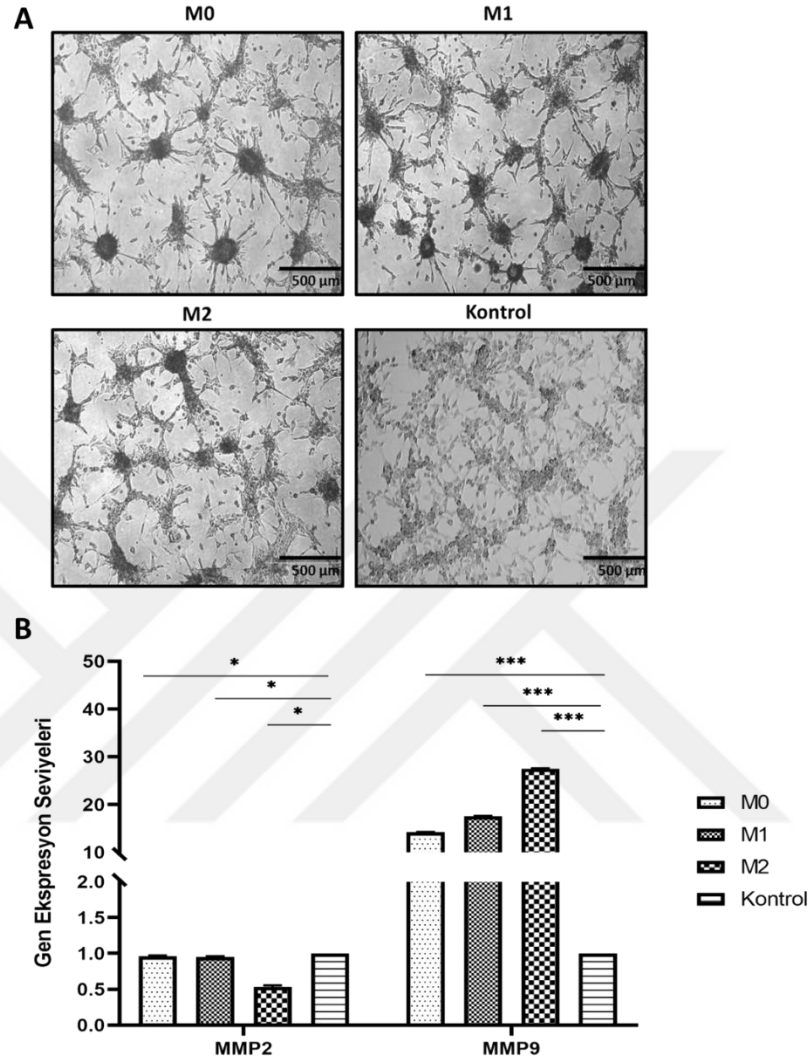


Şekil 5.8 Makrofaj hücreleriyle eş-kültür edilen U87 hücrelerinin A) EMT B) metastaz C) apoptoz ilişkili gen ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri

5.1.7 Eş-kültür yönünün hücre metastazına etkisinin incelenmesi

Bölüm 5.1.6’da verilen eş-kültür deneyi, hücrelerin transwell sisteminde ekim yönü değiştirilerek U87 hücrelerinin metastatik davranışlarının araştırılması için tekrarlanmıştır. Bu deneyde makrofaj hücreleri transwell sisteminin alt bölümüne ekilirken glioblastoma hücreleri sistemin üst bölümüne ekilmiş ve 4 gün süreyle eş-kültürasyon sağlanmıştır. Kültür sürecinde hücreler görüntülenmiş ve akabinde RT-qPCR

analiziyle metastatik gen ifadeleri incelenmiştir.

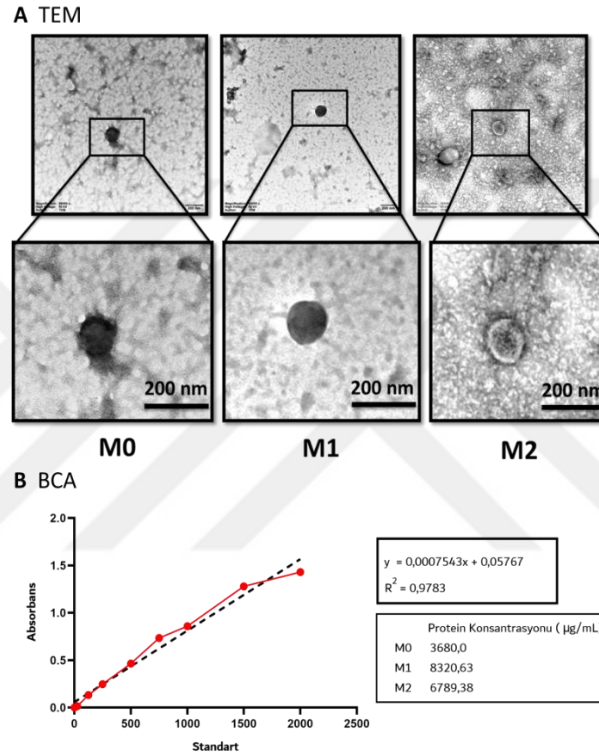


Şekil 5.9 Eş-kültür yönünün değiştirilmesiyle elde edilen A) invert faz/kontrast mikroskobu görüntüleri, B) MMP2 ve MMP9 gen ifadeleri.

Görüntülere bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla morfolojik bakımdan U87-MG hücrelerinde agregat formları görülmüştür (Şekil 5.9.A). Bunun yansıya, MMP2 ve MMP9 ekspresyonlarında tutarsızlık saptanmıştır. MMP2 için kontrol ile kıyaslandığında anlamlı derecede fark bulunmamasına rağmen MMP9 ekspresyonlarında çok yüksek seviyeler gözlenmiştir (Şekil 5.9.B). Moleküler difüzyonun aşağıdan yukarıya doğru olduğu bu eş-kültür sisteminin kanser hücresel davranışlarının moleküler düzeyde incelenmesi için uygun olmadığı değerlendirilmiştir.

5.2 Eksozom Karakterizasyonu

İzole edilen M0, M1 ve M2 eksozomlarının morfolojilerini tayin etmek amacıyla TEM (geçirimli elektron mikroskobu) kullanılmıştır. Boyutları 50-200 nm arasında olduğu gözlenen eksozomların spesifik küresel-eliptik özel şekilleri de yapılan görüntüleme sonucu sunulmuştur (Şekil 5.10.A).

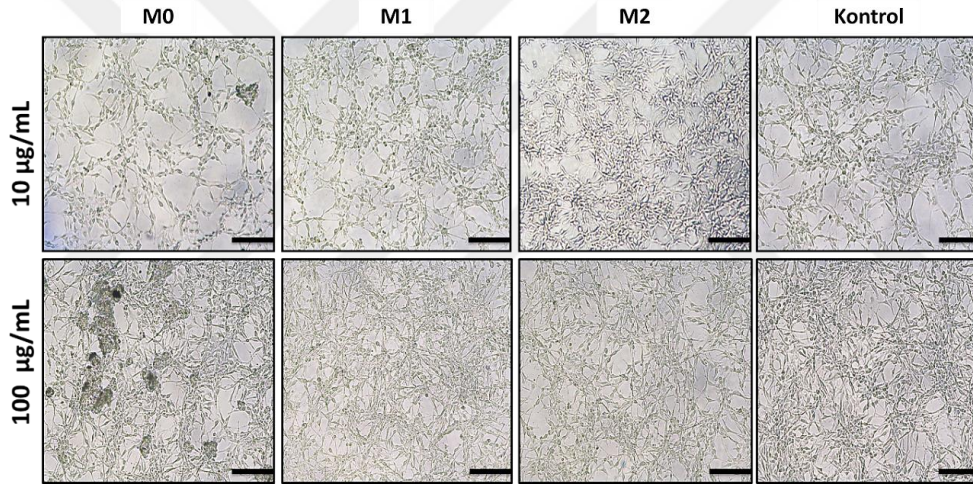


Şekil 5.10 Makrofajlardan izole edilen eksozomların A) TEM görüntüleri ve B) BCA testi sonuçlarına göre protein miktarları

TEM ile eksozom varlığı ve şekilsel/boyutsal uygunluğu doğrulandıktan sonra protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla BCA testi uygulanarak makrofajların eksozomal protein miktarı hesaplanmıştır. BCA testi sonuçlarına örnek absorbansları M0 eksozomlar için 0,6465, M1 eksozomlar için 1,389 ve M2 eksozomlar için 1,144 olarak okunmuştur. Ardından seyreltme faktörü hesaba katılarak nihai protein konsantrasyonları Şekil 5.10B’de verildiği gibi hesaplanmıştır.

5.3 M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomların glioblastoma hücresel morfolojisindeki etkileri

Eş-kültür deneyleri ile üç farklı fenotipteki makrofaj hücrelerinin glioblastoma hücreleri üzerinde dolaylı şekillerde yarattığı etkiler incelendikten sonra konsept eksozomlara taşınarak, meydana gelen fonksiyonel değişiklikler tartışılmıştır. Eksozom konsantrasyonunun U87-MG hücrelerine etkilerini incelemek amacıyla düşük (10 µg/mL) ve yüksek (100 µg/mL) iki konsantrasyon literatürden belirlenerek hücrelere uygulanmıştır (Derkus vd. 2022). Uygulamanın ardından kuyucuklarda kültürlemeye devam edilen hücrelerin floresan mikroskop ile alınan görüntüleri Şekil 5.11’de gösterilmiştir.



Şekil 5.11 M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomların U87-MG kültürüne etkileri, ölçek çubuğu: 200 µm)

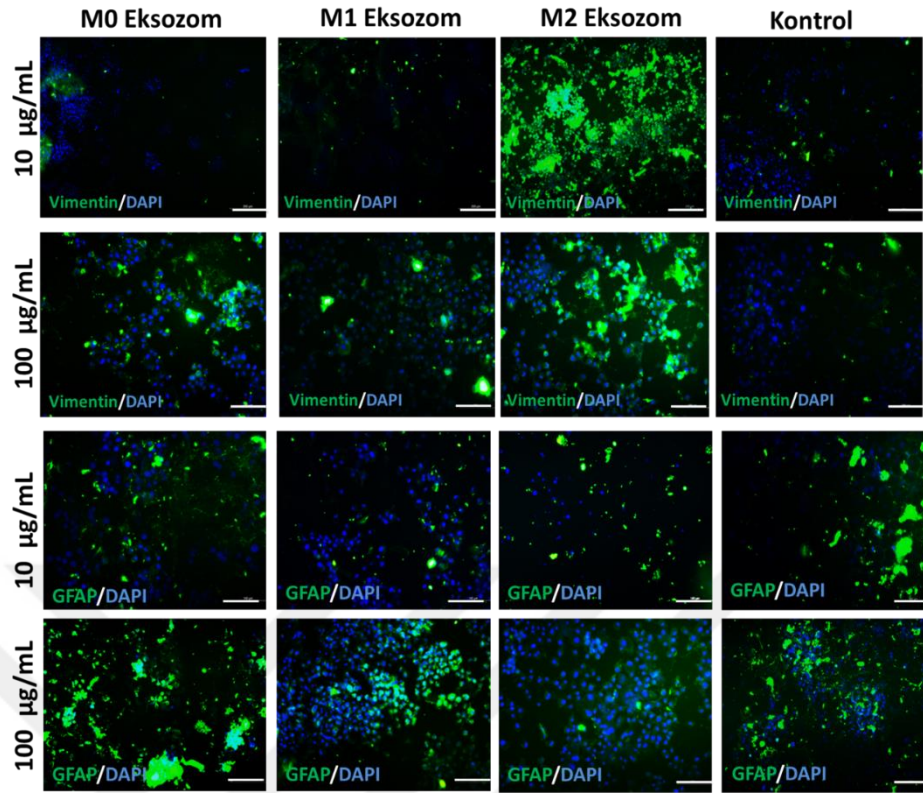
Eksozom uygulamasından sonra kültürün 2. gününde U87-MG hücrelerinin her iki konsantrasyondaki eksozom uygulamasından hücre canlılığının olumsuz etkilenmediği gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, belirgin morfolojik bir değişiklik görülmemiştir.

5.3.1 M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomların glioblastoma hücrelerinde metastatik süreçlere etkilerinin immünfloresan mikroskopisi ile incelenmesi

İmmünofloresan boyaması hem eksozom konsantrasyon etkisi hem de eksozomların

mezenkimal fenotip ifadelerini görselleştirmek için gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.12’de sunulan bulgulara göre, eksozomlar düşük dozda (10 µg/mL) uygulandığında glioblastoma hücrelerinde Vimentin ve GFAP ifadelenmesi anlamında belirgin bir fark görülmemiştir. Eksozom konsantrasyonu (100 µg/mL) arttığında her iki grup içinde yorumlanabilir bulgular elde edilmiştir. Astrositik belirteç olan GFAP, M1 eksozomlar ile indüklenmiş U87-MG hücrelerinde yüksek ekspresyon gösterirken M2 eksozomlar ile indüklenmiş U87-MG hücrelerinde pozitif yanıt göstermemiştir. Bununla beraber kontrol ve M0 grubunda zayıf pozitif ekspresyon gözlemlenmiştir.

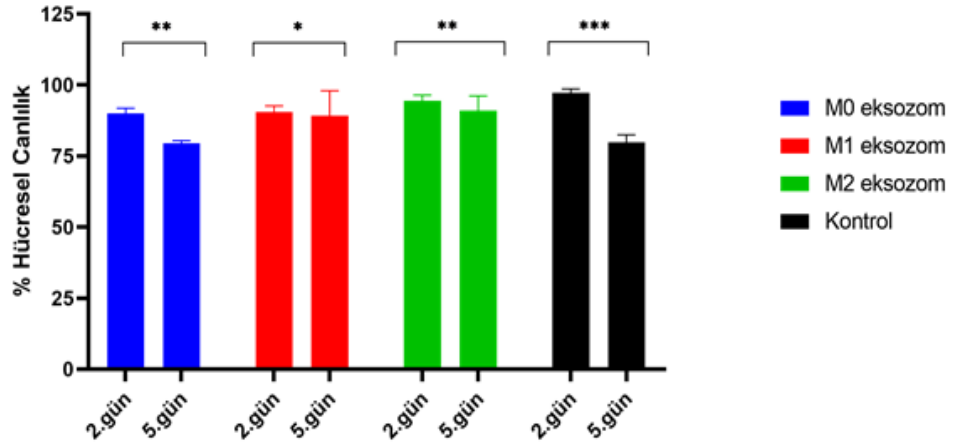
Mezenkimal fenotip belirteci olan Vimentin, eksozom uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla M2 eksozom grubunda kuvvetli pozitif ifade göstermiştir. Bununla birlikte, M0 eksozom grubu U87-MG hücrelerinin mezenkimal fenotipe doğru kaymasını desteklerken M1 grubunda yanıt vermediği gözlemlenmiştir (Şekil 5.12). Sonuç olarak, 10 µg/mL konsantrasyona sahip eksozom grupları glioblastoma hücrelerinin invazif veya metastatik karakteriyle ilişkili olarak etkin olmadığı tespit edilerek, devam eden diğer deneyler için de 100 µg/mL sabit konsantrasyon kabul edilmiştir.



Şekil 5.12 Eksozom konsantrasyonunun EMT ile ilişkilendirilmesine yönelik yapılan immüno Floresan çalışmasına ait görüntüler

5.3.2 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücre canlılığına etkilerinin incelenmesi

Makrofaj eksozomlarının yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) glioblastoma hücrelerine uygulanması, hücrelerde yaratacağı sitotoksik etkilerinin irdelenmesi amacıyla hücresel canlılık belirleyicisi olan XTT testi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla eksozom uygulamasının glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki yaratmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.13).

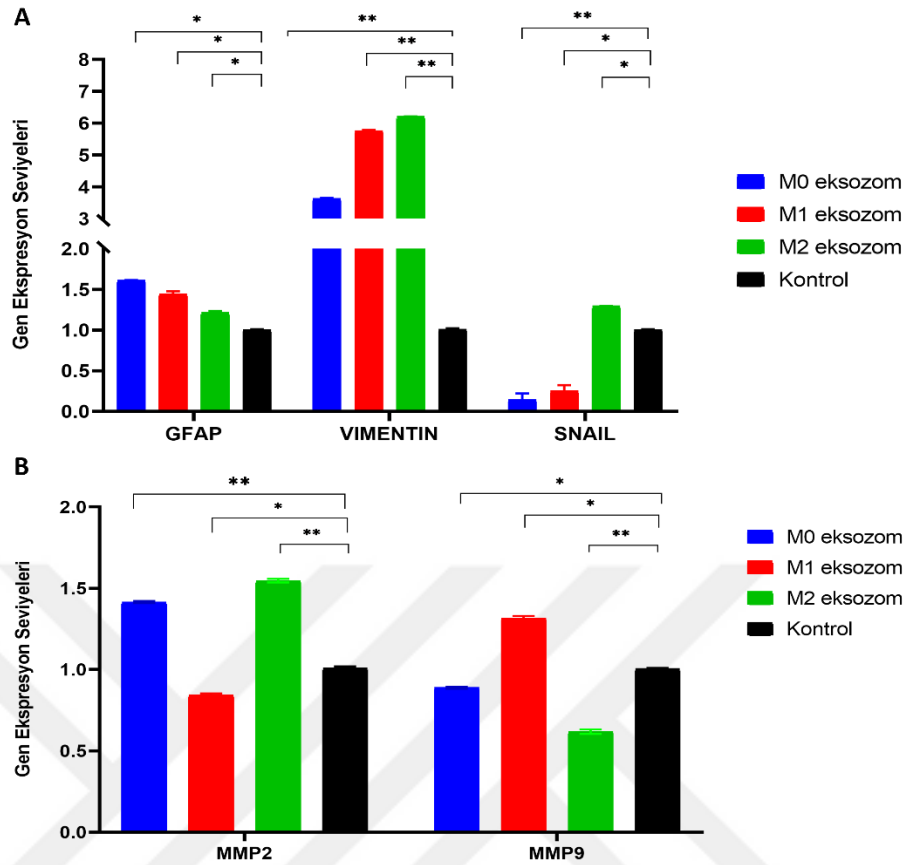


Şekil 5.13 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarıyla indüklenen U87-MG hücrelerinin XTT testine ait grafik

Eksozom uygulamasının ardından geçen 2. günde bütün gruplarda hücre canlılığı en yüksek gözlemlenmişken, 5. güne gelindiğinde hücre canlılığı Şekil 5.13'te görüldüğü gibi belli bir azalmayla sonuçlanmıştır. Eksozom uygulanan bütün gruplarda hücresel proliferasyonda daha az bir azalma mevcutken, eksozom uygulanmayan grupta hücresel canlılığın azalması anlamlı bir fark göstermiştir.

5.3.3 Makrofaj eksozomlarının glioblastoma progresyonuna ilişkin etkilerinin gen ekspresyon bulguları

Makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücreleri üzerinde EMT, metastaz, apoptoz/nekroz olaylarına etkilerinin gen ekspresyon düzeyinde anlaşılması amacıyla RT-qPCR çalışması gerçekleştirilmiştir. Öncelikle invazif karakterin ve tümörün malignitesinin bir ölçüsü olan EMT'de meydana gelen değişikliklerin incelenmesi amacıyla GFAP, Vimentin ve SNAIL ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir.



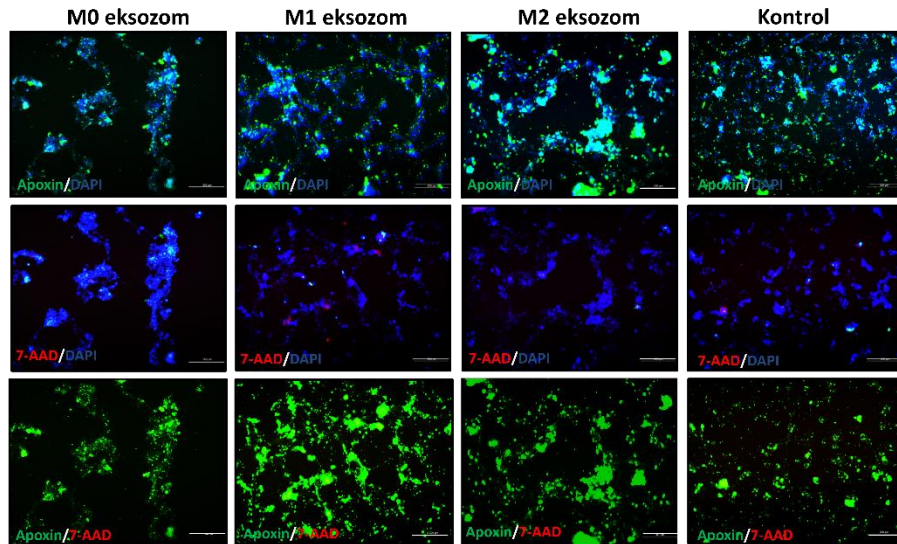
Şekil 5.14 M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomlar ile indüklenen U87-MG hücrelerinin A) EMT, B) metastaz ilişkili gen ekspresyon seviyelerine ait grafikler

EMT ilişkili bulgulara göre, GFAP bütün eksozomlu gruplarda kontrole kıyasla anlamlı bir ekspresyon farkı göstermemiştir (Şekil 5.14.A). Mezenkimal fenotip belirteci olan Vimentin ekspresyonlarına göre, bütün eksozomlu gruplar (M0, M1 ve M2) kontrole kıyasla yüksek sonuç vermiştir (Şekil 5.14.A). Özellikle M2 eksozom uygulanan U87-MG hücrelerinde çıkan yüksek ekspresyon değeri kontrole kıyasla 6,2 katlık bir artışla anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak, makrofaj eksozomlarının mezenkimal karakteri artırarak EMT durumuna ve maligniteye katkı sağladığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte EMT ilişkili olduğu bilinen SNAIL gen ekspresyonları incelenmiştir. M2 eksozom uygulaması M1 eksozom grubuna kıyasla 5,4 kat, M0 eksozom grubuna kıyasla 9,25 kat artırarak yüksek ekspresyon gösterdiği doğrulanmıştır.

Makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücrelerinin metastatik olgularına etkileri MMP2 ve MMP9 genleri ile yorumlanmıştır. Şekil 5.14.B’de verildiği üzere, M2 eksozomlarının glioblastoma hücrelerinde MMP2 aracılı metastazı 1,5 kat desteklediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte M0 eksozom grubunun da kontrol grubuna kıyasla 1,4 kat artışla metastaza katkı sağladığı görülmüştür. M1 eksozom grubu ile kontrol arasında ekspresyon bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. MMP9 aracılı ekspresyonlar MMP2 metastatik yolağın tam tersi şeklinde sonuç vermiştir.

5.3.4 Apoptoz-nekroz testi: Makrofaj eksozomları ile indüklenen glioblastoma hücrelerinin ölüm yollarına etkisinin mikroskopik olarak incelenmesi

Belirlenen 100 µg/mL makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücre proliferasyonu üzerinde negatif bir etki yaratmadığı, fakat hücre canlılığının 5. günden sonra azalmaya başladığı XTT testi ile gösterilmişti. Meydana gelen hücre ölümlerinin Bölüm 5.3.3’te gen ekspresyon düzeyinde verilen bulgularını desteklemek amacıyla fizyolojik/patolojik yolların belirlenmesi amacıyla apoptoz/nekroz boyama testi ile görsel olarak değerlendirilmiştir.

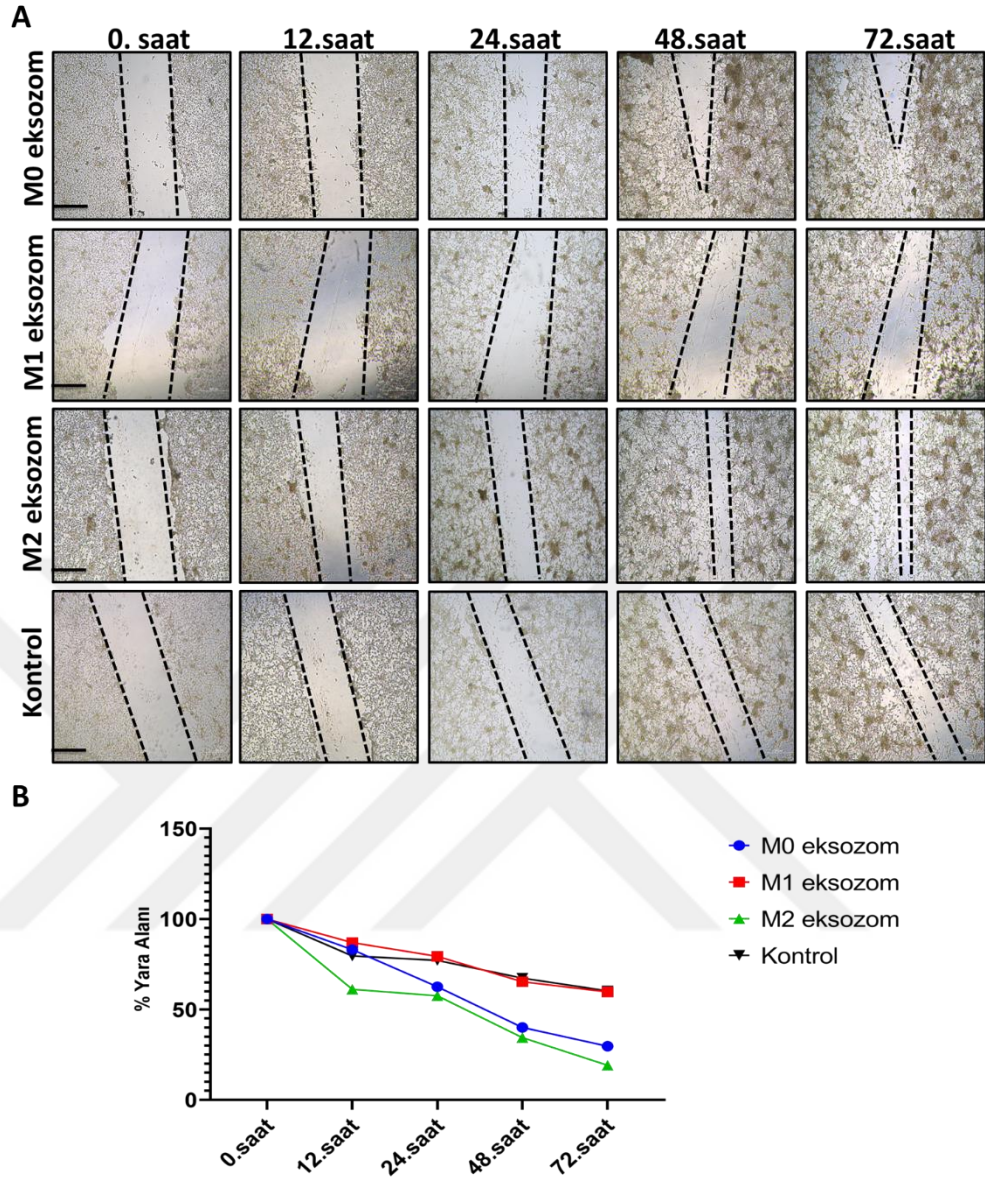


Şekil 5.15 M0, M1, M2 makrofaj-türevli eksozomlar ile indüklenen U87-MG hücrelerine ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri, ölçek çubuğu: 200 µm

Apoptoz/nekroz testinde kullanılan Apoxin boyaması yeşil floresan renk vermekte olup apoptozu temsil ederken, 7-AAD boyaması kırmızı floresan ışıma yaparak nekrozu görselleştirmek için kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerini temsilen kullanılan DAPI mavi renkte görülmektedir. Hem apoptoz hem nekroz görüntülerinde DAPI'nin çekirdekte ve hücre bağlantı yüzeylerinde lokalize olduğu, dolayısıyla hücre DNA'larının hasara karşı direnç gösterdiği gözlemlenmiştir. Makrofaj eksozomlarının yanında, eksozomsuz olarak belirtilmiş U87-MG hücrelerinden oluşan kontrol grubu bulunmaktadır. Elde edilen bulgular, bütün makrofaj eksozomlarının indüksiyonundan kaynaklanan hücre ölümünün nekrotik yolak dışında, fizyolojik bir süreç olan apoptoz ile gerçekleştiği yönündedir. Apoptoz sürecinde, en yüksek ekspresyon gösteren grup kontrole kıyasla M2 eksozomlar ile indüklenmiş U87-MG hücreleri olarak görülmektedir (Şekil 5.15).

5.3.5 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücreleri üzerinde *in vitro* yara iyileştirme potansiyelinin incelenmesi

Makrofaj eksozomlarının kanser hücrelerinin metastaz seviyeleri hakkında bilgi veren *in vitro* yara onarımı (scratch assay) üzerindeki etkilerini makroskopik olarak incelemek amacıyla zamana bağlı yara kapama açısından incelemeler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, M2 eksozom grubunun U87-MG hücreleri üzerinde kontrole kıyasla hızlı proliferasyon olduğu tespit edilmiştir. Oluşturulan yara alanlarının ayrıntılı incelemesinde, yara oluşturulurken boşlukta kalan hücrelerin zamanla komşu hücre kümelerine göre daha hızlı hareket ettiği gözlemlenmiş olup 12 saat sonra başlamıştır (Şekil 5.15). Sonuç olarak, makrofaj eksozomlarının kanser hücrelerinin *in vitro* yara iyileşmesine katıldığı, hücre proliferasyonu için ortam sağladığı, dolayısıyla metastaz sürecinde rol oynadığı doğrulanmıştır.

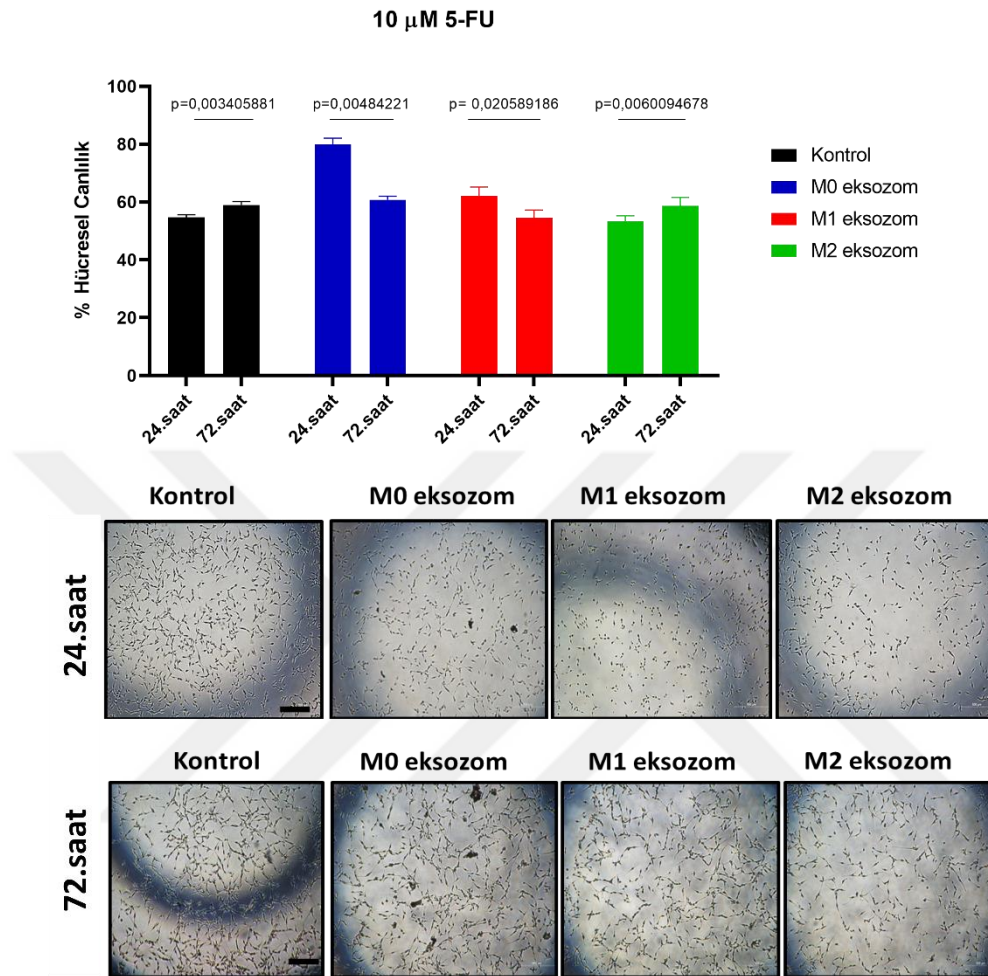


Şekil 5.16 *In vitro* yara iyileşmesinde makrofaj eksozomlarının etkileri: A) yara alanlarının görüntüleri ve B) yara alanı hesabı.

5.3.6 M0, M1, M2 makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücreleri üzerinde anti-kanser ilaç direncine etkilerinin incelenmesi

Glioblastoma, anti-kanser ilaç tedavilerine zayıf yanıt veren bir ilerlemeye sahiptir. Bu tez çalışması kapsamında, 5-Florourasil (5-FU) ilacı kullanılmış olup, makrofaj eksozomlarının ilaç direncine etkileri incelenmiştir. İlaç uygulamasında 10 μ M konsantrasyonda 5-FU kullanılmıştır. Eksozom uygulanmayan grup kontrol olarak belirtilmiştir. Ayrıca deneyler iki farklı zaman noktasında gerçekleştirilerek zamana bağlı

hücre çoğalması XTT testi ile incelenmiştir.



Şekil 5.17 Eksozomlar ile indüklenen U87-MG hücrelerinin anti-kanser ilaç uygulamasıyla hücresel canlılıklarının zamana bağlı incelenmesi: A) XTT bulguları, B) invert faz/kontrast görüntüleri, ölçek çubuğu: 500 μ m

24. saat ve 72. saat bulguları kıyaslandığında, kontrol grubuyla benzerlik gösteren M2 eksozom indüksiyonu gerçekleştirilen U87-MG hücrelerinin 72.saatte hücresel canlılıklarının arttığı gözlenirken, M0 eksozomlu ve M1 eksozomlu grupta 72.saat için hücresel canlılıkta bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 5.17).

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma, bağışıklık sisteminin bir üyesi olan makrofaj hücrelerinden köken alan eksozomların glioblastoma kanser hücrelerinde meydana getirdiği metastaz destekleyici/baskılayıcı özellikleriyle birlikte hücre fenotipinin değişmesi, proliferasyona katkısı, ilaç direnci gibi çeşitli etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu doğrultuda, eksozomal platform kurulmadan önce oluşturulan hipotezin ispat edilmesi için bir eş-kültür sistemi tasarlanmıştır. Eş-kültür sistemi polarize edilmiş makrofaj hücreleri ve glioblastoma hücreleri olmak üzere iki ayrı sistemin transwell sistemleri aracılı etkileşime maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Eş-kültür sisteminde kullanılan makrofaj hücrelerinin, sunulan karakterizasyon verileriyle birlikte polarizasyonu doğrulanmıştır. Şekil 5.1’de bir kez indüklenmiş makrofaj hücrelerinin görüntüleri olup, yeterli farklılıkların ancak iki kez indüklenmiş makrofaj hücrelerinde olduğu saptanmıştır. Şekil 5.2’de verilen morfolojik değişiklikler ve Şekil 5.3’te verilen hücre belirteçlerinin gen ekspresyonlarıyla sunulması, makrofaj hücrelerinin fenotip farklılaşmasının literatür ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Kullanılan CD163 ve STAT6’nın M2 polarizasyonunu yönlendirdiği bilinmektedir (Yu vd. 2019). Bununla birlikte M1 hücre işaretleyicisi olarak CD64 ve STAT1’in literatüre uygun şekilde ekspresyon seviyesi göstermiştir. Özellikle STAT1’in aşırı ekspresyonu, hastalıklarda inflamatuvar yanıtı desteklediği için, proinflamatuvar açıdan M1 polarizasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Zhu vd. 2021). Polarizasyon karakterizasyonu gerçekleştirildikten sonra hücrelerin proliferasyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Şekil 5.4’te sunulduğu üzere M0, M1 ve M2 makrofajların % hücresel canlılıkları 2. gün ve 4. günde yapılan XTT testi ile gösterilmiştir. Burada M0 ve M2 makrofaj hücrelerinin, 4. günde maksimum canlılığa sahip olduğu görülürken, M1 hücrelerinin hızlı proliferasyon olduğundan 4. günde anlamlı bir artış göstermediği tespit edilmiştir. Bunun sebebinin M1 hücrelerini aktive ederken kullanılan LPS olduğu düşünülmektedir. Literatürde (Fan, 1998), bakteriyel lipopolisakkaritin esas olarak makrofajın aktivasyonu ve çoğalmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. LPS tarafından aktive edilen makrofaj hücreleri yanıt olarak sitokin üretmeye başlayarak septik şok fizyolojisi gereği bol miktarda IL-1, IL-6 ve TNF-

α salgılanmasını tetiklemektedir. Makrofajlar üzerindeki LPS için birincil hücre yüzeyi reseptörü, 55-kD glikosil-fosfatidilinositol-bağlı bir membran proteini olan CD14'tür. LPS'nin CD14'e yüksek afiniteli bağlanması, serum proteini LPS bağlayıcı proteinin varlığıyla büyük ölçüde aktive edilmesini sağlamaktadır (Meng ve Lowell, 1997). Bununla birlikte lipopolisakkaritin hücrelerin enerji metabolizmasında etkili olduğundan, proliferasyona ayrıca bir katkı sağladığı düşünülmüştür. Zhang vd. (2018) yayımladıkları çalışmada, LPS konsantrasyonları ile hücre içi ATP seviyeleri arasında pozitif bir ilişki bulunmuş ve hücre içi nitrik oksit üretimi arttığından glikolitik enzim aktivitelerini güçlendirdiği doğrulanmıştır.

Polarize edilen makrofaj hücrelerinin glioblastoma hücreleriyle eş-kültürü aşamasına geçildiğinde floresan mikroskop altında gözlemlenen makrofajlar tarafından glioblastoma hücrelerinde bazı morfolojik değişiklikler yarattığı saptanmıştır. Şekil 5.6'da sunulan görsellerde kırmızı ok işaretleriyle gösterilen kısımlarda artan hücre-hücre etkileşimleri ve uzayan formlar dikkat çekmiştir. Bu durumun, kontrol grubu haricinde eş-kültür sistemi içerisindeki U87-MG hücrelerinde görülmesi, transwell sistemi aracılığıyla makrofajların yukarıdan aşağı şeklinde insört tabanındaki porlardan çeşitli kimyasal ve biyolojik ipuçları göndererek hücre morfolojilerini etkilediği kanısına varılmıştır. Literatüre göre, makrofaj aktivasyonunun çeşitli faktörler ve sitokinler aracılığıyla hücre morfolojilerini doğrudan etkilediği bildirilmiştir (Kaushik vd. 2019). Hücre bağlantılarının artması şeklinde yorumlanan hücre fotoğrafları epitel morfolojiye işaret ettiğinden bu durum mezenkimal-epitelyel geçiş ile uyumlu çıkmıştır. Birçok metastatik kitle ve lezyon epitelyal doğayı paylaştığından EMT teorisi ile tutarsız gibi görülebilmektedir. Literatürde, mezenkimal tipte olan tümör hücrelerinin epitelyal forma geri dönebileceği, meydana gelen MET işleminin, metastazın diğer aşamaları için kritik olarak belirtilmiştir (Yao vd. 2011). Saptanan morfolojik farklılıkları detaylı incelemek amacıyla EMT ilişkili antikorlar ile immüno floresan boyaması yapılmıştır. Nöropatolojik preparatlarda, GFAP sıklıkla astrositlerin ve glial orijinli tümörlerin güvenilir bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Jung vd. 2007). Patolojik durumlarda veya birtakım hastalık etkenlerinden dolayı zarar görme durumunda, astrositik hücreler daha fazla glial fibriler asidik proteini üreterek tepki vermektedirler. Glioblastomada ise GFAP'nin pozitif reaksiyonu, tümör malignitesi ile ters olarak ilişkilendirildiği bilinmektedir (Ahmadipour

vd. 2020).

GFAP boyamasının kantitatif immünohistokimyasal değerlendirmesine göre, M0 ve M1 makrofaj hücreleriyle eş-kültür edilen U87-MG hücrelerinde güçlü bir pozitif yanıt gözlemlenmişken, kontrol grubu ve M2 eş-kültürü gerçekleştirilen U87-MG hücrelerinin yanıt vermediği sonucuna varılmıştır. Bazı çalışmalarda (Ahmadipour vd. 2020) artan astrositom derecesi ile GFAP ekspresyonunun ilerleyici kaybını gösterdiği için, M0 ve M1 hücreleriyle eş-kültür sisteminin kurulması, U87-MG'lerin fenotipik ve genotipik olarak astrositik karakterini artırdığı yönündedir. Dolayısıyla kurulan bu sistemin glioblastoma hücrelerinin malignitesini baskıladığı düşünülmektedir. İmmünofloresan boyamasında kullanılan bir diğer antikor Vimentin olmak üzere, M2 grubunda net bir ekspresyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Vimentin, tipik olarak epitelyal olmayan ve mezenkimal hücrelerde bulunan bir ara filament olduğundan, M2 makrofaj hücrelerinin, transwell sistemi vasıtasıyla glioblastoma hücrelerinin mezenkimal karakterini artırdığı ve malignitesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Makrofaj hücreleriyle glioblastoma hücrelerinin etkileşimi sonucunda malignitenin seyri hakkında gen ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Burada başlıca N-CAD ve E-CAD ekspresyonları değerlendirilmiş ve oranları Şekil 5.8.A'da sunulmuştur. Elde edilen bulgulara göre, makrofaj hücrelerinin glioblastoma hücreleri ile etkileşimi sonucunda epitel fenotipten mezenkimal fenotipe kayma gerçekleştirdiği ve invazif karakterine katkı sağladığı tespit edilmiştir. Genel olarak makrofajlar, çevrelerindeki düşük oksijen içeriğiyle birlikte anjiyogenezi indükleyen faktörler üretmek üzere uyarıldıklarından metastaza katkıda bulunduğu bilinmektedir (Qian ve Pollard, 2010).

Yang vd. (2019) yaptıkları bir çalışmada, M2 makrofajların tümör ilişkili makrofajları (TAM) işaret ettiğini ve TAM-benzeri bu hücrelerin, mezenkimal genleri yukarı regüle ederek IL-10/JAK1 sinyal aracılı tümör büyümesini desteklediği raporlamıştır. Bunun yanında, metastatik genotipi ifade eden MMP2 ve MMP9 ekspresyonlarına bakılmıştır. Şekil 5.8.B'de verildiği gibi MMP9'a kıyasla MMP2'de anlamlı bulgular elde edilmiştir. Yapılan çalışmada artan astrositom ve kanserin agresifliğiyle beraber yaygın olarak MMP2 ekspresyonu saptanmıştır (Ramachandran vd. 2017). Bu bulgular, M0 ve M2

makrofaj hücreleriyle beraber kurulan eş-kültür sisteminin U87-MG hücrelerinin metastatik genotipini artırmasına olanak sağlamıştır. Son olarak, metastatik gen ekspresyon seviyeleri immüno Floresan boyama sonuçlarıyla uyumlu çıkmıştır.

Konsept eksozom platformuna taşınmadan önce eş-kültür platformunda çeşitli değişiklikler yapılarak sistemin metastaza etkisi araştırılmıştır. U87-MG hücreleri ve polarize makrofaj hücreleri tersi yönde ekilerek etkileşime maruz bırakılmıştır. Aynı süreç tamamlanırken, insörite ekilen glioblastoma hücrelerinin zamanla kümelenerek kolonize olduğu ve sferoidimsi hücreler halini aldıkları gözlemlenmiştir (Şekil 5.9.A). Bu durumu destekleyecek şekilde Kaushik vd. (2019) çalışmalarında, soğuk plazma ile aktifleştirilmiş THP-1 monositlerden farklılaştırılan makrofaj hücreleri ve U87-MG, U251 hücrelerinin eş-kültürasyonu gerçekleştirilmiştir. Makrofajların glioblastoma hücrelerinde kanser kök benzeri popülasyonu baskıladığı ve değişen morfolojinin yanında kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte hücre agregatlaşmasının polikarbonat insöritlere karşılık hücrenel bir tepki olabileceği düşünülmektedir. Güncel bir yayında, gözenek boyutu ve zar kalınlığının eş-kültürasyon geçiren hücreler arasındaki parakrin sinyalleme ve doğrudan bağlantıların etkinliğini belirlemede önemli olduğu ve bundan dolayı heterojen hücre kültürlerinin performansının etkilendiği vurgulanmıştır (Yoo vd. 2022). Bunun yanısıra kontrol grubu olarak tek başına kuyucuğa ekimi sağlanan U87-MG hücrelerinde morfolojik bir değişiklik saptanmamıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra elde edilen RNA konsantrasyonlarının az oluşu ve yapısal değişiklikler sebebiyle, gerçekleştirilen metastatik gen ekspresyon analizi anlamsız sonuçlanmıştır (Şekil 5.9.B). Sistem optimize edilmeye çalışılsa da tutarsız bulgular elde edildiğinden sonuçlar raporlanmış ve eksozomal sisteme geçiş yapılmıştır.

Eksozomal sistem tasarısının, kanser *in vitro* modellerinin geliştirilmesinde ve kanser araştırmalarında geniş perspektifte bir kullanımı vardır. Bağışıklık yanıtlarının modüle edilmesi, stromal hücrelerin yeniden programlanması, hücre dışı matrisin yeniden modellenmesi ve kanser hücrelerine ilaç direnci özellikleri kazandırılması dahil birçok fonksiyonun değiştirilmesine olanak sağladığından tercih edilen bir platformdur (Tai vd. 2018). Eksozomlar, parental hücrelerinden taşıdıkları biyomoleküller ile hastalığın seyrini

değiştirme kapasitesine sahiptir (Zhang vd. 2018). Bu tez çalışması kapsamında, eksozom aracılı hücrel iletişimin kanserin özellikle metastaz olmak üzere ayırt edici özellikleri incelenmiştir.

Polarize makrofaj hücrelerinden saflaştırılarak izole edilen eksozomlar TEM ile karakterize edilmiştir. Şekil 5.10.A'da verilen elektron mikroskop görüntülerinde, izolatta bulunan eksozomlar dikkat çekmektedir. Makrofaj eksozomlarının morfolojilerinin literatür verileriyle uyumlu olduğu ve daha önce tarif edilen eksozomlara benzer olarak çift zar yapıları ile fincan veya küre şeklinde ifade edilen yapılara sahip olduğu saptanmıştır (Zhu vd. 2019). Çapları yaklaşık 50-200 nm arasında olduğu tespit edilen eksozomların çevresinde, eksozomal protein yoğunlukları görülmektedir. Bu izlerin, parental hücreleri polarize ederken kullanılan sitokinlerden ileri geldiği düşünülmektedir (Yuan vd. 2017). Ek olarak eksozomların protein seviyelerinin kantitatif açıdan değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen BCA testi sonucunda, her üç grup makrofaj eksozomunun da protein konsantrasyonları yüksek bulunmuştur. BCA sonucunda eksozomal proteinlerin miktarı eksozomların sayısı ile ilişkilendirilmiştir (Canning vd. 2022).

Son yıllarda makrofaj eksozomları, yalnızca inflamatuvar hastalıklar, fibroz ve kanser gibi çoklu hastalıkların patolojisinde hayati araçlar olarak değil, aynı zamanda immün düzenleme, kanser tedavisi, bulaşıcı savunma ve doku onarımında yararlı etkilerin araçları olarak ortaya çıkmıştır (Wang vd. 2020). Bu tez çalışmasında, hayati haberciler olarak makrofajlardan türetilen eksozomlar, U87-MG hücrelerinin biyolojik işlevlerine modüle ederek birçok fonksiyonun değişmesine imkân sağlamıştır. İlk olarak eksozom konsantrasyonunun etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, U87-MG hücreleri kültürü sırasında düşük (10 µg/mL) ve yüksek (100 µg/mL) iki ayrı eksozom uygulaması gerçekleştirilmiştir. Eksozom uygulamasından sonra kültürün 2. gününde U87-MG canlılıklarının, konsantrasyonlara karşın negatif olarak etkilenmediği ve belirgin morfolojik değişiklik göstermediği gözlemlenmiştir (Şekil 5.11).

Ardından gerçekleştirilen immünofloresan boyamasıyla, iki farklı eksozom konsantrasyonuyla EMT ilişkili ekspresyonlar değerlendirilmiştir. Eş-kültürün

immüno Floresan analiziyle benzer şekilde GFAP ve Vimentin kullanılmıştır. Şekil 5.12’de verildiği üzere, 10 µg/mL konsantrasyona sahip eksozom grupları glioblastoma hücreleri için belirgin bir antikor yanıtı vermemiştir. Eksozom yoğunluğu arttıkça yani 100 µg/mL için ekspresyon açısından anlamlı veriler elde edilmiştir. GFAP, daha az kötü huylu bir tümörle ilişkili olan glial farklılaşmayı belirlemek için kullanılır. Robe vd. (2019) yaptığı bir çalışmada GFAP yalnızca olgun astrositler tarafından değil, aynı zamanda beyindeki gelişim sırasında radyal glia ve nöral kök hücreler tarafından da ifade edildiğinden, astrositomdaki GFAP ifadesinin glial farklılaşmanın ve daha az habis bir fenotipin doğrudan bir göstergesi olmayabileceği varsayılmaktadır. Mezenkimal fenotip belirteci Vimentin, eksozom uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla M2 eksozom grubunda kuvvetli pozitif ifade göstermiştir. Literatüre dayanarak Kubelt vd. (2015) yaptıkları bir çalışmada, T98G glioblastoma hücrelerinin TMZ ile tedavi edilmesinin ardından EMT ile ilişkili genlerdeki fonksiyonel değişiklikleri araştırmışlar ve vimentin dahil diğer belirteçlerde (TWIST, SNAIL, GFAP) boyama bulgularını kanıtlamışlardır. Bu tez çalışmasında sunulan immüno Floresan bulguları ve Kubelt vd. (2015) çalışmasında kullanılan kontrol grubu sonuçları benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte glioblastomanın EMT durumuna ortamda bulunan polarize makrofaj eksozomlarının ciddi şekilde etki ettiği gösterilmiştir. M2 eksozomların varlığı U87-MG hücrelerinin malignitesine katkıda bulunurken, M1 eksozomların etkisinin metastazın azaltılmasına aracılık ettiği kanıtlanmıştır.

Tezin asıl amacı, makrofaj eksozomlarının glioblastoma hücre davranışlarını moleküler düzeyde araştırmak olduğundan, toplanan bu veriler ışığında gen ekspresyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.14.A’da EMT ilişkili gen ifadelerine göre, makrofaj eksozomlarının, U87-MG progresyonuna büyük ölçüde destek olduğu Vimentin genindeki anlamlı yükselişle anlaşılmıştır. Bu sonuçların literatür ile uyumlu olduğunu gösteren bir çalışmada (Li vd. 2021), M2-eksozomlarının A549 hücrelerinin göçünü desteklediğini, Vimentin protein ekspresyon seviyesini arttırdığını ve E-cadherin ekspresyonunu inhibe ederek kanser ilerlemesine aracılık ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte GFAP ekspresyonu için M1 eksozomlu U87-MG’lerin kontrol ile görece kuvvetli pozitif reaksiyon verdiği bulunmuştur. Wang vd. (2021) literatüre kazandırdıkları glioma ve eksozom çalışmalarında LPS ile indüksiyonun hem *in vivo* hem de *in vitro* artan GFAP

ekspresyonu ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Bu bilgiyi referans olarak astrosit aktivitesiyle yakından ilişkilendirilen GFAP yanıtı, M1 eksozomlarının katkısı ile ilişkilendirilmiştir.

EMT-ilişkili gen ekspresyonları için eş-kültürde verilen E-CAD ve N-CAD eksozom deneylerinin sonucunda ekspresyonu gözlenmediğinden epitel fenotipe denk gelen astrositik formu GFAP ve mezenkimal fenotip kayması Vimentin aracılığıyla değerlendirilebilmiştir. Şekil 5.14.B’de U87-MG hücrelerinin metastatik gen ifadesindeki değişikliklere bakıldığında MMP2 geni aracılığıyla M0 ve M2 eksozom indüklemesinin kontrol grubuna kıyasla kanser metastazına katkı sağladığı görülmüştür. Bu durum, Roomi vd. (2017) çalışmalarında belirtildiği gibi, T98G glioblastoma hücrelerinde TNF- α indüksiyonunu MMP2 üzerinde yukarı regülasyon etkisi gösterirken MMP9 üzerinde hafif bir etki göstermesi, IL-1 β indüksiyonunun MMP2’de hafif ekspresyona sebep olurken MMP9’u etkilememesi ve LPS’in inaktif MMP2 sekresyonunda azalma gösterirken MMP9 üzerinde bir etkisinin olmaması bu tez çalışmasıyla benzer sonuç göstermiştir. Bununla birlikte literatürde verilen bir diğer bilgide MMP9 geni, glioblastoma için aşırı ekspresyon gösterdiği (Xue vd. 2017). Bu durumda makrofaj eksozomlarının, glioblastoma hücrelerinin metastatik yolağında gidişatını değiştirdiği düşünülmektedir.

Hücrel ölümün kanser progresyonun değerlendirilmesinde önemli rolleri olduğu bilindiğinden detaylı tarama apoptoz/nekroz boyamasında tartışılmıştır. Şekil 5.15’te verilen apoptoz/nekroz görsellerinde, nekrotik ölüme kıyasla apoptotik ölümün baskın olduğu anlaşılmıştır. Apoxin yeşilin özellikle hücrelerin sitozolünde floresan verdiği, gözlemlenmiştir. Burada nekrotik hücre sayısı çok az olmakla birlikte M1 eksozomlu grupta görülmüştür ancak bu anlamlı bir fark olarak değerlendirilmemiştir. Kontrol dahil bütün gruplarda glioblastomanın apoptotik yolağı etkilediği tespit edilmiştir. Gen ekspresyon ve immüno floresan bulgularında apoptoz/nekroz açısından birtakım meydana gelen değişikliklerin hücre sayısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Son araştırmalar, eksozomların yara iyileşmesini artırmak için hücreden hücreye iletişime aracılık etmekte olduğu yönünde bilgiler sunmaktadır (Rani ve Ritter, 2016).

Eksozomların yara iyileşmesinde potansiyel kullanımına ilişkin mevcut verilerden referans alarak, kanser hücrelerinde oluşturulan yara alanlarının iyileşmesine etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda, glioblastoma hücrelerinde yara oluşumu sağlandıktan sonra hücre besiyeri içeriğinde makrofaj eksozomları uygulanmıştır. Elde edilen verilere (Şekil 5.16) göre, M2 makrofaj eksozomlarının ardından M0 eksozomlarının da yara kapanmasında oldukça etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçtan anlaşıldığı üzere, M2 eksozomların glioblastoma hücrelerinin migrasyonuna destek olarak metastazına ilişkin olumlu sonuç verdiği yorumlanmıştır. M2 eksozomlarının hücre migrasyonunu desteklediğini gösteren bir çalışmaya göre (Mi vd. 2020), M2 makrofajlardan türetilen eksozomların miR-26a'yı baskılayarak özafagus kanser hücrelerinin göçünü ve akciğer metastazını teşvik ettiği raporlanmıştır. Yapılan bu çalışmada M1 makrofaj eksozomları ile M2 eksozomları kıyaslanmış ve kanser hücre istilasında M2 eksozomların baskın olduğu sonucuna varılmıştır. Bir başka yayında M2 makrofaj eksozomlarının miR-21-5p ve miR-155-5p aracılığıyla kolorektal kanser hücrelerinde istilayı indükleyerek habis ilerlemede etkisi olduğu gösterilmiştir (Lan vd. 2019).

Nanoteknolojinin ilerleyişi ve eksozomların artan önemiyle birlikte ilaç yüklü eksozomlar geliştirilerek, tümör mikroçevresinde hücre aracılı ilaç dağıtımı için uygulanabilecek yeni araçlar temsil edilmektedir (Gentile ve Garcovich, 2019). Eksozomlar, nükleik asitleri, proteinleri ve metabolitleri içeren yüklerini kanser hücrelerine aktararak veya immünoterapötik hedefler için bir tuzak görevi görerek kemo-direnci teşvik edebilmektedir (Milman vd. 2019). Anti-kanser ilaç uygulamalarının direncini aşabilmek amacıyla eksozomlar terapötik hedefler için kullanıldığı bilinmektedir.

Bu tez çalışması doğrultusunda, glioblastomanın invazif doğasını hedefleyecek makrofaj eksozomları ile ilaç direncinin manipülasyon olasılığı tartışılmıştır. Anti-kanser ilaç olarak 5-FU kullanılmış olup, eksozom indüklü U87-MG hücrelerinin canlılıkları XTT testi ve morfolojik incelemeler ile sunulmuştur. İki ayrı zaman noktasında etkileri Şekil 5.17'de canlılık bakımından değerlendirilmiştir.

Eksozomların hedef hücrelerde otokrin ve parakrin sinyallemesine aracılık etme yeteneği,

doğal yapıları ve düşük immünojenisitetleri ile onları antikanser ilaçların tümörlere verilmesi için çekici bir araç haline getirdiği bilinmektedir (Milman vd. 2019). Preklinik açıdan kanser hücrelerinin makrofaj eksozomlarıyla indüklenmesi, kontrol grubuna göre 24 saatlik kültürde gözlemlendiği gibi ilaç uygulamasına rağmen kanser hücre canlılığına olumlu etki göstermiştir. Kontrol grubu ve M2 eksozom uygulaması hücre canlılığı artırırken, M0 ve M1 eksozom grubunda azalma gözlemlenmiştir. İlaç direnci mekanizması hakkında literatür bilgileri göz önünde bulundurulduğunda Li vd. (2020) yayınlarında, M2 fenotipli TAM'ler tarafından salgılanan eksozomal miR-365, pankreatik duktal adenokarsinomda ilaç direncine katkıda bulunarak kanseri teşvik edici bir rol oynadığı bildirilmiştir. Diğer bir yandan, eksozomlar ilaca karşı dirençten sorumlu fenotipi düzenleyerek duyarlılığı da destekleyebilir. İlaç direncini tersine çeviren bazı miRNA'ların raporlanmasına ilişkin bir çalışmada miR-7, TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen liganda dirençli glioblastoma hücrelerinde apoptozu eksozom bağımlı bir şekilde desteklediği bilinmektedir (Li vd. 2020).

Sonuç olarak, tez çalışması boyunca gerçekleştirilen deneylerde polarize edilmiş makrofaj hücre eksozomları, glioblastomanın *in vitro* progresyonunu önemli ölçüde değiştirmiştir. M2 eksozomlar, tümör-ilişkili makrofaj hücrelerinden köken aldığı davranışlar ile kanserin metastazını uyarak artırmıştır. M1 eksozomların ise pro-inflamatuar karakteri ve anti-tümörijenik özellikleri nedeniyle glioblastomanın invazyonunu bastırdığı yapılan analiz sonuçlarıyla doğrulanmıştır. M0 eksozomları, bulunduğu mikroçevre, konsantrasyon ve alıcı hücrenin fizyopatolojik sinyalleri tarafından etkilenecek M1 veya M2 gibi davranarak dualiteye sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Tüm veriler doğrultusunda, immunomodülatör veziküller olarak makrofaj eksozomlarının glioblastoma için önemi vurgulanmıştır.

Bu tez çalışmasının ileriki çalışmalara ilham olacak potansiyeli, makrofaj polarizasyonunun dinamik değişiklikleriyle ilgili araştırmalara zemin hazırlamasıdır. Ayrıca parental hücreden köken alan eksozomların, güncel terapötik stratejiler tasarlamak için çok önemli olduğu söylenilebilir.

KAYNAKLAR

- Ahmadipour, Y., Gembruch, O., Pierscianek, D., Sure, U., & Jabbarli, R. (2020). Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival?. *Neuro-Chirurgie*, 66(3), 150–154.
- Ali, H., Dong, S. X. M., Gajanayaka, N., Cassol, E., Angel, J. B., & Kumar, A. (2021). Selective induction of cell death in human M1 macrophages by smac mimetics is mediated by cIAP-2 and RIPK-1/3 through the activation of mTORC. *The Journal of Immunology*, 207(9), 2359-2373.
- Benecke, L., Coray, M., Umbricht, S., Chiang, D., Figueiró, F., & Muller, L. (2021). Exosomes: Small EVs with Large Immunomodulatory Effect in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3600.
- Birzu, C., French, P., Caccese, M., Cerretti, G., Idbaih, A., Zagonel, V., & Lombardi, G. (2020). Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives. *Cancers*, 13(1), 47.
- Boccellato, C., & Rehm, M. (2022). Glioblastoma, from disease understanding towards optimal cell-based in vitro models. *Cellular Oncology*, 1-15.
- Boriachek, K., Islam, M. N., Möller, A., Salomon, C., Nguyen, N. T., Hossain, M. S. A., ... & Shiddiky, M. J. (2018). Biological functions and current advances in isolation and detection strategies for exosome nanovesicles. *Small*, 14(6), 1702153.
- Breznik, B., Ko, MW., Tse, C. et al. Infiltrating natural killer cells bind, lyse and increase chemotherapy efficacy in glioblastoma stem-like tumorspheres. *Commun Biol* 5, 436 (2022).
- Brinton, L. T., Sloane, H. S., Kester, M., & Kelly, K. A. (2015). Formation and role of exosomes in cancer. *Cellular and molecular life sciences*, 72(4), 659-671.
- Burkholder, B., Huang, R. Y., Burgess, R., Luo, S., Jones, V. S., Zhang, W., ... & Huang, R. P. (2014). Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1845(2), 182-201.
- Candolfi, M., Curtin, J. F., Yagiz, K., Assi, H., Wibowo, M. K., Alzadeh, G. E., Foulad, D., Muhammad, A. G., Salehi, S., Keech, N., Puntel, M., Liu, C., Sanderson, N. R., Kroeger, K. M., Dunn, R., Martins, G., Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2011). B Cells Are Critical to T-cell-Mediated Antitumor Immunity Induced by a Combined Immune-Stimulatory/Conditionally Cytotoxic Therapy for Glioblastoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 13(10), 947-960.
- Canning, P., Alwan, A., Khalil, F., Zhang, Y., & Opara, E. C. (2022). Perspectives and Challenges on the Potential Use of Exosomes in Bioartificial Pancreas Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 50(10), 1177-1186.

- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *immunity*, 39(1), 1-10.
- Chen, Z., & Hambardzumyan, D. (2018). Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Chuang, H. Y., Su, Y. K., Liu, H. W., Chen, C. H., Chiu, S. C., Cho, D. Y., ... & Lin, C. M. (2019). Preclinical evidence of STAT3 inhibitor pacritinib overcoming temozolomide resistance via downregulating miR- 21-enriched exosomes from M2 glioblastoma-associated macrophages. *Journal of clinical medicine*, 8(7), 959.
- Costa, A. C., Santos, J. M., da Costa, R. M. G., & Medeiros, R. (2021). Impact of immune cells on the hallmarks of cancer: A literature review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 168, 103541.
- del Burgo, L. S., Hernández, R. M., Orive, G., & Pedraz, J. L. (2014). Nanotherapeutic approaches for brain cancer management. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(5), e905-e919.
- Derkus, B., Isik, M., Eylem, C. C., Ergin, I., Camci, C. B., Bilgin, S., ... & Emregul, E. (2022). Xenogenic Neural Stem Cell-Derived Extracellular Nanovesicles Modulate Human Mesenchymal Stem Cell Fate and Reconstruct Metabolomic Structure. *Advanced Biology*, 6(6), 2101317.
- Diori Karidio, I., & Sanlier, S. H. (2021). Reviewing cancer's biology: An eclectic approach. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 33(1), 1-17.
- Doshi, N., & Mitragotri, S. (2010). Macrophages recognize size and shape of their targets. *PloS one*, 5(4), e10051
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11-22.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, 3(11), 991-998.
- Ebnoether, E., & Muller, L. (2020). Diagnostic and therapeutic applications of exosomes in cancer with a special focus on head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4344.
- Eylem, C. C., Yilmaz, M., Derkus, B., Nemutlu, E., Camci, C. B., Yilmaz, E., ... & Emregul, E. (2020). Untargeted multi-omic analysis of colorectal cancer-specific exosomes reveals joint pathways of colorectal cancer in both clinical samples and cell culture. *Cancer letters*, 469, 186-194.
- Fan K. (1998). Regulatory effects of lipopolysaccharide in murine macrophage proliferation. *World journal of gastroenterology*, 4(2), 137– 139.
- Gabrusiewicz, K., Li, X., Wei, J., Hashimoto, Y., Marisetty, A. L., Ott, M., ... & Heimberger, A. B. (2018). Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce

- M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. *Oncoimmunology*, 7(4), e1412909.
- Gao, D., & Jiang, L. (2018). Exosomes in cancer therapy: a novel experimental strategy. *American journal of cancer research*, 8(11), 2165.
- Gentile, P., & Garcovich, S. (2019). Concise review: adipose-derived stem cells (ASCs) and adipocyte-secreted exosomal microRNA (A-SE-miR) modulate cancer growth and promote wound repair. *Journal of clinical medicine*, 8(6), 855.
- Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(96), 20140065.
- Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW. Microglia in Brain Tumors. *Glia* (2002) 40:252–9.
- Grégoire, H., Roncali, L., Rousseau, A., Chérel, M., Delneste, Y., Jeannin, P., Hindré, F., & Garcion, E. (2020). Targeting Tumor Associated Macrophages to Overcome Conventional Treatment Resistance in Glioblastoma. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
- Guan, H., Peng, R., Fang, F., Mao, L., Chen, Z., Yang, S., ... & Chen, M. (2020). Tumor-associated macrophages promote prostate cancer progression via exosome-mediated miR-95 transfer. *Journal of Cellular Physiology*, 235(12), 9729-9742.
- 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.
- Harrington, K. J. (2016). The biology of cancer. *Medicine*, 44(1), 1-5.
- Harty, B. J., & Donnelly, W. H. (1975). The production of cell aggregates in vitro by polycarbonate substrates. *Experimental Cell Research*, 90(2), 444-448.
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127-129.
- Hazrati, A., Soudi, S., Malekpour, K., Mahmoudi, M., Rahimi, A., Hashemi, S. M., & Varma, R. S. (2022). Immune cells-derived exosomes function as a double-edged sword: role in disease progression and their therapeutic applications. *Biomarker Research*, 10(1), 30.
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193-208.
- Huse, J. T., & Holland, E. C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature reviews cancer*, 10(5), 319-331.
- Jafari, D., Shajari, S., Jafari, R., Mardi, N., Gomari, H., Ganji, F., Moghadam, M. F., & Samadikuchaksaraei, A. (2020). Designer Exosomes: A New Platform for

Biotechnology Therapeutics. *Biodrugs*, 34(5), 567- 586.

- Jahangiri, B., Khalaj-Kondori, M., Asadollahi, E., Dizaj, L. P., & Sadeghizadeh, M. (2022). MSC-Derived exosomes suppress colorectal cancer cell proliferation and metastasis via miR-100/mTOR/miR-143 pathway. *International Journal of Pharmaceutics*, 627, 122214.
- Jiang, Y., & Uhrbom, L. (2012). On the origin of glioma. *Upsala journal of medical sciences*, 117(2), 113–121.
- Joshi, D. M., Rana, N. K., & Misra, V. (2010, May). Classification of brain cancer using artificial neural network. In *2010 2nd international conference on electronic computer technology* (pp. 112-116). IEEE.
- Ju, Y., Bai, H., Ren, L., & Zhang, L. (2021). The role of exosome and the ESCRT pathway on enveloped virus infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9060.
- Jung, C. S., Foerch, C., Schänzer, A., Heck, A., Plate, K. H., Seifert, V., ... & Sitzer, M. (2007). Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*, 130(12), 3336-3341.
- Kandimalla, R., Saeed, M., Tyagi, N., Gupta, R. C., & Aqil, F. (2022). Exosome-based Approaches in the Management of Alzheimer's Disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 104974.
- Kaushik, N. K., Kaushik, N., Adhikari, M., Ghimire, B., Linh, N. N., Mishra, Y. K., ... & Choi, E. H. (2019). Preventing the solid cancer progression via release of anticancer-cytokines in co-culture with cold plasma-stimulated macrophages. *Cancers*, 11(6), 842.
- Kim, S. H., Bianco, N., Menon, R., Lechman, E. R., Shufesky, W. J., Morelli, A. E., & Robbins, P. D. (2006). Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Molecular therapy*, 13(2), 289-300.
- Kubelt, C., Hattermann, K., Sebens, S., Mehdorn, H. M., & Held-Feindt, J. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas. *International journal of oncology*, 46(6), 2515- 2525.
- Lambrou, G. I. (2022). Epigenetics and personalized medicine of brain cancer. In *Epigenetics in Precision Medicine* (pp. 281-325). Academic Press.
- Lan, J., Sun, L., Xu, F., Liu, L., Hu, F., Song, D., ... & Wang, G. (2019). M2 macrophage-derived exosomes promote cell migration and invasion in colon cancer. *Cancer research*, 79(1), 146-158.
- Lee, D. S., Rojas, O. L., & Gommerman, J. L. (2021). B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nature reviews Drug discovery*, 20(3), 179-199.
- Lendeckel, U., Venz, S., & Wolke, C. (2022). Macrophages: shapes and functions.

ChemTexts, 8(2), 12.

- Li, D., & Wu, N. (2022). Mechanism and application of exosomes in the wound healing process in diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 109882.
- Li, R., Li, H., Yan, W., Yang, P., Bao, Z., Zhang, C., ... & You, Y. (2015). Genetic and clinical characteristics of primary and secondary glioblastoma is associated with differential molecular subtype distribution. *Oncotarget*, 6(9), 7318.
- Li, S., Wang, A., Jiang, W., & Guan, Z. (2008). Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC cancer*, 8, 1-9
- Li, S., Yi, M., Dong, B., Jiao, Y., Luo, S., & Wu, K. (2020). The roles of exosomes in drug resistance and its therapeutic application. *Clinical and cancer Translational Medicine*, 10(8), e257.
- Li, X., Chen, Z., Ni, Y., Bian, C., Huang, J., Chen, L., Xie, X., & Wang, J. (2021). Tumor-associated macrophages secrete exosomal miR-155 and miR-196a-5p to promote metastasis of non-small-cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 10(3), 1338-1354.
- Lichterman, J. N., & Reddy, S. M. (2021). Mast cells: A new frontier for cancer immunotherapy. *Cells*, 10(6), 1270.
- Lin, Y., Lu, Y., & Li, X. (2020). Biological characteristics of exosomes and genetically engineered exosomes for the targeted delivery of therapeutic agents. *Journal of Drug Targeting*, 28(2), 129-141.
- Lin, Y., Wei, K., Chen, P., Lim, M., & Hwang, T. (2021). Roles of Neutrophils in Glioma and Brain Metastases. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Liu, X., Wang, L., Zhao, S., Ji, X., Luo, Y., & Ling, F. (2011). β -Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. *Medical Oncology*, 28, 608-614.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803-820
- Ma, J., Chen, C. C., & Li, M. (2021). Macrophages/Microglia in the Glioblastoma Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11).
- Maia, J., Caja, S., Strano Moraes, M. C., Couto, N., & Costa-Silva, B. (2018). Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 18.
- Maimela, N. R., Liu, S., & Zhang, Y. (2019). Fates of CD8⁺ T cells in tumor microenvironment. *Computational and structural biotechnology journal*, 17, 1-13.
- Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., & Jiang, W. G. (2013). Cancer invasion

- and metastasis: molecular and cellular perspective. In *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience.
- Matsushita, T. (2019). Regulatory and effector B cells: Friends or foes?. *Journal of dermatological science*, 93(1), 2-7.
- Mehdizadeh, S., Bayatipoor, H., Pashangzadeh, S., Jafarpour, R., Shojaei, Z., & Motalebnezhad, M. (2021). Immune checkpoints and cancer development: Therapeutic implications and future directions. *Pathology- Research and Practice*, 223, 153485.
- Meng, F., & Lowell, C. A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of experimental medicine*, 185(9), 1661–1670.
- Mi, X., Xu, R., Hong, S., Xu, T., Zhang, W., & Liu, M. (2020). M2 macrophage-derived exosomal lncRNA AFAP1-AS1 and MicroRNA-26a affect cell migration and metastasis in esophageal cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 22, 779-790.
- Milman, N., Ginini, L., & Gil, Z. (2019). Exosomes and their role in tumorigenesis and anticancer drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 45, 1-12.
- Nabors, L. B., Portnow, J., Ahluwalia, M., Baehring, J., Brem, H., Brem, S., ... & Darlow, S. D. (2020). Central nervous system cancers, version 3.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(11), 1537-1570.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*, 170(5), 1445- 1453.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma Definition of Primary and Secondary Glioblastomas. *Clinical cancer research*, 19(4), 764-772.
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages. *Frontiers in immunology*, 10, 1084.
- Osborn, A. G., Louis, D. N., Poussaint, T. Y., Linscott, L. L., & Salzman, K. L. (2022). The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. *American Journal of Neuroradiology*, 43(7), 928- 937.
- Ou, Z., Wang, Y., Liu, L., Li, L., Yeh, S., Qi, L., & Chang, C. (2015). Tumor microenvironment B cells increase bladder cancer metastasis via modulation of the IL-8/androgen receptor (AR)/MMPs signals. *Oncotarget*, 6(28), 26065.
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self?. *Annual review of immunology*, 21, 807.

- Pedrote, M. M., Motta, M. F., Ferretti, D. S., Norberto, D. R., Spohr, L. S., Lima, R. S., Gratton, E., & Silva, J. L. (2020). Oncogenic Gain of Function in Glioblastoma Is Linked to Mutant p53 Amyloid Oligomers. *IScience*, 23(2).
- Prionisti, I., Bühler, L. H., Walker, P. R., & Jolivet, R. B. (2019). Harnessing microglia and macrophages for the treatment of glioblastoma. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 506.
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39–51.
- Ramachandran, R. K., Sørensen, M. D., Aaberg-Jessen, C., Hermansen, S. K., & Kristensen, B. W. (2017). Expression and prognostic impact of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in astrocytomas. *PLoS One*, 12(2), e0172234.
- Rani, S., & Ritter, T. (2016). The exosome-A naturally secreted nanoparticle and its application to wound healing. *Advanced materials*, 28(27), 5542- 5552.
- Rezaie, J., Fegghi, M. & Etemadi, T. A review on exosomes application in clinical trials: perspective, questions, and challenges. *Cell Commun Signal* 20, 145 (2022)
- Robe, A. J., & Hol, E. M. (2019). Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. *Glia*, 67(8), 1417-1433.
- Roda, E., & Bottone, M. G. (2022). Editorial: Brain Cancers: New Perspectives and Therapies. *Frontiers in Neuroscience*.
- Roomi, M. W., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2017). Modulation of MMP-2 and MMP-9 secretion by cytokines, inducers and inhibitors in human glioblastoma T-98G cells. *Oncology reports*, 37(3), 1907-1913.
- Scherer, H. J. (1940). A critical review: the pathology of cerebral gliomas. *Journal of neurology and psychiatry*, 3(2), 147.
- Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsins, N., & Neamati, N. (2018). Current challenges and opportunities in treating glioblastoma. *Pharmacological reviews*, 70(3), 412-445.
- Simon, T., Jackson, E., & Giamas, G. (2020). Breaking through the glioblastoma micro-environment via extracellular vesicles. *Oncogene*, 39(23), 4477-4490.
- Sinha, T. (2018). Tumors: Benign and malignant. *Cancer Therapy & Oncology International Journal*, 10(3), 52-54.
- Srivastava, S., Jackson, C., Kim, T., Choi, J., & Lim, M. (2019). A characterization of dendritic cells and their role in immunotherapy in glioblastoma: from preclinical studies to clinical trials. *Cancers*, 11(4), 537.
- Stoyanov, G. S., & Dzhenkov, D. L. (2018). On the concepts and history of glioblastoma multiforme—morphology, genetics and epigenetics. *Folia Med*, 60(1), 48-66.
- Tai, L., Chen, C., Hsieh, T., & Shen, L. (2018). Exosomes in cancer development and

- clinical applications. *Cancer Science*, 109(8), 2364-2374.
- Terrén, I., & Borrego, F. (2022). Role of NK Cells in Tumor Progression. *Experientia supplementum* (2012), 113, 169–187.
- Treffers, L. W., Hiemstra, I. H., Kuijpers, T. W., Van den Berg, T. K., & Matlung, H. L. (2016). Neutrophils in cancer. *Immunological reviews*, 273(1), 312-328.
- Van Niel, G., d'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(4), 213-228.
- Virchow, R. (1863). *Die krankhaften Geschwülste: Dreißig Vorlesungen* (Vol. 1). Hirschwald.
- 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 (BBA)-General Subjects*, 1820(7), 940-948.
- Wang, J., Tang, W., Yang, M., Yin, Y., Li, H., Hu, F., ... & Wang, Y. (2021). Inflammatory tumor microenvironment responsive neutrophil exosomes based drug delivery system for targeted glioma therapy. *Biomaterials*, 273, 120784.
- Wang, Y., Zhao, M., Liu, S., Guo, J., Lu, Y., Cheng, J., & Liu, J. (2020). Macrophage-derived extracellular vesicles: Diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell death & disease*, 11(10), 1-18
- Wu, L., Saxena, S., & Singh, R. K. (2020). Neutrophils in the tumor microenvironment. *Tumor Microenvironment*, 1-20.
- Wu, S. Y., Fu, T., Jiang, Y. Z., & Shao, Z. M. (2020). Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Molecular cancer*, 19(1), 1-26.
- Xing, Y., Sun, X., Dou, Y., Wang, M., Zhao, Y., Yang, Q., & Zhao, Y. (2021). The Immuno-Modulation Effect of Macrophage-Derived Extracellular Vesicles in Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Xu, H., Liao, C., Liang, S., & Ye, B. C. (2021). A novel peptide-equipped exosomes platform for delivery of antisense oligonucleotides. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(9), 10760-10767.
- Xu, J., Zhang, J., Zhang, Z., Gao, Z., Qi, Y., Qiu, W., ... & Li, G. (2021). Hypoxic glioma-derived exosomes promote M2-like macrophage polarization by enhancing autophagy induction. *Cell death & disease*, 12(4), 1-16.
- Xue, Q., Cao, L., Chen, X. Y., Zhao, J., Gao, L., Li, S. Z., & Fei, Z. (2017). High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is associated with patient survival rates. *Oncology letters*, 13(3), 1325–1330.
- Yamazoe, H., Hagihara, Y., & Kobayashi, H. (2016). Multicomponent Coculture System of Makrof Tissue engineering. Part C, Methods, 22(1), 20–29.

- Yan, T., Wang, K., Li, J., Hu, H., Yang, H., Cai, M., ... & Liu, H. (2022). Suppression of the hyaluronic acid pathway induces M1 macrophages polarization via STAT1 in glioblastoma. *Cell death discovery*, 8(1), 1-13.
- Yan, W., & Jiang, S. (2020). Immune Cell-Derived Exosomes in the Cancer- Immunity Cycle. *Trends in cancer*, 6(6), 506–517.
- Yao, D., Dai, C., & Peng, S. (2011). Mechanism of the mesenchymal– epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Molecular cancer research*, 9(12), 1608-1620.
- Yoo, J., Jung, Y., Char, K., & Jang, Y. (2022). Advances in cell coculture membranes recapitulating in vivo microenvironments. *Trends in Biotechnology*.
- Yu, H., Kortylewski, M., & Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews immunology*, 7(1), 41-51.
- Yu, T., Gan, S., Zhu, Q. et al. Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24. *Nat Commun* 10, 4353 (2019).
- Yu, W., Hurley, J., Roberts, D., Chakraborty, S. K., Enderle, D., Noerholm, M., Breakefield, X. O., & Skog, J. K. (2021). Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 32(4), 466–477.
- Yuan, D., Zhao, Y., Banks, W. A., Bullock, K. M., Haney, M., Batrakova, E., & Kabanov, A. V. (2017). Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials*, 142, 1– 12.
- Zhang, C., Ji, Q., Yang, Y., Li, Q., & Wang, Z. (2018). Exosome: Function and role in cancer metastasis and drug resistance. *Technology in cancer research & treatment*, 17, 1533033818763450.
- Zhang, C., Ji, Q., Yang, Y., Li, Q., & Wang, Z. (2018). Exosome: Function and role in cancer metastasis and drug resistance. *Technology in cancer research & treatment*, 17, 1533033818763450.
- Zhang, R., Ji, J., Blaženović, I., Pi, F., Wang, T., Zhang, Y., & Sun, X. (2018). Investigation into Cellular Glycolysis for the Mechanism Study of Energy Metabolism Disorder Triggered by Lipopolysaccharide. *Toxins*, 10(11).
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International journal of nanomedicine*, 15, 6917
- Zhang, Y., Dube, C., Gibert Jr, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., ... & Abounader, R. (2018). The p53 pathway in glioblastoma. *Cancers*, 10(9), 297.
- Zhao, K., Li, X., Shi, Y., Lu, Y., Qiu, P., Deng, Z., ... & Wang, J. (2022). Exosomes in the tumor microenvironment of cholangiocarcinoma: current status and future perspectives. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 1- 14.

- Zhao, Y., Liu, T., & Zhou, M. (2022). Immune-Cell-Derived Exosomes for Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 19(9), 3042-3056.
- Zhou, Y., Li, J., Han, B., Zhong, R., & Zhong, H. (2020). Schwann cells promote lung cancer proliferation by promoting the M2 polarization of macrophages. *Cellular Immunology*, 357, 104211.
- Zhu, J., Liu, B., Wang, Z., Wang, D., Ni, H., Zhang, L., & Wang, Y. (2019). Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation. *Theranostics*, 9(23), 6901.
- Zhu, X., Guo, Q., Zou, J., Wang, B., Zhang, Z., Wei, R., Zhao, L., Zhang, Y., Chu, C., Fu, X., & Li, X. (2021). MiR-19a-3p Suppresses M1 Macrophage Polarization by Inhibiting STAT1/IRF1 Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- Zhu, X., Shen, H., Yin, X., Yang, M., Wei, H., Chen, Q., ... & Li, Y. (2019). Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 1-14