



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMOKSİK VE HİPOKSİK KOŞULLARDA
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİNDE VE
EKSOZOMLARINDA PARAOKSONAZ ENZİM AİLESİ
İLE PI3K/AKT SİNYAL YOLAĞI İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Tuğba Kevser UYSAL

KANSER BİYOLJİSİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2023

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMOKSİK VE HİPOKSİK KOŞULLARDA
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİNDE VE
EKSOZOMLARINDA PARAOKSONAZ ENZİM AİLESİ
İLE PI3K/AKT SİNYAL YOLAĞI İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Tuğba Kevser UYSAL

KANSER BİYOLOJİSİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, yabancı kaynaklardan alınan tüm bilgilerin tarafımdan çevrildiğini, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

15/06/2023

Tuğba Kevser UYSAL



Biricik oğlum Utku Kerem'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tüm lisansüstü eğitim sürecim boyunca deneyimlerinden yararlandığım, öneri ve eleştirileri ile beni hep destekleyen, eğitici ve yönlendirici olarak bilgi birikimimi zenginleştiren, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Eğitimim süresince her türlü imkanı sağlamaya çalışarak desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Hocamız Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN'a, her aşamada bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Anabilim Dalımızın Öğretim Üyesi Hocam Sayın Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e, çalışmamda kullandığım hücre hattı ile ilgili nazik desteğinden dolayı Prof. Dr. Erkan YURTCU ve Dr. İbrahim KARAKUŞ'a teşekkürü borç bilirim. Tüm lisansüstü öğrenimim boyunca acısıyla tatlısıyla hep yanımda olan her türlü yardımı sağlayan Anabilim Dalımızın çiçeği burnunda öğretim üyeleri ve arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Beyza Ecem ÖZ BEDİR'e ve Dr. Öğr. Üyesi Emine TERZİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda büyük emeği geçen, her zaman yanımda olan, zor zamanlarda bile en büyük destekçim, mutluluk ve dayanma sebebim canım arkadaşım Arş. Gör. Elif ERCAN'a her güzel anı için sonsuz teşekkür ederim. Doktora eğitimim ve tez dönemi boyunca birlikte yol aldığımız ve desteğini hep hissettiğim Dr. Muhammet ÖRNEK'e, her türlü anımıza şahit olarak hoşgörü ve desteklerini hiç esirgemeyen 208 nolu odanın sakinleri tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında benim için en hayırlısını isteyen ve her daim desteklerini esirgemeyen sevgili annem Zeliha ARKAN ve babam Selami ARKAN'a anlayış, destek, güven ve sevgi ile dayanağım oldukları ve özellikle bu tez sürecinde göstermiş oldukları fedakarlık ve sabır için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca canım kardeşlerime her türlü destekleri ile hayatıma renk kattıkları için çok teşekkür ederim. Bu uzun ve zorlu akademik süreçte her anıma ortak olan eşim Uğur UYSAL'a ve son olarak da adeta tezimle birlikte büyüyen yaşam enerjim, umut etme sebebim, sevgisinden güç aldığım canım oğlum Utku Kerem UYSAL'a vaktimizden ödün verdiği, çalışmalarına anlayış gösterdiği ve zaman zaman deneylerime gözlemci olarak sorularıyla yüzümü güldürdüğü için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hepatosellüler Karsinom.....	4
2.1.1. Hepatosellüler Karsinomun Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	7
2.1.2. Hepatosellüler Karsinomun Histolojik Sınıflandırılması ve Evrelendirilmesi	9
2.1.3. Hepatosellüler Karsinomun Klinik Bulguları	10
2.1.4. Hepatosellüler Karsinomun Teşhisi	11
2.1.5. Hepatosellüler Karsinomun Tedavisi	12
2.1.6. Hepatosellüler Karsinomda Sağkalım ve Metastaz.....	14
2.2. Hipoksi	14
2.2.1. HIF Sinyal Yolağı.....	15
2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Oksidatif Stres.....	18
2.4. Paraoksonaz Enzim Ailesi.....	20
2.4.1. Paraoksonaz Enzim Ailesi Aktiviteleri.....	22
2.4.2. PON1 Enzimi	25
2.4.3. PON2 Enzimi	26
2.4.4. PON3 Enzimi	26
2.4.5. PON Enzim Ailesi ve Kanser.....	27

2.5. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı	27
2.5.1. Akt Proteini	29
2.5.2. mTOR Proteini	30
2.6. Sıvı Biyopsi	31
2.7. Ekstrasellüler Veziküller	32
2.7.1. Eksozomlar.....	33
2.7.2. Eksozom Biyogenez ve Salınması	35
2.7.3. Eksozom ve Kansere İlişkisi.....	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Antikorlar	39
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	41
3.1.3. Çalışmada Hazırlanan Çözeltiler.....	42
3.2. Yöntem	43
3.2.1. Hücre Kültürü.....	44
3.2.2. Hipoksik Ortam Oluşturulması ve Hipoksinin Doğrulanması	47
3.2.3. Hücre Hatlarından Eksozom Eldesi.....	53
3.2.4. Eksozom Karakterizasyonu.....	56
3.2.5. Paraoksonaz Enzim Ailesi Protein Düzeylerinin ve Aktivitesinin Belirlenmesi	58
3.2.6. PI3K/Akt Sinyal Yolağı Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	60
3.2.7. İstatistiksel Analiz	63
4. BULGULAR.....	64
4.1. HepG2 Hücre Hattının İverted Mikroskop Görüntüleri.....	64
4.2. HepG2 Hücre Hattı için Uygun Hipoksi Maruziyet Süresinin Belirlenmesi ve HIF-1 α Düzeylerine İlişkin Bulgular	64
4.3. HepG2 Hücre Hattından İzole Edilen Eksozomların Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular	67

4.4. PON1, PON2 ve PON3 Proteinlerinin Western Blot Bulguları.....	70
4.5. Paraoksonaz ve Laktonaz Aktivitesine İlişkin Bulgular	71
4.6. PI3K/Akt Sinyal Yolağı Proteinleri olan Akt ve mTOR Proteinlerinin Western Blot Bulguları	73
4.7. Protein Verilerinin Korelasyon Analizine İlişkin Bulgular	79
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
7. KAYNAKLAR	95
8. EKLER.....	116
EK-1. Özgeçmiş	116

ÖZET

Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Hepatosellüler Karsinom Hücrelerinde ve Eksozomlarında Paraoksonaz Enzim Ailesi ile PI3K/Akt Sinyal Yolağı İlişkisinin İncelenmesi

Hepatosellüler karsinom (HCC), hipoksik tümör mikroçevresi ve oksidatif stres ile karakterize edilen, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Enzimatik bir antioksidan olan paraoksonazın (PON) (EC 3.1.1.2), hücreleri oksidatif stresten koruyarak, apoptozun engellenmesi ve kanser hücresinin sağkalımında rol oynadığı düşünülmektedir. ROS detoksifikasyonunda, redoks homeostazında ve PON düzenlenmesinde Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağı etkilidir. Sinyal iletimine aracılık eden eksozomlar karsinogenez süreciyle de yakından ilişkilidir. Non-invaziv olarak elde edilen eksozom içeriklerinin, erken tarama, erken tanı, terapötik etkilerin izlenmesi ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılabilirliği son yıllarda dikkat çekmektedir. Hipoksi ve oksidatif stres koşullarında, eksozom salınımı artmakta ve eksozom içeriği değişmektedir. Çalışmamızın amacı, normoksik ve hipoksik koşullarda hepatosellüler karsinom hücre hattında (HepG2) ve eksozomlarında, PON enzim ailesi ile PI3K/Akt sinyal yolağı proteinlerinin ilişkisini belirlemektir.

Çalışmamızda, MACS sistemiyle HepG2 hücre hattı eksozomları izole edilerek Bradford, SEM ve NTA yöntemleriyle karakterize edilmiştir. HepG2 hücre hattı için uygun hipoksi maruziyet süresinin belirlenmesi adına farklı hipoksik zaman dilimlerinde (2, 4, 6, 12 ve 24 saatler) HIF-1 α protein seviyeleri western blot ve ELISA kullanılarak tespit edilmiştir. Hem normoksik hem de uygun süredeki hipoksik koşullarda çoğaltılan HepG2 hücre hattından hücre ve eksozom lizatları elde edilmiştir. Paraoksonaz ve laktonaz enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Ayrıca PON enzim ailesi (PON1, PON2, PON3) ve PI3K/Akt sinyal yolağı proteinleri (Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR) western blot ile analiz edilmiştir.

Çalışmamız sonucunda HepG2 hücre hattı için uygun hipoksi maruziyet süresi 4 saat olarak belirlenmiştir. Söz konusu HepG2 hücre hattından eksozomlar başarılı bir şekilde izole edilmiştir. Normoksik koşullara kıyasla hipoksik koşullarda,

PON enzim ailesi (PON1, PON2, PON3) protein düzeylerinde anlamlı bir artış olmasına rağmen, paraoksonaz ve laktonaz enzim aktivitelerinde azalma tespit edilmiştir ($p<0.05$). Hipoksik koşullar; Akt, p-Akt, mTOR ve p-mTOR düzeylerinde, HepG2 hücrelerinde artışa sebep olurken, eksozomlarında azalmaya sebep olmuştur.

Bu sonuçlara göre; hipoksik koşullarda PON enzim aktivite azalmasının HCC'nin karsinogenez sürecine katkı sağladığı gösterilmiştir. PON enzimlerinin ekspresyon artışının da onkogen gibi davranarak PI3K/Akt sinyal yolağının aktifleşmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. PI3K/Akt ve PON arasındaki bu ilişkide eksozomların da rol oynadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Eksozom, Hepatosellüler karsinom, Hipoksi, Paraoksonaz, PI3K/Akt sinyal yolağı.

ABSTRACT

An investigation of the relationship between Paraoxonase Enzyme Family and PI3K/Akt Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma Cells and Their Exosomes under Normoxic and Hypoxic Conditions

Hepatocellular carcinoma (HCC), characterized by hypoxic tumor microenvironment and oxidative stress, is the one of the leading cause of cancer deaths worldwide. Paraoxonase (PON) (EC 3.1.1.2) is an enzymatic antioxidant and plays a role in protecting cells from oxidative stress. The PON enzyme family is associated with important mechanism such as inhibition of apoptosis and cancer cell survival during carcinogenesis. The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway is effective in ROS detoxification, redox homeostasis and PON regulation. Exosomes that mediate signal transduction are also closely related to the carcinogenesis process. The use of non-invasively obtained exosome contents for early screening, early diagnosis, monitoring therapeutic effects and detecting drug resistance has attracted attention recently. Under hypoxia and oxidative stress conditions, exosome release increases and exosome content changes. The aim of our study is to determine the relationship between PON enzyme family and the PI3K/Akt signaling pathway proteins in hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) and exosomes under normoxic and hypoxic conditions.

To this end, we isolated exosomes using MACS system and characterized exosomes using Bradford, SEM, and NTA analyzes in the HepG2 cell line. HIF-1 α protein levels were determined by ELISA assay and western blot under both normoxic and hypoxic (2, 4, 6, 12, and 24 hours) conditions to determine the appropriate hypoxia exposure time for the HepG2 cell line. Cell and exosome lysates were obtained from HepG2 cells cultured under these two conditions. The levels of paraoxonase and lactonase enzymes were measured spectrophotometrically. In addition, the enzyme family PON (PON1, PON2, PON3) and the proteins of the PI3K/Akt pathway (Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR) were analyzed by western blot.

Based on the results, we suggest an appropriate hypoxia exposure time of 4 hours for the HepG2 cell line. In addition, our results show that exosomes were successfully isolated from the HepG2 cell line. Although there was a significant increase in protein levels of the PON enzyme family (PON1, PON2, PON3) under hypoxic conditions compared to normoxic conditions, a decrease in paraoxonase and lactonase enzyme activities was observed ($p < 0.05$). While hypoxic conditions increased Akt, p-Akt, mTOR and p-mTOR levels in HepG2 cells, it caused a decrease in exosomes.

Our results suggest that decreased PON enzyme activity under hypoxic conditions has been shown to contribute to the carcinogenesis process of HCC. The increased expression levels of PON is thought to be involved in activating the PI3K/Akt signalling pathway by acting as an oncogene. In this study the results of exosomes status was also crucial to play a role in the relationship between PI3K/Akt and PON.

Keywords: Exosome, Hepatocellular carcinoma, Hypoxia, Paraoxonase, PI3K/Akt pathway.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
α	: Alfa
β	: Beta
g	: Gram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
pH	: Potansiyel Hidrojen
μ L	: Mikrolitre
U	: Enzim Ünitesi
4E-BP	: Başlatıcı Faktörü 4E-Bağlayıcı Protein
ADM	: Adrenomedullin
AFP	: Alfa-Fetoprotein
AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
Akt	: Protein Kinaz-B
Alix	: Apoptoz Bağlantılı Gen 2-Etkileşimli Protein X
ALP	: Alkalen Fosfataz
Apo	: Apolipoprotein
BCLC	: Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri
BSA	: Sığır Serum Albümin
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CAT	: Katalitik Alt Birim
cfDNA	: cell free DNA
CIN	: Servikal İntraepitelyal Neoplazi
C-MYC	: Miyelositomatöz Virüsü Onkogen Hücresel Homoloğu
CRP	: C-Reaktif Protein
CTC	: Dolaşan Tümör Hücreleri
DHC	: Dihidroksükumarin

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPBS	: Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
ECL	: Gelişmiş Kemilüminesans
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
eIF4E	: Ökaryotik Başlatma Faktörü 4E
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
EPO	: Eritropoetin
ER	: Endoplazmik Retikulum
ESCRT	: Taşıma için Gerekli olan Endozomal Sıralama Kompleksi
ESE	: Early-Sorting Endozom
EV	: Ekstrasellüler Vezikül
FBS	: Fetal Sığır Serum
FIB-SEM	: Odaklanmış İyon Demeti Taramalı Elektron Mikroskobu
FIH	: HIF İnhibe Edici Faktör
FoxO	: Forkhead Box O
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
GLUT	: Glukoz Taşıyıcı
GPCR	: G Protein-Bağlı Reseptör
GSK	: Glikojen Sentaz Kinaz
GTP	: Guanozin Trifosfat
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
HCV	: Hepatit C Virüsü
Hcy	: Homosistein
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HIF	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
HK	: Hekzokinaz
HRE	: Hipoksi Yanıt Elemanı

HRP	: Horseradish Peroksidaz
HSC	: Hepatik Stellat Hücre
HSP	: Isı Şok Proteinleri
ID	: DNA Bağlayıcı Protein İnhibitörü
IDL	: Orta Yoğunluklu Lipoprotein
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
ILV	: İntralüminal Veziküller
LAT	: Laktonaz
LDHA	: Laktat Dehidrojenaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LEP	: Leptin
LRP	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü İlişkili Protein
LSE	: Geç Sorting Endozom
MACS	: Manyetik Aktif Hücre Sıralama
miRNA	: mikroRNA
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MS	: Kütle Spektrometresi
mTOR	: Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
MudPIT	: Çok Boyutlu Protein Tanımlama Teknolojisi
MVB	: Multiveziküler Cisimcikler
NaCl	: Sodyum Klorit
NAFLD	: Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
ncRNA	: Kodlamayan RNA
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NTA	: Nanopartikül İzleme Analizi

OSCC	: Oral Skuamöz Hücreli Karsinom
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDK	: Fosfoinositid Bağımlı Kinaz
PH	: Pleckstrin Homoloji
PHD	: Prolil Hidroksilaz
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfat
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PKM	: Piruvat Kinaz M
PON	: Paraoksonaz Enzimi
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homologu
PVDF	: Polivinil Diflorür
Rab	: Ras İlişkili Bağlayıcı Protein
Raptor	: mTOR'un Düzenleyici İlişkili Proteini
RAS	: Rat Sarkoma Virüsü
RFA	: Radyofrekans Ablasyon
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
S6K	: Ribozomal Protein S6 Kinaz
SD	: Standart Sapma
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TGF- α	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-alfa

TGF- β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-beta
TGN	: Trans-Golgi Ağı
TNM	: Primer Tümör Durumu, Bölgesel Lenf Bezlerine Tutulum, Uzak Metastaz Varlığı
TSG101	: Tümör Duyarlılık Geni 101
US	: Ultrasonografi
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VHL	: Von Hippel-Lindau
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Karaciğer lobülünün ayrıntılı yapısı	4
Şekil 2.2.	HCC tanı, tedavi planlaması ve takibinde kullanılan görüntüleme yöntemleri.	12
Şekil 2.3.	BCLC evreleme sistemine göre HCC tedavi seçenekleri	13
Şekil 2.4.	HIF sinyal yolağı mekanizması	16
Şekil 2.5.	HIF-1 α hedef genleri ve kanser ilerlemesi üzerindeki etkileri	17
Şekil 2.6.	Bazı ROS türleri ve antioksidan enzimler arasındaki ilişkinin şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.7.	PON enzimlerinin lipid oksidasyonuna karşı savunmadaki fizyolojik etkileri	22
Şekil 2.8.	Paraoksonaz aktiviteleri ve substratları	23
Şekil 2.9.	PON enziminin paraoksonaz aktivitesi ve paraoksonu hidrolizi	24
Şekil 2.10.	PON enziminin laktonaz aktivitesi ve dihidrokumarini hidrolizi	24
Şekil 2.11.	PI3K/Akt sinyal yolağında Akt fosforilasyonu	29
Şekil 2.12.	PI3K/Akt sinyal yolağına genel bakış	30
Şekil 2.13.	Eksozom içeriği, biyogenezi ve salınması	34
Şekil 2.14.	Eksozomların karakteristik özellikleri	37
Şekil 2.15.	Tez amacı şematik gösterimi	38
Şekil 3.1.	Tez çalışmasının deney düzeneği şeması	44
Şekil 4.1.	HepG2 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüleri	64
Şekil 4.2.	Farklı zaman sürelerinde (2, 4, 6, 12 ve 24 saatler) hipoksik koşullar altında HIF-1 α protein seviyeleri	65
Şekil 4.3.	Normoksik ve hipoksik koşullar altında HIF-1 α protein seviyeleri	66
Şekil 4.4.	HIF-1 α western blot analiz sonuçları.....	67
Şekil 4.5.	Bradford yöntemi ile elde edilen eksozom konsantrasyonu	68
Şekil 4.6.	BSA standartları kullanılarak elde edilen absorbans-protein konsantrasyonu	68
Şekil 4.7.	HepG2 hücre hatlarından salınan eksozomların NTA analizi ile karakterizasyonu.....	69

Şekil 4.8.	HepG2 hücre hatlarından salınan eksozomların SEM görüntüleri.....	69
Şekil 4.9.	PON enzim ailesi western blot analiz sonuçları	71
Şekil 4.10.	HepG2 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullar altında paraoksonaz enzim aktiviteleri.	72
Şekil 4.11.	HepG2 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullar altında laktonaz enzim aktiviteleri.	73
Şekil 4.12.	HepG2 hücre lizatlarının Akt western blot analiz sonuçları.....	74
Şekil 4.13.	HepG2 eksozom lizatlarının Akt western blot analiz sonuçları	75
Şekil 4.14.	Normoksik ve hipoksik koşullarda HepG2 hücre ve eksozom lizatlarının Akt ve p-Akt western blot analiz sonuçları.	76
Şekil 4.15.	HepG2 hücre lizatlarının mTOR western blot analiz sonuçları.....	77
Şekil 4.16.	HepG2 eksozom lizatlarının mTOR western blot analiz sonuçları	78
Şekil 4.17.	Normoksik ve hipoksik koşullarda HepG2 hücre ve eksozom lizatlarının mTOR ve p-mTOR western blot analiz sonuçları.	79

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Normal karaciğer fonksiyonları	5
Tablo 2.2. BCLC evreleme sistemine göre HCC evrelendirilmesi.....	9
Tablo 2.3. TNM evreleme sistemine göre HCC evrelendirilmesi	10
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler.....	39
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar	40
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan cihazların ve gereçlerin listesi	41
Tablo 3.4. %4-8'lik SDS poliakrilamid jelin hazırlanışı.....	62



1. GİRİŞ

Kanser, neoplastik büyüme durumuna geçerek sayısız mutasyon ve bir dizi yeni karakteristik özellik kazanan anormal hücreler ile karakterize edilmektedir. Ayrıca genetik, epigenetik ve metabolik bir hastalık olup kötü huylu tümörler veya neoplazmalar olarak da adlandırılmaktadır (1,2). Dünya genelinde tüm kanser türleri göz önüne alındığında, GLOBOCAN verilerine göre 2020'de yaklaşık 19.3 milyon yeni vaka ve yaklaşık 10 milyon ölüm bildirilmiştir (3). Türkiye'de ise kanser istatistiklerine göre, 2017 yılında 180 288 yeni kanser vakası açıklanmıştır (4). Pimer karaciğer kanseri, dünya genelinde tüm kanserler içerisinde en sık teşhis edilen altıncı kanser olmasına rağmen, kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır. Bunun en önemli sebepleri, tanıdaki gecikmeler, hastalığın kötü prognozu ve ilerlemiş olgularda tedavi seçeneklerinin kısıtlılığıdır. Hastalığın kötü prognozunu iyileştirmek ve mortalite oranını düşürmek için tanı ve tedavi protokollerinde daha fazla ilerlemeye ihtiyaç vardır (3,5).

Kanserden ölümlerde kanser ilerlemesi, anjiyogenez, metastaz ve tedaviye direnç oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu hayati süreçler ile yakın ilişkili olan düşük oksijen seviyesi; hipoksi olarak adlandırılmaktadır (6). Yapılan çalışmalar hipoksinin, oksijenden türetilen bir grup molekül olan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini de artırdığına dikkat çekmektedir (6,7). Yüksek ROS seviyeleri, oksidatif stres oluşturarak birçok patolojiye neden olmaktadır. Hücreler ROS'ların zararlı ve toksik etkilerine karşı antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir. Sağlıklı bir hücrede antioksidan savunma sistemi ve ROS'lar denge durumundadır (8,9).

Hücreleri oksidatif stresten koruyarak antioksidan savunmada ve hücre davranışının düzenlenmesinde rol oynayan önemli enzimatik antioksidanlardan biri paraoksonaz (PON) enzimidir. PON (EC 3.1.1.2, 3.1.1.81, 3.1.8.1) enzim ailesi; kalsiyum bağımlı bir ester hidrolaz olup PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır (10,11). PON, karsinogenez sürecinde de rol oynamaktadır. Bu enzim ailesi apoptozun engellenmesi ve kanser hücresinin sağkalımı gibi önemli

durumlar ile de ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle PON, potansiyel bir onkogen olarak önerilmektedir. Ayrıca PON, yüksek yoğunluklu lipoprotein'in (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein'in (LDL) oksidasyondan korunmasında da rol oynamaktadır. PON enzim ailesinin tüm üyeleri, karaciğerde eksprese edilmektedir (10-13). Bu nedenle en yaygın primer karaciğer kanseri olan ve vakaların % 75-85'ini oluşturan hepatosellüler karsinom (HCC), PON çalışmaları için dikkat çekmektedir (3).

PON ekspresyonunun düzenlenmesinde sinyal yolları etkilidir (10). Oksidatif stresin hücrel yanıtında önemli rol oynayan sinyal iletim yollarından biri olan Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/Protein Kinaz B (Akt) yolağı, ROS detoksifikasyonunu ve redoks homeostazını kolaylaştırmaktadır (14). PI3K/Akt yolağının hepatosellüler karsinomun da dahil olduğu birçok kanser türünde aktive olduğu; proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre hareketliliği, tümör büyümesi ve anjiyogenez gibi birçok hücrel süreçte önemli rol oynadığı bilinmektedir (15). Ancak literatürde PON enzim ailesi üzerinde PI3K/Akt yolağının etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır (16,17). Bu nedenle hem önemli bir antioksidan olan hem de potansiyel bir onkogen olarak önerilen PON enzim ailesinin PI3K/Akt sinyal yolağı ile ilişkisinin aydınlatılması dikkat çekmektedir.

Hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunda veya baskılanmasında hücre-hücre iletişimi yoluyla çeşitli sinyaller aktarılmaktadır. Bu aktarımda özellikle eksozomlar rol oynamaktadır. Eksozomlar, heterojen kargoları ileterek sinyal yollarını etkileyen ekstrasellüler veziküllerden biridir (18). Eksozom içeriğinde birçok protein, lipid ve nükleik asit bulunmaktadır. Aynı zamanda eksozomlar, hücreler arasında madde taşınımına ve sinyal iletimine aracılık etmektedir (19,20). Yapılan çalışmalar ile eksozomların hastalık patogenezinde ve tümör biyolojisinde önemli rollerinin olduğu belirtilmiştir (18-22). Özellikle tümör kaynaklı eksozomlar, son zamanlarda ümit verici sıvı biyopsi tümör belirteçleri olarak kabul edilmektedir. Non-invaziv olarak elde edilen eksozom içeriklerinin; erken tarama, erken tanı, terapötik etkilerin izlenmesi ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılabilirliği dikkat çekmektedir (23). Karsinogenez sürecinde kanser hücresinin elde ettiği ve kanserin karakteristik özellikleri olarak adlandırılan durumların tümünde, eksozomların önemli roller üstlendiği vurgulanmaktadır (24). Son yıllarda yapılan çalışmalar,

tümör hücrelerinden eksozom salınımının ve eksozomal içeriğin kanser üzerindeki prognostik ve prediktif etkilerini detaylıca açıklamaktadır (19,22-24). Yapılan çalışmalarda eksozom salınımının hipoksik koşullarda, normoksik koşullara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (25-27). Ayrıca, oksidatif stres koşullarının eksozomlar ile ilişkisini gösteren çalışmalar da mevcuttur (8,28,29) Fakat önemli bir antioksidan enzim olan PON enzim ailesinin eksozomlar ile ilişkisi aydınlatılmamıştır. Bu ilişkiye hipoksinin etkisini gösteren bir çalışmaya da literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle PON enzim ailesinin eksozomlar ile ilişkisinin aydınlatılması dikkat çekmektedir.

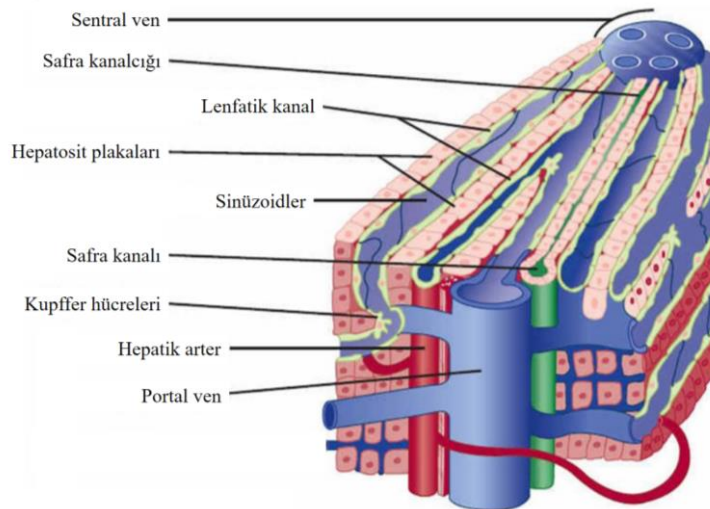
Tüm bunlar göz önüne alınarak, çalışmamızda “Hepatosellüler karsinom hücrelerinde ve eksozomlarında, normoksik ve hipoksik koşullarda paraoksonaz enzimi ile PI3K/Akt sinyal yolağı arasında ilişki vardır” hipotezini test etmek amaçlanmıştır. Bu tez çalışması ile, hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde ve bu hücrelerden elde edilen eksozomlarda, PON enzim ailesi ve PI3K/Akt yolağı proteinleri, normoksik ve hipoksik koşullarda analiz edilmiş ve kıyaslanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinom

Karaciğer karın bölgesinin sağ üst kadranında, diyaframın sağ altında ve göğüs kafesinin alt kısmında peritoneal boşlukta yer alan vücudun en büyük organıdır. Karaciğer erişkinde yaklaşık 1 400 / 1 500 g ağırlığındadır ve fibröz bir kapsülle kaplıdır. Büyük sağ ve daha küçük sol olmak üzere iki lobdan oluşmaktadır. Sağ lob inferiyoruna safra kesesi yerleşmiş olup karaciğerin alt sınırı boyunca uzanmaktadır (30).

Karaciğerin parankimi, retiküloendotelial hücreler olarak adlandırılan destekleyici hücrelerden oluşan bir kafes içinde, hepatosit plakaları halinde düzenlenmiştir. Hepatosit plakaları, genellikle yalnızca bir hücre kalınlığındadır ve tek tek plakalar, sinüzoidler adı verilen vasküler boşluklarla birbirinden ayrılmaktadır. Hepatositlerin içinde bulunduğu retiküloendotelial hücre ağı, çeşitli hücre tiplerini içermektedir. Bu hücrelerin en önemlisi sinüzoidlerin duvarlarını oluşturan endotel hücreleri, sinüzoidal boşlukta sabitlenmiş Kupffer hücreleri olarak adlandırılan özelleşmiş makrofajlar ve hepatositler ile endotel hücreleri arasında yer alarak A vitamini metabolizmasında görevli yağ depolayan hücreler olan stellat hücreler veya lipositlerdir (Şekil 2.1) (30).



Şekil 2.1. Karaciğer lobülünün ayrıntılı yapısı (30).

Vücutta hayati öneme sahip olan karaciğer; metabolizma, sindirim ve bağışıklık gibi birçok görevi yerine getirmektedir. Ayrıca safra üretimi özelliğiyle ekzokrin bez; glukoz, lipoprotein ve plazma proteinlerini kana verme özelliğiyle de endokrin bez niteliği taşımaktadır. Vücudun karbonhidrat, lipid ve proteininin çoğu karaciğerde sentezlenmekte, metabolize edilmekte ve dönüştürülmektedir. Oluşturulan ürünler ise vücudun enerji ve substrat ihtiyaçlarına yanıt olarak kan dolaşımına salınmaktadır. Sağlıklı bir bireyde karaciğerin temel fonksiyonları Tablo 2.1'de dört geniş kategori halinde listelenmiştir (30).

Tablo 2.1. Normal karaciğer fonksiyonları (30).

Enerji Metabolizması
Glukoneogenez ve glikojenoliz aracılığıyla glukoz üretimi
Glikojen sentezi, yağ asidi sentezi, glikoliz ve TCA döngüsü aracılığıyla glukoz tüketimi
Asetattan kolesterol sentezi, yağ asidinden trigliserid sentezi ve bunların Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (VLDL) partiküllerinde salgılanması
Safrada kolesterol ekstraksiyonu ile HDL ve LDL partiküllerinin endositozu aracılığıyla kolesterol ve trigliserit alımı, yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve fazla asetil-CoA'nın ketonlara dönüştürülmesi
Amino asitlerin deaminasyonu ve üre döngüsü aracılığıyla amonyağın üreye dönüştürülmesi
Nonesansiyel amino asitlerin <i>de novo</i> sentezi ve transaminasyonu
Protein Sentezi
Albümin, pıhtılaşma faktörleri, bağlayıcı proteinler, apolipoproteinler, anjiyotensinojen, IGF-1 gibi çeşitli plazma proteinlerinin sentezi
Çözünürlük, Taşıma ve Depolama Fonksiyonları
Faz I ve faz II biyotransformasyon reaksiyonları ile ilaç ve zehirlerin detoksifikasyonu ve safra ile atılımı
Yağların ve yağda çözünen vitaminlerin enterositler tarafından emilimi için safrada çözünmesi
VLDL ve pre-HDL lipoprotein partiküllerinin sentezi ve salgılanması ve HDL, LDL ve şilomikron kalıntıların temizlenmesi
Transferrin, steroid hormon bağlayıcı globulin, tiroid hormonu bağlayıcı globulin, seruloplazmin ve metalloproteinin dahil olmak üzere çeşitli bağlayıcı proteinlerin sentezi ve salgılanması
Vitamin A, D, B12, folatın emilimi ve depolanması
Koruma ve Klerens Fonksiyonları
Üre döngüsü yoluyla amonyak detoksifikasyonu
Mikrozomal oksidasyon ve konjugasyon sistemi yoluyla ilaçların detoksifikasyonu
Glutatyon sentezi ve salınımı
Hasarlı hücrelerin ve proteinlerin, hormonların, ilaçların ve aktive edilmiş pıhtılaşma faktörlerinin portal dolaşımdan temizlenmesi
Bakteri ve antijenlerin portal dolaşımdan temizlenmesi

Karaciğerin bir diğer önemli özelliği ise dual kan akımına sahip olmasıdır. Burada kalp debisinin yaklaşık % 25'i, yani dakikada yaklaşık 1 500 mL kanın akışı sağlanmaktadır. Karaciğere kan akışı hem portal venden venöz akış ile hem de hepatik aterden arteriyel akış ile gerçekleşmektedir. Hepatik venler vena kava inferiorya, lenfatikler porta hepatis'e boşalmaktadır (30-32).

Karaciğer, sahip olduğu bu fizyolojik ve anatomik özelliklerinden dolayı kanser gelişmesinde ve özellikle metastazda hassas bölge olarak değerlendirilmektedir (31,32). Kısmen bu kan besleme sistemi nedeniyle karaciğer, özellikle gastrointestinal sistem, meme ve akciğer kanserlerinin metastatik yayılımı için birincil bölge olarak karşımıza çıkmaktadır (30). Bu nedenle karaciğerde sıklıkla sekonder kaynaklı lezyonlar gözlenirse de primer karaciğer kanseri, geç tanı ve kötü prognoz nedeniyle dünya çapında kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır. Ayrıca kötü prognozun nedenleri olarak ilaç direnci, hızlı proliferasyon ve hücrelerinin güçlü agresifliği sayılmaktadır. Bu nedenle, kötü prognozunu iyileştirmek için tanı ve tedavide daha fazla ilerlemeye ihtiyaç vardır (3,5).

Karaciğer tümörleri benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere ikiye ayrılır. Benign karaciğer tümör türleri arasında;

- a) Hepatasellüler kaynaklı; adenom, fokal nodüler hiperplazi, diffüz nodüler hiperplazi, makrorejeneratif nodüller ve displastik nodüller,
- b) Safra epiteli kaynaklı; safra kanalı kisti, safra kanalı adenom, müsinöz kistik neoplazm, peribiliyer bezi hamartom, von meyenburg kompleksi, safra kistadenomu ve safra papillomatozis,
- c) Vasküler kaynaklı; kavernöz hemanjiyom ve iniltal hemanjiyoendotelyoma,
- d) Diğer; anjiyomyolipoma, mezenkimal hamartoma, soliter fibröz tümör ve inflamatuvar psödotümör yer almaktadır.

Kötü huylu karaciğer tümörleri arasında ise;

- a) Hepatosellüler kaynaklı; hepatosellüler karsinom, fibrolamellar karsinom, hepatokolangiokarsinom, hepatoblastom ve karsinosarkom,
- b) Safra epiteli kaynaklı; kistadenokarsinom ve kolanjiokarsinom,
- c) Vasküler kaynaklı; anjiyosarkom, hemanjiyoendotelyoma ve epiteloid,

d) Diğer; primer lenfomalar ve sarkomlar yer almaktadır (33,34). Karaciğerde rastlanan en sık bening tümör hemanjyom ve en sık primer malign tümör ise HCC olarak karşımıza çıkmaktadır.

HCC tümör hücreleri, belirgin hepatosellüler diferansiyasyon göstermektedir. Tümör hücrelerinin nükleusu genellikle büyümüş ve farklı derecede anaplazi göstermektedir. Ayrıca hücreler genellikle belirgin nükleusa sahiptir. HCC, tek odaklı (unifokal), çok odaklı (multifokal) veya yaygın infiltratif bir tümör olarak ortaya çıkmaktadır. Tüm paternler vasküler invazyon için geniş potansiyel göstermektedir. Siroz ile ilişkili olduğunda, HCC genellikle rejeneratif bir nodülün malign transformasyonundan kaynaklanmaktadır. Anjiyogenez için stimülasyon vardır ve tümör bol arteriyel vaskülarizasyon almaktadır. Ortalama tümör duplikasyon süresi yaklaşık 200 gündür. Tümör arttıkça bu süre azalmaktadır. 3 cm boyutuna kadar olan HCC genellikle iyi diferansiyedir, kapsüllüdür ve kan damarı invazyonu için düşük potansiyele sahiptir. Yaklaşık 5 cm boyutuna ulaştığında nodül diferansiyasyonu kaybetmeye başlamakta ve mikroskobik vasküler invazyon sergileyerek metastaz yapabilme yeteneği kazanmaktadır (35).

2.1.1. Hepatosellüler Karsinomun Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Dünyada en sık teşhis edilen altıncı kanser olan primer karaciğer kanserinde, 900 000'den fazla yeni vaka ve yaklaşık 830 000 ölüm bildirilmiştir. Bu sayılar göz önüne alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda dünya genelinde % 4.7 oranında görülme sıklığı ve kansere bağlı ölümlerin % 8.3'ünü oluşturması ile karaciğer kanseri dikkat çekmektedir (36). Cinsiyete göre sıralandığında ise, primer karaciğer kanseri kadınlarda en sık görülen dokuzuncu, erkeklerde ise en sık görülen beşinci kanserdir (3). Ülkemizde ise 2019 yılında kansere bağlı ölüm nedenleri arasında % 3.47 (2 788 kişi) oranıyla yedinci sırada yer almaktadır (37).

En sık görülen primer karaciğer kanser malignitesi olan HCC, tüm primer karaciğer kanseri vakalarının % 90'ından fazlasını oluşturmaktadır. Dünya çapında en yaygın altıncı kanser türüdür ve insidansında önemli bir artış göstererek kansere bağlı ölümlerin önde gelen üçüncü nedeni haline gelmiştir (35).

HCC görölme sıklığı o bölgedeki dominant hepatit enfeksiyonuna (Doğu Asya ve Ortadoğu'da Hepatit B virüsü (HBV), Avrupa ve Amerika'da Hepatit C virüsü (HCV)) ve toplumda virüslerin bulaşma yaşına bağı olarak değışmektedir. Dünya genelinde HCC için düşük ve yüksek insidans bölgeleri bulunmaktadır. HCC olgulaına, erkeklerde kadınlara göre 2-8 kat daha yaygın olarak rastlanmaktadır. Genel olarak, HCC insidansı yaşla birlikte artmakta ancak yüksek insidans bölgelerinde daha erken HCC geliştirme eğilimi gözlenmektedir. Ayrıca HCC ailesel yatkınlık ile de ilişkilendirilmektedir (38,39).

HCC oluşumuna çok sayıda etiyolojik faktörün sinerjik olarak etki gösterdiği bilinmektedir. Ancak HCC vakalarının % 70-80'i, kronik enfeksiyona bağı sirozun yanı sıra HBV veya HCV ile de ilişkilendirilmektedir (35,39). Nodüler rejenerasyonla ilişkili fibroz olarak tanımlanan siroz, premalign bir durum olarak kabul edilmektedir. HBV varlığı ile ilişkili hemen hemen tüm HCC vakalarında, HBV genomunun hepatosit DNA'sına entegrasyonu gözlemlenmiştir. Ancak B-virüs serolojisi negatif olmasına rağmen tümörde HBV varlığı olan hastalar da bulunmaktadır (35). Kronik karaciğer hastalıklarında hepatositlerde hiperplazi, hücrelerin karsinojenlere karşı duyarlılığının ve kromozomal hasar oluşma riskinin artışı meydana gelmektedir. Bu durum HCC oluşumu riskini artırmaktadır (39).

HCC başlıca kronik karaciğer hastalıkları ve karaciğer sirozu olmak üzere birçok farklı nedenden dolayı gelişmektedir. HCC'nin ana risk faktörleri arasında aşırı ve sık alkol tüketimi, siroz, karaciğer hücre displazisi, adenomatöz hiperplazi (makrorejeneratif ve displastik nodüller) ve kronik karaciğer hastalığı yer almaktadır. Bununla birlikte mevcut çalışmalar, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında (NAFLD) artan sayıda HCC vakalarına dikkat çekmektedir. NAFLD, obezite ve insülin direncine dayanan metabolik sendromun hepatik belirtilerini temsil etmektedir. Ayrıca, aflatoksin (özellikle aflatoksin B1) ile alkilnitrozaminler gibi toksik kanserojenlere maruz kalmanın da HCC oluşumuna katkı sağladığı belirtilmektedir. Tütün kullanımının da sigara içmeyenler ile kıyaslandığında, HCC'ye yakalanma riskini arttırdığı bildirilmiştir. HCC oluşum mekanizmaları arasında hücre döngüsü kontrol kaybı, yaşlanma kontrolünden kaçma, kontrollü hücre ölümüne direnç, fenotipik plastisite, invazyon ve metastaz olduğu düşünülmektedir (35,39,40).

2.1.2. Hepatosellüler Karsinomun Histolojik Sınıflandırılması ve Evrelendirilmesi

Karaciğer epitelini oluşturan hepatositlerden kaynaklanan HCC, bir adenokanserdir. HCC histopatolojik olarak; tek odaklı, çok odaklı veya diffüz infiltratif bir tümör olarak karşımıza çıkmaktadır. HCC'nin prognozu tümör evresi ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla hem prognostik öngörü hem de tedavi belirlenmesi için hastalığın doğru evrelendirilmesi önemli görülmektedir. HCC hastalarının gösterdikleri semptom ve laboratuvar bulguları göz önünde tutularak çeşitli HCC evrelendirme sistemleri bulunmaktadır. Ancak sıklıkla kullanılan evreleme sistemleri; Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri (BCLC) evreleme sistemi (Tablo 2.2) ve Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) tarafından geliştirilen TNM evreleme sistemidir (Tablo 2.3). BCLC sistemi; performans durumu, tümör evresi, okuda evresi ve karaciğer fonksiyonu verilerine dayalı bir evreleme sistemidir. Tümörün histopatolojisini esas alan TNM sistemi ise, hastalığın lokal nodüller ve komşu organlardaki yayılımını incelemektedir (35,39).

Tablo 2.2. BCLC evreleme sistemine göre HCC evrelendirilmesi (39).

Evre	Performans Durumu	Tümör Evresi	Okuda Evresi	Karaciğer Fonksiyonları
Evre A: Erken Evre				
A1	0	Tek	I	Normal bilirubin, portal hipertansiyon yok
A2	0	Tek	I	Normal bilirubin, portal hipertansiyon var
A3	0	Tek	I	Yüksek bilirubin, portal hipertansiyon var
A4	0	3 tümör <3 cm	I-II	Child-Pugh A-B
Evre B: Ara Evre				
	0	Büyük multinodüler	I-II	Child-Pugh A-B
Evre C: İleri Evre				
	1-2	Vasküler invazyon veya ekstrahepatik yayılım	I-II	Child-Pugh A-B
Evre D: Son Evre				
	3-4	Herhangi biri	III	Child-Pugh C

Tablo 2.3. TNM evreleme sistemine göre HCC evrelendirilmesi (39).

T-Primer Tümör			
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor, herhangi bir T		
T0	Primer tümör belirtisi yok		
T1	Solit tümör ≤2 cm, vasküler invazyon yok		
T2	Solit tümör >2 cm		
	Solit tümör ≤2 cm, vasküler invazyon var		
	Bir lobta multiple tümörler, çap ≤2 cm ve vasküler invazyon yok		
T3	Bir lobta multiple tümörler, çap ≤2 cm, vasküler invazyon var		
	Bir lobta multiple tümörler, çap >2 cm, vasküler invazyon var veya yok		
T4	Birden fazla lobta multiple tümör odağı		
	Portal ven, hepatik ven veya majör dallarına tümör invazyonunun varlığı		
N-Bölgesel Lenf Nodları			
Nx	Bölgesel lenf nodlarında tümör değerlendirilemiyor, herhangi bir N		
N0	Bölgesel lenf nodlarında tutulum yok		
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı mevcut		
M-Uzak Metastaz			
Mx	Uzak organ metastazının varlığı değerlendirilemeyen		
M0	Uzak organ metastaz yok		
M1	Uzak organ metastaz var		
Anatomik Evre/Prognostik Gruplar			
Evre	T	N	M
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
Evre III	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
Evre IVA	T1-4	N1	M0
Evre IVB	T1-4	N0-1	M1

2.1.3. Hepatosellüler Karsinomun Klinik Bulguları

HCC, karaciğer fonksiyonları yeterli olan hastalarda asemptomik olarak seyretmektedir. Bu nedenle HCC, erken teşhis şansı olamadan sessizce ilerleyen bir kanser türüdür. Karaciğer fonksiyon bozukluğu olan olgularda ise bu durumun öyküsü ağır seyretmektedir. En sık karşılaşılan belirti ise karın ağrısıdır. Ayrıca asidoz, kilo kaybı, dolgunluk, anoreksiya, mide bulantısı, ateş ve sarılık gibi belirtiler

de görülmektedir. Siroz olduğu bilinen bir hastada genel durumun kötüleştiği ve karında ağırlı kitle varlığında HCC teşhisi düşünülmektedir. Metastaz gelişen vakalarda yukarıdaki belirtilere ek olarak malign asitin, iskelet sistemi ağrılarının, akciğer tutulumu sonucu dispnenin ve beyin metastazları sonucu nörolojik belirtilerin de gözlemlendiği belirtilmiştir (39).

2.1.4. Hepatosellüler Karsinomun Teşhisi

Klinik uygulamada karaciğer kitleleri daha çok abdominal ultrasonografi (US) gibi yaygın kullanılan tetkikler sırasında raslantı sonucu veya başka bir bölgede malignite/sirozu olan hastaların takibi sırasında tespit edildiği bildirilmiştir. Kitlelerin ayırımında karaciğer fonksiyon testlerinin öngürüsü sınırlıdır. Serum bilirübin veya karaciğer transaminazları normal veya hafifçe artmış olmasına rağmen, alkalen fosfataz (ALP) ve gama glutamil transferaz (GGT) enzimlerinin yüksekliği karaciğerde yer kaplayan bir lezyonu işaret etmektedir (39). Karaciğer tümör tespitinde ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle ilk olarak US kullanılmaktadır. Ek olarak, tanıda çoğu zaman bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi daha gelişmiş yöntemlerin kullanıldığı bilinmektedir (39). Solid karaciğer lezyonlarının kesin tanısı perkütan karaciğer biyopsisi veya ince iğne aspirasyonu ile yapılmaktadır (Şekil 2.2). Ayrıca alfa-fetoprotein (AFP); fetal karaciğer hücreleri ve yolc sac hücrelerinde sentezlenen, normal serum seviyesi 10-20 ng/mL olan bir serum proteini olup HCC taramasında kullanılan bir tümör belirteçidir. 400 ng/mL'nin üzerindeki AFP değerleri HCC için belirleyici olmaktadır (39).



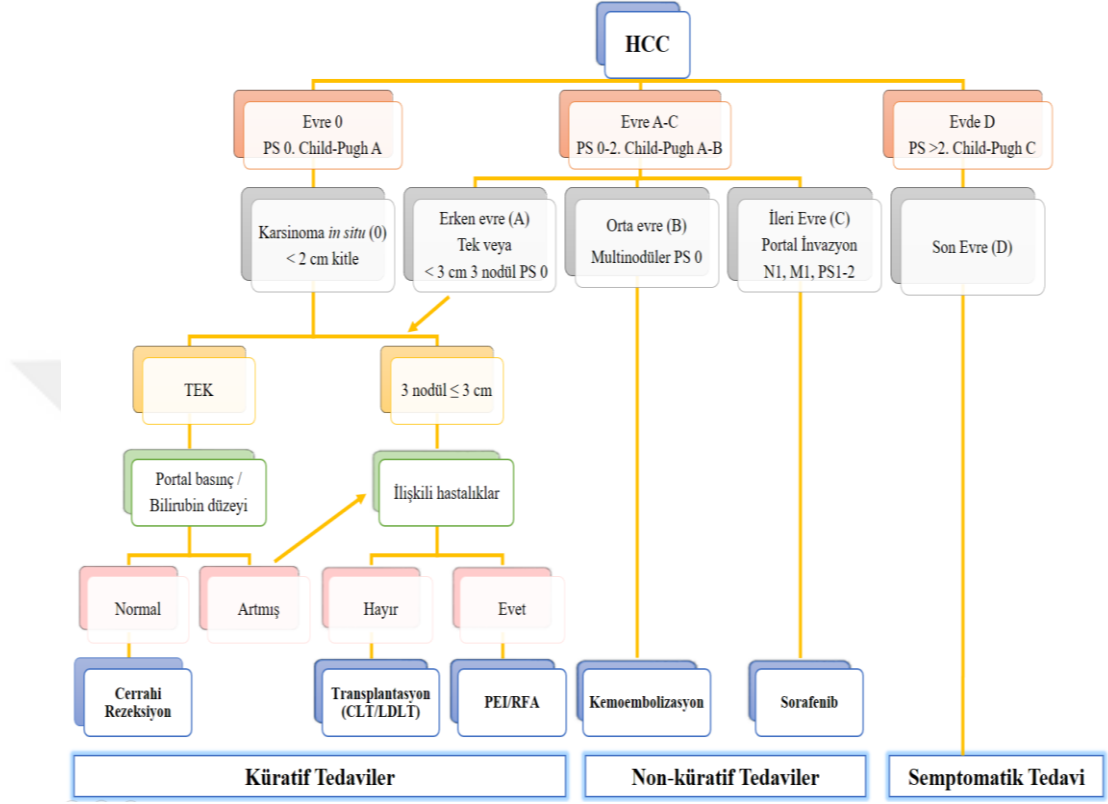
Şekil 2.2. HCC tanı, tedavi planlaması ve takibinde kullanılan görüntüleme yöntemleri (39).

HCC vakalarının tanı anında yalnızca küçük bir kısmı, potansiyel olarak iyileştirici müdahaleye uygun olduğu bildirilmiştir. Operatif müdahale mümkün olmadığında, tümör genellikle karaciğer fonksiyonunu azaltan, intra ve ekstrahepatik metastazlar (esas olarak akciğerlere ve kemiklere) üreten bir tümör olarak geliştiği bilinmektedir. Tümör kaşeksisi, özofagus veya gastrik varis kanaması, karaciğer yetmezliği veya daha nadir olarak tümör rüptürüne sekonder hemoperiton nedeniyle bu vakalarda ölüm genellikle ortalama 10 ay içinde meydana gelmektedir (35).

2.1.5. Hepatosellüler Karsinomun Tedavisi

Günümüzde HCC'nin evresine göre yaşam süresini olumlu yönde etkileyen küratif, non-küratif ve semptomik tedavi seçenekleri bulunmaktadır (Şekil 2.3) (41). Küratif tedavi yöntemleri; cerrahi rezeksiyon, karaciğer transplantasyonu ve perkütan ya da radyofrekans ablasyon (RFA) uygulamalarıdır. Karaciğer transplantasyonu canlı donör karaciğer nakli (LDLT) ya da kadavradan karaciğer nakli (CLT) şeklinde gerçekleştirilmektedir. Perkütan ablasyon yönteminde ise perkütan etanol enjeksiyonu (PEI) uygulaması önem taşımaktadır. Palyatif (non-küratif) tedavi yöntemleri arasında transarteriyel kemoembolizasyon (TAKE) ve sorafenib gibi sistemik

kemoterapötiklerin kullanımı yer almaktadır. Küratif amaçlı tedaviler, HCC'nin erken evresi için uygundur. Ancak orta, ileri ve son evre HCC için palyatif ve semptomatik tedavi seçenekleri uygulanmaktadır (41).



Şekil 2.3. BCLC evreleme sistemine göre HCC tedavi seçenekleri (PS = performans durumu) (41).

Sistemik tedavi arasında multikinaz inhibitörü olan sorafenib kullanımı son 10 yıldır ileri evre HCC hastaları için mevcut birinci tedavi seçeneğidir (42). Lenvatinib, regorafenib ve kabozantinib gibi diğer multikinaz inhibitörleri de HCC tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar ikinci tedavi basamağını oluşturmaktadır ya da sorafenibi tolere edemeyen hastalarda kullanılması önerilmektedir. Ancak bu inhibitörler için yapılan Faz III klinik çalışmalarından bazılarının başarısızlıkla sonuçlandığı bildirilmiştir (42,43). Ayrıca monoklonal antikorlardan olan nivolumab ve pembrolizumabın da HCC tedavisinde kullanımına yönelik ileri klinik çalışmalar devam etmektedir. Özellikle sorafenibe karşı dirençli olan bazı hastalarda nivolumabın kullanımı önerilmektedir. Kanser çok ilerlemiş ise

sorafenible birlikte regorafenib, kabozantinib, ramusirumab, nivolumab ya da pembrolizumabın kullanılması önerilmektedir (42,43).

2.1.6. Hepatosellüler Karsinomda Sağkalım ve Metastaz

HCC hastalarının sağkalım süresi, kanser teşhis edildiği andaki kanserin evresine bağlı olarak değişmektedir (44). Kansere ilişkin semptomların ortaya çıkmasından sonra hastaların sadece % 10'unda yaklaşık beş yıllık sağkalım süresi görülmektedir (45). Erken teşhis edildiği takdirde, cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon gibi küratif tedavi seçenekleri uygulandığında hastaların % 40-70'inde ortalama sağkalım süresi beş yıldan daha fazla olmaktadır. Ancak HCC'nin erken teşhisi oldukça zordur ve genellikle hastaların % 15-42'si vasküler invazyon veya ekstra-hepatik tümör yayılımı olan ileri evrelerde teşhis edilmektedir (46).

HCC portal venöz sistemi invaze ederek hızla karaciğerde yayılmakta ve pulmoner arteriyel sistemden akciğere ulaşabilmektedir. Hepatik venler içinde büyüyerek vena cava ile sağ atriuma kadar uzanabilmektedir. Sık olmamakla birlikte, biliyer sisteme invazyon olasılığı bulunmaktadır. Diyaframa lokal invazyon, bölgesel lenf nodlarına ve akciğere metastaz görülen bulgular arasında sayılmaktadır. Ayrıca kan yoluyla bütün vücuda yayılıp yaygın metastaz oluşturabilmektedirler. Hematojen metastazlar sıklıkla ilerlemiş ya da massif ve diffüz tip tümörlerde görülmektedir (38).

Karaciğer yüksek düzeyde vaskülarizasyona sahip olmasına rağmen HCC'de oksijen, hızla büyüyen tümör hücreleri tarafından yoğun bir şekilde tüketilmektedir. Oksijen temini ve tüketimi arasındaki dengenin bu şekilde bozulması sonucunda hipoksik mikroçevre oluşmaktadır. Bu nedenle, HCC proliferasyonunda hipoksi önemli bir karakteristik özellik olarak dikkat çekmektedir (47).

2.2. Hipoksi

Hipoksi, yetersiz oksijen seviyesi olarak tanımlanmakta ve malign tümörlerin çoğunda yaygın olarak meydana gelmektedir (6,48). Genel olarak hipoksik tümör dokularındaki oksijen seviyesinin ilgili normal dokuların oksijenasyonundan daha

zayıf ve ortalama % 1-2 O₂ arasında ve altında olduğu kabul edilmektedir (6). Malignitelerin çoğunda, oksijen seviyesi yaklaşık 10 mmHg iken, normal dokuların oldukça yüksek oksijen basıncına (40-60 mmHg) sahip olduğu gösterilmiştir (48). Kontrol edilemeyen hücre proliferasyonundan kaynaklanan tümör hipoksisi, yüksek oksijen ihtiyacına oksijen kaynağının yetersiz kalması, anormal tümör vaskülarizasyonu veya hücreler ile mevcut damar sistemi arasındaki mesafenin artmasından dolayı oksijen difüzyonunun engellenmesi nedenlerine dayandırılmaktadır (6,48). Meydana gelen hipoksik ortam, gelişmiş fakat işlevsiz vaskülarizasyona ve epitelyal-mezenkimal geçiş fenotipinin kazanılmasına yol açmaktadır. Bu nedenle hipoksi; hücre mobilitesi, tümör agresifliği ve metastazda rol oynayan tümör mikroçevresinin önemli bir unsuru olarak dikkat çekmektedir (6,48).

Hipoksiye yanıt olarak, kanser hücreleri, hipoksi sinyal yolağının ana bileşenleri olan hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF'ler) ve bununla bağlantılı olan çok sayıda genin transkripsiyonunu değiştirerek avantajlar elde etmektedir (48,49).

2.2.1. HIF Sinyal Yolağı

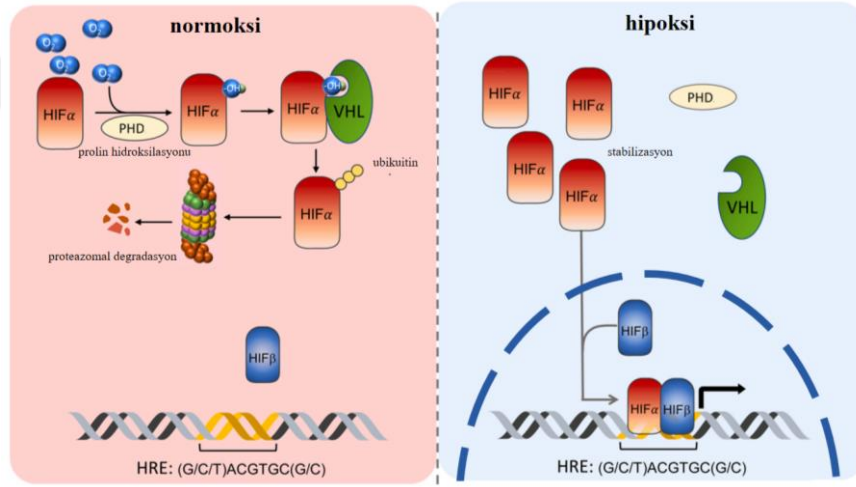
Oksijen, hücresel enerji üretimi ve birçok enzim için kofaktör/substrat olarak kullanılması nedeniyle memeli metabolizması ve fizyolojik fonksiyonları için elzemdir. Hücresel düzeyde oksijen eldesi ve adaptasyonunun merkezi düzenleyicisi, hipoksi ile indüklenebilir faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır (50).

Hipoksi, çoğu büyüme, gelişme, homeostaz ve tümör oluşumunda önemli rol oynayan bir dizi genin transkripsiyonel aktivasyonuna katılmaktadır. Hipoksi özellikle bu farklı rollerini HIF'ler aracılığıyla gerçekleştirmektedir. HIF, oksijene duyarlı bir HIF- α alt biriminden (HIF-1 α , HIF-2 α veya HIF-3 α) ve oksijene duyarsız yapısal olarak eksprese edilmiş bir HIF- β alt biriminden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür (7).

Yeterli oksijen varlığı olarak bilinen normoksi durumunda, HIF-1 α , Von Hippel-Lindau (VHL) proteinine bağlanmasına izin veren birkaç prolin kalıntısında hidroksillenmektedir. Prolil hidroksilazlar (PHD), α -ketoglutarat bağımlı

dioksijenazlar, HIF inhibe edici faktör (FIH), asparajinil hidroksilaz enzimleri; prolin kalıntısının hidroksilasyonunda görevlidir. Hidroksillenme, HIF-1 α 'nın proteazom tarafından poli-ubikitinasyonunu ve proteazomal degradasyonunu uyarmaktadır (Şekil 2.4) (6,7,50,51).

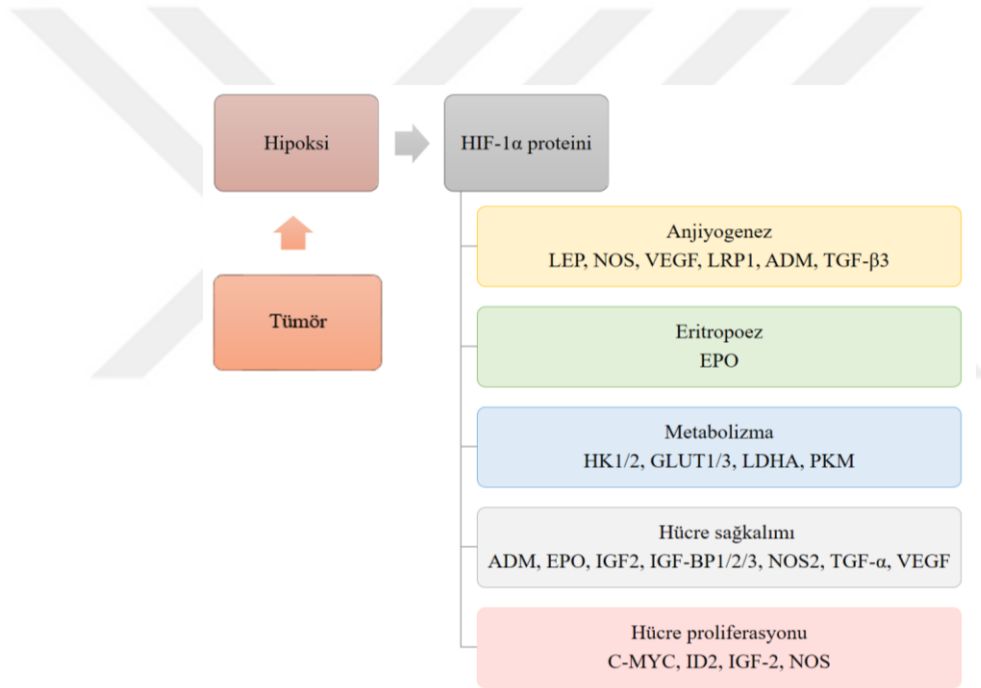
Düşük oksijen seviyesi olan hipoksi durumunda ise, PHD enzimleri aktivitelerini kaybetmekte, HIF-1 α hidroksilasyonu inhibe olmakta ve bozunma mekanizmasından kaçarak HIF-1 α çekirdeğe yer değiştirmektedir. Burada hidroksilenmemiş ve stabilize edilmiş olan HIF-1 α , HIF-1 β alt birimi ile dimerleşmektedir. Oluşan bu HIF-1 α :HIF-1 β kompleksi, birkaç hedef genin promotör bölge içindeki E-box benzeri hipoksi yanıt elemanlarına (HRE'ler) bağlanmaktadır. Ayrıca HIF-1 α :HIF-1 β kompleksine ko-aktivatör olarak CBP/p300'ün de bağlanması üzerine, hedef genlerin transkripsiyonu gerçekleşmektedir (Şekil 2.4) (6,7,50,51).



Şekil 2.4. HIF sinyal yolağı mekanizması (50).

HIF sinyal yolağının aktive ettiği hedef genler; oksijen tüketimi, eritrosit üretimi, anjiyogenez ve mitokondriyal metabolizma ile ilgili olarak hücrel oksijen homeostazını kontrol etmektedir. HIF-1 α aktifleşmesi sonucunda transkribe edilen ve tümörün ilerlemesi için gerekli olan hayati biyolojik süreçleri düzenleyen bu genlerin bazıları Şekil 2.5’de verilmiştir (52). Hipoksik hücreler, esas olarak HIF tarafından düzenlenen transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası mekanizmalarla strese karşı

koyduğu bilinmektedir (51). Bu moleküler değişiklikler, oksidatif metabolizmadan ziyade glikolize geçiş yoluyla oksijen tüketimini ve hücre bölünmesi gibi hücresel süreçler için enerji talebini azaltarak hücrelerin strese adapte olmasını sağlamaktadır. Çoğu katı tümör, kötü klinik sonuçla ilişkili bir dereceye kadar hipoksiye sahiptir. HIF aktivitesinin indüksiyonu, metabolik yeniden programlama, hücre proliferasyonu, invazyon ve metastaz, apoptoz ve terapilere direnç dahil olmak üzere kanserin birçok karakteristik özelliğinde yer alan genleri upregüle etmektedir (51). Hipoksinin karakteristik özelliği olarak özellikle HIF-1 α proteininin artışı dikkat çekmektedir. Bu nedenle hipoksiyi saptamak için HIF-1 α proteininin saptanmasının yeterli olduğunu ileri süren çalışmalar mevcuttur (6,49).



Şekil 2.5. HIF-1 α hedef genleri ve kanser ilerlemesi üzerindeki etkileri (52).

LEP, leptin; NOS, nitrik oksit sentaz; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü; LRP1, LDL-reseptör ilişkili protein 1; ADM, adrenomedullin; TGF- β 3, transforme edici büyüme faktörü- β 3; EPO, eritropoetin; HK, heksokinaz; GLUT, glukoz taşıyıcı; LDHA, laktat dehidrojenaz; PKM, piruvat kinaz M; IGF2, insülin benzeri büyüme faktörü 2; IGF-BP, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein; TGF- α , transforme büyüme faktörü- α ; C-MYC, miyelositomatöz virüsü onkogen hücresel homologu; ID2, DNA bağlayıcı protein inhibitörü.

Hipoksinin, ROS üretimini de artırdığına ilişkin çalışmaların bulunduğu bilinmektedir (6,7). Hipoksi tarafından oluşturulan ROS, HIF-1 α 'nın stabilizasyonu yoluyla özellikle tümör büyümesini, anjiyogenezi ve metastazı etkilemektedir (7).

2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Oksidatif Stres

Hücre içi biyokimyasal reaksiyonlar için gereken kimyasal enerjiyi sağlayan ATP; yaşam için vazgeçilmezdir. Gerekli olan bu enerji, oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılan bir süreç sonucunda mitokondride ATP olarak üretilmektedir. Metabolizma sırasında, glukoz gibi yakıtlar, mitokondriyal matrikse geçen piruvata parçalanmaktadır. Burada piruvat daha da metabolize olarak NADH ve FADH₂ elektron taşıyıcıları formunda CO₂ ve yüksek enerjili elektronlara oksitlenmektedir. İç mitokondriyal zardaki elektron taşıma zincirine yönlendirilen elektronlar, kompleksler arasında transfer edilmekte ve iç mitokondriyal zar boyunca bir proton gradyanı oluşmaktadır. Bu elektrokimyasal gradyandan gelen enerji, ADP ve inorganik fosfattan ATP üretmek için kullanılmaktadır. Sonunda oksijen, suya indirgenen son elektron alıcısı olarak hizmet etmektedir. Ancak, oksijenin tam olarak indirgenmediği durumlarda ROS oluşmaktadır (7).

Biyolojik sistemlerdeki ROS ürünleri, mitokondrilerden bu şekilde kaynaklanmaktadır. Diğer kaynaklar olarak ise NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, sitokrom P450, bağlanmamış endotelial nitrik oksit sentaz, miyeloperoksidaz ve lipoksijenaz enzimlerinin etkileri sonucu oluşmaktadır (9,53,54). Hücrenin kendi metabolizmasının bir sonucu olarak meydana gelen bu ROS'lar endojen kökenli olarak ifade edilmektedir. Ayrıca ksenobiyotikler, radyasyon, kirlleticiler gibi etkenler sonucunda eksojen olarak da ROS üretimi gerçekleşmektedir (55).

ROS, oksijenden türetilen bir grup molekül ve serbest radikaldir. Eşleşmemiş bir valans elektronuna sahip atomlar veya moleküller olarak bulunmaktadır. Normal koşullar altında, ROS üretimi ve ROS eliminasyonu denge halinde tutulmaktadır (9). Hücre içi üretilen başlıca ROS'lar; süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalleridir (OH⁻). Hücreler tarafından ROS'u inaktive etmek ve ROS'u toksik olmayan ürünlere dönüştürmek için antioksidan sistem geliştirilmiştir (7,9). Hücre içi ROS üretim düzeyi ile bunların antioksidanlar tarafından

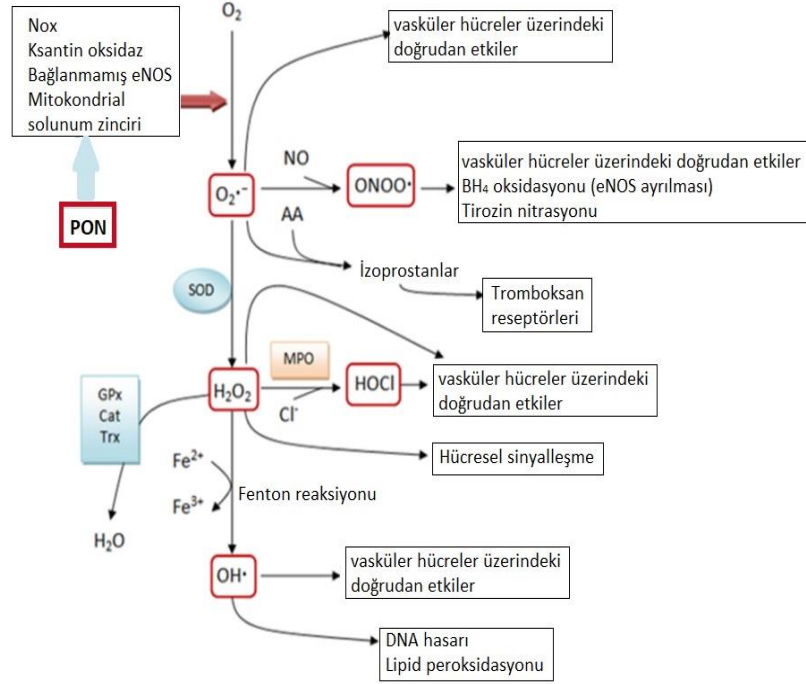
temizlenmesi arasındaki dengesizlik olarak adlandırılan oksidatif stres, son zamanlarda redoks sinyalizasyonunun ve kontrolünün bozulması olarak da tanımlanmaktadır (56,57). Homeostatik ROS konsantrasyonları, hem doğuştan gelen hem de uyarlanabilir bağışıklık yanıtlarında birçok hücre içi sinyal yolağında ikincil haberciler olarak çok önemli roller üstlenmektedir (9,58). Ancak ROSların üretimi, antioksidan savunmasını geçtiğinde; proteinleri, lipitleri ve DNA'yı etkileyen yıkıcı ajanlar olarak hareket ederek hücresel hasara, doku hasarına ve iltihaplanmaya yol açmaktadır (9). Dolayısıyla onkojenik dönüşümün gerçekleştiği uygun bir ortam meydana gelmektedir. Tümör hücrelerinde ROS seviyelerinin sağlıklı hücrelere göre daha yüksek olması bu nedenle beklenen bir durumdur. Özellikle, hipoksik koşullarda karsinogenez ile ilişkili ROS seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir (7).

ROS, çok sayıda temel fizyolojik süreçte yer almaktadır. Özellikle, çok çeşitli fonksiyonları düzenleyen hücre sinyal yollarında rol oynamaktadır. Örneğin, gen transkripsiyonunun aktivasyonu, hücre içi sinyal yollarının regülasyonu, kalsiyum sinyalleşmesinin modülasyonu, apoptoz, otofaji, proliferasyon ve farklılaşma gibi süreçlerde etkilidir. ROS ayrıca patojenlerin yok edilmesinde ve inflamatuvar süreçlerde, kan basıncının kontrolünde ve fiziksel egzersize yanıtta rol oynamaktadır (9).

Düşük ROS seviyeleri fizyolojik koşullarla ilişkili iken, yüksek ROS seviyeleri ve meydana getirdiği oksidatif stres genellikle patolojik durumlarla ilişkilendirilmektedir. Yüksek ROS ve oksidatif stres; nörodejeneratif bozukluklar (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz), kardiyovasküler hastalıklar ve karsinogenez gibi farklı patolojilerin nedensel ajanı olarak gösterilmektedir. Özellikle karsinogenez sürecinde stres koşulları tarafından fizyolojik olarak modifiye edilen adaptif bir yanıtın meydana geldiği öne sürülmüştür (9).

ROS üretimini nötralize etmek için görevli olan birincil antioksidan savunma sistemleri; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX), paraoksonaz (PON) tioredoksin peroksidaz (Trx) ve hem oksijenazlar gibi enzimatik detoksifiye edicilerdir (54). Ek olarak, A, C ve E vitaminleri, glutatyon, peroksiredoksinler, tioredoksinler gibi enzimatik olmayan bileşenler de

antioksidanlar olarak görev almaktadır. Aynı zamanda hemoksisenaz veya ROS oluşumunu önlemeye yönelik katekol-O-metiltransferaz da bu süreçte önem taşımaktadır (Şekil 2.6) (9).



Şekil 2.6. Bazı ROS türleri ve antioksidan enzimler arasındaki ilişkinin şematik gösterimi (9).

2.4. Paraoksonaz Enzim Ailesi

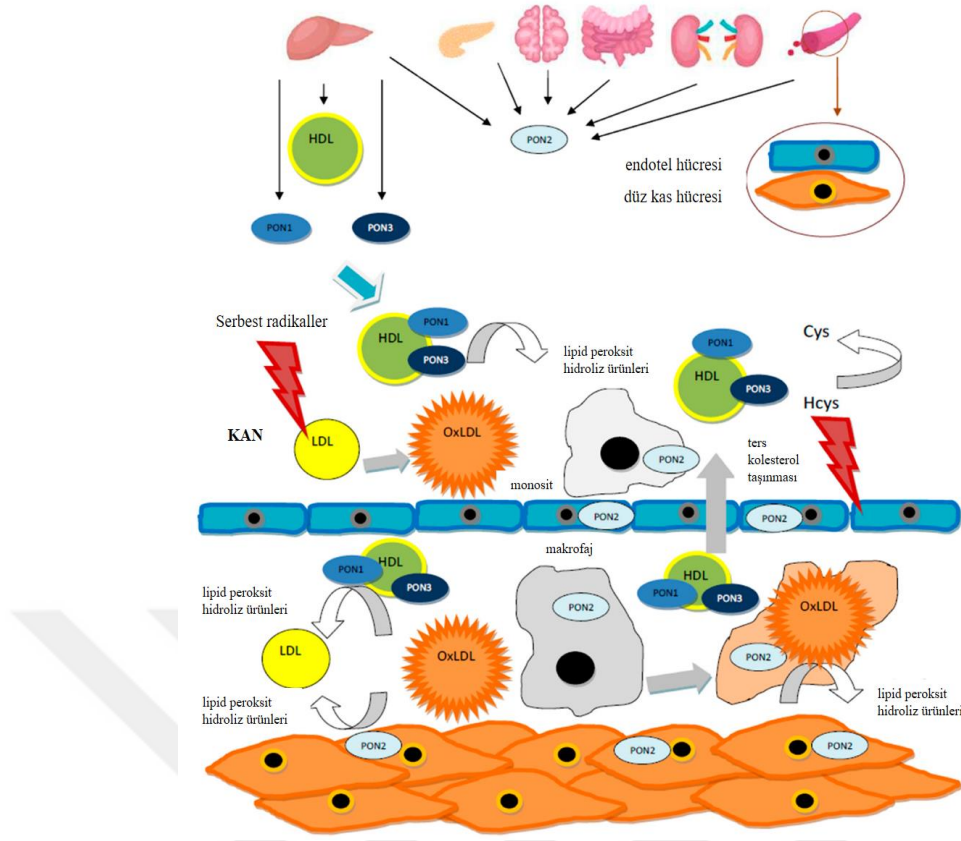
ROS, antioksidan savunma mekanizmasına ağır bastığında, oksidatif stres olarak bilinen biyolojik hasar meydana gelmektedir. Bu hasardan korunmak için geliştirilen antioksidan savunma sistemindeki önemli endojen enzimlerden biri de PON enzim ailesidir (59,60).

PON enzimi, ilk defa 1946'da Abraham Mazur tarafından keşfedilmiş olup memeli dokularında bulunan ve organofosfat bileşiklerini hidroliz eden bir enzim olarak tanımlanmıştır (61). Bu keşif, 1953'te Aldridge tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak paraoksonaz

sınıflandırılmasının önünü açmıştır (62,63). Başlangıçta, enzim "A"-esterazlar olarak adlandırılmış, ancak daha sonra paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat) substratını detoksifiye etme kabiliyeti nedeniyle paraoksonaz olarak tanımlanmıştır (64). İnsanda ise ilk kez serumda Uriel tarafından 1961 yılında HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır (65).

PON'lar Aldridge sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolazlardır. A esteraz sınıfı diğer enzimler Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} bağımlı aktivite göstermesine rağmen, PON Ca^{+2} bağımlı bir ester hidrolazdır. Ca^{+2} , doğrudan katalitik reaksiyonlarda yer alarak ya da aktif bölgenin uygun konformasyonda tutulmasını sağlayarak etkisini göstermektedir. IUBMB sistemine göre de PON, EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1. şeklinde iki numaraya sahiptir. EC 3.1.1.2 arilesterazı ifade ederken EC 3.1.8.1 ise arildialkil fosfatazı ifade etmektedir. Bu numaralandırma sistemleri, enzimin sadece fenolik esterleri (arilesteraz) değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz etmesinden köken almaktadır.

İnsan PON enzim ailesi 7. kromozomun uzun kolu üzerinde (q21.3-q22.1) yer almakta ve PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır (59,60). Tüm üyelerin dokuz eksonu ve nükleotid seviyesinde yaklaşık % 70 homoloji ve amino asit sekansında % 60 oranında benzerlik bulunmaktadır (64). PON2, ailenin en eski üyesi olarak tanımlanmaktadır. PON1 ve PON3 ise muhtemelen gen duplikasyonunun sonucu olarak bulunmaktadır (10). PON1, ekson 1'deki üç ekstra nükleotid kalıntısı ile PON2 ve PON3'ten ayırt edilmektedir. Tüm paraoksonazlar, oksidatif hasara karşı koruma ve endoplazmik retikulum stresini azaltma görevi üstlenmektedir. Ayrıca apoptozun düzenlenmesinde, spesifik olmayan bağışıklıkta ve ilaçların biyoaktivasyonunda rol oynamaktadır (64). Her üç enzim de makrofaj kolesterol akışını güçlendirmekte ve lipid peroksidleri hidrolize ederek lipoprotein oksidasyonunu önlemektedir. Ayrıca laktonaz aktivitesi nedeniyle homosistein (Hcy) tiyolakton doku toksisitesini nötralize etmektedir (Şekil 2.7) (66).

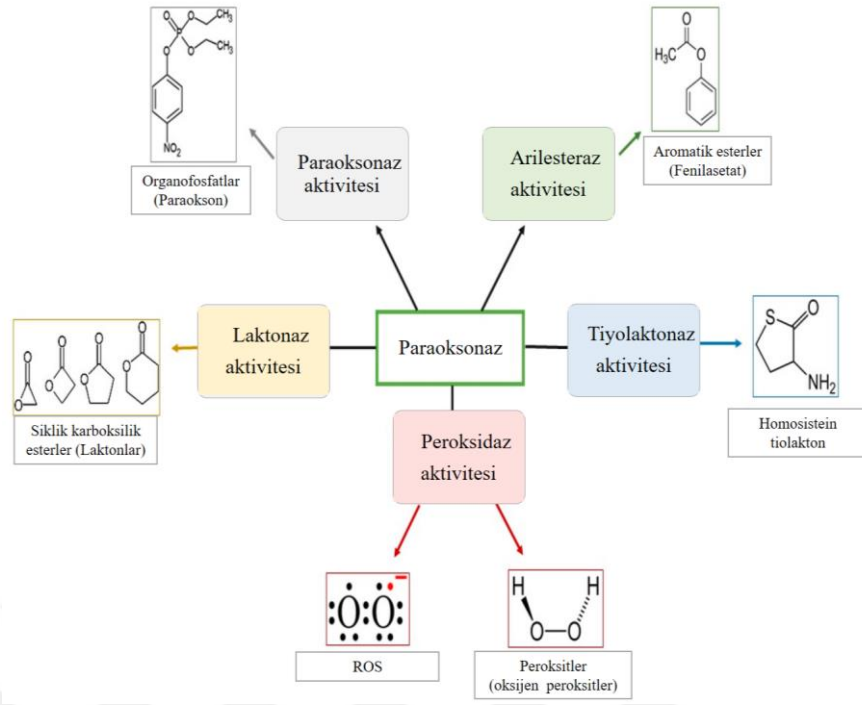


Şekil 2.7. PON enzimlerinin lipid oksidasyonuna karşı savunmadaki fizyolojik etkileri (66).

2.4.1 Paraoksonaz Enzim Ailesi Aktiviteleri

PON enzimi; paraoksonaz, arilesteraz, laktonaz, tiyolaktonaz ve peroksidaz aktivitelerine sahiptir (Şekil 2.8) (64). Başlıca fonksiyonları;

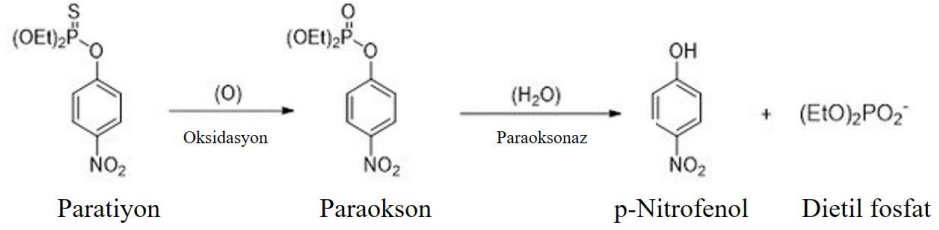
1. Paraokson gibi organofosfatlı pestisit detoksifikasyonuna katılmak,
2. Lipid peroksitleri hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumak,
3. Hidrojen peroksit üzerinde peroksidaz benzeri aktivite göstermek,
4. Mitokondriyal disfonksiyon ve antiapoptotik özelliklere karşı koruma sağlamaktır (11,60,64).



Şekil 2.8. Paraoksonaz enzimi aktiviteleri ve substratları (64).

Paraoksonaz Aktivitesi

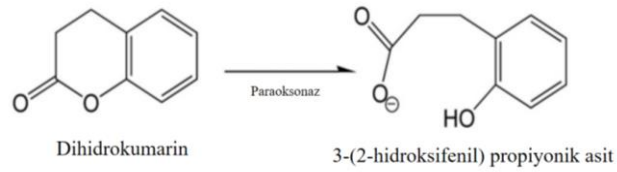
Organofosfat bileşiklerinden parathionun aktif katabolik metaboliti olan paraokson, enzime adını verdiği gibi, paraoksonaz aktivite tayininde de en çok kullanılan substratlardan biridir. PON'un hidrolitik aktivitesiyle açığa çıkan p-nitrofenol veya fenolün konsantrasyonu üzerinden, paraoksonaz aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmektedir. PON1'in, özellikle paraokson substratını hidrolize ederek paraoksonaz aktivitesi göstermesinin yanında laktonaz aktivitesi de dikkat çekmektedir (Şekil 2.9) (67,68).



Şekil 2.9. PON enziminin paraoksonaz aktivitesi ve paraoksonu hidrolizi (67).

Laktonaz Aktivitesi

PON1 için doğal substratların laktonlar olduğu ve lipofilik laktonların birincil substratları oluşturduğu yapılan çalışmalar sonucunda ileri sürülmüştür. PON1'in aktif bölgesindeki amino asitlerin aromatik doğası, enzimin neden lipofilik substratları tercih ettiğini açıklamaktadır. PON1, çeşitli laktonları hidrolize etmektedir. Ayrıca PON ailesinin üç üyesi de (PON1, PON2 ve PON3), farklı substrat özgüllüklerine rağmen laktonaz aktivitesi göstermektedir (68,69). PON enzimi laktonaz enzim aktivitesi ile dihidrokumarin substratını hidroliz ederek 3-(2-hidroksifenil) propiyonik aside dönüştürmektedir. Oluşan ürünün spektrofotometrik olarak tayini, PON'un laktonaz aktivitesinin tespitinde kullanılmaktadır (Şekil 2.10) (70-73).



Şekil 2.10. PON enziminin laktonaz aktivitesi ve dihidrokumarini hidrolizi (72,73).

2.4.2. PON1 Enzimi

PON1, karaciğerde sentezlenen, toplam moleküler kütlesi yaklaşık 43-45 kDa olan 355 amino asitten oluşan Ca^{+2} bağımlı bir ester hidrolazdır. Glikoprotein yapıda olan PON1, molekül ağırlığının % 15.8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içermektedir. Enzimin yapısını stabilize eden bir disülfid köprüsü ile birbirine bağlanan dört β -kıvrım içeren altı silindirik β -pervane yapısından oluşmaktadır. Enzim içindeki konumuna bağlı olarak her bir Ca^{+2} iyonu, PON1'in aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. 42, 284 ve 352 konumlarında üç sistein kalıntısı içermektedir. PON'un yapısındaki 284. pozisyonundaki sistein serbest iken, 42. ve 352. pozisyonundaki sisteinler arasında disülfid bağı bulunmaktadır. Serbest sistein ise substrat tanınması ve bağlanması için gereklidir (64,74).

PON1 bir antioksidan olarak lipid metabolizmasında ve inflamasyonun kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. HDL ile ilişkili önemli enzimlerden biri olan PON1, paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelerine sahiptir (64,75). PON1, organofosfat ksenobiyotikleri ve sinir ajanlarını esteraz aktivitesi ile detoksifiye etmektedir (75). Ayrıca PON1, yağ asitlerinin hidroperoksitlerinin, kolesterol ester hidroperoksitlerin ve H_2O_2 'nin nötralizasyonuna yol açan peroksidaz aktivitesine de sahiptir. PON1 düzeyindeki artış, inflamatuvar süreçte üretilen peroksitlere karşı karaciğerin korunmasına katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.7) (64,66).

PON1 karaciğerde, daha az miktarda da böbrek ve kolonda sentezlenmekte, çoğu hücrenin zarında aynı zamanda HDL'ye bağlı olarak dolaşımda bulunmaktadır. HDL bütünlüğünün korunmasında görevli olan PON1 ve HDL arasında kararlı ve yüksek afiniteli bir bağlanma bulunmaktadır. PON1 yapısındaki hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL lipidleriyle etkileşime girmektedir. N-terminal hidrofobik bölge ile fosfolipidlere ve lipoproteinlere kolayca bağlanmaktadır. PON1'i bağlayan HDL alt birimleri, Apolipoprotein AI (Apo AI) ve Apo J (klusterin) proteinlerini de içerdiğinden, Apo AI ve Apo J'nin de bağlanmada rol oynadığı düşünülmektedir. HDL'ye bağlı PON1, çeşitli doku ve organlarda hücre zarlarına taşınır ve dağıtılır. Bu şekilde, membranların lipid peroksidasyonuna ve LDL oksidasyonuna ayrıca inflamatuvar süreçler ve oksidatif stresin aktivasyonundan kaynaklanan serbest radikallerin oluşumuna karşı birincil bir rol oynamaktadır (10,64,75).

2.4.3. PON2 Enzimi

PON2 izoformunun işlevleri ve düzenlenmesi, PON1'inkinden daha az anlaşılmıştır. Ancak filogenetik bir analize göre, PON2 bu gen ailesinin en eski üyesi olup PON1 ve PON3, PON2'den evrimleşmiştir (64). PON1 ve PON3'ün aksine plazmada bulunmayan PON2; HDL veya LDL molekülleri ile ilişkili değildir. Bununla birlikte, hücre içi olarak lokalizedir ve plazma zarına bağlanmaktadır. Ayrıca, mitokondri zarında ve endoplazmik retikulumda da bulunmaktadır. Karaciğerde üretilen PON2; akciğer, plasenta, testisler, kalp, mide, ince bağırsak, dalak, böbrek, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri gibi farklı doku ve hücrelerde de eksprese edilmektedir (Şekil 2.7) (10,66,74,75). Üç paraoksonaz enzimi arasında sinir dokularında ifade edilen tek enzim PON2'dir (64).

Tüm dokulardaki konumu, ekspresyonu ve laktonaz aktivitesi nedeniyle oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu ile ilgili çalışmalarda özel ilgi görmüştür. Ekspresyonu, hücresel oksidatif stres ve iç mitokondriyal zardan azaltılmış süperoksit salınımı altında düzenlenmektedir. Antioksidatif etkisi ile PON2, hücresel oksidatif hasarı azaltmakta, hücre sağkalımını ve apoptozun azalmasını destekleyen redoks sinyali etkilemektedir (64).

2.4.4. PON3 Enzimi

Farmakolojik ajanlar da dahil olmak üzere birçok substratın hidrolizini katalize eden bir glikoprotein olan PON3, antioksidan ve antiaterosklerotik aktiviteler sergilemektedir. Başlıca karaciğerde eksprese olmasının yanında böbrekte de bulunmaktadır. Ayrıca, PON1 gibi, PON3'ün de HDL yüzeyinde lokalize olduğu bildirilmiştir (10,75). Bazı araştırmalar, PON3'ün birincil olarak hücre içi etki gösterdiği ve fizyolojik olarak kana salınmadığı ve serumdaki varlığının patolojik süreçlerin sonucu olduğu hipotezini desteklemektedir. PON3 yüksek laktonaz ve düşük arilesteraz aktiviteleri gösterirken paraoksonaz aktivitesi göstermemektedir (64,74,76).

2.4.5. PON Enzim Ailesi ve Kanser

Ateroskleroz ve koroner kalp hastalıkları başta olmak üzere diabetes mellitus ve komplikasyonları, karaciğer hastalıkları, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, metabolik sendrom, obezite, yaşlanma ve kanser gibi birçok önemli hastalık ile PON enzimlerinin ilişkisi bulunmaktadır (68,77). Karsinogenez sürecinde hücrelerde, hücre ölüm programının ve apoptoz direncinin düzenlenmesi bozularak neoplastik transformasyon meydana gelmektedir. Yoğun oksidatif stres ve inflamasyon süreci, uzun vadede tümör hücresinin büyümesi için ideal ortamı sağlamanın yanı sıra karsinogeneze de yol açabilmektedir. Kanser hücreleri yüksek konsantrasyonlarda ROS üretmektedir. Üretilen ROS; hücre metabolik yolları, mitokondriyal ve peroksizom fonksiyonları değiştirmekte, hücre reseptörü sinyalinin, inflamatuvar sitokinlerin ve onkogenlerin aktivasyonunu artırmaktadır (64). Altta yatan moleküler mekanizmalar belirsiz kalmasına rağmen, kanser hücresinin hayatta kalmasında ve stres direncinde hayati bir rol oynadığı ortaya konulan PON enzimlerinin antioksidatif ve anti-apoptotik fonksiyonlarının bu mekanizmanın merkezinde olduğu ileri sürülmektedir (13,68). Antioksidan savunma ve hücre davranışının düzenlenmesinde rol oynayan çok işlevli enzimler olan PON'ların, çeşitli kanserlerde aktivitelerindeki ve ekspresyonlarındaki değişimlerin önemi gösterilmektedir (13). PON düzeyinde azalma ve PON polimorfizmleri, kanserleşmenin temel özelliklerinin pek çok sürecinde direkt veya indirekt rol alarak kanser oluşumunu desteklemektedir. PON'lardaki değişen dengenin düzenlenmesi, kemoterapi başarısını arttırmak için potansiyel bir yol olarak önerilmiştir. Özellikle PON ekspresyonuna aracılık eden sinyal iletim yolları araştırılarak mekanizma aydınlatılmaya çalışılmalıdır (68).

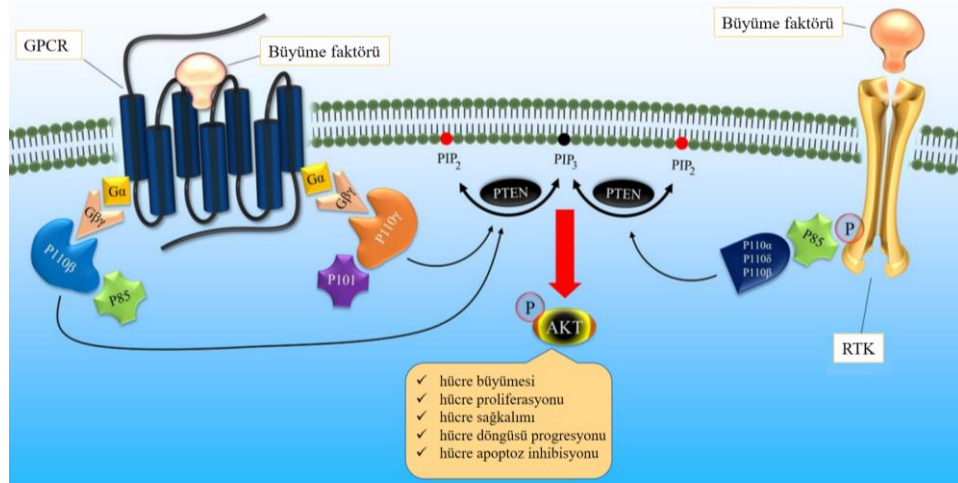
2.5. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

Çok hücreli organizmaların devamlılığı sadece madde ve enerji metabolizmasına değil, aynı zamanda hücreler arası iletişime ve sinyal düzenlemesine de bağlıdır. Genel olarak, farklı iletişim sinyalleri, çeşitli yaşam aktivitelerini ve hücre davranışları düzenlemektedir (78). PI3K/Akt/mTOR (Fosfatidilinositol 3-kinaz/Protein Kinaz-B/ Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) sinyal yolağı; hücre sağkalımı, proliferasyonu, hücre metabolizma, apoptoz, metastaz, hücre iskeletini yeniden düzenleme ve hücre döngüsü ilerlemesi

gibi birçok durum ile ilişkilendirilen en önemli hücre içi sinyal yolaklarından biridir. Bu yolak, büyüme faktörleri aracılığıyla reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) veya G protein-bağlı reseptörlerden (GPCR'ler) sinyaller olarak aktive edilmektedir. Tümörlerin çoğunda bu sinyal yolunda pek çok değişim tespit edilmiştir. Onkoproteinlerin ve tümör baskılayıcı genlerin çoğu, PI3K sinyal iletim yolu proteinlerini hedef alan mekanizmaları aktive veya inhibe ederek hücre metabolik sinyal düzenlemesinde rol oynamaktadır (78,79).

Bir lipid kinaz ailesi olan PI3K'lar; sınıf I, sınıf II ve sınıf III olarak adlandırılan üç sınıftan oluşmaktadır. Kanserle ilgili en önde gelen sınıf olan doğrudan hüce yüzeyi reseptörleri tarafından aktive edilen sınıf I PI3K'lar; sınıf IA (PI3K α , PI3K β ve PI3K δ) ve sınıf IB (PI3K γ) olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf IA PI3K'ler, RTK'ler, GPCR'ler ve küçük G proteini RAS tarafından aktive edilmektedir. Ancak, yalnızca bir alt birimden (PI3K γ) oluşan sınıf IB PI3K'ler, yalnızca GPCR'ler tarafından aktive edilmektedir (79). Sınıf I PI3K'lar, bir katalitik (CAT) alt birimden (p110) ve bir adaptör/düzenleyici alt birimden oluşan heterodimer yapıda bulunmaktadır. Memeli genomu, dört farklı p110 izoformunu (α , β , γ ve δ) ve çok sayıda düzenleyici alt birimi kodlamaktadır. p110 α , p110 β ve p110 δ (sınıf IA) için en yaygın düzenleyici alt birim p85 olarak adlandırılırken; p110 γ (sınıf IB) ise p101 ve p84/p87 düzenleyici alt birimlerle ilişkilendirilmektedir (79).

Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan bir RTK, sınıf I PI3K proteinlerinin aktifleşmesine neden olmaktadır. Sınıf I PI3K'ler (p110 α , p110 β ve p110 δ) p85 ile etkileşime girerek plazma zarında bulunmaktadır. Aktivasyonları, aktive edilmiş p110 ile sonuçlanmaktadır. Ardından aktifleşmiş sınıf I PI3K proteinleri, fosfatidilinositol-4,5-bifosfatı (PIP2) fosforilleyerek ikinci haberci olan fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüştürmektedir. Bu sürecin tersine çevrilmesinde ise fosfataz ve tensin homologu (PTEN) görev almaktadır (Şekil 2.11) (79).



Şekil 2.11. PI3K/Akt sinyal yolağında Akt fosforilasyonu (79).

2.5.1. Akt Proteini

HücreSEL yaşam ve ölüm mekanizmaları olmak üzere birçok hücreSEL fonksiyonun gerçekleştirilmesinde PI3K sinyal yolunun aşağısındaki ana molekül olarak görev alan Akt; bir serin/threonin kinazdır. Akt, son derece korunmuş 3 izoforma sahiptir: Akt1, Akt2 ve Akt3. Birçok kanser türünde Akt'nin izoformlarının tümünde de genetik değişiklikler ve anormallikler keşfedilmiştir. Akt1 birçok dokuda yaygın olarak eksprese edilmektedir. Akt2 esas olarak insüline duyarlı dokularda ve diğer dokularda düşük seviyelerde eksprese olmaktadır. Akt3 ise sadece beyin ve testislerde eksprese edilmektedir. Farklı Akt izoformlarının spesifik doku ekspresyon paternleri, bunların farklı doku veya organlardaki fizyolojik fonksiyonlarının sürdürülmesindeki kilit rollerini ortaya koymaktadır (78).

Üç Akt izoformu, %85 amino asit dizisi homolojisi ve üç farklı fonksiyonel alandan oluşan çok benzer üç boyutlu yapılar sergilemektedir. N-terminal pleckstrin homoloji (PH) alanı, protein-protein ve protein-lipid etkileşimlerini düzenlemektedir. Merkezi kinaz katalitik alanı, enzimatik aktiviteden sorumlu olan protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz C (PKC) bölgeleri ile oldukça homologdur (78).

PI3K/Akt sinyal yolağının ilk aşamalarında sinyal uyarısı sonucu meydana gelen PIP3 ile etkileşime giren Akt proteininin; hücrenin iç membranına

aşağı akışlı bir moleküldür ve fosforile Akt tarafından aktive edilmektedir. Bir PDK2 olarak mTORC2 ise, Ser473'ü fosforile ederek Akt'nin tamamen aktif hale dönüştürülmesinde rol oynamaktadır (78).

Akt/TSC1-TSC2 sinyal yolu, mTOR aktivitesi ile sonuçlanmakta, hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenlemektedir. Ayrıca TSC2, GTPaz aktivitesine sahiptir ve mTORC1 aktivasyonu için gerekli olan küçük GTPaz Rheb'i inhibe etmektedir. TSC2'nin Akt tarafından fosforilasyonunun ardından, TSC2, mTORC1'i inhibe etme ve mTOR'u aktive etme yeteneğini kaybetmektedir. Ayrıca, TSC2, AMPK (AMP (Adenozin monofosfat) ile aktive edilen protein kinaz) fosforilasyonu ile doğrudan aktive olmaktadır. Akt, TSC2'yi tamamen inhibe ederek AMPK inhibisyonuna ve mTOR aktivasyonuna neden olmaktadır (78).

mTOR'un aşağı akış efektörleri, iki sinyal yolunu içermektedir [1] başlatıcı faktörü 4E bağlayıcı protein 1 (4E-BP1) ve [2] ribozomal protein S6 kinaz (S6K) (78). Aktif Akt, mTOR ilişkili fosforilasyonu, S6K alt yollarının uyarılmasını ve translasyon başlatıcı öge olan 4E-BP1 ile ilgili gen transkripsiyonlarını uyarmaktadır. S6K ribozomal S6'yı aktive ederek protein sentezini ve hücre büyümesini desteklemektedir. Bu 4E-BP'ler ise, ökaryotik translasyon başlatma kompleksinin bir alt birimi olan ökaryotik başlatma faktörü 4E'den (eIF4E) ayrılmaktadır. Yüksek oranda fosforile edilmiş 4E-BP1, ilgili mRNA'ların translasyonunu başlatarak ilgili genleri uyarmaktadır (Şekil 2.12) (78,80).

2.6. Sıvı Biyopsi

Sıvı biyopsi, geleneksel tanı yöntemlerine kıyasla kanser teşhisi ve takibi için birçok avantaj sağlamakta, umut verici bir perspektif sunmaktadır. Tümörlerin ve mutasyonların daha iyi izlenmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, sıvı biyopsilerin genomik profillerinin, ait olduğu tümörlerle çok yakından eşleştiği gösterilmiştir (81).

Özellikle kişiselleştirilmiş tıp, biyobelirteçlerin geliştirilmesine dayanmaktadır ve sıvı biyopsinin, tümör gelişimi ve ilerlemesi hakkında bilgi taşıyan

biyobelirteçler olarak tespit edilebildiği bildirilmiştir (82). Tümörler, sıvı biyopsi olarak çeşitli hücrel bileşenleri dolaşıma salmaktadır. Dolaşıma aktarılan bu sıvı biyopsi biyobelirteçleri; dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC), cell free DNA'lar (cfDNA'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar), diğer kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) ve son yıllarda eksozomlar olarak karşımıza çıkmaktadır (83). Kanserin erken teşhisine, terapötik hedeflerin tanımlanmasına ve tedaviye yanıtın izlenmesine olanak sağlayarak non-invaziv olması sıvı biyopsiyi, daha avantajlı bir teknik haline getirmektedir. Ayrıca tümörün karakterizasyonunu incelemeye olanak sağlaması ile de ileri tekniklere fırsat tanımaktadır (84).

Sıvı biyopsi olarak tespit edilerek lipid, protein, RNA ve DNA içeren, paketlenmiş en küçük hücre dışı veziküller olan eksozomlar; hücreler arası iletişimin anahtar oyuncularıdır. İçeriklerini koruyarak vücut sıvılarında dolaşmaları, onları yenilikçi teşhis ve tedavi araçları olarak klinik uygulama için çekici adaylar haline getirmektedir. Dolaşımdaki eksozomlar, zenginleştirilmiş biyobelirteçler içerdikleri için son zamanlarda ümit verici tümör belirteçleri olarak kabul edilmektedir (82).

2.7. Ekstrasellüler Veziküller

Uzun süre bilim insanları yalnızca hormonların, sitokinlerin veya nörotransmitterlerin hücreler arası iletişim sağladığını kabul etmişlerdir. Ancak son yıllarda, ekstrasellüler veziküller (EV'ler) aracılığıyla da hücrelerin iletişim kurabildiği dikkat çekmektedir (85). EV'ler, endozomlardan veya plazma membranının tomurcuklanmasından kaynaklanan küçük zar kesecikleridir. Hem mikroçevre hem de uzak dokular üzerinde etki etmektedirler. EV'ler lipidler, transmembran ve sitozolik proteinler, genomik ve mitokondriyal DNA'lar, mRNA'lar, uzun kodlamayan RNA'lar ve miRNA'lar içermektedir (86). İdrar, tükürük, sinoviyal sıvı, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveolar sıvı, burun sıvısı, rahim sıvısı, amniyotik sıvı, anne sütü, safra, seminal plazma ve kan dahil olmak üzere her vücut sıvısından izole edilerek çeşitli fizyolojik süreçlerde görev almaktadırlar (87).

EV sınıflandırması ve isimlendirmesi açısından belirsizlik olsa da, şu anda EV'ler; biyolojik işlevlerine veya biyogenez mekanizmalarına göre üç türe ayrılmaktadır (86,88-90):

1) EV'ler arasında en büyüğü olan apoptotik cisimlerin boyutları 50 nm'den 5 µm'ye kadar değişmektedir. Apoptoz durumunda, belirli koşullar altında ölmekte olan hücrelerden salınarak makrofajlar tarafından ortadan kaldırılmaktadır.

2) Bir plazma membranı tarafından üretilen ve sitoplazmik kargo içeren, tomurcuklanarak salınan veziküller olarak bilinen mikroveziküllerin çapı ise 50-1000 nm arasında değişmektedir. Ancak kanser hücrelerinden salındığında onkozom adı verilen mikroveziküllerin 10 µm boyutlara çıkabildiği bildirilmiştir.

3) Eksozomlar, endojen kökene sahip tek veziküllerdir. EV ailesinin en küçük üyesi olup boyutları 30-150 nm arasında değişmektedir.

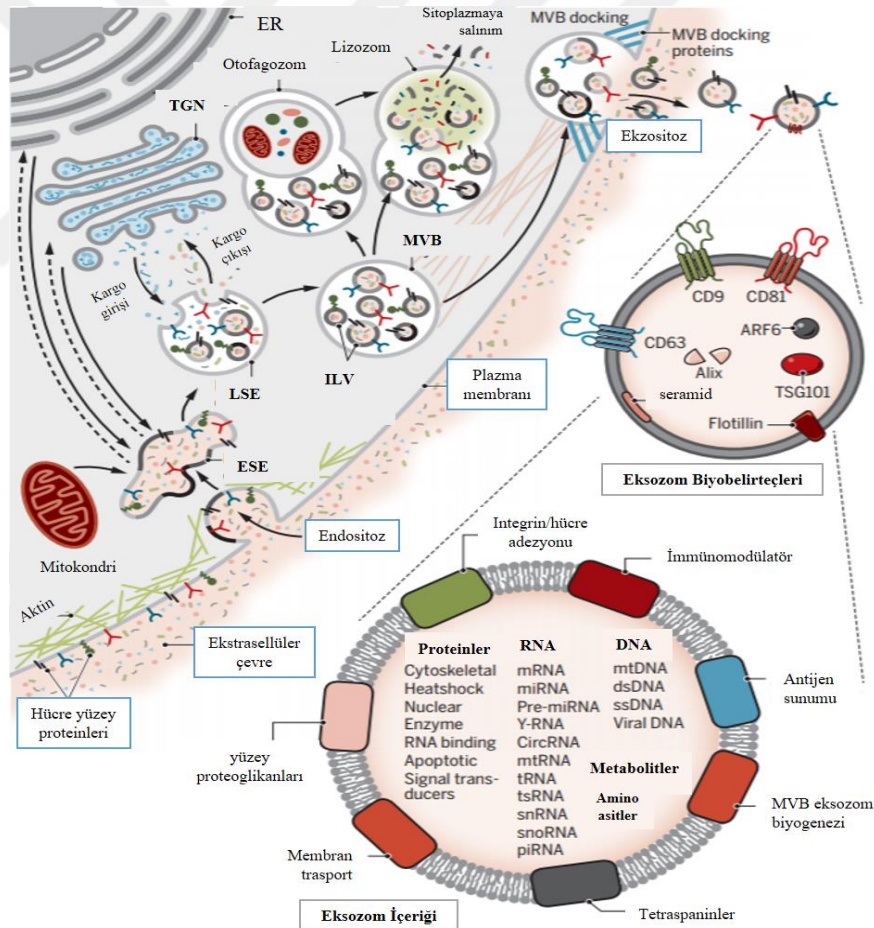
2.7.1. Eksozomlar

Eksozomlar birçok hastalığın tanı ve tedavisine yönelik yapılacak araştırmalarda popüler hale gelmiştir. Yarı ömürlerinin uzun olması, non-immünojenik ve non-toksik olmaları, plazma ya da serum gibi yapılardan kolaylıkla elde edilebilmeleri, kan beyin bariyerini geçebilmeleri, stabilitelerinin yüksek olması dolayısıyla laboratuvar şartlarına uygun olmaları ile istenen terapötik ajanı yükleme yeteneği eksozomları avantajlı hale getirmektedir (91-94).

Eksozomların, alıcı hücrelerin fenotipini ve davranışını etkileyebilecek biyolojik olarak işlevsel veziküller olduğu doğrulanmıştır (95). Güncel eksozom veritabanına dayalı olarak, eksozomlarda 9 769 protein, 2 838 mikroRNA ve 3 408 adet mRNA bulunmaktadır (96).

Hücrelerin mikroçevresi ve biyolojisi, eksozomların içeriğini ve biyobelirteçlerini etkileyerek değiştirmektedir. Ancak genel olarak eksozomlar, zar

proteinlerini, sitozolik ve nükleer proteinleri, hücre dışı matris proteinlerini, metabolitleri ve nükleik asitleri (mRNA, kodlamayan RNA türleri ve DNA) içermektedir. Eksozomları tanımlamak için bir dizi eksozom işaretleyici protein bulunmaktadır. Bunlar, eksozomun salgılanması sırasında yüksek oranda eksprese edilen önemli proteinler olan taşıma, füzyon moleküllerini ve Rab (Ras ilişkili bağlayıcı protein) protein ailesini içermektedir. Ayrıca eksozom biyobelirteç proteinleri olarak; GTPazlar, anneksinler, Flotillin-1, ESCRT (taşıma için gerekli olan endozomal sıralama kompleksi), Alix (apoptoz bağlantılı gen 2-etkileşimli protein X), tümör duyarlılık geni 101 (TSG101), ısı şok proteinleri (HSP90a, HSP70), integrinler ve tetraspanin ailesi (CD9, CD63, CD81 ve CD82) gösterilmektedir (Şekil 2.13) (24).



Şekil 2.13. Eksozom içeriği, biyogenezi ve salınması (24).

Tetraspanin grubuna ait olan proteinler, integrinler, immünomodülatör proteinler gibi eksozom yüzey proteinleri; eksozomun hücre penetrasyonu, invazyonu ve füzyonunda etkili olmaktadır. HSP70 ve HSP90 gibi HSP'ler de antijen bağlanmasında rol oynamaktadır. Bu proteinler aynı zamanda eksozom belirteçleri olarak da kullanılmaktadır (24,97). Ayrıca kolesterol, sfingomiyelin ve seramidin de eksozom yapısında yüksek oranda bulunması nedeniyle biyobelirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (24).

2.7.2. Eksozom Biyogenezi ve Salınması

Hücre zarından doğrudan tomurcuklanan mikroveziküllerin aksine eksozomlar, olgunlaşan endozomların içinde endositik yollarla üretilmektedir (Şekil 2.13). Bu nedenle eksozomlar endozomal kaynaklı EV'ler olarak tanımlanmaktadır. (98). Eksozomları serbest bırakmak için birkaç hücresel adımın tamamlanması gerekmektedir. Bu adımlar; multiveziküler cisimciklerin (MVB) oluşumu, MVB'lerin plazma membranına taşınması ve MVB'lerin plazma membranı ile füzyonudur (24).

Eksozomların biyogenezinde ilk basamak, hücre zarının bir kısmının içe doğru tomurcuklanması ve bu zar yapısının kıvrılarak intralüminal veziküller (ILV) olarak adlandırılan ilk kesecik yapısını oluşturmasıdır. Proteinler, lipidler, metabolitler, küçük moleküller ve iyonlar gibi hücre dışı bileşenler, endositoz ve plazma zarı invajinasyonu yoluyla hücre yüzeyi proteinleriyle birlikte hücreye alınmaktadır. Hücrenin lümen tarafında ortaya çıkan plazma membran tomurcuğu oluşumu, dıştan içe plazma membran oryantasyonu ile meydana gelmektedir. Bu tomurcuklanma süreci, early-sorting endozomların (ESE'ler) oluşumuna olanak sağlamaktadır. Endoplazmik retikulum (ER), trans-golgi ağı (TGN) ve mitokondri bileşenleri ile oluşturulmuş ESE'ler arasında etkileşim meydana gelmektedir. Ayrıca ESE'ler, geç sorting endozomlara (LSE'ler) olgunlaşarak bu iletişim ağında yer almaktadır. Sonuç olarak, plazma zarının içe doğru tomurcuklanması ile oluşan küçük veziküllerin birleşmesiyle oluşan bu erken endozomların olgunlaşma süreci sırasında ILV'ler meydana gelmektedir (24,99,100).

Ardından ILV tarafından, içerisinde çok sayıda vezikül taşıyan ve MVB'ler olarak adlandırılan bir yapı oluşmaktadır. MVB'ler, metabolik olarak iki farklı yol izleyebilmektedir; (1) degradasyon ve (2) eksozom salınımı. Eğer bir MVB degradasyonu söz konusu ise, MVB otofagozomlarla kaynaşarak içeriğini lizozomlarda bozulmaya yönlendirmektedir. MVB'ler degradasyon için lizozomlarla doğrudan da kaynaşabilmektedir. Degradasyon sonucunda açığa çıkan ürünler ise sitoplazmaya salınarak hücreler tarafından geri dönüştürülmektedir. Parçalanmayacak olan MVB'ler ise, hücrenin hücre iskeleti ve mikrotübül ağı aracılığıyla plazma zarına taşınmaktadır. Burada MVB-docking proteinleri yardımıyla plazma zarının lümen tarafına kenetlenmektedir. Ardından eksositoz oluşmakta ve plazma membranı ile benzer bir lipid çift tabakalı oryantasyona sahip bu zarlı yapı eksozom adını alarak hücreden salınma meydana gelmektedir (24,99,100).

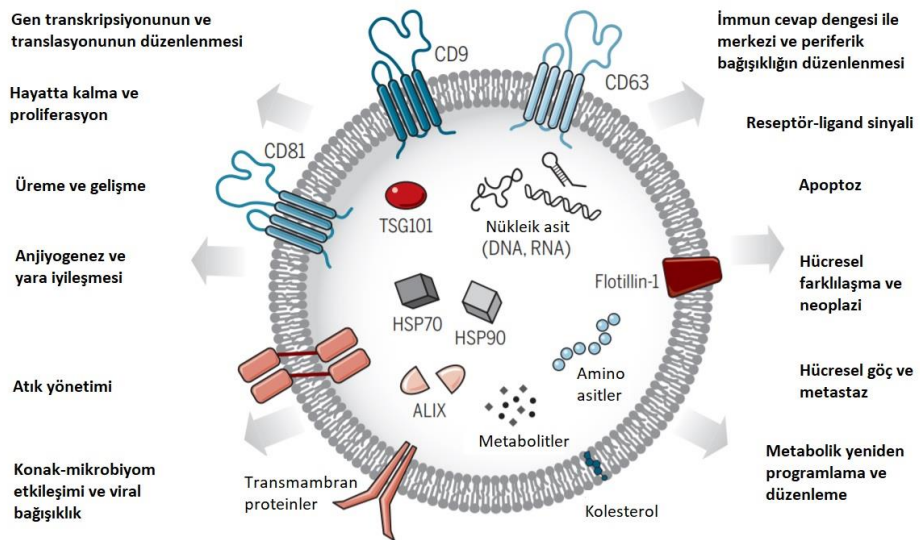
Bir hücrelerden salınan eksozom, bir başka hücreyi iki şekilde etkileyebilir. Birincisi, eksozomların yalnızca hücre zarı reseptörlerine bağlanarak ligand görevi üstlenmesidir. Bu bağlanma ile, olası aşağı akış sinyalleri yönetilmektedir. İkinci etki mekanizması ise, eksozomların doğrudan membran füzyonu yoluyla hücreye alınmasıdır. Hücreye giren eksozom, adeta doğal bir nanotaşıyıcı gibi işlev görerek taşıdığı kargo içeriğini sitozole bırakmakta ve hücre içindeki bir dizi sinyal yolunu aktive veya inhibe etmektedir (24,99-101).

2.7.3. Eksozom ve Kanser İlişkisi

İnsan vücudundaki hemen hemen her tür hücre, eksozomları hücre dışı ortama salma yeteneğine sahiptir. Ancak son yıllarda özellikle eksozomların nörodejeneratif bozukluklar, AIDS gibi birçok hastalığın patogenezinde ve özellikle tümör biyolojisinde önemli rollerinin belirlenmesi dikkat çekmektedir (102,103). Eksozomların hücreler arasında çapraz konuşma yapmak için çözünür faktörleri serbest bıraktıp kanser ve sağlıklı hücreler arasında iletişim kurdukları gösterilmiştir (104). Eksozomlar çeşitli tümör antijenlerini, apoptotik proteinleri, tümör ve dokuya özgü peptidleri iletmektedir (105,106). Böylece, sağlıklı hücreler ile kanser hücreleri arasında iletişim kurmak için hücre içi içeriklerini aktararak karsinogenez sürecine

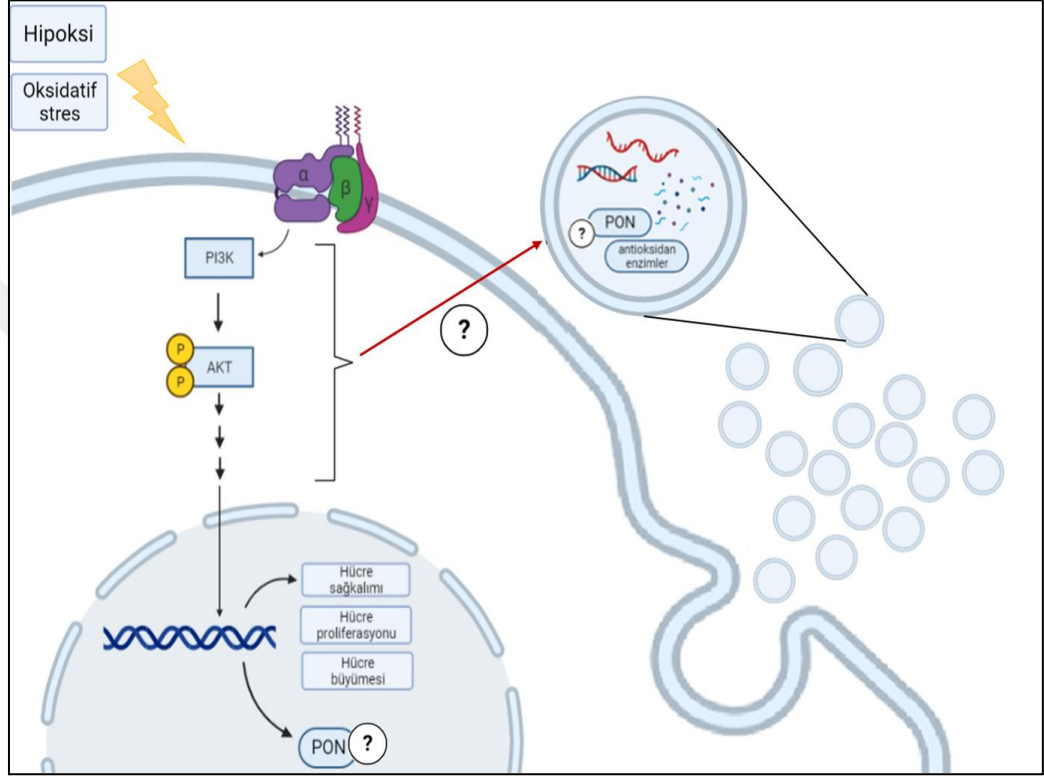
katkıda bulunmaktadır. Ayrıca eksozomlar; tümör büyümesinde, hücre adezyonunda ve ilaç direncinin gelişmesinde etkilidir. Eksozomlar, yüzeylerinde veya içeriklerinde taşıdıkları enzimler, ligandlar, onkogenik sinyal proteinler ve miRNA'lar aracılığıyla kanserin ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunmaktadır (107). Ayrıca hücre proliferasyonunu indükleyebilir, anjiyogenezi teşvik edebilir, hücre dışı matrisi yeniden şekillendirebilir ve T hücre aktivitesini modüle ederek bağışıklık kaçışını tetikleyebilirler (108,109).

Özetle; eksozomlar; insan vücudunda pleiotropik işlevlere sahip hücreden hücreye geçiş sistemi olarak tanımlanmaktadır. Tüm hücreler tarafından üretilen hücre dışı veziküllerdir ve nükleik asitleri, proteinleri, lipitleri, metabolitleri taşımaktadır. Sağlıkta ve hastalıkta yakın-uzun mesafeli hücreler arası iletişimin araçları olarak hücre biyolojisinin çeşitli yönlerini etkilemektedirler. Özellikle kanserin karakteristik özellikleri olarak adlandırılan karsinogenez sürecindeki durumlarda dikkat çekici roller üstlenmektedirler. Eksozomlar; tümör üzerinde elde ettikleri bu karakteristik özellikleri ile, kanserin seyrinde önemli görevler elde etmektedirler. Bu nedenle özellikle son yıllarda tümörojenik eksozom çalışmaları hız kazanmakta ve mekanizmanın aydınlatılması için büyük çaba sarf edilmektedir (Şekil 2.14) (24).



Şekil 2.14. Eksozomların karakteristik özellikleri (24).

Tüm bunlar göz önüne alınarak bu tez çalışmasında; hepatosellüler karsinom hücrelerinde ve eksozomlarında normoksik ve hipoksik koşullarda PON enzim ailesi ile PI3k/Akt sinyal yolağı arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Tez amacı şematik gösterimi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Antikorlar

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve antikorlara ait ürün bilgileri Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler.

Adı	Üretici Firma ve Katalog Numarası
% 4-12 Bis-Tris Jel	Thermo Fisher Scientific/NP0327BOX
Akrilamid	Merck/8.00830.0500
Amonyum Persülfat	Sigma-Aldrich/215589
Amfoterisin B	Biowest/L0009
Bradford Reaktifi	BioBasic/BDE641
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Fisher Chemical/D/4121/PB17
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (DPBS)	Gibco/14190144
ECL WesternBright Kiti	Advansta/K-12045-D50
Etil Alkol	Isolab/64-17-5
Fetal Sığır Serum (FBS)	Capricorn Scientific/CP17-1756
Fosfat Tamponlu Tuz Tableti (PBS)	Sigma-Aldrich/P4417
Fosfataz İnhibitör Kokteyli C	ChemCruz/sc-45065
HIF-1 α ELISA Kit	Coon Koon Biotech/CK-bio-11956
iBlot 2 Transfer Stacks, PVDF Regular	Thermo Fisher Scientific/IB24001
Laemmli Tamponu (SDS PAGE için) (2x)	Serva/42526.01
Eksozom İzolasyon Kiti Pan	MACS Miltenyi Biotech/130-110-912
N,N'-Methylenebis(Akrilamid)	Sigma-Aldrich/146072
N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED)	Nzytech/MB03501
NP-40 (Tergitol solüsyonu)	Sigma-Aldrich/NP40S

Tablo 3.1. Devamı

NuPAGE MOPS SDS Yürütme Tamponu (20X)	Thermo Fisher Scientific Novex/NP0001
Penisilin/Streptomisin	Capricorn Scientific/PS-B
Ponceau S Solüsyonu	Biotium/22001
Protein Ladder	BioLegend/773302
Proteaz İnhibitör Kokteyli	MedChemExpress/HY-K0010
RPMI 1640 Besiyeri	Biowest/L0498
Sodyum Klorit (NaCl)	Sigma-Aldrich/31434
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Nzytech/MB18101
Tripan Mavisi Solüsyonu	Sigma-Aldrich/T8154
Tripsin-EDTA (1X)	Gibco/25200-056
Tris-HCl	Sigma-Aldrich/T5941
Tween 20	Bioshop/TWN510
Yağsız Süt Tozu	Sangon Biotech/A600669

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Antikor Adı	Moleküler Ağırlığı	Kaynak	Dilüsyon Oranı	Üretici Firma ve Katalog Numarası
Primer Antikorlar				
mTOR monoklonal antikor	185-290 kDa	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotechnology/ sc-517464
HIF-1 α poliklonal antikor	92 kDa	Rabbit	1:1000	Bioss/BS-0737R
p-mTOR monoklonal antikor	220 kDa	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotechnology/ sc-293133
pan-Akt 1/2/3 poliklonal antikor	55 kDa	Rabbit	1:500	Affinity Biosciences/ AF6261
PON1 poliklonal antikor	42.9 kDa	Rabbit	1:1000	Thermo Fisher Scientific/ PA5-115780
PON2 poliklonal antikor	43.5 kDa	Rabbit	1:1000	Thermo Fisher Scientific/ PA5-120249

Tablo 3.2. Devamı

PON3 poliklonal antikor	40 kDa	Rabbit	1:1000	Thermo Fisher Scientific/PA5-42068
p-Akt poliklonal antikor	60 kDa	Rabbit	1:500	Biolegend/649001
α -Tübülün poliklonal antikor	50 kDa	Rabbit	1:1000	Affinity Biosciences /AF7010
β -aktin poliklonal antikor	42 kDa	Rabbit	1:1000	St John's Laboratory/STJ91464
Sekonder Antikorlar				
Goat-anti-mouse IgG (H+L) HRP konjuge sekonder antikor	-	Goat	1:20000	Advansta/R-05071
Goat-anti-rabbit IgG (H+L) HRP konjuge sekonder antikor	-	Goat	1:20000	Advansta/R-05072

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.3'te listelenmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan cihazların ve gereçlerin listesi.

Adı	Markası ve Modeli
Azot Tankı	Thermofisher Scientific/808
Buzdolabı (+4°C)	Klimasan/S 900 SC DD
Buz Makinesi	Hoshizaki/FM-80KE
CO ₂ 'li İnkübatör	Panasonic/MCO-170AICUV
Çalkalayıcı	Biosan/PSU-10i
Derin Dondurucu (-20°C)	Regal
Derin Dondurucu (-80°C)	Haier/DW-86L628
Dijital Isı Blok	Benchmark/BSH1002-E
Dijital Mini İnkübatör	Benchmark MyTemp/H2200-H
Dikey Elektropherez	Novex/EI0001
Distile Su Cihazı	ELGA/LA621

Tablo 3.3. Devamı

Görüntüleme Sistemi	UVP/ChemiDoc-It ² 510
Güç Kaynağı	Cleaver/nanoPAC-500
Hassas Terazi	MRC/ASB-220-C2
Hipoksik Chamber	StemCell Technologies/27310
Inverted Mikroskop	Euromex
Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı	IKA/RH Basic 2
Işık Mikroskobu	Nikon/Eclipse E100
Kuru Blotlama Sistemi (iBlot)	Invitrogen/iBlot 2
Laminar Flow Kabini	Scanlaf/Mars1500
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec/130-042-303
MACS Separatör (µ)	Miltenyi Biotec/130-042-602
Mini Santrifüj (Spin)	MRC/Ecen-6
Nanodrop	Hangzhou Allsheng/Nano-200
Nanopartikül İzleme Analiz (NTA) Cihazı	Malvern Analytical/Nanosight NS300
Odaklanmış İyon Demeti Taramalı Elektron Mikroskobu (FIB-SEM)	Tescan/GAIA3+
Otoklav	MRC/STE-TAN-23L
Otomatik Mikropipetler (10, 100, 1000 µL'lik)	Eppendorf
pH Metre	Thermofisher Scientific/Orion star A211
Soğutmalı Santrifüj (Mikro)	Hettich/Mikro 220 R
Soğutmalı Santrifüj (Universal)	Hettich/Universal 320 R
Sonikatör	Sonics/VCX130PB
Spektrofotometre (Mikroplaka Okuyucu)	BioTek/Epoch2C
Su Banyosu	Memmert/WNB 14
Şarjlı Otomatik Pipet Pompası	Eppendorf/Easypet 3
Thoma Lamı	Isolab/0.0025 mm ²
Vorteks	MRC/SI-100

3.1.3. Çalışmada Hazırlanan Çözeltiler

Lizis Tampon Çözeltisi: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %1 NP-40 içeren çözeltinin son hacmi pH=8 olacak şekilde distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Proteaz inhibitör kokteyli ve fosfataz inhibitör kokteyli taze olarak %1 oranında kullanım öncesinde eklenmiştir.

Yürütme Tampon Çözeltisi: 20X olarak hazır temin edilen NuPAGE yürütme tamponu 1X olacak şekilde distile su ile dilüe edilerek hazırlanmıştır.

Blotlama Tampon Çözeltisi: 3.025g Tris, 14.4g glisin ve 200mL metanol içeren çözeltinin son hacmi distile su ile 1000mL'ye tamamlanmıştır.

PBS-Tween20 Yıkama Çözeltisi: %0.3 Tween 20 içeren PBS (5 tablet) çözeltisi son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

Süt Tozu Çözeltisi (%3): 3g yağsız süt tozu, son hacim 100 mL olacak şekilde PBS-Tween20 çözeltisi ile tamamlanmıştır.

PON Paraoksonaz Bazal Aktivite Tamponu: (2 mM CaCl_2 içeren 100 mM Tris-HCl) 3.0285g Tris-HCl tartılarak 200 mL distile su eklenmiştir ve manyetik karıştırıcıda çözülmüştür. Daha sonra çözeltinin pH'ı 8'e ayarlanmıştır. Üzerine 0.0555g CaCl_2 eklenerek son hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

PON Paraoksonaz Substrat Çözeltisi: (2 mM paraokson çözeltisi): 1 mL aseton içerisinde 10.8 μL paraokson manyetik karıştırıcıda buz üzerinde çözülmüştür. Üzerine hazırlanan PON paraoksonaz bazal aktivite tamponundan 1 mL eklenerek çözelti tamamlanmıştır.

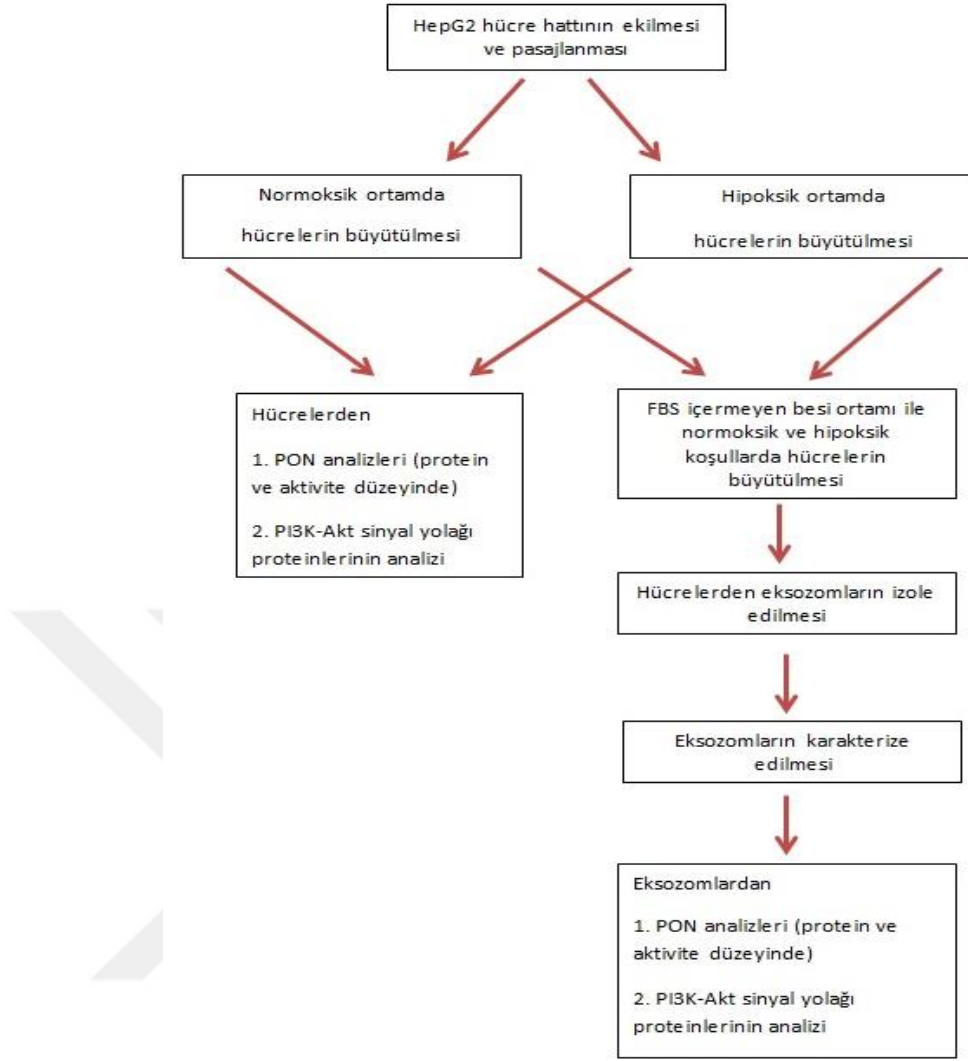
PON Laktonaz Aktivitesi için 50mM Tris-HCl: 0.647g Tris-HCl 80 mL distile suda çözülmüştür. pH'ı 8'e ayarlanıp son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

PON Laktonaz Aktivitesi için 2mM CaCl_2 : 0.261g CaCl_2 bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

Dihidroksümarin (DHC) Çözeltisi: 974.4 μL metanol üzerine 25.6 μL DHC ilave edilerek vortekslenmiştir.

3.2. Yöntem

Tez çalışmasının hedefleri doğrultusunda gerçekleştirilen deneysel aşamalar Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasının deney düzeneği şeması.

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan insan hepatosellüler karsinoma hücre hattı, HepG2 (HB-8065; ATCC; American Type Culture Collection, Manassas, VA, ABD) Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Karaciğer dokusuna ait, *Homo sapiens* kökenli, hepatosellüler karsinom hastalık modelinde bir hücre hattı olan HepG2, epitel benzeri hücre morfolojisi sergilemektedir.

Hücre Hattının Çözdürülmesi, Ekimi ve Büyütülmesi

Hücreler %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin-Gentamisin solüsyonu ile desteklenen RPMI 1640 besiyerinde kültüre edilmiştir. İlk olarak -80 °C derin dondurucu veya sıvı azot tankında muhafaza edilen hücre hatlarının bulunduğu kryotüpler 37°C sıcaklıktaki su banyosunda çözülmüştür. Çözünen hücreler 15mL'lik falkon tüpüne 5 mL besiyeri ile karıştırılarak aktarılmıştır. Ardından 99 x g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra hazırlanan büyütme besiyeri ile homojenize edilen hücre pelleti T25 flaska ekilmiştir. Hücreler ekim sonrası standart koşullarda (%5 CO₂ ve 37°C) CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Besiyerleri iki gün aralıkla değiştirilerek hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyütülmesi sağlanmıştır. Tüm hücre kültürü deneyleri aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlanarak deneyler devam ettirilmiştir. Ayrıca hücreler, inkübasyon süreleri boyunca canlılık, çoğalma ve kontaminasyon açısından inverted mikroskop altında kontrol edilmiştir.

Hücre Hattının Pasajlanması

Hücreler %80-90 oranında konfluent olduğunda diğer flaslara aktarılma aşaması olan pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasajlama için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

1. İlk olarak besiyeri çekilerek uzaklaştırılmış ve DPBS ile yıkanmıştır.
2. Ardından, hücre adezyonunda etkili olan divalent (iki değerlikli) katyonları uzaklaştırmak ve flask yüzeyinden hücreleri ayırmak için hücreler Tripsin/EDTA ile 37 °C'de 5 dk inkübatörde inkübe edilmiştir.
3. İnverted mikroskop altında hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı teyit edildikten sonra, Tripsin-EDTA hacminin iki katı besiyeri eklenmiştir. Bu sayede Tripsin-EDTA inhibe edilmiştir. Hücreler süspanse edilerek steril 15 mL'lik falkon tüpüne aktarılmıştır.
4. Ardından süspansiyon 617 x g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.

5. Pellet medium ile çözölüp pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Hücre sayımının ardından hücreler yoğunluğuna bağılı olarak T25/T75 flasklara pasajlanıp 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

Hücre Sayımı

Hücrelerin sayımı, pasajlama ve dondurma işlemleri için son derece önemlidir. Hücre sayısının belirlenmesi amacıyla ışık mikroskobu altında Thoma lamı kullanılmıştır. İlk olarak besiyeri uzaklaştırılan hücreler, DPBS ile yıkandıktan sonra Tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden ayrılmıştır. Ardından yaklaşık 5 mL besiyeri ile homojenize edilen hücreler, 15 mL'lik steril falkon tüpüne aktarılmıştır. 617 x g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantı atılmıştır. Kalan hücre peleti 1 mL besiyeri ile çözölerek süspansiyon elde edilmiştir.

Elde edilen bu hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak, 1:1 (v:v) oranında tripan mavisi solüsyonu ile homojenize edilmiştir. Ardından 10 µL boyanmış numune, Thoma lamı ve lamel arasına yüklenerek 10X büyütmede mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır.

Hücrelerin canlılık durumları değerlendirilerek sayım yapılmıştır. Tripan mavisi, canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için kullanılan bir boyadır. Ölü hücrelerin hücre membranları seçici geçirgenlik özelliğini yitirdiği için, bu hücreler mavi renk boyanırlar. 16 kare bulunan 4 farklı sette canlı hücreler sayılarak ortalaması alınmıştır. Hücre süspansiyonunun 1 mL'inde bulunan canlı hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Hücre sayısı} = A \times 10^4 \times SF$$

1 mL içindeki canlı hücre sayısı = 16 büyük karedeki ortalama sayılan hücre sayısı x 10⁴ x seyreltme faktörü

Hücre Hattının Dondurulması

Sağlıklı bir şekilde çoğaltılan hücreler bir sonraki deneysel basamaklar için sıvı azotta ya da -80°C buzdolabında dondurularak saklanmıştır. Dondurma protokolü aşağıdaki şekildedir:

1. Besiyeri uzaklaştırılan hücreler ilk olarak DPBS ile yıkanarak Tripsin-EDTA ile pasajlama işleminde olduğu gibi kaldırılmıştır.
2. Ardından santrifüj işlemi ($3 \times 124 \times \text{g}$, 20°C , 5 dk) ile pellet halinde elde edilen hücreler, %10 DMSO içeren FBS'li dondurma besiyeri içerisinde homojen hale getirilerek hücre yoğunluğuna göre kryotüplere aktarılmıştır.
3. Hücrelerin dondurma işleminde zarar görmemeleri için kryotüpler aşamalı olarak soğutulmuştur. İlk olarak 1 saat -20°C buzdolabında muhafaza edildikten sonra 24 saat -80°C buzdolabında muhafaza edilmiştir. Eğer kısa süreli dondurma gerekli ise bu aşamada kryotüpler -80°C buzdolabında bekletilmiştir. Ancak uzun süreli dondurma gerekli ise kryotüpler ertesi gün sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

3.2.2. Hipoksik Ortam Oluşturulması ve Hipoksinin Doğrulanması

Ekilen HepG2 karaciğer hücreleri normoksik ve hipoksik olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Normoksik grup kontrol olarak kullanılmış olup hücre kültürü için gerekli olan standart koşullarda (% 5 CO_2 ve 37°C) inkübe edilmiştir. Hipoksik grup için ise hipoksik chamber kullanılarak (Stemcell Technologies, cat #27310) hipoksik ortam oluşturulmuştur. Hipoksik chamber kullanımı ardından standart inkübatörde hücreler kültüre edilmiştir.

Hipoksik Ortam Oluşturulması

Hipoksik chamber protokolündeki adımlar izlenerek T25 flask ile hücreler chamber tepsisine yerleştirilmiştir. Ayrıca kültürlerin yeterli şekilde nemlendirilmesini sağlamak için bölmeye 10-20 mL steril distile su içeren 10 mm'lik bir petri kabı ağzı açık olarak yerleştirilmiştir. Chamber, hava geçirmeyecek şekilde kilitlenmiştir. Hipoksi oluşturmak için, chamber borusu %2 O_2 , %10 CO_2 ve %88 N_2 gaz karışımı içeren bir hipoksi tankına takılmıştır. Chamber içerisindeki oksijenin

uzaklaştırılarak hipoksi tankının gaz karışımı ile doldurulması için chamber, 4 dk boyunca dakikada 20 L akış hızında gaz karışımı ile muamele edilmiştir. Ardından gaz akışı hızla kapatılıp her iki beyaz kelepçe de kapatılarak chamber, standart CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. HIF-1 α proteininin optimal zaman ifadesini belirlemek amacıyla bir zaman eğrisi oluşturmak için hücreler 2, 4, 6, 12 ve 24 saat dilimlerinde inkübe edilmiştir. Bu şekilde hipoksik ortam sağlanarak hipoksik ortamın doğrulanması için önemli bir hipoksi biyobelirteci olan HIF-1 α proteini, ELISA ve western blot ile analiz edilmiştir.

Hipoksinin Doğrulanması

Hipoksinin doğrulanması için ilk olarak hücre lizatı oluşturulmuş ve lizatlardan ELISA ve western blot yöntemleri ile HIF-1 α seviyeleri belirlenmiştir.

Hücre Lizatı Hazırlanması

Normoksik ve hipoksik koşullarda sağlıklı bir şekilde konfluent olan hücrelerin protein içeriğinin elde edilmesi için flasklar buz üzerine alınarak hücre lizatı oluşturulmuştur. Hücre lizatı elde etmek için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp soğuk DPBS ile yıkanmıştır.
2. Ardından hazırlanan soğuk lizis tamponu, T25 flask için yaklaşık 200 μ L olacak şekilde flask yüzeyine eklenmiştir.
3. Hücreler buz üzerinde hücre kazıyıcı ile kazınarak homojenize edilip, eppendorf tüplere alınmıştır.
4. Buz üzerinde sonikatörde 3 vuruş (%70 Amp ayarında) sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur.
5. Bu şekilde gerçekleştirilen mekanik parçalama sonrası homojenatlar 15 dk 4°C 16249 x g'de santrifüj edilerek proteinleri içeren süpernatant, ELISA ve western blot deneylerinde kullanılmak üzere ayrı bir eppendorf tüpe aktarılmıştır.

6. Hazırlanan bu lizatlar kullanım anına kadar -20°C derin dondurucuda stoklanmıştır.

Protein Konsantrasyonunun Ölçümü

Lizatların protein konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. Nanodrop cihazı mikro hacimli spektrofotometredir. Bu cihaz, seyreltmeye gerek kalmadan hızlı, doğru ve tekrarlanabilir mikro hacimde ölçümleri yapmaktadır. Nanodrop cihazında ilk olarak örneğin içinde bulunduğu çözelti cihazın ilgili bölümüne 1 µL olacak şekilde eklenmiştir. Bu çözelti kör olarak okutulmuştur. Ardından 1 µL örnek cihaza eklenip ölçüm alınmıştır. Bu ölçüm sonucunda elde edilen A₂₈₀ değeri protein konsantrasyonunu vermektedir.

ELISA Protokolü

Hem normoksik koşullarda, hem de 2, 4, 6, 12 ve 24 saat hipoksik koşullarda büyütülen HepG2 hücre hatlarından hazırlanan hücre lizatlarında HIF-1α düzeyini tespit etmek için ELISA (Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi) kiti (#CK-11956, Shangai coon Koon) kullanılmıştır. Bir sandviç ELISA yöntemi olan bu kitin içeriğinde bulunan 96 kuyucuklu kültür kabının tabanı HIF-1α antikoru ile kaplanmıştır. Kitin çalışma prensibine göre, her kuyucuğa uygulanan örnek içeriğindeki HIF-1α proteini bu antikora bağlanır. Bu bağlanma üzerine eklenen biyotinlenmiş HIF-1α antikoru, Streptoavidin-HRP'nin bağlanmasını sağlamaktadır. İnkübasyonun ardından eklenen substrat solüsyonu ile meydana gelen ışıma; örnekteki HIF-1α düzeyini göstermektedir.

ELISA kit içeriğinde anlatılan talimatlar doğrultusunda hem standart hem de örnek kuyucukları oluşturulmuştur. Kit içeriğinde yer alan standart solüsyon 1:2 (v:v) seri dilüsyonlar ile 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL ve 1.25 ng/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. 96'lık kültür kabına standart kuyucuklarına (genellikle ilk ve son sıra kuyucuklara) sırasıyla bu dilüe solüsyonlardan 50 µL eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise sırasıyla 40 µL hücre lizatı örneği (normoksi, 2, 4, 6, 12 ve 24 saat hipoksi), 10 µL biyotinlenmiş HIF-1α antikoru ve 50 µL Streptoavidin HRP

eklenmiştir. Ardından kültür kabı 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, kültür kabı içindeki solüsyon dökülerek 1x yıkama solüsyonu ile tüm kuyucuklar 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara 50 µL kromojen A solüsyonu ve 50 µL kromojen B solüsyonu eklendikten sonra 37 °C’de 10 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Son olarak tüm kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklenerek 10 dk içerisinde, 450 nm’de Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek, ABD) kullanılarak ortama salınan HIF-1α proteini ölçülmüştür.

Western Blot Protokolü

Örnek içeriğindeki proteinleri ayırmak için hazırlanan lizatlara sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulanmıştır. Kullanılan %4-12 ve %4-8’lik jel sistemi, yükleme ve ayrılma olmak üzere iki farklı jelden oluşmaktadır. Proteinlerin çözüldüğü ayırma jelinde moleküler ağırlıklarına bağlı olarak proteinler ayrılmaktadır. Proteinler, ayırma jeline girmeden önce ise konsantre edildiği bir yükleme jelinde yürütülmektedir. Bu aşamada kullanılan tüm tamponlar ve içerikleri bölüm 3.1.3’te, kullanılan antikorlar ve dilüsyonları ise Tablo 3.2’de verilmiştir.

Örneklerin Hazırlanması

Örneklerin protein konsantrasyonları belirlendikten sonra lizatlar, 2X laemmli yükleme tamponu ile 1:1 (v:v) oranında karıştırılarak vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler önceden 96°C’ye ayarlanmış ısıtıcı blok cihazında 8-10 dk inkübe edilmiştir. Bu aşamada proteinlerin tamamen denatüre olması sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından kısa bir vorteks yapıp spin atırılan örnekler, elektroforez işlemi için jele yüklenmek üzere hazır hale gelmiştir.

Örneklerin Jele Yüklenmesi

Elektroforezde yürütme işlemi için ticari olarak temin edilen %4-12 Bis-Tris jel kullanılmıştır. Ancak istisnai durumu nedeniyle bazı proteinler %4-8'lik Bis-Tris jelde yürütülmüştür ve bu husus ileriki bölümlerde detaylıca anlatılmıştır. İlk olarak, %4-12 Bis-Tris jel üzerinde bulunan elektrik bandı çıkarılmış, jel kaseti distile su ile yıkanmış, jel titizlikle tanka yerleştirilmiş ve sıkıştırılmıştır. Ardından yürütme tamponu orta bölmeye dökülerek sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra tüm tank yürütme tamponu ile jelin üzerini geçecek şekilde doldurulmuştur. Son olarak, tarak çıkarılmış ve enjektör kullanılarak her bir kuyucuk yürütme tamponu ile yıkanarak yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi

Kuyucuklardan birine veya bir kaçına jel planına uygun olarak 5 µL ladder, diğerlerine ise her biri 15 µg protein olacak şekilde hesaplanarak elde edilen hacimdeki (µL) örnek titizlikle yüklenmiştir. Yükleme tamamlanınca tank kapatılarak elektrotlar bağlanmış ve güç kaynağı 100 V, 120A olacak şekilde ayarlanarak yükleme tamponunda yer alan bromofenol mavisi jelin alt kenarına ulaşana kadar (yaklaşık 100 dk) yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin Jelden Membrana Transferi

Proteinlerin jelden polivinil diflorür (PVDF) membrana transferi için, iBlot 2 jel transfer cihazı kullanılmıştır. iBlot, western blot transferini yaklaşık 7 dk içinde ve sıvı tamponlara ihtiyaç duymadan verimli bir şekilde gerçekleştiren bir kuru blotlama cihazıdır. Transfer cihazının yanında gerekli tamponları ve transfer membranını içeren sarf malzeme niteliğindeki transfer stacktan oluşan iki bileşenli bir sistemdir.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel kaseti tanktan çıkarılarak distile su ile yıkanmıştır. Spatül yardımıyla kaset açılarak jel çıkarılmış ve jelin kuyucukları ile kullanılmayacak kısımları kesilmiştir. Ardından jel transfer tamponunun olduğu kaba aktarılmıştır. iBlot transfer stack'ın PVDF membran içeren alt kısmı talimatına uygun şekilde cihaza yerleştirilmiştir. Ardından membran üzerine sırasıyla jel, transfer tamponu ile ıslatılmış filtre kağıdı ve stack'ın üst kısmı yerleştirilerek baloncuk oluşmaması için üzerinden silindir ile geçilmiştir. Son olarak cihaz kapak kısmına iletkenliği tamamlamak amacıyla tasarlanmış olan sünger de yerleştirilerek cihaz kapatılmıştır. 20V ve 7-10 dk boyunca aktarım yapılmasının ardından protein örneklerini içeren membran elde edilmiştir.

Jelden membrana aktarımın başarılı bir şekilde olup olmadığını kontrol etmek için, membran Ponceau S boyası ile boyanarak proteinlerin görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Ponceau S boyası ile 1-2 dk muamele edilen membranda protein bantları gözlemlendikten sonra, membran PBS-Tween20 ile 10-15 dk boyunca çalkalayıcı yardımıyla yıkanarak berraklaştırılmıştır. Bu yıkama aşaması gereklilik durumuna göre birkaç kez tekrarlanmıştır.

Membrandaki Proteinlerin Bloklanması

Protein transferinin başarılı olduğu teyit edilen membranda bulunan büyük antijenik bölgelerin bloklanması ve gereksiz bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama aşaması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada hazırlanan yağsız süt tozu çözeltisi ile membran, 1 saat boyunca oda ısısında 130 rpm çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Bu şekilde bloklanan membran, 10-15 dk 1-2 kez PBS-Tween20 ile yıkanmıştır.

Membranın Primer Antikor ile Muamelesi

Yıkama işleminin ardından membranda bulunan ilgili proteinin görüntülenmesi için ilk adım olan primer antikor ile muamele aşamasına geçilmiştir. Hipoksiyi doğrulamak ve HepG2 hücre hattı için uygun olan hipoksik ortama

maruziyet saatini belirlemek için primer antikör olarak HIF-1 α poliklonal antikörü kullanılmıştır. Tablo 3.2’de belirlenen dilüsyon oranlarında PBS-Tween20 ile dilüe edilmiş ve analiz edilecek olan primer antikörler kullanılarak membran, gece boyu +4°C’de, 130 rpm çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

Membranın Sekonder Antikör ile Muamelesi

Gece boyunca primer antikör ile inkübe edilen membran, antikör kalıntılarını uzaklaştırmak için PBS-Tween20 çözeltisi ile 3 kez 10-15 dk yıkanmıştır. Ardından uygulanan primer antiköre uygun olarak seçilen ve Tablo 3.2’de belirlenen dilüsyon oranlarında hazırlanmış goat-anti-rabbit HRP sekonder antikör ile membran, 130 rpm çalkalayıcıda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak, kemilüminesans saptamadan önce membran 5 dakika boyunca 3 kez PBS-Tween20 ile yıkanmıştır.

Membrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi

Membrandaki proteinlerin görüntülenmesi için ECL (gelişmiş kemilüminesans) kiti kullanılmıştır. Bu kit luminol ve peroksit solüsyonu olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Sekonder antiköre konjuge olan horseradish peroksidaz (HRP) enziminin varlığında luminol, ışık yayan (kemilüminesans) bir kimyasal reaksiyonla oksitlenir. Bu prensibe dayanan ve taze hazırlanan ECL solüsyonu ile proteinler görünür hale getirilir. Bu amaçla ECL solüsyonu hazırlamak için luminol ve peroksit solüsyonları 1:1 (v:v) oranında karıştırılmıştır ve membran üzerine eklenmiştir. Membran bu solüsyon ile 3 dk karanlık ortamda inkübe edildikten sonra, görüntüleme cihazında (UVP ChemiDoc-It2) görüntü alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.3. Hücre Hatlarından Eksozom Eldesi

Uygun hipoksik ortama maruziyet süresi belirlendikten sonra hem normoksik hem de hipoksik koşullarda çoğaltılan HepG2 hücre hattından eksozom izolasyonu yapabilmek için “Eksozom İzolasyon Kiti Pan (MACS, Miltenyi Biotec)”

kullanılarak hücre kültürü süpernatantından eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. CD9, CD63 ve CD81 tetraspanin proteinlerini hedef alan manyetik boncuk tabanlı bir yöntem olan MACs kullanımı için, ilk olarak hücre kültürü süpernatantı oluşturulmuştur.

Hücreler, T25 flaskta %80-%90 yoğunluğa ulaştığında FBS'li besiyerleri uzaklaştırılarak, 1X PBS ile yıkanmış ve 24/48 saat FBS içermeyen 2 mL RPMI besiyerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasında hücreler normoksik ortam için %5 CO₂ içeren etüvde, hipoksik ortam için ise uygun inkübasyon süresinde hipoksik chamber uygulamasının ardından %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Bu aşamada kullanılan besiyerinin FBS içermemesi özellikle gereklidir. Çünkü, FBS yüksek miktarda eksozom içermektedir ve FBS kaynaklı bu eksozomların deneysel sürece dahil olmaması, yalnızca hücre kaynaklı eksozomların izolasyonu sağlanmalıdır.

İnkübasyon işleminden sonra eksozom izolasyonu için, HepG2 hücreleri tarafından salınan eksozomları içeren besiyeri; hücreler, hücre debris ve diğer büyük veziküllerden arındırılmak için 10 dakika 300 ×g, 30 dakika 2 000 ×g ve 45 dakika 10 000 ×g seri santrifülemeye tabi tutularak hücre kültürü süpernatantı elde edilmiştir.

Bir sonraki aşamada eksozom izolasyon kiti kullanılarak protokole uygun şekilde eksozomlar izole edilmiştir. Manyetik tabanlı bir izolasyon teknolojisi olan MACS sisteminde kullanılan separatörler, esas olarak güçlü mıknatıslar olarak görev yapmaktadır. Bu separatörlere yerleştirilen kolonlar ile izolasyon alanı oluşturulmuştur. Tetraspanin proteinleri CD9, CD63 veya CD81'i tanıyan mikroboncuklar kullanılarak eksozomların izolasyonu pozitif seçim ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan mikroboncuklar ile manyetik olarak etiketlenmiş eksozomlar kolon içinde tutulurken, etiketlenmemiş veziküller ve hücre bileşenleri kolon boyunca ilerlemektedir. Kolonun manyetik alandan çıkarılmasından sonra, bozulmamış eksozomların izolasyonu tamamlanmış olmaktadır.

Süpernatant elde edildikten sonra 0.22 µm filtreden geçirilerek eksozom izolasyon kiti protokolü aşağıdaki basamaklarla gerçekleştirilmiştir:

1. Eksozom içeren süpernatanta 50 µL CD9, CD63 ve CD81 konjuge mikrobuncuklar eklenerek vortekslenmiştir.
2. Ardından, oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübe edilmiştir.
3. MACS standına µMACS separatörü takılarak manyetik alanına “µ kolon” yerleştirilmiştir.
4. Kolon üzerine 100 µL Equilibration buffer uygulanarak kolon hazırlanmıştır.
5. Kolon 3 kez 100 µL izolasyon tamponu ile yıkanmıştır.
6. Manyetik olarak etiketlenmiş numune vortekslenerek kolona uygulandıktan ve aktıktan sonra, kolon 4 kez 200 µL izolasyon tamponu ile yıkanmıştır.
7. Kolon manyetik ayırıcıdan çıkarılarak 1.5 mL eppendorf tüpe yerleştirilmiştir.
8. Kolon üzerine 100 µL izolasyon tamponu eklenerek piston yardımıyla manyetik işaretli eksozomların eppendorf tüpüne akması sağlanmıştır.

Bu şekilde eksozom karakterizasyonu için yapılacak olan Bradford, NTA ve SEM analizleri için parçalanmamış eksozomlar elde edilmiştir.

Eksozom içeriği ile ilgili yapılacak olan Nanodrop ve western blot analizleri için ise eksozomların parçalanarak proteinlerin elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla yukarıda detaylıca anlatılan protokolde şu değişiklikler yapılarak deneyler gerçekleştirilmiştir:

1. Yukarıda anlatıldığı şekilde mikrobuncuklar ile etiketlenmiş eksozomları içeren numune kolondan geçirilmiştir.
2. Ardından kolon 4 kez 200 µL izolasyon tamponu ile yıkanmıştır.
3. Kolon manyetik ayırıcıdan çıkarılarak eppendorf tüpe yerleştirilmiştir.
4. Kolon üzerine 100 µL liziz tamponu eklenerek piston yardımıyla eksozom lizatının eppendorf tüpe akması sağlanmıştır. Ardından yükleme tamponu ile karıştırılarak western blot protokolü uygulanmıştır.

3.2.4. Eksozom Karakterizasyonu

İzole edilen eksozomların konsantrasyon ve boyut analizleri için NTA, görüntülenmesi için ise SEM analizi uygulanmıştır. Eksozom miktarı Bradford yöntemi ile, eksozomların sahip olduğu toplam protein içeriği ise Nanodrop cihazı ile belirlenmiştir. Western blot yöntemi ile ise eksozom içeriğinde bulunan ve belirlenen proteinlerin tayini gerçekleştirilmiştir.

Bradford Metodu ile Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücreden izole edilmiş eksozom numunelerinin protein konsantrasyonunu belirlemek için Bradford protein tayin yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin prensibi, negatif yüklü olan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının, proteinlerin pozitif grupları ile etkileşerek oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'de absorpsiyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

İlk olarak Sığır Serum Albumin (BSA) ve distile su ile 0.5mg/mL'lik bir stok çözelti hazırlanmıştır. Ardından, bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart grafik için seri dilüsyonlar ile stok BSA'dan sırasıyla 5, 10, 15, ve 20 µL alınarak son hacimleri 0.15 N NaCl içeren distile su ile 100 µL'ye tamamlanmıştır. Kör olarak ise 100 µL 0.15 N NaCl içeren distile su kullanılmıştır. Her tüpe 1 mL Bradford reaktifi eklenerek vortekslenmiştir. Ardından, 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1 mL'lik kuvartz küvete alınan standart solüsyonların 595 nm'de absorpsiyonu ölçülmüştür. BSA standartlarının konsantrasyon ve absorpsiyon değerleri kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuştur. Protein konsantrasyonu bilinmeyen örnekler için de aynı basamaklar gerçekleştirilmiştir. Burada BSA yerine numune eklenmiştir. Çizilen grafik yardımıyla protein konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin optik dansite değerlerinden protein miktarları belirlenmiştir. Protein konsantrasyonları, protein örneklerinin absorpsiyon değerleri standart eğrinin doğrusal denklemine yerleştirilerek hesaplanmıştır. Ardından, ölçüm sonuçlarından milyon hücre başına izole edilen eksozom miktarı hesaplanmıştır.

Hücre lizatlarının ve izole edilen eksozomların protein miktarı da Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Eksozom membranları lize edilerek toplam protein içeriği belirlenmiştir. Eksozomlar lizis solüsyonu ile parçalanarak vorteks ve santrifüj basamaklarından sonra süpernatant toplanmıştır. Eksozom ve hücre lizatlarındaki proteinlerin analizi için yüklenecek protein konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile belirlenmiştir.

Nanoparçacık İzleme Analizi (NTA)

Eksozomların boyutu, boyut dağılımı ve konsantrasyon analizleri Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan NanoSight NS300 (Malvern Analytical) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Aynı anda birçok ayrı partikülü video ile izleme ve kaydetme yoluyla partikül boyut ve konsantrasyonunu analiz edebilen bu cihaz; kamera sistemi, şırınga pompası ve elde edilen verileri işleyecek bir bilgisayar sisteminden oluşmaktadır. Cihazın çalışma prensibi, hem ışık saçılımının hem de Brownian hareketinin özelliklerinin kullanılması ile sıvı süspansiyonda nanopartikülün boyut dağılımının elde edilmesi ve kayıt altına alınması esasına dayanmaktadır. 30 nm kadar küçük çaplı nanopartikülleri bile ölçebilme yeteneği nedeniyle, eksozomların tespitinde NTA kullanımı avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, yöntem numune hazırlamada kolaylık ve hızlı olmasından dolayı da tercih edilmektedir.

Hazırlanan eksozom numuneleri 1:10 000 oranında PBS ile seyreltilmiştir. Analiz için 40-255 nm çapındaki parçacıkları hedefleyen NP80 nanopore kullanılmıştır. Voltaj 0.56 V olarak ayarlanarak akım stabilize edildiğinde partikül sayıları kaydedilmeye başlanmıştır. Video, en az beş yakalama için 60 saniyelik aralıklarla nanopartikülleri değerlendirmiştir. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Parçacık boyutu dağılımı ve eksozom konsantrasyonu, NTA yazılımı sürüm 3.3.301 kullanılarak elde edilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Eksozomların görüntülenmesi için SEM analizi Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikroskop ve Görüntüleme Laboratuvarı bünyesinde bulunan Odaklanmış İyon Demeti Taramalı Elektron Mikroskobu (FIB-SEM) (Tescan, GAIA3+, Oxford) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, HepG2 hücrelerinin besiyerinden izole edilen eksozomları içeren numune, 1:10 000 oranında PBS ile seyreltilerek temiz bir lam üzerine yayılmış ve kurutulmuştur. Karbon kaplı elektron mikroskobu ızgaralarına aktarılan numuneler, taramalı elektron mikroskobu yardımıyla görüntülenmiştir.

3.2.5. Paraoksonaz Enzim Ailesi Protein Düzeylerinin ve Aktivitesinin Belirlenmesi

Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda elde edilen lizatlarının total protein düzeyleri belirlendikten sonra, PON enzim ailesi protein düzeylerinin (PON1, PON2, PON3) belirlenmesi için western blot protokolü uygulanmıştır. SDS-PAGE uygulanarak ayrılan proteinler iBlot transfer sistemi kullanılarak membrana aktarılmıştır. Süt tozu ile bloklanan membranlar, gece boyu ayrı ayrı primer antikorlar (anti-PON1, anti-PON2, anti-PON3, α -Tübülün) ile +4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün yıkama işleminin ardından 1 saat uygun sekonder antikorlar ile (anti-mouse ya da anti-rabbit) inkübe edilerek işaretlenmiştir. Protein bantlarının görüntüsü ECL substrat kullanılarak görüntüleme cihazında elde edilmiştir. Son olarak ImageJ programı kullanılarak protein bandı yoğunlukları hesaplanmıştır ve protein ifade düzeyleri arasındaki farklılıklara bağlı olarak korelasyon belirlenerek yorumlanmıştır.

PON enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem; PON'ların paraoksonaz (PON) ve laktonaz (LAT) aktivitelerini veren paraokson ve dihidrokumarin substratlarını hidrolize etme yeteneklerine dayanmaktadır. Bu nedenle hem normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen hücre lizatlarının hem de eksozom içeriğinin bulunduğu numunelerin paraoksonaz ve laktonaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Paraksonaz Aktivitesinin Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi

Aktivite ölçümü için ilk olarak bazal aktivite tamponu ve substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Sonraki aşamada spektrofotometre ölçümü için kör ve örnek kuvartz küvetleri oluşturulmuştur. Kör küveti için 850 µL bazal aktivite tamponu ve 100 µL substrat çözeltisi eklenmiştir. Son olarak tekrar bazal aktivite tamponundan 100 µL eklenerek küvet spektrofotometre cihazının kör olarak tanımlanan bölümüne yerleştirilmiştir. Örnek küveti için ise 850 µL bazal aktivite tamponu, 100 µL substrat çözeltisi eklenmiştir. Son olarak hem normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen hücre lizatlarının hem de eksozom içeriğinin bulunduğu numuneden 100 µL eklenmiştir. Hızlıca örnek küveti de spektrofotometrenin örnek olarak tanımlanan bölümüne yerleştirilmiştir. Ardından, 37°C de, 412 nm ve 1 dakikadaki absorbansta meydana gelen değişim (dA/dt) elde edilmiştir. Enzimatik aktivite (U/mL) olarak aşağıda yer alan formül ile hesaplanarak ifade edilmiştir.

$$U = ((\text{Reaksiyon hacmi} \times (dA/dt)) \times 1000) / (\epsilon \times \text{Enzim hacmi} \times d)$$

U: Enzim aktivitesi (U/mL),

dA/dt: Son absorbans ile ilk absorbans arası fark,

ϵ : molar absorptivite sabiti,

d: ışık yolunun uzunluğu (cm).

Normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen ve analiz edilen paraoksonaz enzim aktivitesi toplam protein miktarına oranlanarak normalize edilmiş ve U/mg protein olarak değerlendirilmiştir.

Laktonaz Aktivitesinin Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi

Aktivite ölçümü için ilk olarak gerekli olan 50 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂ çözeltileri ve substrat çözeltisi olarak da DHC hazırlanmıştır. Sonraki aşamada spektrofotometre ölçümü için kör ve örnek kuvartz küvetleri oluşturulmuştur. Kör küveti için 900 µL Tris-HCl, 85 µL CaCl₂ çözeltileri ve 5 µL distile su eklenmiştir. Ardından substrat çözeltisi olarak 10 µL DHC eklenerek küvet spektrofotometre cihazının kör olarak tanımlanan bölümüne yerleştirilmiştir. Örnek küveti için ise 900

μL Tris-HCl, 85 μL CaCl_2 çözeltileri ve 10 μL DHC eklenmiştir. Son olarak hem normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen hücre lizatlarının hem de eksozom içeriğinin bulunduğu numuneden 5 μL eklenmiştir. Hızlıca örnek küveti de spektrofotometrenin örnek olarak tanımlanan bölümüne yerleştirilmiştir. Ardından, 37°C’de, 270 nm dalga boyunda, 3 dk süre ile köre karşı kinetik ölçüm alınmıştır. Absorbansta meydana gelen değişim (ΔA) elde edilerek enzimatik aktivite (U/mL) olarak 1 dakikada 1 μmol DHC hidrolizi olarak aşağıda yer alan formül ile hesaplanmıştır:

$$U = (\Delta A / dk) \times ((V_t \times 10^6) / (\epsilon \times f \times V_s))$$

U: Enzim aktivitesi (U/mL),

V_t: Toplam hacim (μL),

V_s: numune hacmi (μL),

ϵ : molar absorptivite sabiti,

f: ışık yolunun uzunluğu (cm),

ΔA : Son absorbans ile ilk absorbans arası fark ($A_2 - A_1$).

Normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen ve analiz edilen laktonaz enzim aktivitesi toplam protein miktarına oranlanarak normalize edilmiş ve U/mg protein olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. PI3K/Akt Sinyal Yolağı Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Hem normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen hücre lizatlarının hem de eksozom içeriğinin bulunduğu numunelerden total protein düzeyleri belirlendikten sonra, PI3K/Akt sinyal yolağı protein düzeylerinin (Akt, mTOR) belirlenmesi için western blot protokolü uygulanmıştır. Seçilen antikorlar Akt ve mTOR’a özgüdür. Akt ve mTOR proteinleri aktive olduğunda fosforillenirler. Bu sebeple bu çalışmada bu proteinlerin aktifleşip aktifleşmediğini göstermek amacıyla p-Akt ve p-mTOR primer antikorları kullanılmıştır. Bu proteinlerin hem total hem de fosforile halleri arasında değişimlere bakılarak yolak üzerindeki etkileri araştırılmıştır. mTOR ve p-mTOR proteinlerinin boyutları büyük olduğu için jel olarak %4-8’lik Bis-Tris jel tercih edilmiştir.

%4-8'lik Bis-Tris jel aşağıdaki protokole göre hazırlanmış ve ardından yukarıda detaylıca anlatılan SDS-PAGE protokolü uygulanmıştır.

%4-8'lik Bis-Tris Jel Hazırlanması

1. Jel dökmek için kullanılacak olan uzun ve kısa camlar, sırasıyla distile su ve %70'lik etil alkol ile dikkatli bir şekilde temizlenmiş ve kurulanmıştır.
2. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek, kenar ve alt kısımlarından elektrik bandı ile bantlanmış ve jel hazırlama standına yerleştirilmiştir.
3. Hazırlanan bu düzenekte sızıntı olmadığından emin olmak için camlar arasına kalan boşluğa distile su eklenerek kontrol edilmiştir. Sızıntı olmadığı garantilendikten sonra distile su çekilmiş ve kuruyan camlar arasına jel dökme işlemine geçilmiştir.
4. Öncelikle ayırma jeli camlar arasına yüklenmiştir. Ayrılma jeli %8'lik olarak Tablo 3.4'de belirtilen kimyasal malzemeler kullanılarak hazırlanmıştır. Kimyasal malzemelerin sırasıyla eklenmesi gerekmektedir. Bu noktada dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, APS ve TEMED'in karışıma en son eklenmesi gerektiğidir. Her kimyasalın eklenmesinin ardından homojenliğin sağlanması için, jelin hazırlandığı falkon tüpündeki karışım dairesel hareketler ile karıştırılmıştır.
5. Son olarak, polimerleşmeyi sağlayacak olan TEMED'in de karışıma eklenmesinden sonra birkaç kez pipetaj yapılarak hazırlanan jel, camlar arasında kalan boşluğa hava kabarcığı bırakmadan aktarılmıştır. Ayrılma jeli, kısa camın st kısmından yaklaşık 1 cm aşağısına kadar eklenmiştir.
6. Ardından jel üzerine izopropanol eklenerek st kısmın düz bir şekilde polimerleşmesi sağlanmıştır.
7. Ardından yaklaşık 30-60 dk jelin polimerleşmesi için beklenmiştir. Bu aşamada falkon tüpünde arta kalan jel baz alınarak polimerizasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edilmiştir.

8. Ayırma jeli polimerleştikten sonra, jelin üzerindeki izopropanol filtre kağıdı yardımıyla çekilerek uzaklaştırılmıştır.
9. Ayırma jeline benzer şekilde yükleme jeli hazırlamak için Tablo 3.4’de yer alan kimsayallar sırasıyla miktarlarına uygun şekilde falkon tüpüne aktarılmıştır. Bu şekilde %4’lük yükleme jeli elde edilmiştir.
10. TEMED’in de son olarak karışıma eklenmesinin ardından hızlı bir şekilde camlar arasında kalan boşluğa ayrılma jelinin üzerine, yükleme jeli de aktarılmıştır.
11. Ardından hızlı ve dikkatli bir şekilde tarak yerleştirilmiştir ve polimerleşme için beklenmiştir.
12. Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından ise camlar, kenarlarında bulunan bantlar çıkarılarak tanktaki haznesine titizlikle yerleştirilmiş ve sıkıştırılmıştır.
13. Son olarak, yürütme tamponu ile tank doldurulmuş ve tarak çıkarılarak kuyucuklar yıkanmıştır. Bu şekilde kuyucuklar hazır hale gelmiş ve yukarıda detaylıca anlatıldığı şekilde western blot protokolü uygulanmıştır.

Tablo 3.4. %4-8’lik SDS poliakrilamid jelin hazırlanışı.

Kimyasallar	%4’lük Yükleme Jeli (5 mL)	%8’lik Ayırma Jeli (10 mL)
ddH ₂ O	2.975 mL	4.6 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid (%30 / %0.8)	0.67 mL	3.4 mL
0.5 M Tris-HCl, pH:6.8	1.25 mL	—
1.5 M Tris-HCl, pH:8.8	—	2.6 mL
%10 SDS	0.05 mL	0.1 mL
%10 APS	0.05 mL	100 µL
TEMED	0.005 mL	10 µL

Yürütme işleminden sonra ayrılan proteinler iBlot transfer sistemi kullanılarak membrana aktarılmıştır. Süt tozu ile bloklanan membranlar, gece boyu ayrı ayrı primer antikorlar (anti-Akt, anti-p-Akt, anti-mTOR, anti-p-mTOR, β -aktin) ile gece boyu +4°C’de inkübe edilmiştir. Ertesi gün yıkama işleminin ardından 1 saat uygun sekonder antikorlar ile (anti-mouse ya da anti-rabbit) inkübe edilerek işaretlenmiştir. Protein bantlarının görüntüsü ECL substrat kullanılarak görüntüleme cihazında elde edilmiştir. Son olarak ImageJ programı kullanılarak protein bandı yoğunlukları hesaplanmıştır ve protein ifade düzeyleri arasındaki farklılıklara bağlı olarak korelasyon belirlenerek yorumlanmıştır.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

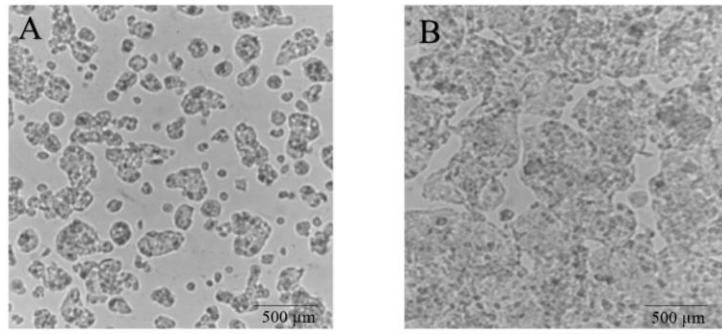
Tez kapsamında elde edilen western blot sonuçları ilk olarak, ImageJ Software (version 1.53k, National Institutes of Health, ABD) kullanılarak housekeeping proteine (α -Tübülin veya β -aktin) normalize edildikten sonra, sayısal verilere dönüştürülmüştür. Sonuçlar üçer tekrarlı olacak şekilde değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında elde edilen tüm enzim aktivite seviyeleri, ELISA ve western blot bulguları, GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, ABD) ve SPSS 26.0 for Windows (IBM SPSS, Armonk, NY) yazılımları kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Tüm istatistiksel analizler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak verilmiştir. İki grup arasındaki korelasyon anlamlılık analizi Student’s t-testi veya Mann-Whitney U testi, çoklu gruplar arasındaki anlamlılık testleri ise One-Way ANOVA veya post hoc Tukey testi ile analiz edilmiştir. Testlere uygun grafikler çizilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Ayrıca, tüm veriler arasındaki ilişkilerin istatistiksel olarak yorumlanması için Pearson korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık düzeyleri ise $*=p < 0.05$, $**=p < 0.01$, $***=p < 0.001$ ve $****=p < 0.0001$ olarak tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. HepG2 Hücre Hattının Inverted Mikroskop Görüntüleri

HepG2 hücre hattı sağlıklı bir şekilde ekilmiş, büyütülmüş ve çoğaltılmıştır. Hücreler inkübasyon süreleri boyunca canlılık, çoğalma ve kontaminasyon açısından inverted mikroskop altında kontrol edilmiştir. HepG2 hücre hattının düşük ve yüksek yoğunluklardaki mikroskop görüntüleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



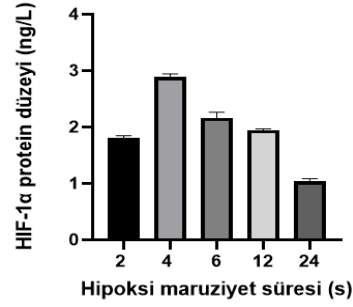
Şekil 4.1. HepG2 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüleri A. düşük yoğunluklu hücre alanları B. yüksek yoğunluklu hücre alanları. Ölçek: 500 µm (10x büyütme).

4.2. HepG2 Hücre Hattı için Uygun Hipoksi Maruziyet Süresinin Belirlenmesi ve HIF-1α Düzeylerine İlişkin Bulgular

Hipoksik koşullarda özellikle HIF-1α proteininin artışı hipoksinin karakteristik özelliği olarak dikkat çekmektedir. Bu nedenle HepG2 hücre hattında doğru hipoksik ortam maruziyet süresini belirlemek ve hipoksiyi saptamak için HIF-1α proteini düzeyleri analiz edilmiştir. İlk olarak normoksik koşullarda ve 2, 4, 6, 12, 24 saat süre ile hipoksik koşullarda, hücrelerin %80-90 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından hazırlanan hücre lizatlarından HIF-1α düzeyini belirlemek için ELISA ve western blot analizleri gerçekleştirilmiştir.

ELISA sonuçları doğrultusunda; 2, 4, 6, 12 ve 24 saat hipoksiye maruz bırakılan HepG2 hücre hatlarında sırasıyla ortalama 1.8088 ng/L; 2.8906 ng/L;

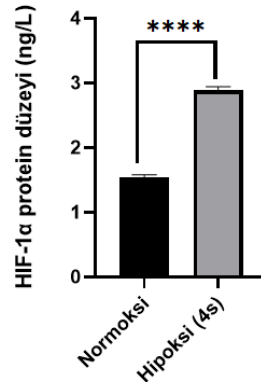
2.1601 ng/L; 1.9485 ng/L; 1.0383 ng/L HIF-1 α proteini üretildiği tespit edilmiştir. Zamana bağlı hipoksik koşullar altında elde edilen HIF-1 α protein seviyeleri kıyaslandığında, optimum seviye 4 saatlik hipoksi maruziyetinde gözlemlenmiştir. Ayrıca, HepG2 hücrelerinde 4 saatten fazla hipoksiye maruz kalmanın HIF-1 α seviyelerinin düşmesine yol açtığı gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Hipoksi maruziyet süresi	2 saat	4 saat	6 saat	12 saat	24 saat
Ortalama HIF-1 α protein seviyeleri (ng/L)	1.8088	2.8906	2.1601	1.9485	1.0383

Şekil 4.2. Farklı zaman sürelerinde (2, 4, 6, 12 ve 24 saatler) hipoksik koşullar altında HIF-1 α protein seviyeleri

Normoksi ile kıyaslandığında 4 saatlik hipoksik koşullarda ELISA HIF-1 α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p < 0.0001$). HepG2 hücre hattında kontrol grubu olarak değerlendirilen normoksik koşullarda ortalama 1.5493 ng/L HIF-1 α proteini üretilirken; uygun zaman olarak belirlenen 4 saat hipoksik ortam maruziyeti sonrasında ortalama 2.8906 ng/L HIF-1 α proteini üretilmiştir (Şekil 4.3).

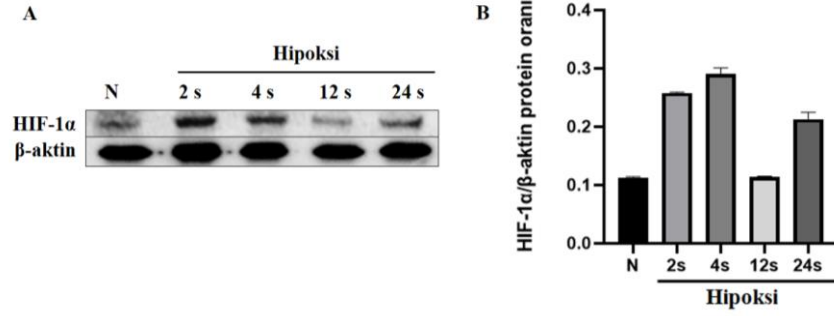


	Normoksi	Hipoksi (4 s)
Ortalama HIF-1α protein seviyeleri (ng/L)	1.5493	2.8906

Şekil 4.3. Normoksik ve hipoksik koşullar altında HIF-1α protein seviyeleri

****= $p < 0.0001$

Ayrıca, HIF-1 α 'nın ekspresyonu normoksik ve hipoksik koşullar altında western blot ile incelenmiştir. HIF-1α protein seviyeleri, β -aktin ile normalize edilerek HIF-1α/ β -aktin protein oranları elde edilmiştir. Western blot analizi sonucunda da ELISA verilerine benzer şekilde, normoksik ve hipoksik koşullar altında HIF-1α protein ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterilmiştir ($p < 0.001$). HIF-1α protein ifade düzeylerinde en anlamlı artışın hipoksik ortama 4 saat maruziyet sonucunda ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Hipoksik ortama 4 saatten uzun süre maruz kalmanın HIF-1 α 'nın ekspresyonunda azalışa yol açtığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.4).

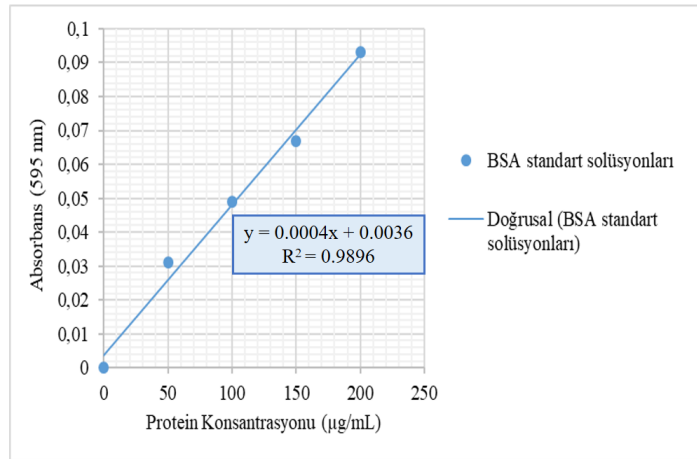


Şekil 4.4. HIF-1α western blot analiz sonuçları (N=Normoksi) A. HIF-1α (92 kDa) ve β-aktin (42 kDa) ile elde edilen membran görüntüsü. B. Normoksik ve zamana bağlı hipoksik koşullar arasındaki protein oranı farkı. Her numunenin optik yoğunluğu, β-aktin ekspresyonuna oranlanarak normalize edilmiştir. Veriler HIF-1 α / β-aktin olarak ifade edilmiştir.

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, HepG2 hücre hattında hipoksik koşullarda HIF sinyal yolağının aktive edildiği ve HIF-1α protein seviyesinin normoksik koşullara göre arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, HepG2 hücre hattı için uygun hipoksik ortama maruziyet saati 4 saat olarak belirlenmiş ve sonraki deneysel aşamalar için hipoksik grup oluşturmak amacıyla 4 saat hipoksi maruziyeti uygulanmıştır.

4.3. HepG2 Hücre Hattından İzole edilen Eksozomların Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

Uygun hipoksik ortam maruziyet süresi, 4 saat olarak belirlendikten sonra HepG2 hücre hattı hipoksik grup için 4 saat hipoksiye maruz bırakılmış ve eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca normoksik koşullarda çoğaltılan HepG2 hücre hattından da eksozomlar izole edilmiştir. Eksozomlar CD9, CD63 ve CD81 antikorlarına özgü pozitif seçim ile elde edildikten sonra, ilk olarak miktar tayini için Bradford yöntemi uygulanmıştır. Öncelikle hazırlanan BSA seri dilüsyonları ile elde edilen standart grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.5). Ardından eksozomların protein konsantrasyonları, standart grafikten elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinden elde edilen eksozom süspansiyonunun ortalama protein konsantrasyonu 0.5306 µg/µL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6).

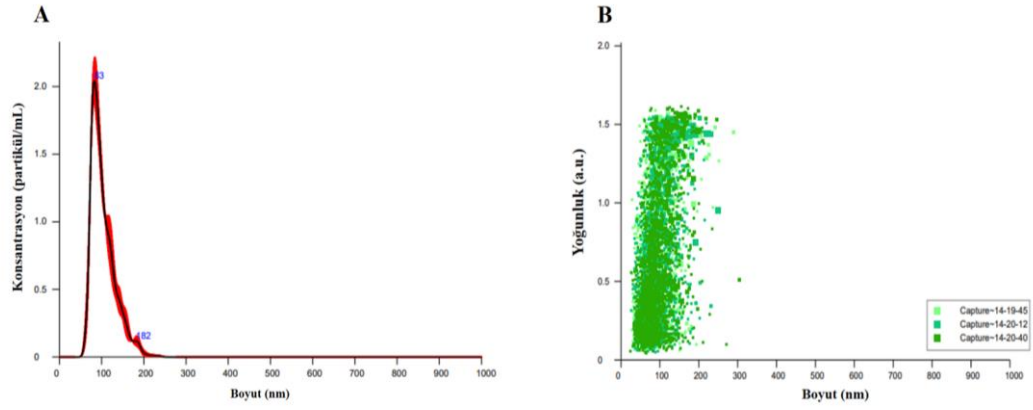


Şekil 4.5. Bradford yöntemi ile elde edilen eksozom konsantrasyonu BSA standartları kullanılarak elde edilen absorbans-protein konsantrasyonu standart grafiği ($R^2=0.9896$).

Numune	1	2	3	4	5	6	Ort
Eksozom Konsantrasyonu (µg/µL)	0.561	0.5235	0.4935	0.5785	0.5285	0.4985	0.5306

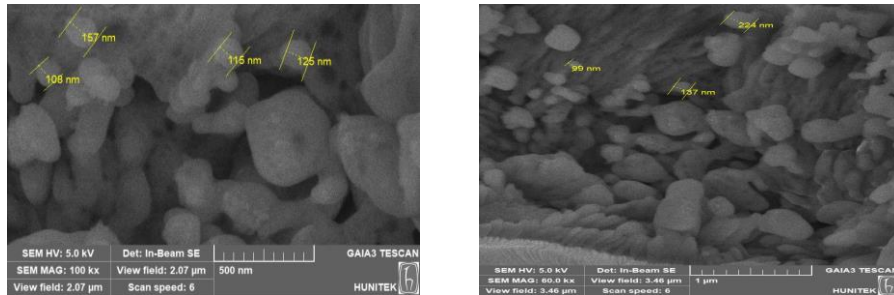
Şekil 4.6. BSA standartları kullanılarak elde edilen eksozom protein konsantrasyonu (µg/µL).

Ayrıca eksozomların konsantrasyonlarını, boyutlarını ve boyut dağılımlarını belirlemek için NTA uygulanmıştır. Eksozomlar 1:10 000 (v:v) oranında PBS ile seyreltilerek karakterize edilmiştir. NTA verilerine göre, HepG2 hücre hattından izole edilen eksozomların boyut dağılımı yaklaşık 50-200 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Eksozomların ortalama boyutu 103.7 ± 0.7 nm ve ortalama biçim (mod) boyutu 83.0 ± 1.1 nm olarak belirlenmiştir. Eksozom konsantrasyonun $1.01 \times 10^{13} \pm 3.06 \times 10^{11}$ partikül/mL olduğu ve çerçeve başına partikül sayısının 86.9 ± 1.8 partikül/çerçeve olduğu da tespit edilmiştir. Sonuç olarak Şekil 4.7’de gösterilen grafikler elde edilmiştir. Bu sayede NTA analizi ile, eksozomların başarılı bir şekilde izole edildiği doğrulanmıştır.



Şekil 4.7. HepG2 hücre hatlarından salınan eksozomların NTA analizi ile karakterizasyonu. A. Eksozomların boyut dağılımı ve ortalama partikül çapı. B. Eksozomların yoğunluk/boyut dağılımı. Grup sayısı $n=3$ ve hata çubukları ortalama ± 1 standart hatayı göstermektedir.

HepG2 hücre hattından elde edilen eksozomların varlığını, boyutunu ve morfolojilerini tanımlayarak karakterize etmek için ise SEM analizi yapılmıştır. Eksozomların izolasyonu besiyeri süpernatantından protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen süspanse haldeki eksozomların küresel ve zarlı yapıdaki SEM görüntüleri Şekil 4.8’da gösterilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda, eksozomlar başarılı bir şekilde izole edilmiş ve boyut ve morfoloji açısından literatür ile uyumlu şekilde görüntülenmiştir.

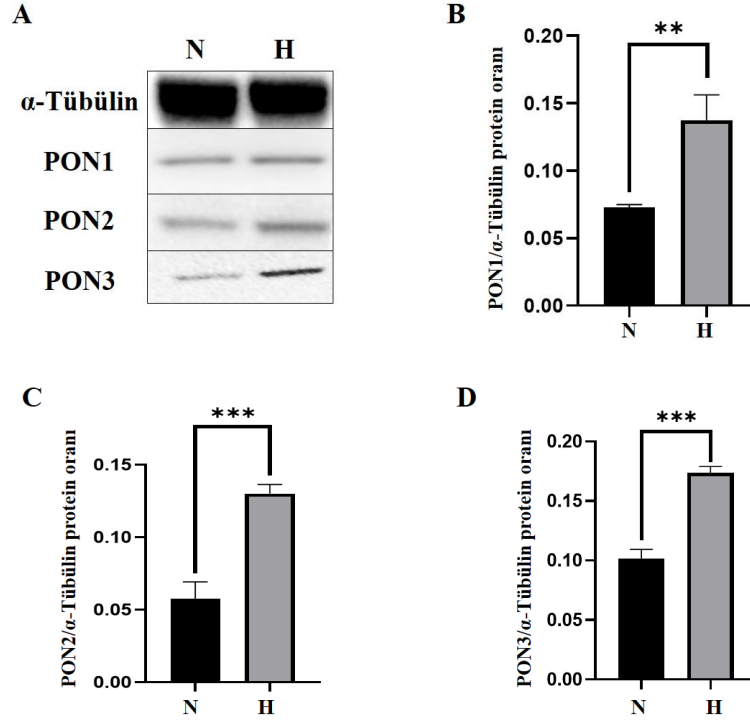


Şekil 4.8. HepG2 hücre hatlarından salınan eksozomların SEM görüntüleri (ölçek çubuğu 500 nm ve 1µm)

4.4. PON1, PON2 ve PON3 Proteinlerinin Western Blot Bulguları

HepG2 hücre hattından izole edilen eksozomların başarılı bir şekilde karakterize edilmesinin ardından hem normoksik hem de hipoksik koşullarda deneyler devam ettirilmiştir. Normoksik ve hipoksik olmak üzere oluşturulan bu iki grupta da hem hücre lizatı oluşturulmuş, hem de eksozom izolasyonu gerçekleştirilerek eksozom içeriği elde edilmiştir. Oluşturulan eksozom ve hücre lizatlarının total protein konsantrasyonları NanoDrop cihazı ile belirlenmiştir. Ardından, eksozom ve hücre lizatlarının proteinleri SDS-PAGE üzerinde ayrılarak PON1, PON2, PON3 ve α -Tübülün antikorları ile inkübe edilmiştir. Elektroblotlamanın ardından PVDF membranda görüntüler elde edilmiştir. Ancak izole edilen eksozom lizatlarında PON1, PON2 ve PON3 proteinleri gözlemlenememiştir.

HepG2 hücre hattında normoksik ve hipoksik numunelerin PON1, PON2, PON3 ve α -Tübülün düzeylerinin western blot analizi sonucunda elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.9 (A)'da gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen bant görüntülerinin optik yoğunluğu hesaplanarak normalize edilen PON düzeylerinin normoksik ve hipoksik koşullardaki değişimi Şekil 4.9 (B, C, D)'de gösterilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda, HepG2 hücre hattında hipoksik koşullarda, normoksik koşullara kıyasla PON1, PON2, PON3 ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$) (Şekil 4.9).



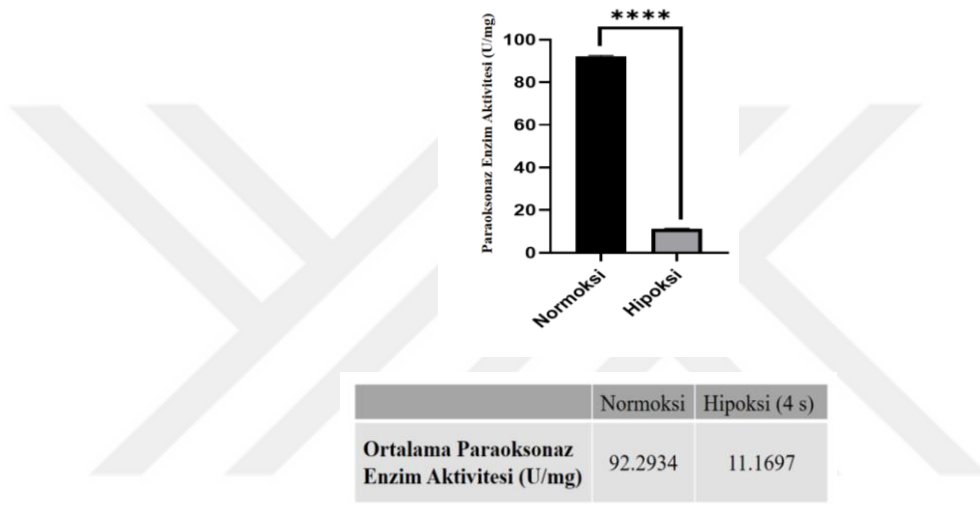
Şekil 4.9. PON enzim ailesi western blot analiz sonuçları A. PON1 (42.9 kDa), PON2 (43.5 kDa), PON3 (40 kDa) ve α-Tübülün (50 kDa) ile elde edilen membran görüntüsü. Her numunenin optik yoğunluğu, α-Tübülün ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir. B. PON1 ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler PON1/α-Tübülün olarak ifade edilmiştir. C. PON2 ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler PON2/α-Tübülün olarak ifade edilmiştir. D. PON3 ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler PON3/α-Tübülün olarak ifade edilmiştir. N=Normoksi H=Hipoksi **= $P < 0.01$ ***= $P < 0.001$

4.5. Paraoksonaz ve Laktonaz Aktivitesine İlişkin Bulgular

Hem normoksik ve hem de hipoksik koşullarda elde edilen hücre lizatlarında paraoksonaz ve laktonaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Ancak hem normoksik hem de hipoksik koşullarda elde edilen eksozom içeriğinde PON

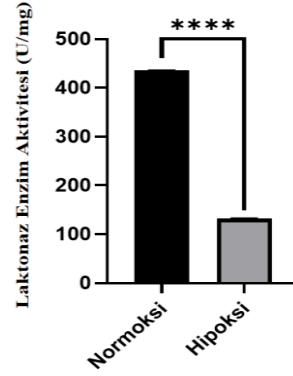
enzim ailesi düzeyleri western blot yöntemi ile gözlemlenemediği için enzim aktivite düzeyleri analiz edilememiştir.

HepG2 hücre hattı için seçilen uygun süre (4 saat) hipoksik ve normoksik koşullarda elde edilen numuneler, paraoksonaz aktivite seviyeleri açısından kıyaslanmıştır. Hipoksik paraoksonaz aktivitesi normoksik aktiviteden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.0001$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. HepG2 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullar altında paraoksonaz enzim aktiviteleri. Paraoksonaz enzim aktivitesi toplam protein miktarına oranlanarak normalize edilmiş ve U/mg protein olarak değerlendirilmiştir. ****= $p<0.0001$

HepG2 hücre hattı için seçilen uygun süre (4 saat) hipoksik ve normoksik koşullarda elde edilen numuneler, laktonaz aktivite seviyeleri açısından da kıyaslanmıştır. Hipoksik laktonaz aktivitesi, normoksik aktiviteden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.0001$) (Şekil 4.11).



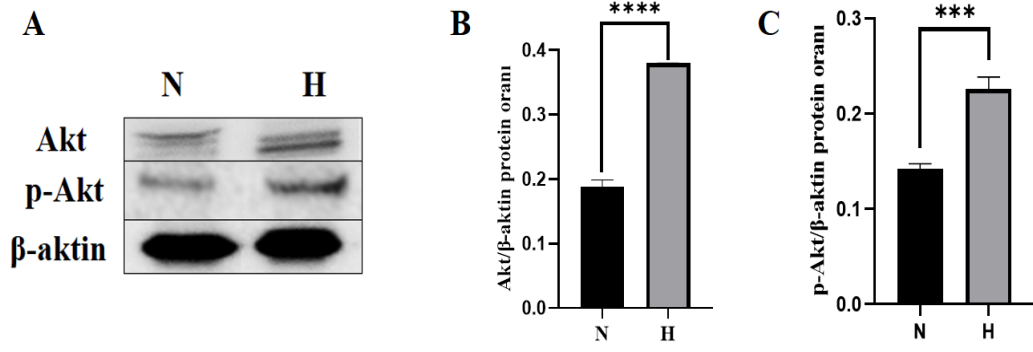
	Normoksi	Hipoksi (4 s)
Ortalama Laktonaz Enzim Aktivitesi (ng/L)	435.2548	132.4425

Şekil 4.11. HepG2 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullar altında laktonaz enzim aktiviteleri. Laktonaz enzim aktivitesi toplam protein miktarına oranlanarak normalize edilmiş ve U/mg protein olarak değerlendirilmiştir. ****= $p < 0.0001$

4.6. PI3K/Akt Sinyal Yolağı Proteinleri olan Akt ve mTOR Proteinlerinin Western Blot Bulguları

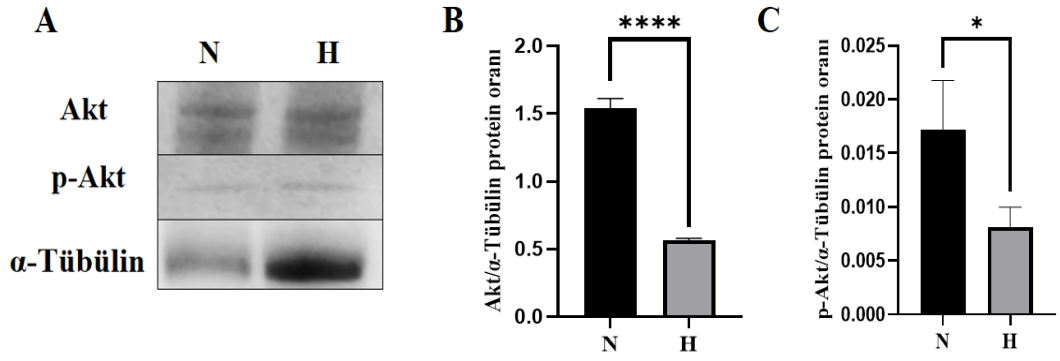
Hem normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen hücre lizatlarının, hem de eksozom içeriğinin bulunduğu numunelerden total protein düzeyleri belirlenmiştir. Ardından, PI3K/Akt sinyal yolağı proteinlerinden Akt ve mTOR düzeylerinin belirlenmesi için western blot protokolü uygulanmıştır. Akt ve mTOR proteinleri aktive olduğunda fosforillenir. Bu sebeple aktifleşip aktifleşmediğini göstermek amacıyla total formlarının yanı sıra fosforile formları olan p-Akt ve p-mTOR proteinleri de analiz edilmiştir. Sonuçlar, β -aktin veya α -Tübülin antikorları ile normolize edilerek değerlendirilmiştir.

HepG2 hücre hattında hipoksik koşullarda, normoksik koşullara kıyasla Akt ve p-Akt ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) (Şekil 4.12).



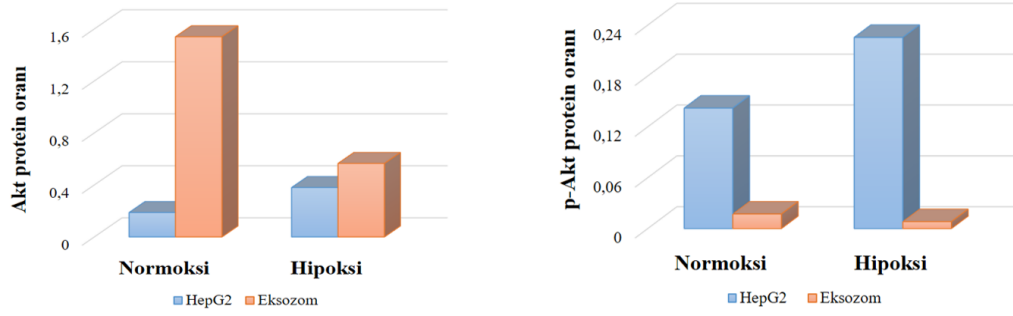
Şekil 4.12. HepG2 hücre lizatlarının Akt western blot analiz sonuçları A. Akt (55 kDa), p-Akt (60 kDa) ve β-aktin (42 kDa) ile elde edilen membran görüntüsü. Her numunenin optik yoğunluğu, β-aktin ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir. B. Akt ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler Akt/β-aktin olarak ifade edilmiştir. C. p-Akt ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler p-Akt/β-aktin olarak ifade edilmiştir. N=Normoksi H=Hipoksi ***= $p<0.001$ ****= $p<0.0001$

HepG2 hücre hattından elde edilen eksozom lizatlarında ise hipoksik koşullarda, normoksik koşullara kıyasla Akt ve p-Akt ekspresyonundaki istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma dikkat çekmektedir ($p<0.05$) (Şekil 4.13).



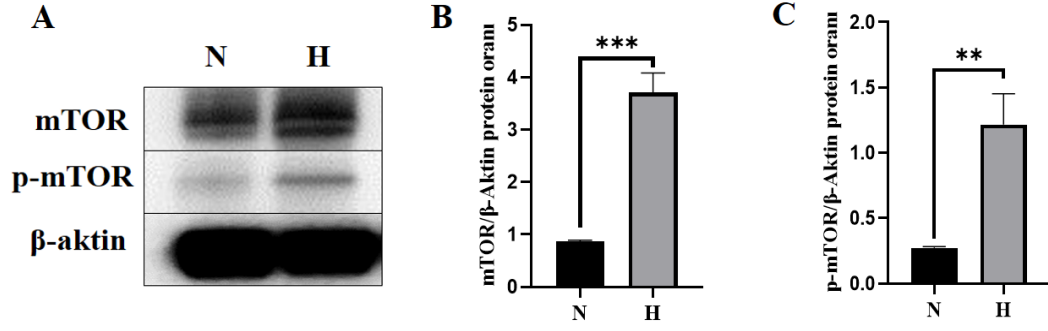
Şekil 4.13. HepG2 eksozom lizatlarının Akt western blot analiz sonuçları A. Akt (55 kDa), p-Akt (60 kDa) ve α-Tübülün (50 kDa) ile elde edilen membran görüntüsü. Her numunenin optik yoğunluğu, α-Tübülün ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir. B. Akt ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler Akt/α-Tübülün olarak ifade edilmiştir. C. p-Akt ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler p-Akt/α-Tübülün olarak ifade edilmiştir. N=Normoksi H=Hipoksi *=p<0.05 ****=p<0.0001

HepG2 hücre lizaları ile eksozom içeriği Akt ve p-Akt verileri açısından kıyaslanmıştır. Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda Akt proteininin hücre lizatlarına kıyasla eksozom içeriğinde arttığı gösterilmiştir. Ancak p-Akt proteininin ise hücre lizatlarında daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



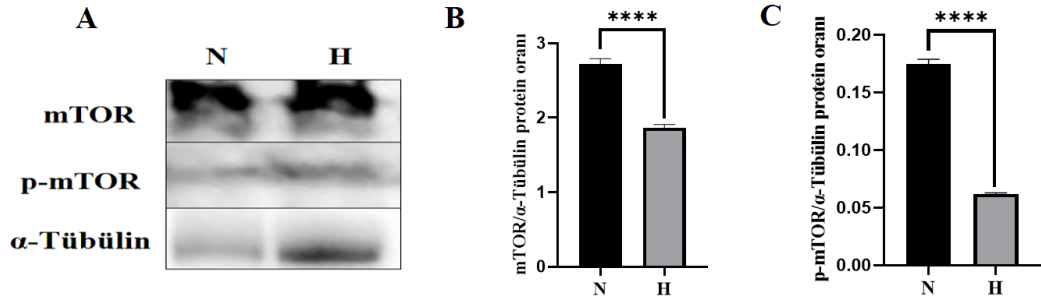
Şekil 4.14. Normoksik ve hipoksik koşullarda HepG2 hücre ve eksozom lizatlarının Akt ve p-Akt western blot analiz sonuçları. Her numunenin optik yoğunluğu, housekeeping protein ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir.

HepG2 hücre hattında hipoksik koşullarda, normoksik koşullara kıyasla mTOR ve p-mTOR ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) (Şekil 4.15).



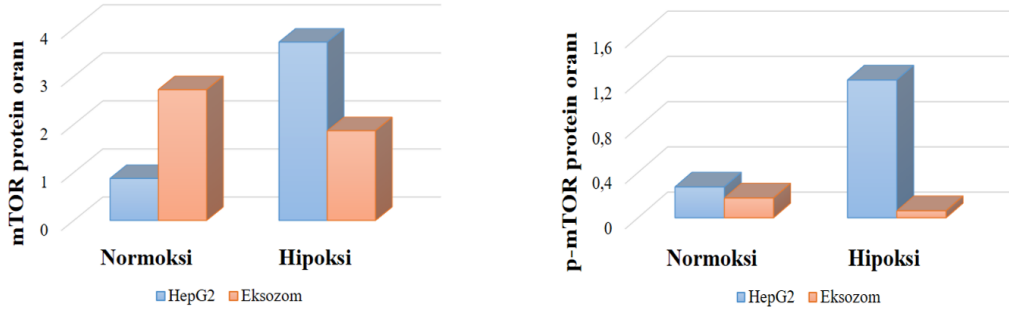
Şekil 4.15. HepG2 hücre lizatlarının mTOR western blot analiz sonuçları A. mTOR (215 kDa), p-mTOR (220 kDa) ve β-aktin (42 kDa) ile elde edilen membran görüntüsü. Her numunenin optik yoğunluğu, β-aktin ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir. B. mTOR ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler mTOR/β-aktin olarak ifade edilmiştir. C. p-mTOR ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler p-mTOR/β-aktin olarak ifade edilmiştir. N=Normoksi H=Hipoksi **= $p < 0.01$ ***= $p < 0.001$

HepG2 hücre hattından elde edilen eksozom lizatlarında ise hipoksik koşullarda, normoksik koşullara kıyasla mTOR ve p-mTOR ekspresyonundaki istatistiksel olarak anlamlı azalış dikkat çekmektedir ($p < 0.01$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. HepG2 eksozom lizatlarının mTOR western blot analiz sonuçları
A. mTOR (215 kDa), p-mTOR (220 kDa) ve α-Tübülün (50 kDa) ile elde edilen membran görüntüsü. Her numunenin optik yoğunluğu, α-Tübülün ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir. B. mTOR ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler mTOR/α-Tübülün olarak ifade edilmiştir. C. p-mTOR ekspresyon miktar tayini ve normoksik ve hipoksik koşullar arasındaki fark. Veriler p-mTOR/α-Tübülün olarak ifade edilmiştir. N=Normoksi H=Hipoksi ****=p<0.0001

HepG2 hücre lizatlarında eksozom içeriğine oranla mTOR ve p-mTOR verilerinin özellikle hipoksik koşullarda arttığı tespit edilmiştir. Normoksi durumunda eksozom içeriğinde mTOR düzeyleri hücre lizatları ile kıyaslandığında eksozom içeriğinde artmış bulunmuştur (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Normoksik ve hipoksik koşullarda HepG2 hücre ve eksozom lizatlarının mTOR ve p-mTOR western blot analiz sonuçları. Her numunenin optik yoğunluğu, housekeeping protein ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiştir.

4.7. Protein Verilerinin Korelasyon Analizine İlişkin Bulgular

Hem normoksik ve hipoksik koşullarda elde edilen hücre lizatlarının, hem de eksozom içeriğinin bulunduğu numunelerin protein bulguları yukarıda detaylıca anlatılan şekilde belirlenmiştir. Ardından tez kapsamında elde edilen tüm veriler arası korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

HepG2 hücre hattında normoksik koşullarda, PON2 ve p-Akt ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde pozitif yönlü korelasyon saptanmıştır ($r=1.000$, $p=0.018$). PON2 ekspresyonunun arttığı durumlarda p-Akt ekspresyonunun da anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir.

HepG2 hücre hattında normoksik koşullarda, mTOR ve p-mTOR ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde negatif yönlü korelasyon saptanmıştır ($r=-1.000$, $p=0.018$). mTOR ve p-Akt ekspresyonları arasında da istatistiksel olarak anlamlı şekilde negatif yönlü korelasyon saptanmıştır ($r=-0.998$, $p=0.041$). mTOR ekspresyonunun azaldığı durumlarda p-mTOR ve p-Akt ekspresyonları anlamlı düzeyde artmaktadır. Ayrıca p-mTOR ve p-Akt ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde pozitif yönlü korelasyon

saptanmıştır ($r=0.999$, $p=0.022$). p-Akt ekspresyonunun arttığı durumlarda p-mTOR ekspresyonunun da anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir.

HepG2 hücre hattında normoksik koşullarda, PON2 ve eksozomal Akt ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde pozitif yönlü korelasyon saptanmıştır ($r=0.998$, $p=0.038$). p-Akt ve eksozomal Akt ekspresyonları arasında da istatistiksel olarak anlamlı şekilde pozitif yönlü korelasyon saptanmıştır ($r=0.999$, $p=0.020$). PON2 ve p-Akt ekspresyonlarının hücrede arttığı durumlarda, eksozomal Akt ekspresyonunun da anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinom, sınırlı terapötik seçenekleri ve düşük sağkalım oranı ile karaciğer kanserinin en önemli türlerinden biridir. HCC'de düşük oksijen seviyesi ile karakterize edilen hipoksik mikroçevre hayati bir rol oynamakta ve HCC, hipoksik tümör olarak değerlendirilmektedir (110-112). Hipoksinin HCC'de immün kaçışı, invazyon ve metastazı, hücre proliferasyonu aktivasyonunu, ilaç direncini, tümör gelişimini, genetik instabiliteyi, anjiyogenezi, metabolizmada yeniden düzenlemeyi ve apoptoz inhibisyonunu teşvik ederek tümör agresifliğine katkı sağladığı kanıtlanmıştır (111-115). Tümör hücrelerinin metastatik fenotipler için daha invaziv hale gelmesine olanak veren HIF-1 α proteini, hipoksik koşullarda indüklenerek birçok protein ile etkileşime girmektedir (6,49,116,117).

Ancak literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, dikkat çekici bir şekilde kronik miyelojen lösemi, embriyonik böbrek (49), kolon kanseri ve malign melanom (118) gibi bazı hücrelerin normoksik koşullar altında dahi HIF-1 α ekspresyonu gösterdiği vurgulanmaktadır. Bu duruma, karaciğer kanseri hücre hatları olan HepG2, HepG-3B ve Huh-7 hücre hatları da örnek verilebilir (115,119). Yapılan çalışmalarda HCC örneklerinin yaklaşık %60'ının zaten pozitif HIF-1 α ifadesine sahip olduğu gösterilmiştir (115,120,121). Bu nedenle, hipoksi çalışmalarında HIF-1 α 'nın bazal seviyelerini tespit etmek için bir normoksik kontrol kullanmak çok önemlidir (49). Tüm bunlar göz önünde bulundurularak çalışmamızda, hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücre hattında HIF-1 α seviyelerini hem normoksik hem de hipoksik koşullar altında araştırdık. Sonuç olarak, çalışmamızda normoksik koşullarda da HIF-1 α gözlenmesine rağmen hipoksik koşullarda HIF-1 α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4).

Genellikle HIF-1 α protein seviyesini oksijen bağımlı ubiquitinasyon kontrol etmektedir. Ancak, HIF-1 α stabilitesini kontrol eden başka faktörler de bulunmaktadır (122). Bu mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olsa da, normoksiden hipoksiye doğru değişen oksijenasyonun, tümörlerde statik olmadığı ve dalgalanan seviyeler gösterdiği yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (7,123). Ayrıca, HIF-1 α protein seviyeleri zamana bağlı hipoksik koşullar altında dalgalanmaktadır. Jaśkiewicz ve ark. primer endotel hücrelerinde, 4 saatlik hipoksi maruziyetinde HIF-

1 ekspresyonunun en yüksek olduğunu, 8 saat'lik hipoksi sonrasında ise azaldığını göstermiştir (124). Moszyńska ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise HIF-1 α seviyelerinin maksimum değerlerine 6 saat hipoksi maruziyetinde ulaşıldığı gözlenmiştir. HIF-1 α düzeylerinin normoksik kontrole kıyasla 12 ve 24 saat sonra ise düştüğü doğrulanmıştır (125). HCC'de yapılan bir çalışmada ise, 0-4 saat hipoksik koşullar altında artan HIF-1 α protein seviyesi belirlenmiş ve 4 saatten daha uzun süreli hipoksi altında HIF-1 α protein seviyesinin düştüğü doğrulanmıştır (126). Çalışmamızda, HepG2 hücre hattının uygun hipoksi maruziyet süresini belirlemek için farklı hipoksik zaman dilimlerinde (2, 4, 6, 12 ve 24 saatler) HIF-1 α protein seviyeleri western blot ve ELISA yöntemleri ile tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, literatür ile uyumlu olarak HIF-1 α protein seviyelerinin zamana bağlı dalgalanma gösterdiğini doğrulamaktadır. HepG2 hücre hattı için uygun hipoksi maruziyet süresini 4 saat olarak belirledik ve 4 saatten fazla hipoksiye maruz kalmanın HIF-1 α seviyelerinin düşmesine yol açtığını gözlemledik (Şekil 4.2, Şekil 4.4).

ROS; HIF-1 α ekspresyonunun ve aktivasyonunun düzenlenmesinde, oksidatif stres ve redoks durumu da etkilidir (68,127). ROS'un, PHD'nin katalitik aktivitesi için gerekli olan demiri oksitlediği ve bu enzimin aktivitesini azalarak HIF-1 α 'yı stabilize ettiği ileri sürülmüştür (127). Ayrıca literatürdeki çalışmalar ile hipoksinin de ROS üretimini artırdığı belirtilmiştir (6,7). Yani ROS ve hipoksi arasındaki çift taraflı ilişkinin varlığı literatürde dikkat çekmektedir.

ROS; hücre proliferasyonu, apoptoz, otofaji ve gen transkripsiyonunun aktivasyonu için hücrenin sinyal yollarını düzenlemektedir (8). Hücreler ROS'ların zararlı ve toksik etkilerine karşı antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir. Bu hayati savunma sistemi ile ROS'ların hücrede dengede tutulması sağlanmaktadır (8,9). Ancak, karsinogenez sürecinde artan ROS seviyelerine ek olarak bu antioksidan savunma sisteminde de değişiklikler meydana gelmektedir.

Son zamanlarda birçok çalışma, bir enzimatik antioksidan olan PON enzim ailesi (PON1, PON2, PON3) ve kanser arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına odaklanmıştır. PON enzim ailesi üyelerinin genotip, aktivite ve/veya ekspresyon değişimlerinin önemi kanserden etkilenen hastalarda ve *in vitro* olarak çeşitli kanser hücrelerinde gösterilmiştir. PON'lar, hücreleri oksidatif stresten koruyarak antioksidan savunmada ve hücre davranışının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu

durumun karsinogenez sürecinde; apoptozun engellenmesi, kanser hücresinin hayatta kalması, hücre proliferasyonu ve invazyon gibi önemli durumlar ile de ilişkilendirildiği ve PON enziminin potansiyel bir onkogen davranışı gösterdiği düşünülmektedir (11-13,68).

Karaciğer, anatomik konumu ve işlevleri nedeniyle birçok kronik yaralanmaya karşı savunmasızdır. Hücre içi antioksidan sistemi sayesinde de çeşitli ilaçların ve ksenobiyotiklerin metabolizması sırasında oluşan serbest radikalleri temizleme konusunda olağanüstü bir yeteneğe sahiptir. Hepatositlerde azalan antioksidan savunma ile birlikte artan serbest radikal üretimi, çeşitli karaciğer işlev bozukluklarına yol açan oksidatif stresin ilerlemesini desteklemektedir. Bu nedenle, karaciğerde oksidatif stres HCC oluşumunda da rol oynamaktadır. Çok sayıda deneysel ve klinik çalışma ile antioksidanların karaciğer hastalıkları üzerinde hepatoprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir (128). Önemli bir antioksidan olan PON enzim ailesinin tüm üyeleri karaciğerde eksprese edilmektedir. Bu nedenle, en yaygın birincil karaciğer malignitesi olan HCC, PON çalışmaları için dikkat çekicidir. Ayrıca, PON ekspresyonunu düzenleyen sinyal iletim yollarının araştırılması; karsinogenez sürecindeki mekanizmanın aydınlatılması ve kemoterapötikler için potansiyel hedeflerin belirlenmesi de son derece önemlidir (68) (129).

PON enzimleri; paraoksonaz, arilesteraz, laktonaz, peroksidaz ve tiyolaktonaz aktiviteleri göstermektedir. PON ve aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, özellikle paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine yoğunlaşmıştır. Baş boyun (130), mesane (131), kolorektal (132,133), meme (132,134,135), prostat (136), akciğer (132,135), non-Hodgkin lenfoma (135) ve merkezi sinir sistemi (137) gibi çeşitli kanser türlerinde kontrol grubuna kıyasla düşük paraoksonaz aktiviteleri dikkat çekmektedir. Düşük PON aktivitesinin, oksidatif stresi artırdığı ve kanser hastalarında kötü prognoz ile bu durumun ilişkilendirildiği düşünülmektedir (68,138). PON aktivitesinin ölçümü, karaciğer fonksiyonunun değerlendirilmesi için potansiyel bir test olarak önerilmiştir (139). 807 kronik karaciğer hastalığı olan bireylerin değerlendirildiği kapsamlı bir meta-analiz çalışmasında, kontrol grubuna kıyasla PON aktivitelerinin önemli düzeyde düştüğü tespit edilmiştir (140). Ayrıca yapılan çalışmalarda karaciğer kanserinde de paraoksonaz aktivitesinin azaldığı

gösterilmiştir (132,141). PON1, hem esteraz hem de laktonaz aktivitesine sahiptir. PON2 ve PON3 ise sadece laktonaz aktivitesine sahiptir (139). Bu nedenle çalışmamızda HepG2 hücre hattında paraoksonaz aktivitesinin yanında laktonaz aktivitesi de analiz edilmiştir. Özellikle, PON1'in, lipoproteinler ve hücrelerdeki lipid peroksidleri parçalama yeteneğini laktonaz aktivitesi ile gerçekleştirdiği ve kronik karaciğer hastalıklarının patofizyolojisinde yer alan anahtar süreçler olan oksidatif stres ve inflamasyona karşı bu özelliği ile koruyucu bir rol üstlendiği ileri sürülmüştür (139). PON3'ün karaciğer hastalığına yol açan histolojik değişiklikleri ve karaciğer hücresi apoptozunu önleyen hepatoprotektif bir role sahip olduğu ve bu koruma etkisini, laktonaz ve antioksidan aktiviteleri ile ilişkili olarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (142). Kolorektal kanser hastalarında azalan laktonaz aktivitesi, kronik ve akut inflamasyon ile ilişkilendirilerek HDL azalmasının nedeni olabileceği ileri sürülmüştür (143). Çalışmamızda normoksik koşullar ile kıyaslandığında hipoksik koşullarda hem paraoksonaz hem de laktonaz aktivitesinin anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11). Tümör agresifliği ile yakın ilişkili olan hipoksi durumunun, aktivite üzerindeki bu etkisi, HCC'de tümör ilerlemesi ile ilişkilendirilmektedir.

PON enzim aile üyelerinin ekspresyon değişikliklerinde çelişkili sonuçlar olsa da, yapılan çalışmalar sonucunda karsinogenez sürecinde onkogen olabileceği önerilmektedir. Özellikle upregüle olarak bu sürece katkı sağlayan PON enzimleri ile yapılan çalışmalar kanserdeki önemini gözler önüne sermektedir. PON2 ekspresyon artışının, oral skuamöz hücreli karsinomda (OSCC), mitokondriyal ROS aracılı apoptoza karşı koruma sağlayarak hücrel stres direncini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (144). Benzer şekilde prostat karsinomu, renal karsinom, mesane kanseri, glioblastoma, mide kanseri, meme kanseri ve hepatosellüler karsinom gibi bazı solid tümörlerde de PON2 artışı tanımlanmıştır (68,145). Ayrıca, 31 farklı kanser türüne sahip 10 000'den fazla hastadan alınan tümör örneklerinden elde edilen RNA ve DNA dizileme verilerinin biyoinformatik analizi ile yapılan bir çalışmada da, yüksek düzeyde PON2 ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda analiz edilen kanser türleri arasında özellikle PON2'nin en yüksek ekspresyon seviyesinin karaciğer kanserinde gözlemlenmesi dikkat çekicidir (146). Benzer şekilde literatürde PON3 enziminin de ekspresyon artışını gösteren çalışmalar mevcuttur. PON3 upregülasyonu, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu ile

ilişkilendirilmiştir (17). Özellikle, PON2 ve PON3 enzimlerinin anti-apoptotik aktivite kazandırarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasında ve kemoterapi direncinde rol oynadığı belirtilmiştir (68,145). Karagenç ve ark. yaptığı çalışmada HIF-1 transkripsiyon faktörünün hipoksik ve normoksik koşullarda PON2 ile ilişkisini araştırmıştır. İnsan küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hatlarında (H1299, A549 ve PC14), normoksik koşul ile kıyaslandığında 4 saat hipoksik koşulda PON2 ekspresyonunun artışı tespit edilmiştir (147). HepG2 hücre hattında PON1, PON2 ve PON3 ekspresyonunu analiz ettiğimiz çalışmamızda, literatür ile uyumlu olarak normoksi ile kıyaslandığında hipoksik koşullarda anlamlı derecede artış tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Sonuç olarak, özellikle tümörün ilerlemesini takiben artan hipoksi durumunda PON enzim ailesi üyelerinin upregüle olarak onkogen gibi davranabileceği ileri sürülebilir.

Yapılan çalışmalarda PON ekspresyonunun düzenlenmesinde sinyal yollarının da etkili olduğu dikkat çekmektedir (68). Oksidatif stresin hücresel yanıtında önemli rol oynayan sinyal iletim yollarından biri olan PI3K/Akt yolağı, ROS detoksifikasyonunu ve redoks homeostazını kolaylaştırmaktadır. PI3K/Akt sinyal yolağı, çeşitli antioksidan yolları doğrudan aktive etme kapasitesine sahiptir (14).

Normal hücrelerde sinyal iletim yolları, eksojen büyüme faktörlerinden, sitokinlerden veya hormonlardan gelen sinyalleri alarak, hücre fizyolojisindeki adaptif değişiklikler doğrultusunda hücresel fonksiyonları kontrol etmektedir. Hücrede yaygın olarak bulunan ve büyüme faktörü tarafından düzenlenen PI3K/Akt sinyal yolağı, besin taşıyıcılarının ve metabolik enzimlerin doğrudan düzenlenmesi veya metabolik yolların temel bileşenlerinin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin kontrolü yoluyla hücresel metabolizma üzerinde etkilere sahiptir (148). Bu sinyal yolağının anormal aktivasyonu, HCC de dahil birçok kanser türünde en sık görülen olaylardan biridir. Bu süreçte onkogenler ve tümör baskılayıcı genler görev almaktadır (17,79). Bu yolak, kanserde proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre hareketliliği, tümör büyümesi ve anjiyogenez gibi birçok hücresel süreçte önemli rol oynamaktadır (149). Hücresel redoks homeostazında önemli görülmesine rağmen, PI3K/Akt yolağının

antioksidanlar ile ilişkisinin mekanizması hala aydınlatılmayı beklemektedir. Bu araştırma alanı, yalnızca yeni biyobelirteçlerin tanımlanması için değil, aynı zamanda daha güçlü terapötik kombinasyonları uygulama olanağı sunması ile de umut vadetmektedir (14). Ayrıca literatürde PON enzim ailesi üzerinde PI3K/Akt yolağının etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Zhu ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada PON3'un, OSCC'de PI3K/Akt yolağı üzerinden hücre proliferasyonunu ve metastazı geliştirdiğine dikkat çekmiştir (17). Bir başka çalışmada ise ROS üretiminin, hücreSEL PON2 ekspresyonu ve PI3K sinyal yolağı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (16). Bu nedenle hem önemli bir antioksidan olan hem de karsinogenez sürecinde potansiyel bir onkogen olarak önerilen PON enzim ailesinin PI3K/Akt sinyal yolağı ile ilişkisinin aydınlatılması amacıyla çalışmamızda PI3K/Akt sinyal yolağı proteinleri olan Akt ve mTOR ekspresyonları da analiz edilmiştir. Normoksik koşullara kıyasla hipoksik koşullarda Akt ve mTOR proteinlerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca hipoksik koşullarda bu proteinlerin aktive formları olan p-Akt ve p-mTOR proteinlerindeki artış da dikkat çekmektedir (Şekil 4.12, Şekil 4.15). PON enzim düzeylerindeki artış da göz önüne alınarak hipoksik koşullarda PI3K/Akt sinyal yolağının aktive olduğu belirtilebilir.

Hücre içi sinyal yollarının başlatılması veya baskılanmasında hücre-hücre iletişimi yoluyla çeşitli sinyaller aktarılır. Bu aktarımda özellikle eksozomlar da rol oynamaktadır. Eksozomlar, heterojen kargoları ileterek sinyal yollarını etkileyen ekstrasellüler veziküllerden biridir (18). Eksozomlar birçok protein, karbohidrat, lipid ve nükleik asit içerir. Hücreler arasında madde taşınımı ve sinyal iletimine aracılık etmektedir (19,20). Yapılan çalışmalar ile eksozomların hastalık patogenezinde ve tümör biyolojisinde önemli rollerinin olduğu ortaya konulmuştur (18-22). Özellikle, tümör kaynaklı eksozomlar; son zamanlarda ümit verici sıvı biyopsi tümör belirteçleri olarak kabul edilmektedir (23). Non-invaziv olarak elde edilen eksozomlardaki genlerin; erken tarama, erken tanı, terapötik etkilerin izlenmesi ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılabileceği ileri sürülmüştür (150,151). Eksozomların kanser ile sağlıklı hücreler arasında iletişim kurabilmek amacıyla yakın ve uzak mesafeli hücreler arasında çözünür faktörleri taşıdığı gösterilmiştir (104). Ayrıca eksozomlar tümör oluşumu, gelişimi, metastaz, invazyon ve ilaç direnci ile de yakından ilişkilidir (19,22). Özetle, kanserin karakteristik

özellikleri olarak adlandırılan birçok durumda dikkat çekici roller üstlenmektedirler (24).

Yapılan çalışmalarda; presipitasyon, boyut eleme kromatografisi, ultrafiltrasyon ve ultrasantrifüjleme eksozomların izolasyonu için kullanılan en temel tekniklerdir. Bunlardan özellikle ultrasantrifüj yöntemi, basit protokol ve verimi nedeniyle eksozom izolasyonu için kabul edilmesine rağmen düşük saflıkta eksozom izole edilmesine olanak sağlamaktadır ve özel ekipman ile zaman gerektirmektedir. Hücre terapötikleri ve sıvı biyopsi olarak eksozomların klinik kullanıma geçebilmesi için daha hızlı ve güvenilir bir şekilde elde edilebilmeleri önemlidir. Bu hususlar göz önüne alınarak yakın zamanda Ciftci ve arkadaşları, altın standart yöntem olarak kabul edilen ultrasantrifüj yöntemi ile manyetik olarak işaretlenerek pozitif seçilime olanak sağlayan MACS sistemini kıyaslamışlardır. Sonuçları doğrultusunda eksozom izolasyonu için yüksek saflık oranı ile daha hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak MACS kullanımını önermişlerdir (152). Bu teknik, eksozomların tetraspanin membran antikorlarına (CD9, CD63 veya CD81) özgü ayrılması esasına dayanmaktadır. Manyetik işaretleme ile eksozom izolasyon yöntemi, eksozomların seçilmiş alt popülasyonlarının saptanmasını sağladığından ve oldukça saf bir popülasyon sunduğundan, alternatif ve yeni bir yöntem olarak dikkat çekmektedir (152-155). Çalışmamızda MACS sistemi ile avantajlı ve başarılı bir şekilde HepG2 hücre hattından salınan eksozomlar izole edilerek karakterize edilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).

Ciftci ve ark. (152) MACS sistemi kullanarak hBMSC numunelerinde $9.31 \pm 4.4 \times 10^9$ partikül/mL oranında eksozom izole etmişlerdir. Çalışmamızda ise benzer şekilde MACS sistemi kullanılarak HepG2 hücrelerinden izole edilen eksozomların miktarı, $(101 \pm 3.06) \times 10^{11}$ partikül/mL oranıyla dikkat çekmektedir (Şekil 4.7). Yapılan çalışmalar ile kanser hücrelerinin genellikle normal hücrelerden daha fazla eksozom ürettiği ve kanser hücrelerinden türetilen eksozomların, hem yakın hem de uzak mikroçevreleri değiştirmek için güçlü bir kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir (156). Ayrıca çalışmamızda hem SEM hem de NTA analizleri sonucunda 50-200 nm boyut aralığında HepG2 eksozomları izole edilmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8). Bu aralık literatürde yer alan doğru ve güvenilir eksozom boyutu ile

uyumludur (152,157). Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz HepG2 eksozom miktar ve çap aralığı açısından literatür ile benzer özellikler taşımaktadır.

Yapılan çalışmalarda eksozom salınımının hipoksik koşullarda, normoksik koşullara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (25-27). Normoksik koşullarda eksozom salınımında ön elemanlar olan geç endozomlar, lizozomlarla birleşme eğilimindedir. Ancak hipoksik koşullarda lizozom ile birleşmeyerek salınım yolunu tercih ederler. Böylece eksozomlar, hipoksi altında tümör hücresinden daha fazla salınırlar (26). Hipoksinin tümör ilerlemesi ve metastaz ile yakın ilişkisi göz önünde bulundurulduğunda, eksozomların da bu süreçlerde etkili olması dikkat çekicidir. Hipoksik tümör hücrelerinden anjiyojenik ve metastatik özelliklere sahip eksozomlar salınır. Böylece tümör büyümesini ve invazyonunu teşvik etmek için mikroçevreyi etkilemektedirler (158). Hatta yapılan dikkat çekici bir çalışma ise, tümörden türetilen eksozomların integrin profilinin, tümörün hangi organa metastaz yapacağını belirlediğini ve gelen eksozomların, organa özgü hücreler tarafından alındıklarında pre-metastatik niş oluşturmaya yardımcı olduğunu ortaya koymuştur (159).

Hipoksinin, HCC ilerlemesinde de önemli rolleri vardır. Ancak, HCC'deki hipoksiye bağlı eksozomların etkisinin nasıl olduğu belirsizliğini korumaktadır. Bu belirsizliği aydınlatmak amacıyla yakın zamanda yapılan bir çalışmada hipoksik koşulların, HCC hücrelerinde eksozom üretimini artırdığı ve hipoksik tümör hücreleri tarafından salınan eksozomların normoksik tümör hücrelerinde proliferasyonu ve maligniteyi indüklemeye potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (28). Hipoksik eksozomların bu etkilerini aydınlatabilmek için içeriklerinin detaylıca araştırılması gerekmektedir.

Eksozom salınımını etkileyen bir diğer faktör ise oksidatif stres koşullarıdır. Oksidatif stres koşulları altında salınan eksozomlar, temel hücresel ve biyolojik fonksiyonları düzenlemek için çok fonksiyonlu sinyal kompleksleri olarak tanımlanmaktadırlar. Böylelikle, ROS metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar (8,29). Çeşitli çalışmalar, eksozomların oksidatif strese karşı koruyucu bir fonksiyonu olduğunu ortaya koymaktadır (160,161). ROS'a maruz bırakılan hücrelerden elde edilen eksozomlarda antioksidanların arttığı ve daha sonra bu eksozomlarla muamele edilen hücrelerde antioksidan mekanizmaların uyarıldığı gösterilmiştir (162,163). Literatürde GPX, Glutatyon-S-Transferaz (GST), SOD ve

CAT gibi antioksidan enzimlerin eksozomlarda bulunduğuna dair araştırmalar mevcuttur (8). Fakat, önemli bir antioksidan enzim olan PON enzim ailesinin eksozomal ekspresyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Tendler ve ark.'nın 2018 yılında yaptıkları çalışmada eksozomların makrofaj PON2'nin aktivitesini artırdığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada C-Reaktif Protein (CRP) değeri yüksek ve inflamatuvar bir hastalık olan ateroskleroza bulunan beş örnekten eksozom izole edilmiştir. Elde edilen bu fraksiyonlar ile makrofaj hücre hattı inkübe edilmiştir. Ardından makrofaj PON2 aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (70). Bir başka çalışmada ise VLDL ve IDL (orta yoğunluklu lipoprotein) fraksiyonları ile birleşen insan plazma eksozomlarını saflaştırmak için çok basamaklı bir ayırma metodu geliştirilmiştir. Eksozomla ilişkili proteinler, SDS-PAGE ile ayrılmış ve hem hücresel hem de hücre dışı proteinleri içeren 66 protein LC-MS/MS ile tanımlanmıştır. Analiz edilen 66 protein içerisinde bulunan PON enzimi ile ilgili ise çalışmada herhangi bir yorumda bulunulmamıştır (164). Gonzalez-Begne ve ark. ise MudPIT (çok boyutlu protein tanımlama teknolojisi) kütle spektrometrisini kullanarak, insan parotis tükürüğünün eksozom fraksiyonunda 491 proteini tanımlamışlardır. Parotis bezleri, bezin metabolik ve fonksiyonel durumunu yansıtan eksozomlar salgırlar ve ayrıca sistemik hastalıkların tanı ve tedavisinde faydalı olan bilgilendirici protein belirteçleri taşıyabilirler sonucuna varılmıştır. Tanımlanan bu proteinler içerisinde yer alan PON ile ilgili bu çalışmada da herhangi bir yorumda bulunulmamıştır (165). 2008 yılında Conde-Vancells ve ark. ilk kez tümöral olmayan hepatositlerde eksozom sekresyonunu tanımlamış ve proteomik yaklaşım kullanarak karakterize etmişlerdir. PON1 ve PON3 proteinleri de belirlenen proteinler arasında yer almaktadır. Elde ettikleri bu yeni bulguların, hepatosit biyolojisi hakkındaki bilgileri geliştirmeye katkıda bulunacağı ve karaciğer hastalıklarında önemli tanıl, prognoz ve terapötik etkilere sahip olabileceği vurgulanmıştır (166). Bu çalışmalar doğrultusunda çalışmamızda tümöral olan HepG2 hücre hattında ilk kez PON enzim ailesinin eksozomal ifadelerini belirlemeyi amaçladık. Ancak izole edilen HepG2 eksozom lizatlarında PON1, PON2 ve PON3 proteinlerini uyguladığımız western blot yöntemi ile gözlemleyemedik. Dolayısıyla PON eksozomal ifadelerinin analizi için daha ileri teknikler kullanılarak deneyler gerçekleştirilmelidir sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda ayrıca western blot yöntemi ile PI3K/Akt sinyal yolağı proteinleri olan Akt ve mTOR düzeyleri eksozom içeriğinde de analiz edilmiştir. Eksozomların içeriğinde yer alan moleküller ile, sinyal yolaklarında aktivasyon ve inhibisyonlara neden olarak hücrenin kaderini belirlediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (24,99-101). Bu nedenle eksozom içeriklerinin ve sinyal yolakları ile etkileşiminin araştırılması son derece önem arz etmektedir. Zhang ve ark. bu amaçla yaptıkları çalışmada, servikal kanserde ve eksozomlarında PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu proteinlerini (PI3K, Akt ve mTOR) analiz etmişlerdir. Sağlıklı ve CİN (servikal intraepitelyal neoplazi) grubu ile karşılaştırıldığında PI3K, Akt ve mTOR protein seviyelerinin servikal kanser hastalarında arttığı tespit edilmiştir. Bu artış kanserin malignite derecesi ile de pozitif korelasyonlu bulunmuştur. Vajinal sekresyondan elde edilen eksozom içeriklerinde de PI3K, Akt ve mTOR proteinlerinin dokulardakine kıyasla anlamlı derecede yüksek ekspresyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile eksozomlardaki PI3K/Akt/mTOR genlerinin, servikal kanserin tanı ve tedavisi için potansiyel biyobelirteçler olarak hareket edebileceği ileri sürülmüştür (167). Ayrıca, eksozom içeriğindeki moleküllerin HCC'de PI3K/Akt yolağını aktive ederek karsinogenez sürecine katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. HCC ile yapılan bir çalışmada, HCC hücrelerinin PTEN'i hedef alan eksozomal miRNA'lar salgılayarak hepatik stellat hücrelerde (HSC'ler) PDK1/Akt sinyalinin aktivasyonuna yol açtığını ortaya koyulmuştur. HSC'ler ve HCC tümör hücreleri arasındaki hücreler arası iletişime tümör kaynaklı eksozomların aracılık ettiği tespit edilmiştir. Bu iletişim ağının anlaşılması ile HCC invazyonunun ve moleküler mekanizmasının daha da aydınlatıldığı ileri sürülmüştür (168). Eksozom içeriğinde taşınan miRNA ile yapılan bir diğer çalışmada ise, ilk kez eksozom yoluyla miR-32-5p'nin dirençli hücrelerden hassas hücrelere iletilmesi sonucunda PI3K/Akt yolağının aktive edilerek anjiyogenezi ve EMT'yi modüle ettiği ve çoklu ilaç direncini indüklediği gösterilmiştir (169). He ve ark. tarafından HCC invazyon mekanizmasının aydınlatılması amacıyla yapılan bir diğer çalışmada ise, HCC hücrelerinden salınan eksozomların hepatositlerde migrasyon ve invazyon yeteneklerini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur. Tümöral eksozomların hepatositlere alınması ile PI3K/Akt sinyal yolağı proteinlerinin fosforile olarak aktifleştiği ortaya konulmuştur. Bu çalışma ile ilk kez, kanser kaynaklı eksozomların tümör metastazını desteklemek için karaciğer ortamını değiştirebileceği, HCC tümör hücreleri ile karaciğer parankima

hücreleri arasında eksozomal düzeyde bir iletişim meydana gelerek PI3K/Akt sinyal yolağının invazyonu tetikleyebileceği düşünülmüştür (170). Çalışmamızda PI3K/Akt sinyal yolağı proteinleri olan Akt ve mTOR'un HepG2 hücre hattının eksozomal içeriğinde taşındığı gözlemlenmiştir. Normoksik koşullarda üretilen eksozomların hipoksik koşullardakine kıyasla daha yüksek düzeyde Akt ve mTOR ihtiva ettikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.13, Şekil 4.16). Eksozomal içerikte fosforile hallerinin yanısıra total formdaki Akt ve mTOR'un taşındığı ve normoksik koşullarda daha da etkin iletişime katılabildikleri ileri sürülebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında, normoksik ve hipoksik koşullarda hepatosellüler karsinom hücre hattında (HepG2) ve eksozomlarında, PON enzim ailesi ile PI3K/Akt sinyal yolağı proteinlerinin ilişkisini belirlemek amaçlanmıştır.
- Çalışmamızda, hipoksinin etkisi de göz önüne alınarak eksozom aracılı iletişimde PI3K/Akt sinyal yolağı ve PON enzim ailesi arasındaki ilişki ilk kez çalışılmıştır.
- HepG2 hücre hattında hipoksik maruziyet süresini belirlemek için hipoksik (2, 4, 6, 12 ve 24 saat) ve normoksik koşullarda inkübe edilen hücrelerden lizatlar hazırlanmıştır. Daha sonra, HIF-1 α protein seviyeleri western blot ve ELISA kullanılarak tespit edilmiştir.
- HepG2 hücre hattı için hipoksi maruziyet süresi 4 saat olarak belirlenmiştir.
- HepG2 hücre hattı eksozomlarının izole edilmesi için manyetik tabanlı pozitif seçim yöntemi olan MACS sistemi kullanılmıştır. Elde edilen eksozomların karakterizasyonu Bradford, SEM ve NTA yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Verilerimiz sonucunda eksozomların başarılı bir şekilde izole edildiği gösterilmiştir.
- Hem normoksik hem de hipoksik (4 saat) koşullarda HepG2 hücre ve eksozom lizatları elde edilmiştir. Lizatlarda paraoksonaz ve laktonaz enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Ayrıca PON enzim ailesi (PON1, PON2, PON3) ve PI3K/Akt sinyal yolağı proteinleri (Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR) western blot ile analiz edilmiştir.
- PON enzim ailesi üyeleri eksozom içeriğinde western blot yöntemi ile tespit edilememiştir. Dolayısıyla eksozomların paraoksonaz ve laktonaz aktivite seviyeleri de elde edilememiştir. PON ailesinin eksozomal varlığını gösterebilmek için daha kapsamlı, güvenilir ve az numune ile çalışmaya olanak sağlayan kütle spektrometresi (MS), yeni nesil dizileme (NGS) ve akım sitometrisi gibi ileri teknikler kullanılarak ileri çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

- HepG2 hücre hattında normoksik koşullara kıyasla hipoksik koşullarda, PON enzim ailesi (PON1, PON2, PON3) protein düzeyleri, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmasına rağmen, paraoksonaz ve laktonaz enzim aktivitelerinde azalma tespit edilmiştir ($p<0.05$).
- Hipoksik koşullarda aktivitelerini azaltarak HCC'nin karsinogenez sürecine katkı sağlayan PON ailesi üyelerinin, ekspresyonlarını artırmak suretiyle de onkogen gibi davranıp sinyal yollarını aktive edebileceği düşünülmektedir.
- Hipoksi; Akt, p-Akt, mTOR ve p-mTOR düzeylerinde, HepG2 hücrelerinde normoksik koşullar ile kıyaslandığında artışa sebep olmuştur. Bu durum hipoksinin PI3K/Akt yolağını aktive ederek HCC ilerlemesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.
- HepG2 hücrelerinden izole edilen eksozomların içeriğinde de hipoksik koşullarda normoksik koşullara kıyasla Akt, p-Akt, mTOR ve p-mTOR düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. Bu durum normoksik koşullardaki PI3K/Akt yolağı proteinleri aracılığıyla hücreler arası iletişimin HCC'de daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.
- İstatistiksel analizler sonucunda elde ettiğimiz korelasyon verileri doğrultusunda, HepG2 hücre hattında normoksik koşullarda, mTOR ile p-mTOR ve p-Akt ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde negatif yönlü korelasyon saptanmıştır.
- mTOR ekspresyonunun azaldığı durumlarda p-mTOR ve p-Akt ekspresyonları anlamlı düzeyde artmaktadır.
- p-mTOR ve p-Akt ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde pozitif yönlü korelasyon saptanmıştır. Bu durum PI3K/Akt yolağının mekanizmasını aydınlatma adına uygun sonuçlar vermektedir.

- Ayrıca, dikkat çekici bir şekilde normoksik koşullarda özellikle PON2 ekspresyonu ile p-Akt ve eksozomal Akt arasında pozitif yönlü korelasyon tespit edilmiştir.
- p-Akt ve eksozomal Akt ekspresyonları arasında da istatistiksel olarak anlamlı şekilde pozitif yönlü korelasyon saptanmıştır.
- Dolayısıyla PON2'nin hem hücresel düzeyde Akt fosforilasyonundaki rolünü, hem de eksozomal düzeyde Akt taşınımı ile arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacıyla daha ileri çalışmalar önerilmektedir.
- Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücreler ile kıyaslandığında eksozom içeriğinde Akt seviyelerinde artış, p-Akt seviyelerinde ise azalma gözlenmiştir.
- Hem normoksik hem de hipoksik koşullarda hücreler ile kıyaslandığında eksozom içeriğinde p-mTor seviyelerinde azalma gözlenmiştir.
- Normoksik koşullarda hücreler ile kıyaslandığında eksozom içeriğinde mTor seviyelerinin artışı dikkat çekmektedir.
- Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonunda eksozom içeriğinin de etkili olabileceği ve özellikle hipoksinin bu aktivasyonda rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Ancak bu etki mekanizmasının daha kapsamlı deneysel süreçler ile incelenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Gyamfi J, Kim J, Choi J. Cancer as a Metabolic Disorder, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(3):1155.
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions, *Cancer Discov.*, 2022, 12(1):31-46.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J. Clin.*, 2021,71(3):209-249.
4. Kara F, Kesinkılıç B. Türkiye Kanser İstatistikleri 2017. <https://hsgmdestek.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2017-turkiye-kanser-i-statistikleri.html>.9 Mart 2023.
5. Yang C, Feng H, Dai C. Development and validation of an immune-related prognosis signature associated with hypoxia and ferroptosis in hepatocellular carcinoma, *Cancer Med.*, 2022, 1-13.
6. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy, *Hypoxia*, 2015, 83.
7. Hielscher A, Gerecht S. Hypoxia and free radicals: Role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 79:281-291.
8. Bodega G, Alique M, Puebla L, Carracedo J, Ramírez RM. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers, *J. Extracell. Vesicles*, 2019, 8(1).
9. Sena CM, Leandro A, Azul L, Seiça R, Perry G. Vascular oxidative stress:

Impact and therapeutic approaches, *Front. Physiol.*, 2018, 1-11.

10. Bacchetti T, Ferretti G, Sahebkar A. The role of paraoxonase in cancer, *Semin. Cancer Biol.*, 2019, 72-86.
11. Neşelioğlu S, Pekcan G, Gök G, Yurt EF, Erel Ö. Lenfomada Myeloperoksidaz/Paraoksonaz Oranını kullanarak Disfonksiyonel HDL'nin Araştırılması, *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg.*, 2019.
12. Şimşek E, Yavuz AF, Terzi E, Uysal TK, Öz Bedir BE, Haqverdiyev E, et al. Enzymes During Pregnancy: Cytosolic Carbonic Anhydrase, Catalase, Paraoxonase 1 and Xanthine Oxidase Levels, *Online Turkish J. Heal. Sci.*, 2019, 4(1):79-93.
13. Witte I, Foerstermann U, Devarajan A, Reddy ST, Horke S. Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer, *J. Lipids*, 2012, 2012:1-12.
14. Koundouros N, Poulogiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer, *Front. Oncol.*, 2018, 15;8.
15. Chen J, Wang Q, Fu X, Huang X-H, Chen X, Cao L, et al. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9, *Hepatol. Res.*, 2009, 39(2):177-186.
16. Fuhrman B, Gantman A, Khateeb J, Volkova N, Horke S, Kiyan J, et al. Urokinase activates macrophage PON2 gene transcription via the PI3K/ROS/MEK/SREBP-2 signalling cascade mediated by the PDGFR- β , *Cardiovasc. Res.*, 2009, 84(1):145-154.
17. Zhu L, Shen Y, Sun W. Paraoxonase 3 promotes cell proliferation and metastasis by PI3K/Akt in oral squamous cell carcinoma, *Biomed.*

Pharmacother., 2017, 85:712-717.

18. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi A mohammad, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance, *Mol. Cancer*, 2019, 18(1):75.
19. Li X, Wang Y, Wang Q, Liu Y, Bao W, Wu S. Exosomes in cancer: Small transporters with big functions, *Cancer Lett.*, 2018, 435:55-65.
20. Kawahara H, Hanayama R. The Role of Exosomes/Extracellular Vesicles in Neural Signal Transduction, *Biol. Pharm. Bull.*, 2018, 41(8):1119-1125.
21. Tan SS, Yin Y, Lee T, Lai RC, Yeo RWY, Zhang B, et al. Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane, *J. Extracell. Vesicles*, 2013, 2(1):22614.
22. Kosaka N, Yoshioka Y, Tominaga N, Hagiwara K, Katsuda T, Ochiya T. Dark side of the exosome: the role of the exosome in cancer metastasis and targeting the exosome as a strategy for cancer therapy, *Futur. Oncol.*, 2014, 10(4):671-681.
23. He M, Zeng Y. Microfluidic Exosome Analysis toward Liquid Biopsy for Cancer, *SLAS Technol.*, 2016, 21(4):599-608.
24. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, 2020, 367(6478).
25. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading, *Semin. Cancer Biol.*, 2014, 28:3-13.
26. Neviani P, Fabbri M. Exosomic microRNAs in the Tumor Microenvironment,

Front. Med., 2015, 22;2.

27. King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells, *BMC Cancer*, 2012, 12(1):421.
28. Yu Y, Min Z, Zhou zhihang, Linhong M, Tao R, Yan L, et al. Hypoxia-induced exosomes promote hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis via miR-1273f transfer, *Exp. Cell Res.*, 2019, 385(1):111649.
29. Saeed-Zidane M, Linden L, Salilew-Wondim D, Held E, Neuhoﬀ C, Tholen E, et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress, *PLoS One*, 2017, 12(11):e0187569.
30. Khalili M, Burman B. Pathophysiology of Disease. In: Gary DH, McPhee SJ (eds). *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*. 7th ed. Yunanistan, McGraw-Hill Education, 2014.
31. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. *Physiology, Liver*, StatPearls Publishing, 2018.
32. Mukhtar NA, Khalili M. Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine. In: Hammer GD, McPhee SJ, Education MH (eds). *Liver Disease*, USA, McGraw-Hill Education, 2016:935-1031.
33. Ferrell LD, Kakar S, Terracciano LM, Wee A. MacSween's pathology of the liver. In: Burt, A. D., Ferrell, L. D., Hubscher SG (eds). *Tumours and Tumour-like Lesions of the Liver*. Philadelphia, Elsevier Health Sciences, 2017:780-789.
34. Yang JD, Roberts LR. Other Malignant Hepatic Tumors. In: Boyer TD, Lindor KD (eds). *Zakim and Boyer's hepatology: A textbook of liver disease*.

Philadelphia, Elsevier Health Sciences, 2016:708-720.

35. Chedid MF, Kruel CRP, Pinto MA, Grezzana-Filho TJM, Leipnitz I, Kruel CDP, et al. Hepatocellular carcinoma : diagnosis and operative management, *Arq. Bras. Cir. Dig.*, 2017, 30(4):272-278.
36. Globocan. Liver. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>. 13 Şubat 2023.
37. TÜİK. Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2019. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>. 13 Şubat 2023.
38. Dilek ON. *Karaciğer I.cilt.* 1. Basım. Ankara, Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2003.
39. Dimitroulis D, Damaskos C, Valsami S, Davakis S, Garmpis N, Spartalis E, et al. From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world, *World J. Gastroenterol.*, 2017, 23(29):5282-5294.
40. Balogh J, Victor D, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, et al. Hepatocellular carcinoma: a review, *J. Hepatocell. Carcinoma*, 2016, 3:41-53.
41. Diener Dasse, PharmD, BCOP K, J. Lander, PharmD M, M. Novelli P. Chemoembolization With Drug-Eluting Beads for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma, *J. Adv. Pract. Oncol.*, 2016, 7(7).
42. Mattia E De, Cecchin E, Guardascione M, Foltran L, Raimo T Di, Angelini F, et al. Pharmacogenetics of the systemic treatment in advanced hepatocellular carcinoma, *World J. Gastroenterol.*, 2019, 25(29):3870-3896.

43. Benson AB, D'Angelica MI, Abbott DE, Abrams TA, Alberts SR, Anaya DA, et al. Guidelines Insights: Hepatobiliary Cancers, Version 2.2019, *J. Natl. Compr. Cancer Netw.*, 2019, 17:302-310.
44. Tunissiolli NM, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, Pavarino ÉC, da Silva RF, da Silva R de CMA, et al. Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2017, 18(4):863.
45. Akyıldız Ü, Yalçın KS, Türkay FC. *Hepatosellüler Karsinom Tedavisi*. Fatih Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hast Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara, Güncel Gastroenteroloji.
46. Onan HB, Pehlivan UA. Metastatik hepatosellüler karsinom tedavisinde transarteriyel kemoembolizasyon (TAKE). In: Sedef AM, Yıldırım BA, Sedef AK (eds). *Onkolojide Görüntüleme ve Nükleer Tıp Temelli Tedaviler*. Ankara, Akademisyen Kitabevi, 2020;103-112.
47. Hu B, Yang X-B, Sang X-T. Development and Verification of the Hypoxia-Related and Immune-Associated Prognosis Signature for Hepatocellular Carcinoma, *J. Hepatocell. Carcinoma*, 2020, 7:315-330.
48. Shao C, Yang F, Miao S, Liu W, Wang C, Shu Y, et al. Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology, *Mol. Cancer*, 2018, 17(1):1-8.
49. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture, *J. Vis. Exp.*, 2011, (54) :e2899.
50. Ivan M, Fishel ML, Tudoran OM, Pollok KE, Wu X, Smith PJ. Hypoxia signaling: Challenges and opportunities for cancer therapy, *Semin. Cancer Biol.*, 2022, 85:185-195.

51. Choudhry H, Harris AL. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology, *Cell Metab.*, 2018, 27(2):281-298.
52. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy, *Acta Pharm Sin. B.*, 2015, 5(5):378-389.
53. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25(1):29-38.
54. Santilli F, D'Ardes D, Davì G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention, *Vascul. Pharmacol.*, 2015, 74:23-37.
55. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹¹This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920-1998), in gratitude for all he gave to us, *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 29(3-4):222-30.
56. Betteridge DJ. What is oxidative stress?, *Metabolism*, 2000, 49(2):3-8.
57. Jones DP. Redefining Oxidative Stress, *Antioxid. Redox Signal*, 2006, 8(9-10):1865-1879.
58. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress, *Curr. Biol.*, 2014, 24(10):R453-62.
59. Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions?, *Chem. Biol. Interact.*, 2016, 259:51-62.
60. Şimşek E, Yavuz AF, Terzi E, Uysal TK, Öz Bedir BE, Haqverdiyev E, et al. Gebelikte enzimler: sitozolik karbonik anhidraz, katalaz, paraoksonaz 1 ve ksantin oksidaz düzeyleri, *Online Türk Sağlık Bilim. Derg.*, 2019, 4(1):79-93.

61. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates, *J. Biol. Chem.*, 1946, (164):271-289.
62. Aldridge WN. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p -nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination, *Biochem. J.*, 1953, 53(1):110.
63. Aldridge WN. Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p -nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera, *Biochem. J.*, 1953, 53(1):117.
64. Levy D, Reichert CO, Bydlowski SP. Paraoxonases Activities and Polymorphisms in Elderly and Old-Age Diseases: An Overview, *Antioxidants*, 2019, 8(5):118.
65. Uriel J. Characterization of cholinesterase and other carboxylic esterases after electrophoresis and immunoelectrophoresis on agar. I. Application to the study of esterases of normal human serum, *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, 101:104-119.
66. Wysocka A, Zwolak A. The Relevance of Noncoding DNA Variations of Paraoxonase Gene Cluster in Atherosclerosis-Related Diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(4):2137.
67. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, 2008, 1(2):147-152.
68. Bacchetti T, Ferretti G, Sahebkar A. The role of paraoxonase in cancer, *Semin. Cancer Biol.*, 2019, 56:72-86.
69. Mackness M, Sozmen EY. A critical review on human serum Paraoxonase-1

in the literature: truths and misconceptions, *Turkish J. Biochem.*, 2020, 46(1):3-8.

70. Tendler Y, Aviram M, Volkova N, Kaplan M. Human Serum CRP - Rich Exosomes Fraction Increases the Activity of Macrophage Paraoxonase 2 (Pon2), *Ann. Atheroscler Res.*, 2018, 1(1):2-4.
71. Khersonsky O, Tawfik DS. Chromogenic and Fluorogenic Assays for the Lactonase Activity of Serum Paraoxonases, *ChemBioChem.*, 2006, 7(1):49-53.
72. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit Serum Paraoxonase 3 (PON3) Is a High Density Lipoprotein-associated Lactonase and Protects Low Density Lipoprotein against Oxidation, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(43):33435-33442.
73. Lin B, Su H, Ma G, Liu Y, Hou Q. Theoretical study of the hydrolysis mechanism of dihydrocoumarin catalyzed by serum paraoxonase 1 (PON1): different roles of Glu53 and His115 for catalysis, *RSC Adv.*, 2016, 6(65):60376-60384.
74. Kowalska K, Socha E, Milnerowicz H. Review: The role of paraoxonase in cardiovascular diseases, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2015, 45(2):226-233.
75. Arenas M, Rodríguez E, Sahebkar A, Sabater S, Rizo D, Pallisé O, et al. Paraoxonase-1 activity in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2018, 127:6-14.
76. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities, *J. Lipid Res.*, 2005, 46(6):1239-1247.

77. She Z-G, Chen H-Z, Yan Y, Li H, Liu D-P. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis, *Antioxid. Redox Signal*, 2012, 16(6):597-632.
78. Xu F, Na L, Li Y, Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours, *Cell Biosci.*, 2020, 10(1):54.
79. Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, Sadreddini S, Baradaran B. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer, *Gene*, 2019, 698:120-128.
80. Su Y-C, Lee W-C, Wang C-C, Yeh S-A, Chen W-H, Chen P-J. Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway as a Radiosensitization in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(24):15749.
81. Santoni M, Cimadamore A, Cheng L, Lopez-Beltran A, Battelli N, Massari F, et al. Circulating tumor cells in renal cell carcinoma: Recent findings and future challenges, *Front. Oncol.*, 2019, 9:228.
82. Zhang W, Xia W, Lv Z, Ni C, Xin Y, Yang L. Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes?, *Cell Physiol. Biochem.*, 2017, 41(2):755-768.
83. Bhan I, Haber DA, Chung RT, Ting DT. Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma, *Hepatocellular Carcinoma: Translational Precision Medicine Approaches*, 2019, 125-141.
84. Salvianti F, Gelmini S, Costanza F, Mancini I, Sonnati G, Simi L, et al. The pre-analytical phase of the liquid biopsy, *N. Biotechnol.*, 2020, 55:19-29.
85. Chiba M, Kubota S, Sakai A, Monzen S. Cell-to-cell communication via extracellular vesicles among human pancreatic cancer cells derived from the

same patient, *Mol. Med. Rep.*, 2018, 18(4):3989-3996.

86. Rufino-Ramos D, Albuquerque PR, Carmona V, Perfeito R, Nobre RJ, Pereira de Almeida L. Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases, *J. Control Release*, 2017, 262:247-258.
87. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, *J. Extracell. Vesicles*, 2015, 4(1):27066.
88. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2015, 40:41-51.
89. EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2013, 12(5):347-357.
90. McAndrews KM, Kalluri R. Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer, *Mol. Cancer*, 2019, 18(1):1-11.
91. Kooijmans SAA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems, *Int. J. Nanomedicine*, 2012, 1525-1541.
92. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain, *Mol. Ther.*, 2011, 19(10):1769-1779.
93. Jiang X-C, Gao J-Q. Exosomes as novel bio-carriers for gene and drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 2017, 521(1-2):167-175.

94. Wahlgren J, De L Karlson T, Brisslert M, Vaziri Sani F, Telemo E, Sunnerhagen P, et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes, *Nucleic Acids Res.*, 2012, 40(17):e130.
95. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells, *J. Biol. Chem.*, 2010, 285(23):17442-17452.
96. ExoCarta. Exosome Protein, RNA and Lipid Database. <http://exocarta.org>. 10 Ocak 2023.
97. Vlassov A V., Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2012, 1820(7):940-948.
98. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake, *Cell Mol. Neurobiol.*, 2016, 36(3):301-312.
99. McGough IJ, Vincent J-P. Exosomes in developmental signalling, *Development*, 2016, 143(14):2482-2493.
100. Stahl PD, Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis, *Physiology*, 2019, 34(3):169-77.
101. French KC, Antonyak MA, Cerione RA. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2017, 67:48-55.
102. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-

- Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET, *Nat. Med.*, 2012, 18(6):883-891.
103. Nakamoto H, Vigh L. The small heat shock proteins and their clients, *Cell Mol. Life Sci.*, 2007, 64:294-306.
104. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment, *Glia*, 2011, 59(8):1169-1180.
105. Hall J, Prabhakar S, Balaj L, Lai CP, Cerione RA, Breakefield XO. Delivery of Therapeutic Proteins via Extracellular Vesicles: Review and Potential Treatments for Parkinson's Disease, Glioma, and Schwannoma, *Cell Mol. Neurobiol.*, 2016, 36(3):417-427.
106. Hung ME, Leonard JN. Stabilization of Exosome-targeting Peptides via Engineered Glycosylation, *J. Biol. Chem.*, 2015, 290(13):8166-8172.
107. Rak J, Guha A. Extracellular vesicles - vehicles that spread cancer genes. *Bioessays*, 2012, 34(6):489-497.
108. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nat. Cell Biol.*, 2008, 10(12):1470-1476.
109. Higginbotham JN, Demory Beckler M, Gephart JD, Franklin JL, Bogatcheva G, Kremers G-J, et al. Amphiregulin Exosomes Increase Cancer Cell Invasion, *Curr. Biol.*, 2011, 21(9):779-786.
110. Li Q, Jin L, Jin M. Novel Hypoxia-Related Gene Signature for Risk Stratification and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma, *Front. Genet.*, 2021,

12: :613890.

111. Cai C, Yang L, Zhou K. 8DEstablishment and validation of a hypoxia-related signature predicting prognosis in hepatocellular carcinoma, *BMC Gastroenterol.*, 2021, 21:1-14.
112. Cramer T, Vaupel P. Severe hypoxia is a typical characteristic of human hepatocellular carcinoma: Scientific fact or fallacy?, *J. Hepatol.*, 2022, 76(4):975-80.
113. Zhang Q, Qiao L, Liu Q, Kong X, Hu J, Hu W, et al. Hypoxia associated multi-omics molecular landscape of tumor tissue in patients with hepatocellular carcinoma, *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(5):6525.
114. Yang C, Feng H, Dai C. Development and validation of an immune-related prognosis signature associated with hypoxia and ferroptosis in hepatocellular carcinoma, *Cancer Med.*, 2022, 11(11):2329-2341.
115. Wang M, Liu H, Zhang X, Zhao W, Lin X, Zhang F, et al. Lack of MOF Decreases Susceptibility to Hypoxia and Promotes Multidrug Resistance in Hepatocellular Carcinoma via HIF-1 α , *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, 9:718707.
116. Park HS, Kim JH, Sun BK, Song SU, Suh W, Sung J-H. Hypoxia induces glucose uptake and metabolism of adipose-derived stem cells, *Mol. Med. Rep.*, 2016, 14(5):4706-4714.
117. Xu O, Li X, Qu Y, Liu S, An J, Wang M, et al. Regulation of glucose transporter protein-1 and vascular endothelial growth factor by hypoxia inducible factor 1 α under hypoxic conditions in Hep-2 human cells, *Mol. Med. Rep.*, 2012, 6(6):1418-1422.
118. Yusuf ZS, Uysal TK, Simsek E, Nocentini A, Osman SM, Supuran CT, et al.

The inhibitory effect of boric acid on hypoxia-regulated tumour-associated carbonic anhydrase IX, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2022, 37(1):1340-1345.

119. Tsai CH, Li CH, Liao PL, Cheng YW, Lin CH, Huang SH, et al. NcoA2-dependent inhibition of HIF-1 α activation is regulated via AhR, *Toxicol. Sci.*, 2015, 148(2):517-530.
120. Srivastava S, Thakkar B, Yeoh KG, Ho KY, Teh M, Soong R, et al. Expression of proteins associated with hypoxia and Wnt pathway activation is of prognostic significance in hepatocellular carcinoma, *Virchows Arch.*, 2015, 466:541-548.
121. El Shorbagy S, AbuTaleb F, Labib HA, Ebian H, Harb OA, Mohammed MS, et al. Prognostic Significance of VEGF and HIF-1 α in Hepatocellular Carcinoma Patients Receiving Sorafenib Versus Metformin Sorafenib Combination, *J. Gastrointest. Cancer*, 2021, 52:269-279.
122. Han X, Sun S, Zhao M, Cheng X, Chen G, Lin S, et al. Celastrol stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor cells by initiating the ros/akt/p70s6k signaling pathway and enhancing hypoxia-inducible factor-1 α protein synthesis, *PLoS One*, 2014, 9(11): :e112470.
123. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*, 2011, 144(5):646-674.
124. Jaśkiewicz M, Moszyńska A, Króliczewski J, Cabaj A, Bartoszewska S, Charzyńska A, et al. The transition from HIF-1 to HIF-2 during prolonged hypoxia results from reactivation of PHDs and HIF1A mRNA instability, *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2022, 27(1):1-19.
125. Moszyńska A, Collawn JF, Bartoszewski R. IRE1 Endoribonuclease Activity Modulates Hypoxic HIF-1 α Signaling in Human Endothelial Cells, *Biomolecules*, 2020, 10(6):895.

126. Jiang Y, Zhu Y, Wang X, Gong J, Hu C, Guo B, et al. Temporal regulation of HIF-1 and NF- κ B in hypoxic hepatocarcinoma cells, *Oncotarget*, 2015, 6(11):9409.
127. Wang X, Wu D, Yang L, Gan L, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1 potentiates ethanol induction of hypoxia and HIF-1 α in vivo, *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, 63:175-186.
128. Ezhilarasan D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: Clinical and experimental perspective, *Arab. J. Gastroenterol.*, 2018, 19(2):56-64.
129. Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: Implication in arteriosclerosis diseases, *N. Am. J. Med. Sci.*, 2012, 4(11):523.
130. Mutlu M, Korkmaz MH, Simsek E, Terzi E, Oz Bedir BE, Uysal TK, et al. Do CO₂ and oxidative stress induce cancer?: a brief study about the evaluation of PON 1, CAT, CA and XO enzyme levels on head and neck cancer patients, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2019, 34(1):459-464.
131. Utangac MM, Yeni E, Savas M, Altunkol A, Ciftci H, Gumus K, et al. Paraoxonase and arylesterase activity in bladder cancer, *Turkish J. Urol.*, 2017, 43(2):147.
132. Balci H, Genc H, Papila C, Can G, Papila B, Yanardag H, et al. Serum Lipid Hydroperoxide Levels and Paraoxonase Activity in Patients With Lung, Breast, and Colorectal Cancer, *J. Clin. Lab. Anal.*, 2012, 26(3):155-160.
133. Bulbuller N, Eren E, Ellidag HY, Oner OZ, Sezer C, Aydin O, et al. Diagnostic value of thiols, paraoxonase 1, arylesterase and oxidative balance in colorectal cancer in human, *Neoplasma*, 2013, 60(4):419-424.

134. Kaya MO, Sinan S, Güler ÖÖ, Arslan O. Is there a relation between genetic susceptibility with cancer? A study about paraoxanase (PON1) enzyme activity in breast cancer cases, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2016, 31(6):1349-1355.
135. Samra ZQ, Pervaiz S, Shaheen S, Dar N, Athar MA. Determination of oxygen derived free radicals producer (xanthine oxidase) and scavenger (paraoxonase1) enzymes and lipid parameters in different cancer patients, *Clin. Lab.*, 2011, 57(9-10):741-747.
136. Eroglu M, Yilmaz N, Yalcinkaya S, Ay N, Aydin O, Sezer C. Enhanced HDL-cholesterol-associated anti-oxidant PON-1 activity in prostate cancer patients, *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 2013, 29(7):368-373.
137. Kafadar AM, Ergen A, Zeybek U, Agachan B, Kuday C, Isbir T. Paraoxonase 192 gene polymorphism and serum paraoxonase activity in high grade gliomas and meningiomas, *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 2006, 24(5):455-460.
138. Medina-Díaz IM, Ponce-Ruíz N, Rojas-García AE, Zambrano-Zargoza JF, Bernal-Hernández YY, González-Arias CA, et al. The Relationship between Cancer and Paraoxonase 1, *Antioxidants*, 2022, 11(4):697.
139. Camps J, Marsillach J, Joven J. Measurement of serum paraoxonase-1 activity in the evaluation of liver function, *World J. Gastroenterol*, 2009, 15(16):1929.
140. Salari N, Kazeminia M, Mansouri K, Hosseinian-Far A, Mohammadi M. The Activity and Polymorphism of the PON1 in Patients with Chronic Liver Disease: a Systematic Review and Meta-analysis, *J. Gastrointest. Cancer*, 2022, 53(3):745-755.
141. Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A, Koca S. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a

Turkish population, *BMC Cancer*, 2007, 7(1):1-8.

142. Mohammed CJ, Lamichhane S, Connolly JA, Soehnlen SM, Khalaf FK, Malhotra D, et al. A PON for All Seasons: Comparing Paraoxonase Enzyme Substrates, Activity and Action including the Role of PON3 in Health and Disease, *Antioxidants*, 2022, 11(3):590.
143. Bains Y, Caccavello R, Kotani K, Gugliucci A. Paraoxonase 1, HDL Subclasses and Post Surgery Acute Inflammation: A Pilot Study, *Antioxidants*, 2019, 8(6):192.
144. Krüger M, Pabst AM, Al-Nawas B, Horke S, Moergel M. Paraoxonase-2 (PON2) protects oral squamous cell cancer cells against irradiation-induced apoptosis, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2015, 141(10):1757-1766.
145. Manco G, Porzio E, Carusone TM. Human Paraoxonase-2 (PON2): Protein Functions and Modulation, *Antioxidants*, 2021, 10(2):256.
146. Shakhparonov MI, Antipova N V, Shender VO, Shnaider P V, Arapidi GP, Pestov NB, et al. Expression and Intracellular Localization of Paraoxonase 2 in Different Types of Malignancies, *Acta Naturae*, 2018, 10(3):92-99.
147. Karagenç N, Meydancı D, Küçüksayan H. Akciğer kanseri hücre dizilerinde hipoksi indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) ve paraoksonaz enzim ilişkisinin araştırılması, *Dicle Med. J.*, 2015, 42(3):361-367.
148. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism, *Nat. Rev. Cancer*, 2020, 20(2):74-88.
149. Cheng Y, Luo Y, Zhou Y, Wu H, Xie Z. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in malignant melanoma,

Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi, 2009, 25(2):134-136.

150. Elsherbini A, Bieberich E. Ceramide and Exosomes: A Novel Target in Cancer Biology and Therapy, *Advances in Cancer Research.*, 2018, 140:121-154.
151. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment, *J. Control Release*, 2015, 219:278-294.
152. Ciftci E, Bozbeyoglu N, Gursel I, Korkusuz F, Bakan Misirlioglu F, Korkusuz P. Comparative analysis of magnetically activated cell sorting and ultracentrifugation methods for exosome isolation, *PLoS One*, 2023, 18(2):e0282238.
153. Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. *Methods Mol. Biol.*, 2015, 1295:179-209.
154. Juzenas S, Venkatesh G, Hübenthal M, Hoeppner MP, Du ZG, Paulsen M, et al. A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood, *Nucleic Acids Res.*, 2017, 45(16):9290-9301.
155. Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang CS, Mechler A, Simpson RJ, et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma, *Proteomics*, 2013, 13(22):3354-3364.
156. Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity, *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer*, 2019, 1871(2):455-468.

157. Mussack V, Wittmann G, Pfaffl MW. Comparing small urinary extracellular vesicle purification methods with a view to RNA sequencing-Enabling robust and non-invasive biomarker research, *Biomol. Detect. Quantif.*, 2019, 17: 100089.
158. Park JE, Tan H Sen, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, et al. Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes, *Mol. Cell Proteomics*, 2010, 9(6):1085-1099.
159. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature*, 2015, 527(7578):329-335.
160. Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernås M, et al. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA, *PLoS One*, 2010, 5(12):e15353.
161. Ezquer F, Quintanilla ME, Morales P, Santapau D, Ezquer M, Kogan MJ, et al. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell-derived exosomes reduces oxidative stress and markedly inhibits ethanol consumption and post-deprivation relapse drinking, *Addict. Biol.*, 2019, 24(5):994-1007.
162. Patel GK, Khan MA, Bhardwaj A, Srivastava SK, Zubair H, Patton MC, et al. Exosomes confer chemoresistance to pancreatic cancer cells by promoting ROS detoxification and miR-155-mediated suppression of key gemcitabine-metabolising enzyme, *DCK. Br. J. Cancer*, 2017, 116(5):609-619.
163. Shi B, Wang Y, Zhao R, Long X, Deng W, Wang Z. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-21 protects C-kit⁺ cardiac stem cells from oxidative injury through the PTEN/PI3K/Akt axis, *PLoS One*, 2018, 13(2):e0191616.

164. Looze C, Yui D, Leung L, Ingham M, Kaler M, Yao X, et al. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPAR γ as an exosome-associated protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, 378(3):433-438.
165. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, et al. Proteomic Analysis of Human Parotid Gland Exosomes by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT), *J. Proteome Res.*, 2009, 8(3):1304-1314.
166. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes, *J. Proteome Res.*, 2008, 7(12):5157-5166.
167. Zhang W, Zhou Q, Wei Y, Da M, Zhang C, Zhong J, et al. The exosome-mediated PI3k/Akt/mTOR signaling pathway in cervical cancer, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2019, 12(7):2474.
168. Zhou Y, Ren H, Dai B, Li J, Shang L, Huang J, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2018, 37(1):1-18.
169. Fu X, Liu M, Qu S, Ma J, Zhang Y, Shi T, et al. Exosomal microRNA-32-5p induces multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2018, 37:1-18.
170. He M, Qin H, Poon TCW, Sze SC, Ding X, Co NN, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs, *Carcinogenesis*, 2015, 36(9):1008-1018.