

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI**

**MELATONİN VE UMBİLİKAL KORD KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ
BE(2)-C NÖROBLASTOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDE
TERAPÖTİK POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Ahmet ŞENGÜL**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER
İkinci Danışman
Öğr. Gör. Dr. Dilek KAAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI**

**MELATONİN VE UMBİLİKAL KORD KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ BE(2)-C
NÖROBLASTOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDE TERAPÖTİK
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Ahmet ŞENGÜL**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER
İkinci Danışman
Öğr. Gör. Dr. Dilek KAAN**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2022-11756 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Aralık 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Ahmet ŞENGÜL

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

‘Melatonin ve Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının BE(2)-C Nöroblastoma Hücreleri Üzerinde Terapötik Potansiyellerinin Araştırılması’ adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Ahmet ŞENGÜL

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER

2. Danışman

Öğr.Gör.Dr. Dilek KAAN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL

ONAY

Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER ve Öğr.Gör.Dr. Dilek KAAN danışmanlığında **Ahmet ŞENGÜL** tarafından hazırlanan ‘**Melatonin ve Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının BE(2)-C Nöroblastoma Hücreleri Üzerinde Terapötik Potansiyellerinin Araştırılması**’ adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

....../....2022

JÜRİ

İmza

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER

Üye: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Üye: Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/....../2022 tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../...../2022

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansa başladığım ilk günden itibaren çok büyük desteğini ve rehberliğini gördüğüm, tez çalışması boyunca aşamadığım zorlukların üstesinden gelmemde yardımlarını ve güler yüzünü esirgemeyen, bu günlere gelmemde katkı sahibi danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER hocama, tezimde ele aldığımız konuyla ilgili çok değerli rehberliğini gördüğüm, çalışmanın başından sonuna, her zaman yanımda olan, çalışma fikrinden deneysel müdahalelere kadar her aşamasında bilgisinden ve emeklerinden yararlandığım, nezaketini, iletişim beceresini ve bilgisini örnek aldığım 2. Danışmanım Öğr.Gör.Dr. Dilek KAAN hocama teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında büyük katkıları olan Genom ve Kök Hücre merkezi yönetici ile çalışanlarına, bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TYL-2022-11756) teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan eşim Fatma ŞENGÜL'e ve hayatım boyunca ailevi desteğini esirgemeyen babam Hamdullah ŞENGÜL'e, annem Ayten ŞENGÜL'e ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Ahmet ŞENGÜL

Kayseri, Aralık 2022

MELATONİN ve UMBİLİKAL KORD KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ BE(2)-C NÖROBLASTOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDE TERAPÖTİK POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet ŞENGÜL

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER

2. Danışman: Öğr.Gör.Dr. Dilek KAAN

ÖZET

Nöroblastoma, embriyolojik olarak nöral krestin gelişim bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan, çocukluk döneminin malignitesi yüksek ve en sık görülen ekstrasaniyal solid tümörlerinden olup adrenal medulla sempatik ganglionlarda görülen pediatrik popülasyonda kansere bağlı ölümlerin %15'inden sorumlu tümördür. Bu çalışmada, umbilikal kord dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinden salınan eksozomların (UK-MKH-Ekso) ve ayrıca epifiz bezi tarafından üretilen indolamin özellikle hormon olan melatoninin yüksek riskli hasta gruplarında izole edilmiş nöroblast hücre hattı, BE(2)-C üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada 1, 2,5 ve 5 mM konsantrasyonlarında melatonin ve 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında UK-MKH-Eksozomun 24, 48 ve 72 saat boyunca nöroblast hücreleri üzerindeki sitotoksikite ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Her iki etken grubun sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak % hücre canlılığı kontrol grubuna göre ve kendi aralarında değerlendirildiğinde anlamlı farklılıklar göstermiştir (**P<0,001). Melatonin ve eksozomların yarı inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) sırasıyla 2,68 mM ve 69.4 µg/mL bulunmuştur. 48 ve 72 saat süre sonunda 2.5 mM ve 5 mM konsantrasyonunda melatonin ve 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında UK-MKH-Eksozomun BE(2)-C hücreleri üzerinde apoptozu indüklediği, konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark bulunmazken (P>0,05), uygulanan her konsantrasyon ve her zamana bağlı olarak canlı hücreler kontrol olarak ele alındığında geç evre apoptotik, erken evre apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzde değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklılık göstermiştir (**P<0,001). Bu çalışmada, kan-beyin bariyerini geçebilen eksozomlar ve melatoninin nöroblast hücreleri üzerinde güçlü terapötik potansiyellerinin olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: BE(2)-C; Eksozom; Melatonin; Nöroblastoma.

**INVESTIGATION OF THE THERAPEUTIC POTENTIALS OF MELATONIN
AND UMBILICAL CORD DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL
EXOSOMES ON BE(2)-C NEUROBLASTOMA CELLS**

Ahmet ŞENGÜL

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Stem Cell Sciences

Master's Thesis December 2022

Supervisor: Ass. Dr Hatice GÜLER

2. Supervisor: Lect. Dr Dilek KAAN

ABSTRACT

Neuroblastoma is one of childhood's most common extracranial solid tumours with high malignancy, arising due to embryological neural crest development disorder, and is a tumour sympathetic ganglion of the adrenal medulla. In this study, the effects of exosomes (UC-MS-Exo) released from umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and melatonin, an indolamine hormone produced by the pineal gland, on the neuroblast cell line BE(2)-C observed in high-risk patient groups have been investigated. In this study, 1, 2.5, 5 mM and 25, 50, and 100 µg/mL concentrations of melatonin and exosome, respectively have been applied to neuroblast cells for 24, 48, and 72 hours and their cytotoxicity and apoptotic effects have been evaluated. When the results of both factors were statistically evaluated, % of cell vibrancy varies according to the control group, depending on time and concentration and when assessed between them (**P<0,001). The semi-inhibition concentration of melatonin and exosomes (IC₅₀) have been found 2.68 mM ve 69.4 µg/mL respectively. After 48 and 72 hours, 2.5 mM and 5 mM concentrations of melatonin and 50 and 100 µg/mL concentrations of UK-MS-Exosome induced apoptosis on BE(2)-C cells, while there was no significant difference between the concentrations (P>0.05), the percentage values of late-stage apoptotic, early-stage apoptotic and necrotic cells differed statistically significantly, depending on each applied concentration and each time. (**P<0,001). This study showed exosomes that can cross the blood-brain barrier and melatonin have strong therapeutic potentials on neuroblast cells.

Keywords: BE(2)-C; Exosome; Melatonin, Neuroblastoma.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Beyin Tümörleri	4
2.2. Nöroblastoma	6
2.2.1. Epidemiyolojisi	6
2.2.2. Klinik Tablo	6
2.2.3. Nöroblastomanın Moleküler Patogenezi	7
2.2.4. Nöroblastoma Evreleme	8
2.2.5. Nöroblastoma ve Tedavisi	8
2.3. Melatonin	8
2.3.1. Karanlık-Işık Döngüsü ve Melatonin Salınımının Düzenlenmesi ..	9
2.3.2. Melatonin ve Kanseri İlişkisi	10
2.4. Kök Hücre ve Tarihçesi	12
2.4.1. Kök Hücre ve Özellikleri	15
2.4.2. Kök Hücre ve Sınıflandırılması.....	16
2.4.2.1. Kök Hücrelerin Farklılaşabilme Kapasitelerine Göre Sınıflandırılması	16
2.4.2.1.1. Totipotent Kök Hücre.....	17
2.4.2.1.2. Pluripotent Kök Hücre	17
2.4.2.1.3. Multipotent Kök Hücre	18

2.4.2.1.4.Oligopotent Kök Hücreler	19
2.4.2.1.5. Unipotent Kök Hücreler	19
2.4.2.2. Elde Edildikleri Dokuya Göre Kök Hücreler	19
2.4.2.2.1.Embriyonik Kök Hücreler	19
2.4.2.2.2.Yetişkin Kök Hücreler	20
2.4.2.2.2.1.Mezenkimal kök hücreler.....	21
2.4.2.2.2.1.2.Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre	23
2.4.2.2.2.2.Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre ...	26
2.5. Mikroveziküller	27
2.5.1. Apoptotik Cisimler	29
2.5.2 Eksozomlar	29
2.5.3. Eksozomlar.....	30
2.5.3.1. Eksozom Biyogenezi	31
2.5.3.2. Eksozom İzolasyon Teknikleri.....	33
2.5.3.2.1.Diferansiyel Ultrasantrifüjleme	34
2.5.3.2.2.Boyut Tabanlı Teknikler	36
2.5.3.2.3.İmmünoafinite Yakalama Tabanlı Teknikler ...	37
2.5.3.2.4. Eksozom Çökeltme Teknikleri	37
2.5.3.2.5.Mikroakışkan Tabanlı Teknikler	38
2.5.3.3. Eksozomların Moleküler Bileşimi	38
2.5.3.4. Eksozomların Hedef Hücreye Alınımı	39
2.5.3.5. Eksozom Karakterizasyonu	40
2.5.3.6. Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların İşlevleri	41
2.6. Hücre Döngüsü	44
2.6.1. Hücre Döngüsü Düzenleyicileri	45
2.7. Apoptoz.....	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1. Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Canlandırılması ...	50
3.2. Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerden Eksozom (UK- MKH-Ekso) İzolasyonu	50

3.2.1. Eksozom Karakterizasyonu.....	51
3.2.1.1. Eksozomların Görüntülenmesi.....	51
3.2.1.2. Eksozomların Zeta Potansiyeli.....	51
3.2.1.3. Eksozomların Konsantrasyon ve Parçacık Boyut Analizi	52
3.3. BE(2)-C Nöroblast Hücre Hattının Yetiştirilme Ortamı.....	52
3.4. BE(2)-C Hücrelerinde XTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	52
3.5. BE(2)-C Hücrelerinde Anneksin V ile Apoptotoik Etkinin Belirlenmesi .	53
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	55
4. BULGULAR	56
4.1. Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojisi	56
4.2. Eksozom İzolasyonu	56
4.2.1. Eksozom Karakterizasyonu Bulguları	56
4.2.1.1. Eksozomların Görüntülenmesi.....	56
4.2.1.2. Eksozomların Boyut Analizi.....	57
4.2.1.3. Eksozomların Konsantrasyon ve Parçacık Boyut Analizi	58
4.3. BE(2)-C Nöroblast Hücrelerinin Morfolojisi	59
4.4. BE(2)-C Hücrelerinde XTT Yöntemi ile Sitotoksiste Bulguları.....	59
4.5. BE(2)-C Hücrelerinde Anneksin V Yöntemi ile Apoptoz Bulguları.....	61
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
6.KAYNAKLAR	70
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

°C	: Derece
µg	: Mikrogram
µg/ml	: Mikrogram/ mililitre
AADC	: Aromatik Asit Dekarboksilazın
AANAT	: N- asetiltransferaz
AD-KH	: Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücreler
ADKH-EXO	: Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre Eksozomları
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinazın
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
ApoEV	: Apoptotik Hücre Dışı Vekizkülleri
ATRT	: Atipik teratoid/rabloid tümör
BAT	: Kahverengi Yağ Dokusu
Ca ²⁺	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CDK	: Siklin Bağımlı Kinazlar
circRNA	: Dairesel RNA
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
DNA	: Deosiribonükleik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktör
EKH	: Embriyonik Kök Hücreler
ELİSA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analizi
ESCRT	: Taşıma İçin Gerekli Endozomal Sıralama Kompleksleri
EV	: Ekstrasellüler Veziküller
FADD	: Fas İle İlişkili Ölüm Alanı Proteini
FDG	: Fluorodeoksiglukoz
G	: Bir Kütleye Belirli Bir Durumda Etki Eden Hızlanma
g/mL	: gram/mililitre
GD2	: Anti- Disialogangliosid
GPCR	: G-Protein-Bağlı Reseptör

GTP	: Guanozin Trifosfat
HDAC	: Histon Deasetilazlar
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktör
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ILV	: İntرالuminal Veziküller
ISEV	: Uluslararası Hücre Dışı Veziküller Derneği
İPKH	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
KH	: Kök hücreler
lncRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
MKH	: Mezenkimal Kök Hücreler
MKH-EKSO	: Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomlar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MSH 2	: DNA Uyumsuzluğu Onarım Proteini 2
mV	: Milivolt
MVB	: Multiveziküler Cisimler
MVKH	: Multipotent Vasküler Kök Hücreler
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
ncRNAs	: Kodlanmayan RNA
nm	: Nanometre
NTA	: Nanoparçacık İzleme Teknolojisi Analizi
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktör
PEG	: Polietilen Glikol
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PHOX2B	: Paired- Like Homeobox 2B
PS	: Fosfatidler
SEC	: Boyut Dışlama Kromatografisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus

TBG	: Tümör Baskılayıcı Genler
TEM	: Elektron Mikroskobu
TGF- β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TLR	: Membran Reseptörlerine
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TNFR1	: Apoptotik Süreçte Dışsal Yol; Reseptörü 1
TP5H	: Triptofan Hidroksilaz
TRADD	: TNFR1 İle İlişkili Ölüm Alanı Proteini
UF	: Ultrafiltrasyon
UK_MKH	: Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
VEGF	: Vasküler Endotelyal Faktör
VIP	: Vazoaktif İntestinal Polipeptidi
WAT	: Beyaz Yağ Dokusu
WB	: Western Blot

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Kanser modellerinde melatoninin onkostatik etkisi	12
Tablo 2.2.	Hücre biyolojisi ve tıp alanında kök hücrelerle ilgili araştırmaların kronolojisi	14
Tablo 2.3.	Yetişkin kök hücre kaynakları	21
Tablo 2.4.	MKH'lerin yüzey antijen ekspresyonu.....	22
Tablo 2.5.	Ekstrasellüler veziküllerin sınıflandırılması (He ve Zheng, 2018).	31
Tablo 2.6.	İzolasyon tekniklerinin avantaj ve dezavantajları (Yang ve Zhang, 2020)	34
Tablo 3.1.	Anneksin V ve 7-AAD boyalarına, hücrelerin verdiği yanıtlar	54
Tablo 4.1.	Melatonin ve eksozomun BE(2)-C hücreleri üzerine % canlılık değeri....	60
Tablo 4.2.	Melatonin ve eksozomun BE(2)-C hücreleri üzerinde yüzde apoptoz değerleri (%)	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Embriyonal tümörlerde moleküler testler ve sonuçları	5
Şekil 2.2.	İnsanda melatonin biyosentezi	9
Şekil 2.3.	Kanser belirtilerini kısıtlamada melatonin etkisi	11
Şekil 2.4.	Kök Hücrelerde asimetrik ve simetrik bölünme	15
Şekil 2.5.	Kök hücre farklılaşmaları açısından aralarındaki sıra düzeni	16
Şekil 2.6.	Totipotentten pluripotent, multipotent ve unipotent hücreye farklılaşma .	17
Şekil 2.7.	Embriyonik kök hücrelerin özellikleri	20
Şekil 2.8.	MKH 'lerin etki mekanizması	23
Şekil 2.9.	Umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulaması ve etki mekanizmaları	25
Şekil 2.10.	Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin farklılaşma yetenekleri	27
Şekil 2.11.	EV'lerin hedef hücreye girişi	28
Şekil 2.12.	EV'lerin salınımı	29
Şekil 2.13.	Eksozom Salınım Mekanizması	32
Şekil 2.14.	Eksozomların ultrasantifüj yöntemi ile izolasyonu	35
Şekil 2.15.	Gradyan yoğunluğu ultrasantrifüjleme tabanlı eksozom izolasyon şeması	36
Şekil 2.16.	Polimer Çökeltme Şeması	38
Şekil 2.17.	Eksozomların hedef hücreye transfer mekanizması	40
Şekil 2.18.	MKH'lerden türetilen eksozomların metodoloji (MKH izolasyon grafiksel gösterimi, eksozom biyogenezi, eksozomların izolasyonu ve rejeneratif tıpta eksozomların terapötik uygulamaları	42
Şekil 2.19.	Eksozom fonksiyonlarının, nöral hücre iletişiminde şematik gösterimi ..	43
Şekil 2.20.	Hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol eden kanonik RB işlevi	46
Şekil 2.21.	Apoptoz içsel ve dışsal yolları	49
Şekil 4.1.	İnsan umbilikal kord kaynaklı MKH 'lerin mikroskopik görüntüsü	56

Şekil 4.2.	Image J programı ile çapları ölçülmüş eksozomların SEM görüntüsü	57
Şekil 4.3.	Eksozomların zeta potansiyeli değerleri.....	57
Şekil 4.4.	NTA ile eksozomların boyut dağılımı ve konsantrasyonu.	58
Şekil 4.5.	NTA ile eksozomların 3 boyutlu konsantrasyon ve boyut dağılımı grafiği.....	58
Şekil 4.6.	BE(2)-C nöroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (x50µm)	59
Şekil 4.8.	BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin 24, 48 ve 72 saat sonundaki IC ₅₀ değerleri	60
Şekil 4.9.	BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 48 saat sonundaki apoptoz değerlerinin karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.10.	BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 72 saat sonundaki apoptoz değerlerinin karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.11.	BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 48 saat sonundaki apoptoz değerlerinin flow sitometri sonuçları	64
Şekil 4.12.	BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 72 saat sonundaki apoptoz değerlerinin flow sitometri sonuçları	65

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağı kanserleri arasında yer alan en yaygın tümör, nöroblastoma'dır. Çocukluk çağı kanserlere bağlı ölümlerin %15'ini oluşturur. Sempatik sinir sisteminde ortaya çıkan bu tümör en çok karın bölgesinde gelişir ve adrenal bezde lokalizedir (Zafar ve ark. 2021). Lenf nodlarına, kemiğe, kemik iliğine ve akciğerlere, merkezi sinir sistemine metastaz yapma eğilimindedir (Park ve ark. 2019).

Nöroblastoma da düşük riskli olan hastalara tek başına cerrahi işlem uygulanabilir veya spontan tümör gerilemesi yaşanabilir. Orta riskli hastalara daha hafif kemoterapi uygulanır ve kalan tümör kitlesi cerrahi yöntem ile alınır. Yüksek riskli hastalar, metastaz ve MYCN onkogen amplifikasyonu ile karakterizedir ve tedavisi, indüksiyon, konsolidasyon ve idame olarak 3 aşamada yapılır. İndüksiyon kemoterapisi, tümörü küçültmeyi ve kemoterapi ve cerrahi yol ile metastazı engellemek amacıyla yapılır. Konsolidasyon aşamasında, otolog kök hücre nakli, radyoterapi ve yüksek doz kemoterapi uygulamasını içerir. İdame ise, sitokinler ve anti- disialogangliosid (GD2) monoklonal antikor kullanılarak immünoterapi ve 11-cis-retinol kullanarak farklılaşma tedavisini içerir (Zafar ve ark. 2021). Nöroblastoma tedavisinde otolog kök hücre nakli, hastanın kendi kanı veya kemik iliğinden alınıp izolasyon işlemi sonrasında dondurulur ve yüksek doz kemoterapi sonrası hastaya geri verilme aşamalarını içerir (Fish ve Grupp, 2008).

Melatonin, karanlığa tepki olarak bilinen epifiz bezi tarafından üretilen indolamindir. Ana üretim yeri epifiz bezi olmasına rağmen, gastrointestinal sistem, deri, retina ve kemik iliği gibi çeşitli dokularda da üretilir (Talib, 2018). Melatoninin antioksidan etkisi, DNA'yı oksidatif hasardan korur. Bunun için ya doğrudan serbest radikallerin

süpürülmesi yoluyla ya da dolaylı olarak metal kaynaklı DNA hasarını inhibe ederek, antioksidan enzimleri uyarır ve DNA onarım sistemini güçlendirir (Galano ve ark, 2018).

Kök hücreler, çoğalma, tek bir hücreden meydana gelme ve farklı doku tiplerine farklılaşma ile karakterize, özelleşmemiş hücrelerden oluşan özel bir hücre grubudur. Farklı potansiyellere sahip birçok kök hücre kaynağı vardır. Erken embriyoda, pluripotent kök hücreler tüm dokular için progenitörleri temsil eden embriyonik kök hücrelerdir. Daha sonraki gelişimde, doku kısıtlı kök hücreler, doku dengesini ve yenilenmesini sağlayan somatik kök hücrelerdir. Pluripotent hücreler, 3 germ tabakasının tamamından (endoderm, mezoderm ve ektoderm) dokuya farklılaşabilirler (Kolios ve Moodley, 2013). Multipotent kök hücreler, adipoz doku, kemik dokusu ve kıkırdak dokusu oluşturabilen mezenkimal kök hücreler gibi tek germ tabakasından türemiş dokuya dönüşebilirler. Kök hücreler hücrel tedavide hasarlı hücreleri değiştirmek veya organları yenilemek için kullanılabilecekleri gibi hastalığın patogenezi, hastalığa ait hücre dizilerini çoğaltmada ve ilaç geliştirmede kullanılabılırler. Kök hücre biyolojisinin gelişmesine rağmen hücrenin hazırlanma süresi ve in vitro ortamda kültür edilen hücrelerin bir ilaç gibi stabilizesini koruyamaması, tümör oluşumunu desteklemesi ve embriyonik kök hücre kullanımında oluşan etik sorunlar nedeniyle tedavi amaçlı çalışmaları kısıtlamaktadır (George, 2015).

Organizmada yer alan hücrelerin görevlerini yerine getirebilmeleri için haberleşmeleri gerekir. Hücrelerin haberleşmesi yakınındaki ve uzak mesafede yer alan hücrelerle kimyasal iletiler salgılayarak gerçekleşir. Yakın mesafede yer alan hücrelerle iletişimini nörotransmitterler ve yerel regülatör gibi lokal düzenleyicilerle sağlanır. Uzak mesafedekilerle iletişim ise hormonlar ve ekstrasellüler veziküller (EV) ile sağlanır (İnanır ve Ekici, 2020).

EV'ler apoptatik cisimler, ektozomlar ve eksozomlar olmak üzere üç kısma ayrılır. Eksozomlar EV'ler en küçük üyesi olarak endozomların olgunlaşmasıyla oluşur ve boyutları 20-200 nm arasındadır. Eksozomlar içerisinde protein, DNA, mRNA ve kodlanmayan RNA'lar (ncRNAs) başta olmak üzere çeşitli molekülleri bünyesinde barındırır (Harke ve ark,2021). Plazma, serum, idrar, anne sütü, amniyotik sıvı ve sinoviyal sıvı gibi vücut sıvılarından elde edilebilir. Eksozomların ilk zamanlar hücre

içerisinde bulunan proteinleri hücre dışına atılmasında görev aldığı düşünülmekteydi (Bahar, 2019). Son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte hücreler arası iletişim, genetik materyallerin transferi, sinyal iletimi ve immünolojik yanıtların düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Eksozomların hedef hücreye yalnızca içeriklerini aktarmadığı aynı zamanda hedef hücrede bazı değişikliklere neden olduğu glioblastomlu olgularda gösterilmiştir. 2008 yılında yapılan bir çalışmada, eksozomların taşıdığı mRNA ve miRNA'nın alındıkları beyin endotel hücrelerinde proteine dönüştüğü ve bu proteinin tümör çevresini düzenlemekte görev aldığı saptamıştır (Skog ve Würdinger 2008).

MKH kaynaklı eksozomlarda bünyesinde protein, lipid, DNA taşırlar. Mezenkimal kök hücre eksozomlarının birçok hastalık ve doku tamirinde etkin rol oynadığı bilinmektedir (Kuen ve Park2013). Karaciğer hasarında apoptozu azalttığı, diyabetin neden olduğu bilişsel bozukluk gibi hastalıkların tedavisinde umut verici bir araç olabileceği gösterilmiştir (Cosenza ve Toupet 2018).

Bu çalışmada melatonin ve insan umbilikal kord dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinden salınan eksozomların yüksek riskli hasta gruplarından izole edilmiş nöroblast hücre hattı BE(2)-C üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. 1, 2,5 ve 5 mM konsantrasyonlarında melatonin ve 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında eksozom 24, 48 ve 72 saat boyunca nöroblast hücrelerine uygulanmış ve XTT yöntemiyle sitotoksosite etkileri, Anneksin V & Dead Cell yöntemi ile apoptotik etkileri değerlendirilmiştir.

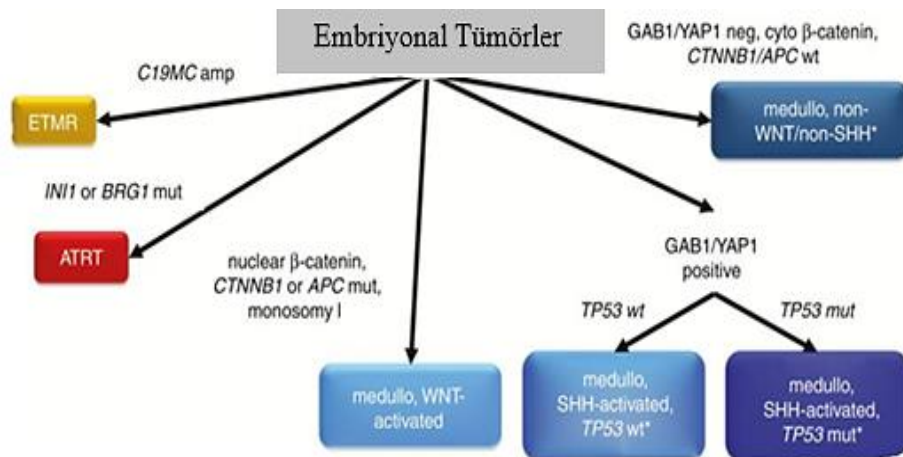
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin Tümörleri

Beyin ve merkezi sinir sistemi tümörleri en ölümcül kanserler arasında yer almaktadır. Amerika’da 2013-2017 arasında görülme sıklığı 100.000 kişide 23.79’dur. Beyin tümörlerinin görülme sıklığı düşük olmasına rağmen ölüm oranı bir o kadar yüksektir. Beyin tümörü tedavisi kan-beyin bariyerinin seçici geçirgenliği nedeniyle düşüktür. Bununla birlikte seçici geçirgenlik, beyin patolojisi biyobelirteçlerinin periferik dolaşıma geçmesini de engeller. Tümör kaynaklı biyobelirteçleri tespit etmek için geleneksel yöntemlerden, cerrahi doku biyopsisine gereksinim duyulur. Tekrarlanan biyopsiler ise yüksek komplikasyon ve morbidite riski nedeniyle mümkün olmayabilir. Sıvı biyopsiler yoluyla, beyin tümörü belirteçleri periferik kanda veya beyin omurilik sıvısında (BOS) tespit edilebilir. Bu sayede, bir tümörün evrimi bir hastanın tedaviye yanıtı basit ve minimal invaziv ile tespit edilebilir. Dolaşımda tümör hücrelerine ve tümör DNA’sına rastlanabilir. Dolaşımdaki tümör DNA’sı, tümör hücresi apoptozu veya nekrozu sırasında dolaşımda saptanabilen DNA’dır. Erken kanser dönemlerinde 1 ml kan numunesinde %0,001’den daha az tümör DNA’sına içerir (Torrella ve ark, 2022).

Beyin tümörleri, yaş (<10 yaşındaki çocuklar ve 60 yaş üstü bireylerde daha sık görülür), ırk (Avrupa kökenlilerde gliomalar ve nöroepityal tümörler daha sık görülür) ve cinsiyete (kötü huylu tümörler erkeklerde daha fazla görülür) göre değişen önemli heterojen bir tümör grubudur. Beyin tümörleri için doğrulanmış risk faktörleri olarak iyonlaştırıcı radyasyon ve alerji öyküsüdür. İyonlaştırıcı radyasyon çocuklarda daha güçlü olmakla birlikte, yetişkinler içinde risk içerir (Ostrom ve ark, 2019). Beyin tümörleri primer ve sekonder tümörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer tümörler; beynin kendi dokusundan kaynaklanan tümörlerdir. Sekonder tümörler ise, beyin dışında gelişen ve beyin dokusuna metastaz yapan tümörlerdir. En fazla akciğer, böbrek ve meme kanserleri metastaz yaparlar. Primer beyin tümörleri, supratentorial ve infratentorial tümörler olarak ikiye ayrılır. İnfratentorial tümörler; nöroepitelyal

tümörler, meninkslerde oluşan tümörler, sinir kılıfı hücreleri tümörü, hematopoetik tümörler, germ hücresi tümörleri, sellar bölgede yer alan tümörler ve komşu bölgelerde gelişen tümörlerdir. Nöroepitelyal tümörler; astrositik, oligodendrogial tümör, ependimal tümör, koroid pleksus tümör, pineal tümör ve embriyonal tümörler olarak sınıflandırılır (Horbinski ve ark, 2019). Embriyonal tümörler nöral krestten kaynaklanan malign neoplazmdır. Medullablastom, medullepitelyom, nöroblastoma ve ganglionöroblastom olmak üzere bir dizi tümörü kapsar. Medullablastom en yaygın embriyonal tümörlerdir. Kendi genetik tanımı (SHH ile aktive olan TP53-mutant, SHH ile aktive olan TP53-vahşi tip, WNT ile aktive olan SHH/WNT aktif olmayan, SHH/WNT aktif olmayan) grupları vardır. Genetik profil ve histoloji kombinasyonuna (klasik, desmoplastik, anaplastik ve yaygın nodülüllüğe sahip medullablastom) göre tümörlerin prognozu belirlenir. SHH kromozom 7'de hücrenin uzmanlaşması ve büyümesinde önemli olan dikenli protein kodlanmıştır. Kromozom 12q13 bölgesinde WNT gen ailesi, hücre çoğalmasını ve embriyogenezi düzenleyen sinyal proteinleri kodlar. Diğer embriyonal tümörler, 19. kromozomun üzerinde C19MC bölgesindeki amplifikasyona göre adlandırılır. Amplifikasyona sahip ise, C19MC değiştirilmiş, amplifikasyona sahip değilse NOS olarak adlandırılır. Diğerleri ise, nöroblastoma, medullaepitelyoma, ganglioblastoma ve INI1 veya BRG1 değişikliğine göre atipik teratoid/rabloid tümör (ATRT) olarak adlandırılır (Şekil 2.1.) (Rios ve ark, 2021).



Şekil 2.1. Embriyonal tümörlerde moleküler testler ve sonuçları (Horbinski ve ark, 2019).

2.2. Nöroblastoma

Nöroblastoma, çocukluk döneminin malignitesi yüksek ve en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörlerinden biridir. Nöral krest hücrelerinden köken alır. Adrenal medulla ve sempatik ganglionlarda görülür (Dacidoff ve ark, 2021).

2.2.1. Epidemiyolojisi

Nöroblastoma, tüm çocukluk çağı tümörlerinin %8-10 unda görülen, bebek ve çocuklarda en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörlerdir. Pediatrik popülasyonda kanser bağlı ölümlerin %15'inden sorumludur. İnsidansı, 15 yaş altında 1.10^6 'da 10,2 vaka ve yılda 500 yeni vaka bildirirler. Vakaların %90'ı 5 yaşından önce teşhis edilirken, 530'u ilk yıl içerisindeydir. Ortalama tanı yaşı 22 aydır. Nadiren ergen ve yetişkinlerde çıkar ve bu yaş grubunda daha ağır tablo ile karşılaşılır. Irk için herhangi bir ayrım içermezken, cinsiyet olarak, erkeklerde görülme sıklığı fazladır (Colon ve ark, 2011).

2.2.2. Klinik Tablo

Nöroblastomanın klinik tablosunda, tümörün konumu, boyutu invazyon derecesi, katekolamin sekresyonunun etkileri ve para neoplastik sendromlara bağlı birçok faktör rol oynar. Tümörlerin yaklaşık %65'i karın bölgesinde ortaya çıkar ve bunun yarısı adrenal bezin medulasına lokalizedir. Bunun dışında %5 boyun, %5 pelvis ve %20'de göğüste oluşabilir (Park ve ark, 2010). Bir çok hasta semptom vermezken, bazı hastalarda ateş, halsizlik ve kilo kaybı, büyüyen bir kitle, ağrı, abdominal distansiyon, lenfadenopati gösterebilir. Göğüs bölgesinde gelişmesi halinde solunum sıkıntısı, pelvis bölgesinde görülürse, karın ağrısı, kabızlık idrar yapamama semptomları görülebilir. Servikal tümörlerde hastada, Horner Sendromu gelişebilir ve hastaların %15'inde epidural genişleme ilerleyici felç gibi nörolojik defisitlere neden olabilir. Tanı sırasında, hastaların %50'sinde lokalize belirtiler görülür, %35'inde ise bölgesel lenf nodu yayılımı görülür. Hematojen ve lenfatik yol ile kemik iliği, karaciğer, cilt ve kemiklere metastaz yapabilir. Cilde metastaz yapması halinde hastalarda, mavi deri altı nodülleri gelişir. Nöroendokrin özellikleri nedeniyle nöroblastoma, hipertansiyon ve taşikardi ile sonuçlanan katekolamin salgılama potansiyellerine sahiptir. Hastada vazoaaktif intestinal polipeptidi (VIP), ensefalomiyelit, inatçı diyare gelişebilir.

Antikorlar ve serebellar doku çapraz reaksiyona girdiğinde ortaya opsocionus-miyoklonus sendromu (OMS) gelişir. OMS'ye bağlı, kol ve bacaklarda spazm ve göz nistagmusu gelişir (Colon ve ark, 2011).

2.2.3. Nöroblastomanın Moleküler Patogenezi

Nöroblastoma, sempatik sinir sisteminin nöronal ganglionlarında ortaya çıkan gelişimsel bir malignitedir. Bu nöronal yapılar, embriyogenez sırasında erken dönemde nöral tüpten göç eden nöral krest hücrelerinden türemektedir. Bazen dördüncü germ tabakası olarak adlandırılan nöral krest, nöro ektodermden türetilen geçici embriyonik dokudur. Omurgalılarda nöral tüp oluşumunda, nöral krest, karmaşık bir transkripsiyon/epigenetik düzenleyici şemaya yanıt verecek bir olgunlaşma süreci meydana gelir. Bu süreç boyunca nöral krest öncüleri kök hücreyi anımsatan çok noktalı farklılaşma potansiyeli kazanır. BMP, Wnt, Notch ve diğer ligandların, ardışık sinyal gradyanları, yüz, gövde ve kalbin epitelyalarına, mezenkimal ve endotelial bileşenlere farklılaşmasını sağlar. Bu olgunlaşma sürecinin inhibisyonu sonucu, erken multipotent nöral krest öncülerinin malign dönüşüme yatkın hale gelir (Louis ve ark, 2014).

Nöroblastomanın onkogeni kromozom 2'nin 2p24 distal kısa kolunda türetilen MYCN onkogenidir. Primer nöroblastomanın, yaklaşık %25'i MYCN amplifikasyonuna sahiptir. MYCN amplifikasyonu ilerlemiş hastalığı olanların %40'ında ve düşük evreli hastaların %5-10 arasında mevcuttur. MYCN amplifikasyonunda hücre başına 10'dan fazla gen kopyasının tanımlanması, hastalığın ileri evreleri, hızlı tümör ilerlemesi ve morbidite ile sonuçlanır (Fredlund ve ark, 2008). Anaplastik Lenfoma Kinazın (ALK) aktive edici mutasyonları da nöroblastomanın onkogen sürücüleri olarak düşünülür. Ailesel nöroblastoma vakaların tamamında ve spontan vakaların %6-10'u arasında mutasyonlar görülür. ALK ve MYCN mutasyonu tümör oluşumunu teşvik etmekle birlikte iş birliği yaparlar (Schulte ve ark, 2012).

PHOX2B (Paired- like Homeobox 2B) germ hattı mutasyonları, ailesel nöroblastoma ve sporadik vakalarda görülür. PHOX2B ve PHOX2A, nöral krest hücrelerinin, sempatik nöronlara doğru farklılaşmasını sağlar. Bu yoldaki mutasyonlar, Hirschsprung hastalığı ve merkezi hipoventilasyon sendromu gibi hastalıklara sebep olur (Di Lascio ve ark, 2016). ATRX, daha büyük ve ergenlerde ortaya çıkan nöroblastoma tümörlerinde

mutasyona uğrar. ATPase/helikaz alanı içerir ve SWI/SNF kromatin değiştiricileri ailesinin üyesidir. Telomer uzunluğunun düzenlenmesinde görev alır. 12 yaşından büyük çocukların 4. Evre nöroblastomaların %44'ünde mutasyon görülürken, 12 yaşından küçüklerin sadece %9'unda mutasyon görülür (Saenz ve ark, 2021).

2.2.4. Nöroblastoma Evreleme

1988 yılında yayınlanan Uluslararası Evreleme Sistemi, hastanın evresini cerrahi prosedür ile tanımladı. Evre I; tamamen rezeke edilen lokalize tümörlerdir. Evre II; tümörler küçük, lenf nodu tutulumu olabilir veya olmayabilir ancak tamamen rezeke değildir. Evre III; lezyonlar, hastanın orta hattını geçen ve tamamen rezeke edilemeyen büyük tümörlerdir. Evre IV; 18 aydan daha küçük olan çocuklarda deri, karaciğer ve kemik iliğine metastaz yapar (Louis ve ark, 2014).

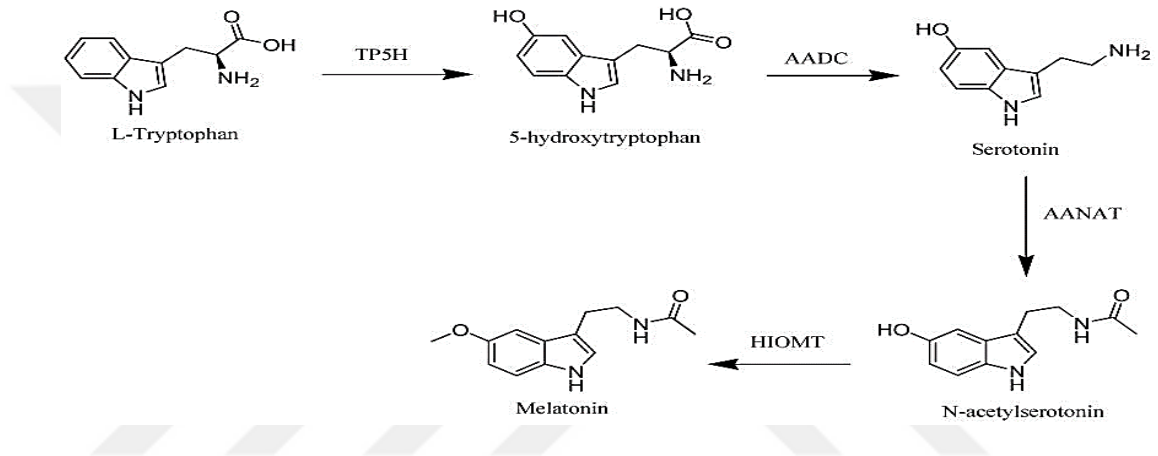
2.2.5. Nöroblastoma ve Tedavisi

Risk sınıflamasına göre nöroblastoma tedavisi değişebilmektedir. Düşük risk kabul edilen hastalar için genellikle cerrahi rezeksiyon veya semptomlara neden olmayan spontan gerilemesi muhtemel tümörler gözlem yapılarak tedavi uygulanabilir. Orta seviye risk kabul edilen hastalar için, 2-8 arası kemoterapi ile tedavi edilebilir. Yüksek risk kabul edilen hastalara göre kemoterapi dozu daha düşüktür. Yüksek risk olan hastalar MYCN amplifikasyonu gerçekleşmiş, 18 yaşından büyük ve IV. Evredeki hastaları kapsar. Bu hastaların ve ailelerin hastanede yatış süresi ve tedavinin uzun sürmesi nedeniyle, terapi yoğunluğunun sürekli olarak artırılmasına odaklanılmıştır. Tedavisi ise, tümör yükünü azaltmak ve cerrahi rezeksiyona uygun hale gelmesi için çok sayıda indüksiyon kemoterapisi (platin ilacı, antrasiklinler ve alkilleyici ajanlar içerir) döngüsü ile başlar. Daha sonra primer cerrahi ile tümör çıkarılır. Bunu kök hücre transplantasyonu ile 1-2 arası miyeloablatif tedavi kürü verilir ve ardından tümör yatağına radyasyon tedavisi ile müdahale edilir (Tolbert ve ark, 2019).

2.3. Melatonin

Melatonin, karanlığa tepki olarak bilinen epifiz bezi tarafından üretilen indolamindir. Ana üretim yeri epifiz bezi olmasına rağmen, gastrointestinal sistem, deri, retina ve kemik iliği gibi çeşitli dokularda da üretilir (Talib, 2018). Melatonin seviyesinin kontrolü, karanlık-ışık döngüsü dışında, yaş cinsiyet, fizyolojik koşullar tarafından

sağlanır. Melatonin, vücudun biyolojik saati olarak bilinen sirkadiyen ritim izleme, immün modülatör, anti-inflamatuar, antioksidan, vazoregülasyon ve onkostatik aktivitelere sahiptir (Chiru ve ark, 2014). İnsanlarda melatonin biyosentezinin başlangıç maddesi, esansiyel bir amino asit olan triptofandır. Triptofan hidroksilaz (TP5H) ve aromatik asit dekarboksilazın (AADC) etkisi ile, enzimler triptofan nörotransmitter serotonine dönüşür. Serotonin ise, arilakilamin N-asetiltransferaz (AANAT) ve hidroksindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimlerinin etkisi ile melatonine dönüşür (Şekil 2.2.) (Alyased ve ark, 2021).



Şekil 2.2. İnsanda melatonin biyosentezi (Alyased ve ark, 2021).

Melatoninin MT1 (MTNR1A tarafından kodlanan) ve MT2 (MTNR2B tarafından kodlanan) olmak üzere G-protein-bağlı reseptör (GPCR) grubuna bağlı iki adet reseptörü vardır. Adenil sikliaz ve siklik AMP'nin inhibisyonunda yer alır ve linoleik asit alınımini inhibe ederek antikanser etkisine aracılık ederler. Reseptörden bağımsız etkileriyle, apoptozu indüklediği, anjiyogenez inhibisyonu, ve sirkadiyen ritim bozulmasının önlenmesi gibi mekanizmaları içerir. Ayrıca terapötik etkileri güçlendirerek, kemoterapinin veya radyasyonun yan etkilerini azaltarak kanser tedavisinde de yardımcı ajan olarak kullanılma potansiyelleri mevcuttur (Li ve ark, 2017).

2.3.1. Karanlık-Işık Döngüsü ve Melatonin Salınımının Düzenlenmesi

Epifiz bezinde, karanlık-ışık döngüsü ile melatonin üretimi sağlanır. Geceleri yüksek oranda melatonin üretimi yapılırken gün boyunca bu üretim seviyesi düşer. Epifiz bezi ile ışık arasındaki iletişim, retinanın, retinohipotalamik yol ile beyindeki sirkadiyen bir

osilatör olan suprakiazmatik çekirdeğe sinyaller göndermesi ile başlar. Günün ışıkların aktif olarak alındığı saatlerde, suprakiazmatik çekirdekdeki nöronlar aşırı aktif olur ve epifiz bezinin fonksiyonunu engelleyici sinyaller gönderir. Geceleri ise bu engelleyici sinyallerin gelmemesi ile epifiz bezi görevini yerine getirerek melatonin üretimini sağlar (Touitou ve ark, 2017).

2.3.2. Melatonin ve Kanseri İlişkisi

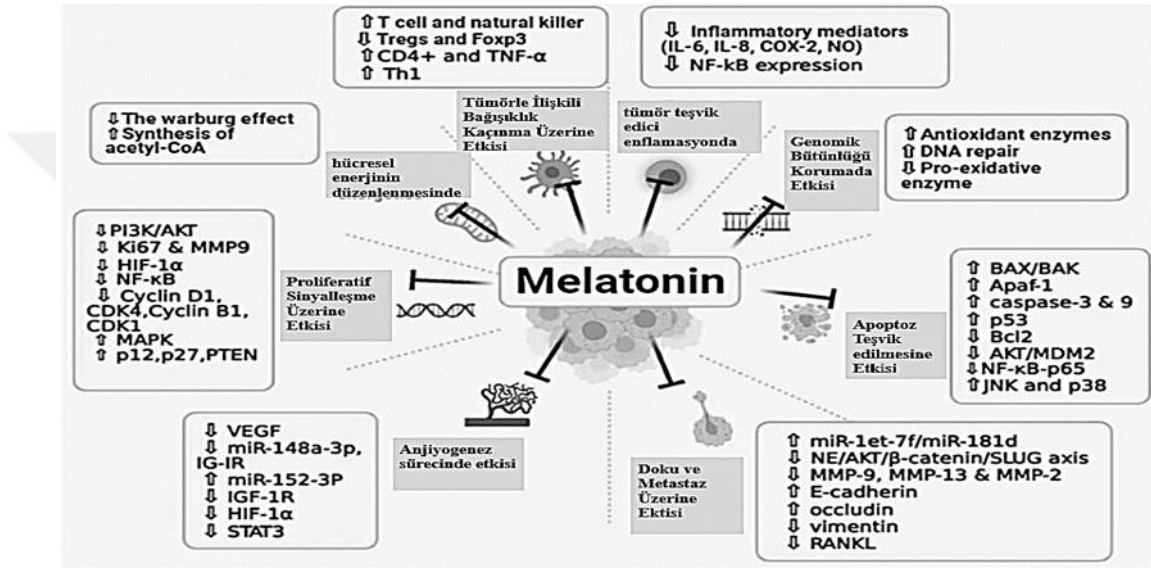
Melatoninin antioksidan etkisi, DNA'yı oksidatif hasardan korur. Bunun için ya doğrudan serbest radikallerin süpürülmesi yoluyla ya da dolaylı olarak metal kaynaklı DNA hasarını inhibe ederek, antioksidan enzimleri uyarır ve DNA onarım sistemini güçlendirir (Galano ve ark, 2018). Yapılan bir çalışmaya göre tümör taşıyan farelere, melatonin ve sisplatin verilerek, melatonin DNA hasarını onarabileceği ve sisplatinin antikanser aktivesi iyileştirdiğini göstermiştir (Huang ve ark, 2021).

Apoptotik kontrol kaybı, kanserin ayırt edici özelliklerindendir. Sınırsız büyüme ve anjiyogenez ve apoptozdan kaçınma gerçekleşir. Melatonin, BAX/BAK, Apaf-1, kaspazlar ve p53 gibi pro-apoptotik mediatörlerin ekspresyonunu artırır (Mortezaee ve ark, 2019). Araştırmalarda, mide kanseri hücrelerine melatonin verilmesi ile p38 ve p-JNK proteinin ekspresyonun artması ve p65'in aşağı regülasyonu yolu ile apoptozun uyarıldığı görülmüştür (Li ve ark, 2017). Başka bir çalışmada ise melatonin, MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Bcl-2'yi inhibe ederek BAD/BAX genlerini yukarı regülasyonu etkisi gösterir (Gonzalez ve ark, 2018).

Tümörlerin, hücre proliferasyonu ve metastatik yayılımın kurulması için yeni kan damarların oluşumu (anjiyogenez) gerekmektedir. Anjiyogenezin, vasküler endotelial faktör (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktör (PDGF), epidermal büyüme faktör (EGF), hepatosit büyüme faktör (HGF) kontrol eder. Melatoninin yapılan bir çalışmada SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde VEGF ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Menendez ve ark, 2017). Melatoninin osteosarkomda miR-424-5p/VEGF sinyal yoluyla tümör anjiyogenezi engellediği gösterilmiştir (Vimalraj ve ark, 2020).

Kanser hücreleri, protein ekspresyonunun ve sinyal yollarının modülasyonu ile aşırı çoğalma yeteneği kazanır. Melatoninin ise bu aktiviteleri kısıtlamada aktif bir şekilde

etkileri mevcuttur (Şekil 2.3). Melatonin ve 5-florourasil ile kombine edilmesi ile PI3K/AKT sinyal yollarının aşağı regülasyonu ile anti proliferasyon ve anti göç ve pro-apoptotik etkiler gösterir (Gao ve ark, 2016). PI3K ve MAPK sinyal yollarının hem reseptöre bağımlı hem de bağımsız şekilde değiştirilmesi yoluyla hücre göçünü engeller ve kanser kök hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. Melatonin aynı zamanda, siklin D1, CDK4, Siklin B1 ve CDK1 ekspresyonunu azaltarak osteosarkom hücrelerinde (MG-63 hücreleri) hücre proliferasyonunu baskılar (Li ve ark, 2017).



Şekil 2.3. Kanser belirtilerini kısıtlamada melatonin etkisi (Alyased ve ark, 2021).

Çok sayıda klinik araştırmayı içeren Tablo 2.1.'de, mide kanseri, meme kanseri, prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde melatoninin onkostatik rolü gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Kanser modellerinde melatoninin onkostatik etkisi (Alyased ve ark, 2021).

Kanser Türü	Çalışma Modeli	Melatonin Dozu	Melatonin Ana Etkileri ve Sonuçları
Mide Kanseri	AGS ve MGC803 insan mide hücre hattı	3mm melatonin	Apoptoz ile ilgili proteinleri yukarı doğru indüklemiştir. Kaspaz -3, -9 ve yukarı akış düzenleyicileri MDM2 ve Akt'nin fosforilasyonunu ve ekspresyonunu aşağı doğru düzenlemiştir.
Glioblastom	U251 ve U87 glioblastoma hücreleri	1nM ve 1 mM melatonin	HIF-1a proteininin ekspresyonunu blok eder ve hipoksi altında VEGF ve MMP-2 (matris metallaproteinaz 2) ekspresyonunu inhibe etmiştir.
Prostat Kanseri	Pc-3 hücre hattı	1mm melatonin	Hipoksi altında anjiyogenez ile ilgili genlerin mRNA ekspresyonunu azaltmıştır.
Akciğer Kanseri	CL1-0, CL1-5 ve A549 hücre hatları	0.1, 0.3. ve 1mM melatonin	Akciğer kanseri hücrelerinde CD133 ekspresyonunu azaltmıştır.
Karaciğer Kanseri	HepG2 hepatokarsinom hücre hattı	10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} ve 10^{-3} mol/L melatonin	Siklooksijenaz-2(COX-2) ekspresyonunu aktive edici transkripsiyon faktörü inhibisyonunu blok edilmesi ve Bcl-2/BAX oranının azaltılması yoluyla ER stresi altında HepG2'de apoptoz artmıştır.

2.4. Kök Hücre ve Tarihçesi

Alman bir bilim adamı olan Rudolf Virchow'un 1800'lü yıllarda tüm hücrelerin önceden var olan hücrelerden geldiğine dair bilimsel hücre teorisi vardır (Lois ve Magner, 2002). 1868'li yıllara gelindiği zaman Ernst Haeckel tarafından Almanca bir kelime olan stammzelle (kök hücre) terimini kullanan ve filogenetik temelli evrim ağacı yazarıdır (Dröscher, 2014). Bilinen ilk kök hücre terimini kullanan popüler kök hücre yaklaşımının temeli Ernst Haeckel 'a dayanmaktadır. Rus histoloji ve embriyoloji alanında araştırmalar yapan Alexander Maximov, hematopoez teorisi üzerine çalışmalarıyla tanınır: tüm kan hücrelerinin ortak bir öncü hücreden geliştiğini

söyleyerek multipotent kök hücre kaynaklı hematopoetik kök hücrelere değinmiştir (Konstantinov, 2000). 1960 yıllarda ilk kemik iliği nakli gerçekleştirilmiştir.

Ülkemizde Türk tıp topluluğu adına önemli katkılarda bulunanlardan biri olan Süreyya Tahsin Aygün 1970’li yıllarda kök hücre üzerine çalışmalar yapan ilk bilim adamıdır. Hücre kültürü üzerine araştırmalar yapan Aygün, kardiyak kök hücrelerin yenilenme ve yayılma yetenekleri üzerine çalışmalar yapıp yayınlamıştır (Çınar ve Vatanoğlu, 2018). Hücre biyolojisi ve tıp alanında kök hücrelerle ilgili araştırmalar bunlarla sınırlı kalmamış önemli gelişmeler 2000’li yılların gelmesiyle hızla yaşanmıştır (Tablo 2.2).

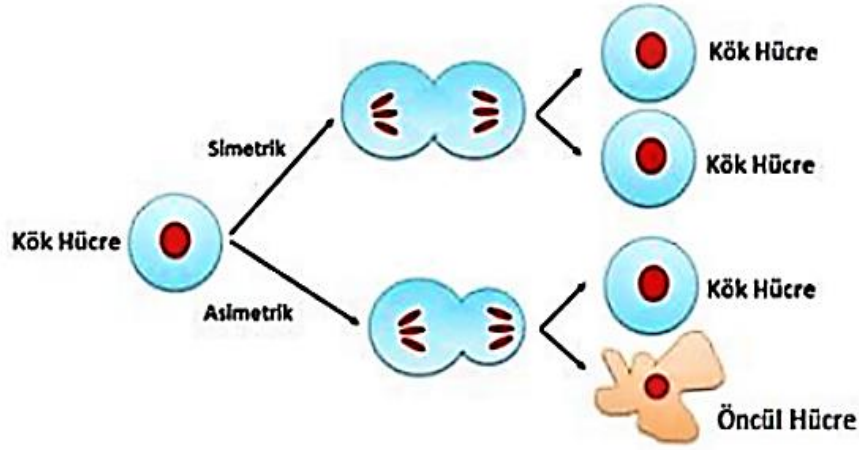


Tablo 2.2. Hücre biyolojisi ve tıp alanında kök hücrelerle ilgili araştırmaların kronolojisi (Elçin, 2015).

YIL	GELİŞMELER
1981	Fare embriyonik kök hücrelerin blastokistin iç hücre kütesinden ayrıştırılması
1987	Embriyonik kök hücre temelli gen hedefleme teknolojisinin geliştirilmesi
1988	İlk göbek kordonu kan nakli
1989	Hematopoetik kök hücrelerin FACS yöntemiyle ayrıştırılması
1996	Somatik hücre çekirdek nakliyle ilk klon memeli olan, koyun Dolly'nin doğumu
1998	İnsan embriyonik kök hücrelerinin ilk defa ayrıştırılması
2001	İnsan embriyonik kök hücre çalışmalarının yasaklanması
2002	Primordiyal eşey hücrelerinden pluripotent kök hücrelerin üretilmesi
2004	California Proposition 71 fonunun kök hücre araştırılmasına aktarılması
2005	Türkiye'de insan embriyonik kök hücre çalışmalarının askıya alınması
2006	Kemik iliği elde edilen kök hücrelerin ayrıştırılması
2006	Fare uyarılmış pluripotent kök hücrelerin elde edilmesi
2006	Tek blastomerden embriyonik kök hücrelerin üretilmesi
2007	İnsan uyarılmış pluripotent kök hücrelerin elde edilmesi
2007	Martin Evans- Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülü (Embriyonik Kök Hücreler)
2009	İnsan embriyonik kök hücre çalışmalarının Amerika'da serbestleştirilmesi
2010	İnsan embriyonik kök hücrelerin omurilik hasarına yönelik kullanılması (Geron)
2012	Shinya Yamanaka-Nobel Fizyoloji- Tıp ödülü (Uyarılmış Pluripotent KH)
2014	Terapötik klonlama ile insulin üreten beta hücrelerinin üretilmesi
2014	Uyarılmış pluripotent KH insan klinik çalışmaların başlaması

2.4.1.Kök Hücre ve Özellikleri

Kök hücreler (KH) vücudumuzda bulunan henüz özelleşmemiş hücrelerdir. Bir organizmanın herhangi bir hücresine özelleşebilir ve kendisini yenileme yeteneğine sahiptir. KH insan vücudunda yer alan bütün olgunlaşmamış hücrelerin oluşumuna katkı sağlar ve her hücre, her doku ve her organın temelini oluştururlar (Zakrzewski ve ark, 2019). Kök hücreler hem yenilenmeyi ve hem de farklı bir hücreye özelleşmeyi garanti ederler. Bunun yolu asimetrik bölünme özelliğinden geçer. Bunun dışında hücre klonlanması yani özdeş hücrelere bölünmesiyle simetrik özellikte gösterirler (Şekil 2.4) (Charitos ve ark, 2021).



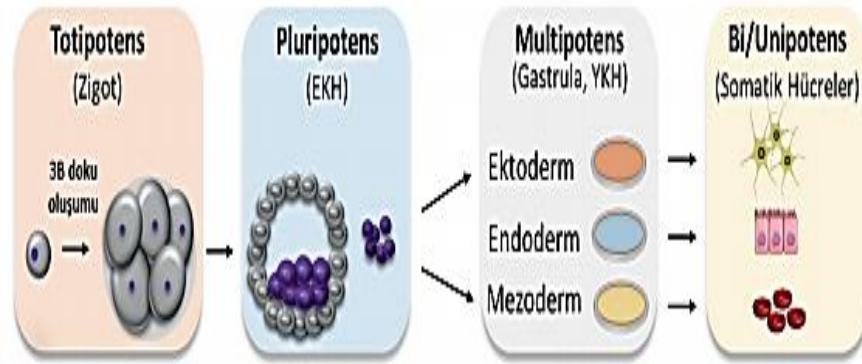
Şekil 2.4. Kök Hücrelerde asimetrik ve simetrik bölünme (Charitos ve ark, 2021)

Kök hücreler vücudumuzda bulunan 200 kadar hücreyi meydana getirirler. Dokuların, hücrelerin ve organların temel yapısını oluştururlar. Heterojenlik ve plastisite kök hücrelerin ayırt edici özellikleridir. Asimetrik ve simetrik bölünme özelliği gösterirler. Hasarlı dokuların onarımını sağlarlar (Wang, 2019). Kök hücrelerin uzun süre boyunca kendilerini yenileme ve bölünme özelliği vardır. Kök hücreler dışında yer alan hücrelerin doğumdan sonra telomeraz aktivitesi azalır. Bunun sonucunda hücre yaşlanmasına yol açar. 2007 yılında Hiyama'nın yapmış olduğu çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerde telomeraz aktivitesinin düşük olduğunu bildirmiştir (Fatih ve ark, 2019). Kök hücreler diğer hücrelere göre daha fazla strese karşı dayanıklıdır.

Kök hücrelerin çözülmemiş oksidatif stres altında kalması daha kolay yaşlanmasına neden olacağı kabul edilmiştir (Chen, 2017).

2.4.2. Kök Hücre ve Sınıflandırılması

Kök hücreler farklılaşabilme ve elde edildikleri dokuya göre iki farklı sınıflandırma yapılabilir. Kök hücreler farklılaşabilme kapasitelerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent kök hücreler olacak şekilde 5 sınıfta toplanır (Şekil 2.5). Elde edildikleri dokuya göre iki ana tipi mevcuttur. Bunlar embriyonik ve yetişkin kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler (EKH), endoderm, mezoderm ve ektoderm germ tabakalarına türeyebilen zigot ve blastositten gelişen totipotent kök hücrelerdir. Yetişkin kök hücreler dokularda bulunan, kendini yenileme özelliğine sahip multipotent hücrelerdir.

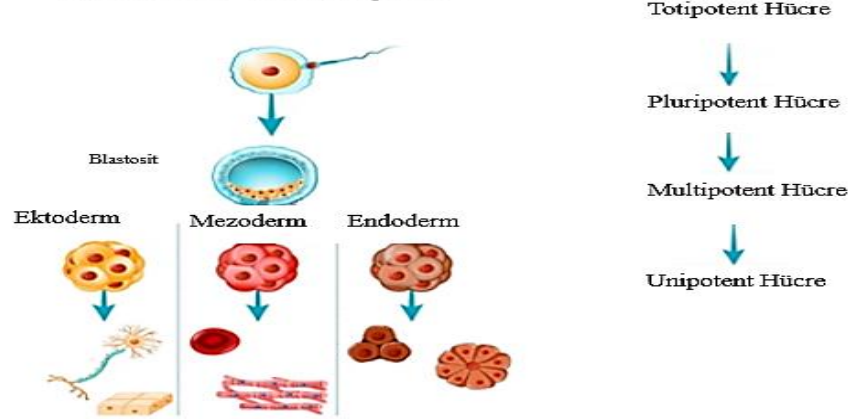


Şekil 2.5. Kök hücre farklılaşmaları açısından aralarındaki sıra düzeni (Elçin, 2015).

2.4.2.1. Kök Hücrelerin Farklılaşabilme Kapasitelerine Göre Sınıflandırılması

Kök hücreler, döllenmeden yetişkinliğe kadar tüm doku ve organların temelini oluşturacak şekilde kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Farklılaşma kapasitelerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent kök hücreler olacak şekilde 5 sınıfta toplanır (Şekil 2.6).

Hücre Potansiyeli



Şekil 2.6. Totipotentten pluripotent, multipotent ve unipotent hücreye farklılaşma (Wu ve ark, 2017)

2.4.2.1.1. Totipotent Kök Hücre

Çok hücreli organizmaların tipik olarak totipotent hücre olan zigottan kaynaklanır. Zigot, embriyogenez sürecini başlatır ve ekstra embriyonal keseler ve plasenta dahil olmak üzere tüm somatik hücrelere farklılaşır. Organize bir şekilde 200’den fazla farklı doku tipini oluşturan hücrelerle bir organizmayı oluşturabilir. 1902 yılında Alman bir bitki fizyoloğu Göttlieb Haberlandt’ın yapmış olduğu bir konuşmada terminal olarak farklılaşmamış hücrelerin bitkileri yeniden üretme potansiyeli adı altında gerçekleşen konuşmasında ‘hücrel totipotent’ kavramını ilk kez kullanmıştır (Wu ve ark, 2017).

2.4.2.1.2.Pluripotent Kök Hücre

Pluripotent kök hücreler, bir hücrenin gelişim boyunca ve yetişkinlikte mevcut olan doku tiplerine farklılaşabilme yeteneğini tanımlar. İnsan pluripotent kök hücreleri blastokistin oluşumundan yaklaşık 4 gün sonra oluşan iç hücre kitlesi denilen ve daha sonra embriyoya dönüşen özel hücre gruplarından elde edilir ya da OCT4, SOX2, KLF4 VE c-MYC veya benzer transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu yoluyla somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla elde edilir (Goodvin ve ark, 2020). 4 özel genin (OCT4, SOX2, KLF4 VE c-MYC) farklılaşmış hücrelere aktarılmasıyla embriyonik benzeri bir duruma yeniden programlamıştır (Yamanaka ve Takahashi, 2006). Teoriye göre; göbek kordonu kanı, kemik iliği hücreleri, periferik kan hücreleri, fibroblastlar, keratinositler ve hatta idrardaki hücreler olmak üzere insan vücudundaki hemen hemen

bütün olgun hücre tipleri indüklenmiş pluripotent kök hücrelere programlanabilirler (Liu ve ark, 2019). Pluripotent kök hücreler kanser hücreleriyle birtakım benzerlikler gösterir. Her ikisi de temel sınırsız çoğalma kapasitesine sahip, DNA onarım kontrol noktalarına atlama yeteneği ve onkojenik belirteçleri ifade etme yeteneğine sahiptir. Örneğin, c-MYC transkripsiyon faktörü hem kanserli hücrelerde hem de insan embriyonik kök hücrelerde yüksek oranda taşınır. Sınırsız kendini yenileme ve vücudun hemen hemen tüm hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri onları hücre replasman tedavileri için çekici bir aday yapar ve rejeneratif tıp için umut vericidir. Bununla birlikte in vivo farklılaşmamış insan pluripotent kök hücrelerin transplante edildiğinde teratom oluşturur ve tümör oluşumu riski klinik uygulamasını kısıtlamaktadır (Ford ve ark, 2020).

2.4.2.1.3. Multipotent Kök Hücre

Belirli doku veya organda bölünerek, birden fazla spesifik hücre tipine dönüşerek kendini yenileme yeteneğine sahip bir kök hücre grubudur. Multipotent kök hücreler, gelişim, doku iyileşmesi ve savunma prosedüründe önemli katkıları bulunmaktadır. Terapötik etkilerini bir dizi hücresel ve moleküler yolların aktivasyonu veya inhibisyonu sonucu sergiledikleri gösterilmiştir (Mirzaei ve ark, 2017). Nöral ve kardiyak bozuklukların tedavisinde, tıp biliminin geleceğinde önemli bir yer tutacaktır. Yapılan çalışmalarda kan damarı duvarından yeni bir yetişkin kök hücre türü, multipotent vasküler kök hücreler (MVKH) tespit edilmiştir. MVKH 'lerin kendini yenileme yetenekleri vardır. SOX10, SOX17 gibi nöral krest kök hücrelerini ifade ederek farklılaşabilirler. İn vivo araştırmalarda, vasküler yaralanmalarda, proliferatif hale gelebildiği ve düz kas hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir (Huang ve ark, 2019).

Multipotent kök hücreler, pluripotent hücre uygulamalarında olduğu gibi immünolojik sorunlar, hasta bağışıklık sisteminin 'yabancı' bir dokuyu reddetme olasılığı gibi başlıca sorunları yoktur. Bu kök hücrelerin ekstra avantajı hücresel tedavilerde fetal bir dokudan veya embriyodan elde edilme gereksinimi olmadığından etik problemler ve anlaşmazlıklardan uzaktır (Sobhani ve ark, 2017).

2.4.2.1.4.Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent kök hücreler, kendi kendini yenileyebilme ve dokularda 2 veya daha fazla hücrelere dönüşebilme özelliğine sahiptirler. Oligopotent kök hücrelerden hematopoetik kaynaklı olan miyeloid hücreler, monositler, nötrofiller ve dentritik hücrelere farklılaşır ancak lenfositlere farklılaşamazlar (Yanez ve Georgridge, 2018).

2.4.2.1.5. Unipotent Kök Hücreler

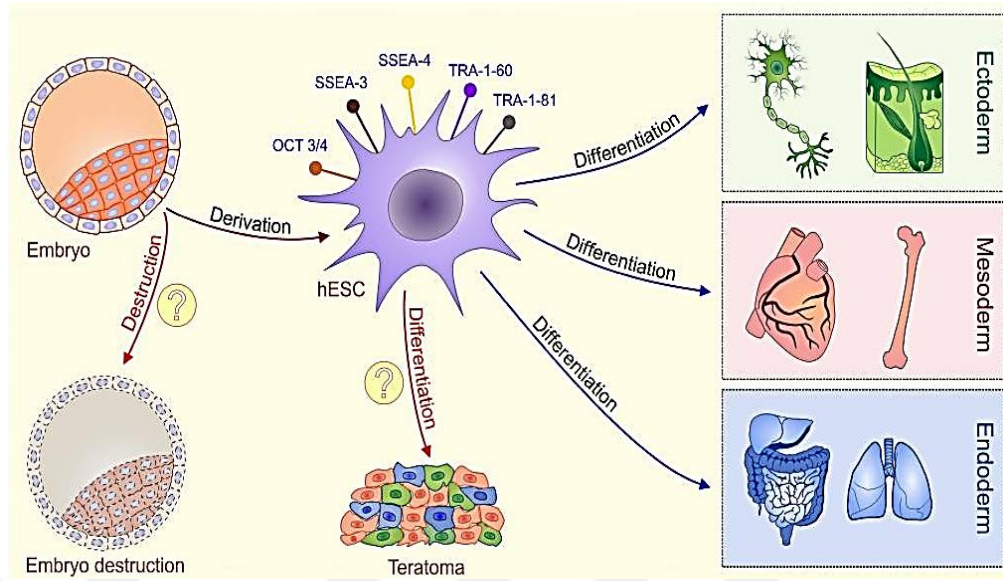
Unipotent kök hücreler, kendini yenileme ve sadece belirli bir hücreye farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Unipotent kök hücre grubuna ait olan kas kök hücreleri, olgun iskelet kası liflerinin bazal laminasının altında yer alan tek çekirdekli hücrelerdir. Kas kök hücreleri hareketsiz ve farklılaşmamış halde tutulur. Ancak miyofibriller hasar gördüğünde ve dejenerasyon meydana geldiği zaman, kas kök hücreleri aktif hale gelerek hücre döngüsüne katılırlar (Fukada ve Akimoto, 2020).

2.4.2.2. Elde Edildikleri Dokuya Göre Kök Hücreler

Kök hücreler elde edildikleri dokuya göre 2 kategoride incelenebilirler. Bunlar: embriyonik ve yetişkin kök hücrelerdir.

2.4.2.2.1.Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler döllenmeden 4 – 5 gün sonra oluşan blastosistin iç hücre kitlesinden in vitro ortamda büyütülerek elde edilmiştir. (Rippon ve Piskopos, 2004). Embriyonik kök hücreler kendini yenileme ve 3 germ tabakasının her birine farklılaşma kapasitesi göstererek giderek daha özel hücrelere dönüşürler (Harvey ve Caretti, 2019). Esnek ve sınırsız kendini yenilme kapasiteleri nedeniyle, embriyonik kök hücreler, yaralanma ve hastalıkların tedavisinde, doku replasmanı için önemli konumdadır. Embriyonik kök hücrelerin önündeki en büyük engel, bağışıklık reddi ve tümör oluşturma riskidir (Şekil 2.7) (Zhang ve Xu, 2019).



Şekil 2.7. Embriyonik kök hücrelerin özellikleri (Volarevic ve Markovic, 2018).

Embriyonik kök hücrelerin in vivo ortamda geliştikten sonra embriyonik hayatın sonlandırılması pek çok tartışmayı beraberinde getirmektedir (Volarevic ve Markovi, 2018). Ancak indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (İPKH) keşfiyle birlikte, İPKH'lerin, ilaç keşfi ve toksikoloji ile ilgili çalışmaları embriyonik kök hücrelerden daha çekici hale getirmiştir (Ilic ve ark, 2017). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, karyotip, fenotip, telomeraz aktivitesi ve farklılaşma kapasitesi açısından embriyonik kök hücrelere benzerdir. Bununla birlikte embriyoların yok edilmesi gerekmediği için, İPKH'ler ahlaki açıdan daha üstün kabul edilmektedir (Volarevic ve Markovi, 2018).

2.4.2.2. Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler, vücudumuzun bütün doku ve organlarında bulunan nadir, farklılaşmamış, hareketsiz ve bölünmemiş bir halde bulunurlar. Dokularda doğal olarak ölmekte olan hücrelerin yerlerini almak ve yaralanmalarda yaralı hücrelerin yerlerini onarmak için çoğalarak farklılaşabilirler. Yetişkin kök hücreler tedavileri dikkat çekici bir konumda olsalar da, çoğaltıcı yapıları onları tehlikeli hale getirmektedir. Bu düzensizlikler kansere yol açabilirler. Bu yetişkin kök hücreler için güvenlik endişeleri doğururken, kanser tedavileri yaklaşımlarını da yol açar. Kanserojenез sırasında kök hücrelerde ters giden moleküler mekanizmaları anlamak kanser terapötiklerine yol açabilirler (Cable ve Fuchs, 2020).

Yetişkin kök hücreler kemik iliği, plasenta, göbek kordonu başta olmak üzere, deri, bağırsak epiteli gibi dokulardan da elde edilir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Yetişkin kök hücre kaynakları

Plasenta	YETİŞKİN KÖK HÜCRELER
Göbek kordonu	
Diş pulpası	
Kemik iliği	
Bağırsak epiteli	
Deri	

2.4.2.2.2.1. Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) Multipotent stromal veya mezenkimal stromal hücreler olarak da adlandırılırlar. Mezodermden kaynaklanan MKH'ler, osteoblastlar, kondrositler ve adipositler gibi mezenkimal doku soylarına farklılaşma kapasitesine sahiptir (Spees ve lee, 2016). MKH'ler, kemik iliği olmak üzere adipoz doku, sinovyal sıvılar, periferik kan, akciğer, uzun kemik iliği boşluklarında dahil olmak üzere hemen hemen tüm dokularda bulunur ve kolayca elde edilir (Han ve Li, 2019). Son yapılan çalışmalar MKH'lerin, perisitlere benzediğini ve kan damarlarını çevreleyen periferik stromal bölgeden de elde edildiğini gösterir. MKH'ler, hücre tedavisi ve dokuların onarımında en çok kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılır. Yaralanma sinyallerine yanıt olarak, kemik iliği kaynaklı MKH'ler, nişlerinden periferik dolaşıma geçebilir ve hedef dokulara ulaşmak için damar duvarlarından rahat geçebilirler (Fu ve liu, 2019). MKH'ler, kemik iliği aspirasyonundan sonra elde edilir. Daha sonra in vitro plastik yapışma için eleme yoluyla izole edilirler. Kolayca koloni oluştururlar ve farklılaşma yeteneğine sahiptirler. MKH'leri tanımlayan özellikler, koloni oluşturma kapasitesi, kendi kendini yenileme potansiyeli, yüzey belirteçlerinin ifadesine ve farklılaşma kapasitesine dayanır. MKH 'lerin, in vitro ortamda plastik yapışık klonojenik hücreler kemik iliğinden elde edilir ve ilk büyümelerinde koloni oluştururlar. Koloni oluşturma potansiyeli genellikle 50-75 cm $0.5 \cdot 10^6$ - $3 \cdot 10^6$ yoğunluklarda kemik

iliği hücrelerinin tohumlanmasıyla yapılır. Bu koloniler MKH 'lerin tanımlamak ve karakterize etmek için rutin olarak kullanılan ve kabul edilen standart değerlerdir. MKH'ler yüzeylerinde CD105, CD73, CD90, CD146, CD29 eksprese ederler (Tablo 2.4) (Samsonraj ve ark, 2017).

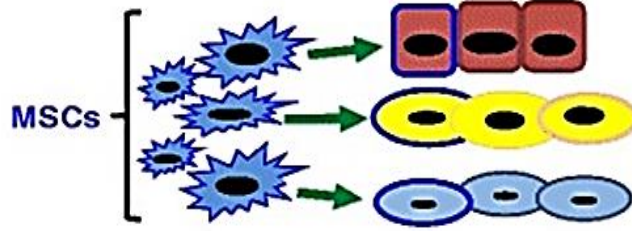
Tablo 2.4. MKH'lerin yüzey antijen ekspresyonu

CD	PROTEİN AÇIKLAMASI	MKH ÖZGÜLLÜĞÜ
CD14	Myeloid hücreye özgü lösin bakımından zengin glikoprotein	⊖
CD19	B-lenfosit yüzey antijeni	⊖
CD13	Aminopeptidaz N	⊖
CD29	İntegrin β1 zinciri	+
CD34	Hematopoetik Progenitör hücre antijeni	⊖
CD45	Lenfosit ortak antijeni	⊖
CD73	Ekto-5'-nükleotidaz	+
CD90	THY-1	+
CD105	Endoglin, TGFβ R III	+
CD146	Melenom hücre yapışma molekülü	+

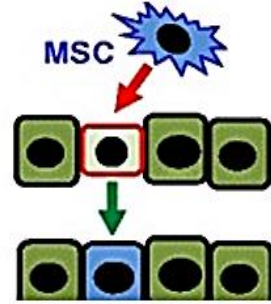
Mezenkimal kök hücreler çeşitli mekanizmalarla yaralı hücreleri ve dokuları kurtarma ve onarma görevleri vardır. Mezenkimal kök hücrelerin etki mekanizması (Şekil 2.8):

- Yedek hücre tiplerine farklılaşma,
- Hücre füzyonu yoluyla hasarlı veya ölmekte olan hücrelerin kurtarılması,
- Büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar gibi parakrin faktörlerin salgılanması,
- Organellerin veya moleküllerin tünelleme nanotüpleri yoluyla transferi,
- Proteinler, RNA, hormonlar ve kimyasalların eksozomlar veya mikrovezikülerle transferi (Spees ve lee, 2016).

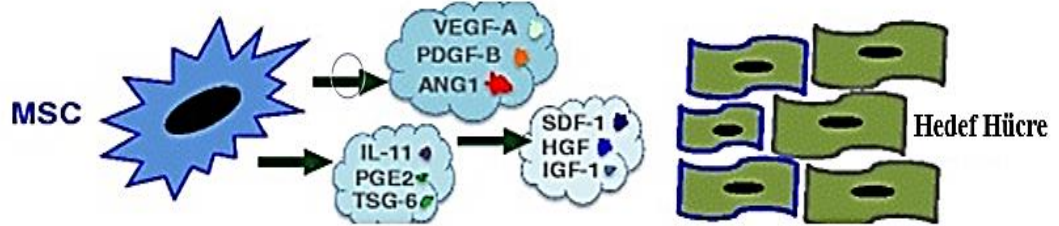
a. Yedek hücre tiplerine farklılaşma



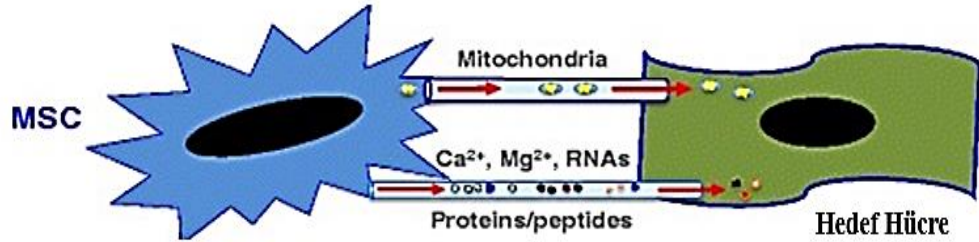
b. Hücre füzyonu yolu



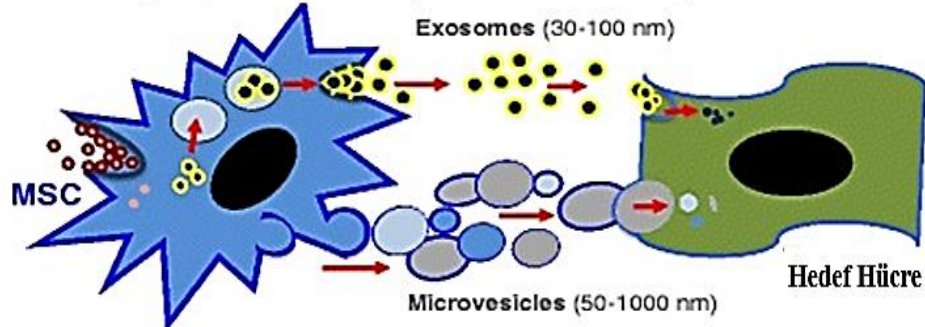
c. Büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar gibi parakrin faktörlerin salgılanması



d. Organellerin veya moleküllerin tünelleme nanotüpleri yoluyla transferi



e. Proteinler, RNA, hormonlar ve kimyasalların eksozomlar veya mikroveziküllerle transferi



Şekil 2.8. MKH 'lerin etki mekanizması (Spees ve lee, 2016)

2.4.2.2.1.2.Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

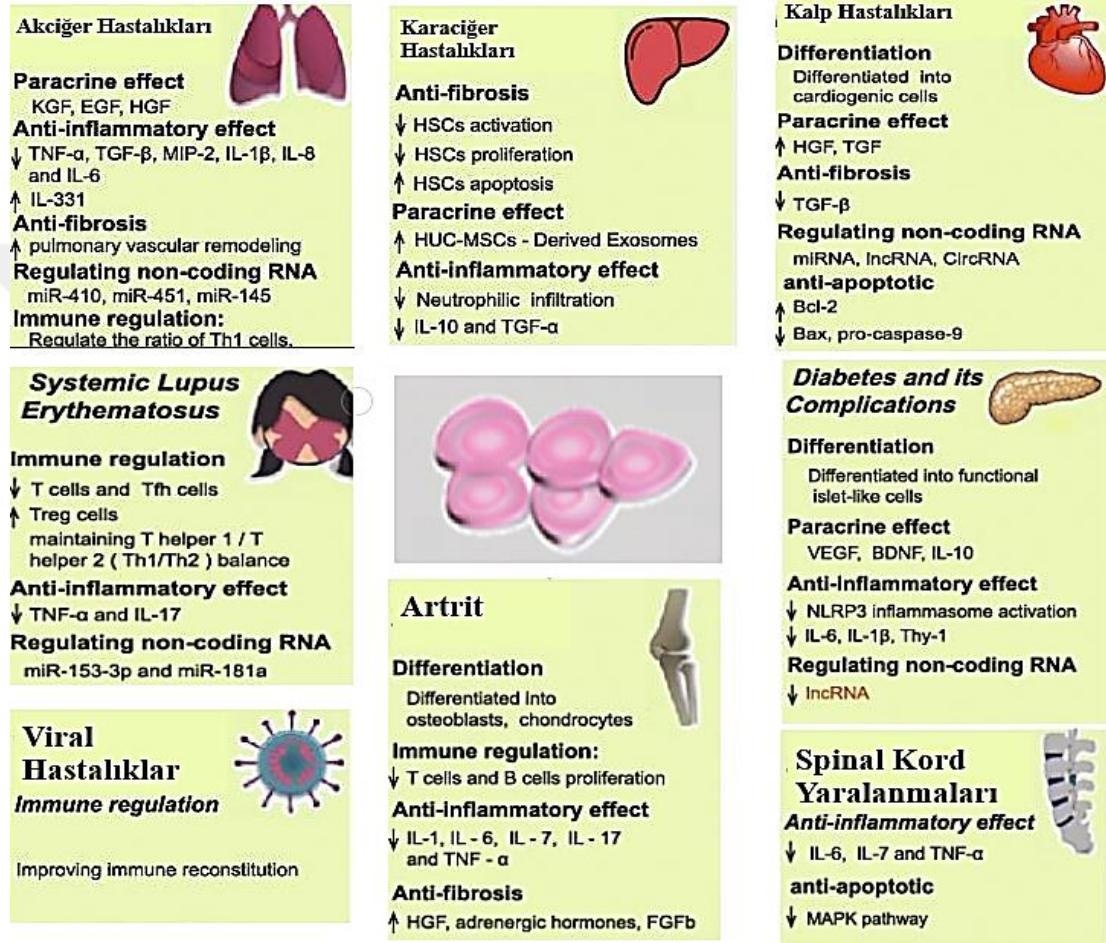
Umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücreler (UK-MKH), kendini yenileyebilen ve multipotent kök hücrelerdir. Düşük immünojeniteye sahiptirler. Belirli koşullar altında sürekli çoğalabilirler ve insan dokularını ve organlarını oluşturan bir ve birden fazla hücre tipine farklılaşabilme yeteneklerini bünyelerinde barındırırlar. Bağışıklık

tepkilerini etkilerler. İnvaziv işlem gerektirmeden kolayca elde edilebilir, ayrılabilir, kültürlenebilir, genişletilebilir ve saflaştırılabilirler. UK-MKH'lerin yüzey antijenleri belirgin değildir, nakledilen hücrelerin reddi önemsiz ve eşleştirme gereksinimleri katı değildir, bu da allogreftlerde kullanımlarını kolaylaştırır (Xie ve Liu, 2020). Son zamanlarda UK-MKH 'lerin çeşitli bölmeleri arasında Wharton's Jölesinin en iyi mezenkimal kök hücre olduğu kanıtlanmıştır. Göbek kordonun plasentaya doğru olan kısım, kordonun orta kısmı ve fetüse bağlı kısmından ayrı ayrı olarak elde edilen Wharton's Jölesinin, mezenkimal kök hücrelerin hepatosit benzeri hücre farklılaşmasına yönelik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Bharti ve shivakumar, 2018).

Terapötik uygulamaları için UK-MKH'lerin etkileri;

1. **Farklılaşma:** UK-MKH'ler tarafından farklılaşmış hücrelerin üretilmesi doku rejenerasyonunu destekler ve doku fonksiyonunu iyileştirir.
2. **Bağışıklık düzenlenmesi:** T hücreleri, B hücreleri ve gibi bağışıklık hücrelerinin çoğalmasını engeller. Makrofajların proinflamatuvar fenotiplerden anti-inflamatuvar fenotiplere farklılaşmasını indükler ve interlökin-10 (IL-10) ve interlökin-4 (IL-4) salgılayarak iltihabı azaltır.
3. **Parakrin etkiler:** Keratinosit büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve diğer sitokinler gibi çözünür molekülleri salgılayarak doku yenilenmesini destekler.
4. **Anti-inflamatuvar etki:** İnterlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) ve interlökin-8'in (IL-8) baskılayarak inflamasyonu azaltır ve oksidatif stres altında kalmayı engeller, apoptozunu baskılar.
5. **Anti-fibrotik aktivite:** Fibröz ile ilgili hücre apoptozunu ve diğer moleküllerin salgılanmasını uyarır. Anti-fibrotik fonksiyona ayrıca ilgili sinyal yollarını düzenler.
6. **Kodlanmayan RNA düzenlenmesi:** mikroRNA (miRNA), uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) ve dairesel RNA'nın (circRNA) ekspresyonunu etkileyebilir, hedef genleri dolaylı olarak düzenler ve terapötik etkiler elde edebilirler.

Son yıllarda UK-MKH 'lerin klinik uygulaması ve etki mekanizmaları; diyabet ve komplikasyonları, karaciğer hastalıkları, sistemik lupus eritematozus (SLE), artrit, beyin hasarı ve serebrovasküler hastalık, kalp hastalıkları, omurilik yaralanması, solunum hastalıkları, viral enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 2.9) (Xie ve Liu, 2020).



Şekil 2.9. Umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulaması ve etki mekanizmaları (Xie ve Liu, 2020).

Kemik iliği ve göbek kordonu terapötikler için mezenkimal kök hücrelerin ana kaynaklarıdır (Han ve Wang, 2013). UK-MKH'ler kemik iliği kaynaklı kök hücrelere benzer morfojik, fenotipik ve çok soylu farklılaşma potansiyellerine sahiptir. İn vitro olarak fonksiyonel hepatosit benzeri hücrelere farklılaşabilirler ve immünojeniteleri düşük kalırlar (Li ve Xu, 2018).

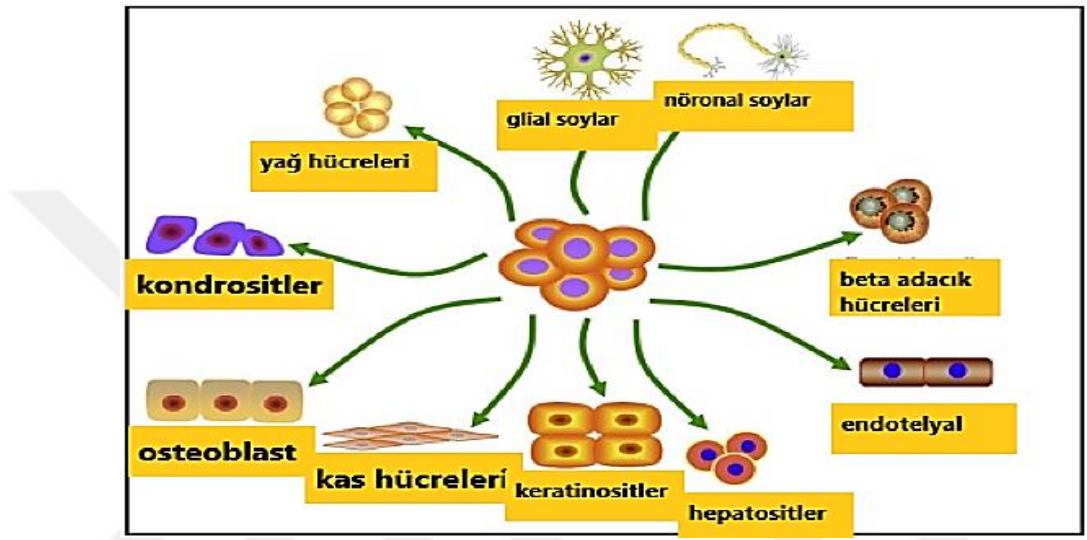
2.4.2.2.2. Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre

Yağ dokusu genellikle iki tipe ayrılır, beyaz yağ dokusu (WAT) ve kahverengi yağ dokusu (BAT). WAT, trigliseritleri depolamak ve harekete geçirmek için hareket eder ve derinin altında, vücut organlarını çevreleyen vücut boşluklarında bulunur. BAT, ısı üretimi için yağ asitlerini ve glikozu yakma işlevine sahiptirler ve yeni doğanlarda perivasküler, peri-organ visseral alanlarında bulunurken, yetişkinlerde, servikal, supraklaviküler, mediastinal ve böbrek üstü bölgelerde depo olarak bulunurlar (Constantin ve Flippi, 2020).

Yağ dokusu, uzun yıllar besinler için, inert bir depo olarak görüldü. Ancak şimdi birçok yapılan çalışmalarda yağ dokusunun metabolizma, bağışıklık ve endokrin fonksiyonunun düzenlenmesi, yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin tanımlanmasını içeren çeşitli fizyolojik rolleri bulunmaktadır. Adipoz doku kaynaklı kök hücreler (AD-KH), kendini yenileme ve pasif bir enerji deposundan elde edilerek çok potansiyelli farklılaşma özelliklerine sahip umut verici bir kök hücre kaynağıdır (Klar ve Zimoch, 2017). Osteoblastlar, kondrositler, adipositler ve iskelet miyositleri dahil olmak üzere, mezenkimal soylara farklılaşma konusunda dikkate değer yetenekleri mevcuttur. AD-KH'ler mezodermal orjinli olsalar da, ektodermal, endodermal ve mezodermal orjinli hücelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Şekil 2.10) (Si ve Wang, 2019). AD-KH'ler çeşitli sitokinlerin, anjiyogenez ve yara iyileşmesinde, saç foliküllerini uyardığı ve saç büyümesini indüklediği bilinmektedir (Fukuoka ve Narita, 2017). Ayrıca, multipl skleroz, diabetes mellitus, Chron's, SLE dahil olmak üzere birçok hastalığın patolojisinde çok önemli rol oynayan anti-inflamatuvar sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgılayarak bağışıklık sistemini düzenleme yeteneklerinden dolayı klinikte kullanıma elverişlidir (Al-ghadban ve ark, 2020).

Kemik iliği kaynaklı kök hücreler rejeneratif tıpta altın bir standart halindedir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde halen birinci sırada yer alırken, ağırlı izolasyon süreci, genel anestezi ihtiyacı ve düşük hücre verimleri gibi dezavantajları vardır. AD-KH ile karşılaştırıldıklarında, AD-KH'ler tek bir liposuction sırasında, genel anestezi gerektirmeden, büyük miktarda elde edilebilirler. AD-KH'leri CD73, CD90, CD105 ve CD36, yüzey antijenleri bulunur.

AD-KH 'lerin kalça, uyluk bölgesi deri altına oranla, abdominal subkutan bölgelerde elde edilen kök hücrelerde daha fazla verimlilik gözlenmişti. Kök hücrelerin elde edildikleri yerin dışında, yaş, vücut kitle indeksi ve cinsiyet gibi faktörlerle kök hücre konsantrasyonları arasında değerlendirildiklerinde, vücut kitle indeksi ile negatif bir korelasyon tanımlamışlar ancak yaş ile ilişkili bir durum bulamamışlardır. (Klar ve Zimoch, 2017).

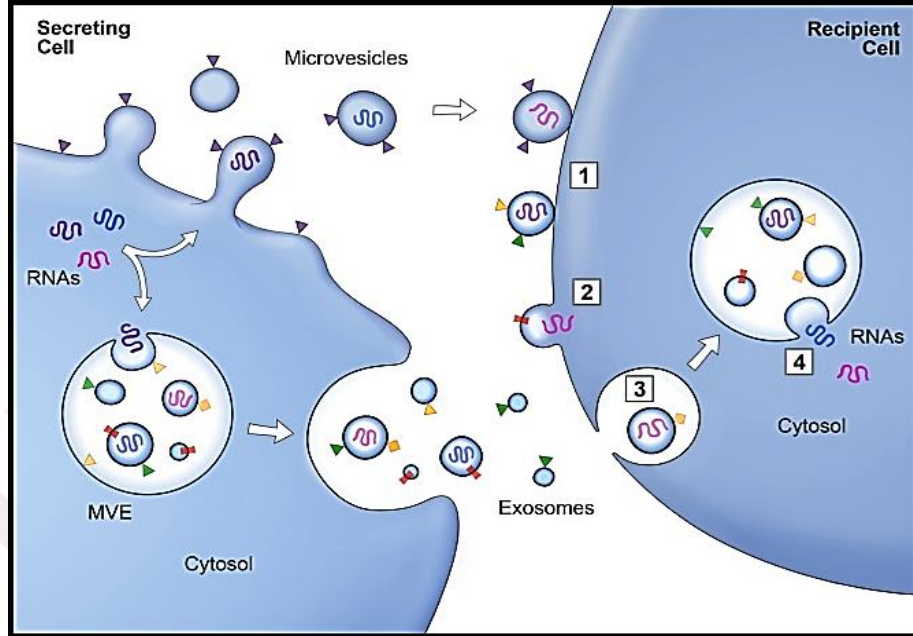


Şekil 2.10. Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin farklılaşma yetenekleri (Si ve Wang, 2019).

2.5. Mikroveziküller

Ekstrasellüler veziküller (EV) olarak adlandırılan mikroveziküller, ilk yapılan çalışmalarda, hücrelerden istenmeyen atıkları çıkarılması için bir araç olarak tanımlandı. Şimdilerde ise, sadece atık taşıyıcıdan daha fazlası olduğu bilinmektedir. Ev'ler, proteinler, miRNA, mRNA, uzun kodlanmayan RNA, DNA zincirleri, lipidler ve ana hücrelerden karbonhidratlar gibi sayısız biyomolekülleri içererek, hedef hücrelere iletme görevleri bulunmaktadır (Hassanpour ve Rexaie, 2020). EV 'lerin lipid çift tabakası, bu molekülleri hücre dışı ortamda bozulmasına karşı korur ve hedef hücreye güvenle teslim edilmesini sağlarlar (Şekil 2.11). Hormonların kan dolaşımında taşınmasında sorun olmazken, nükleik asitler gibi yüksek bozulma kapasitesine sahip hücreler bozulabilirler. Örnek olarak, miRNA'ların eksozomlar tarafından taşınması, hedef hücrelerde gen ekspresyonunun çok hızlı gelişmesini sağlar. Kan, bronkoalveolar

lavaj, tükürük, idrar, süt, beyin omurilik sıvısı, asetik ve amniyotik sıvılarda bulunurlar (Szatanek ve Krzyworzeka, 2017).

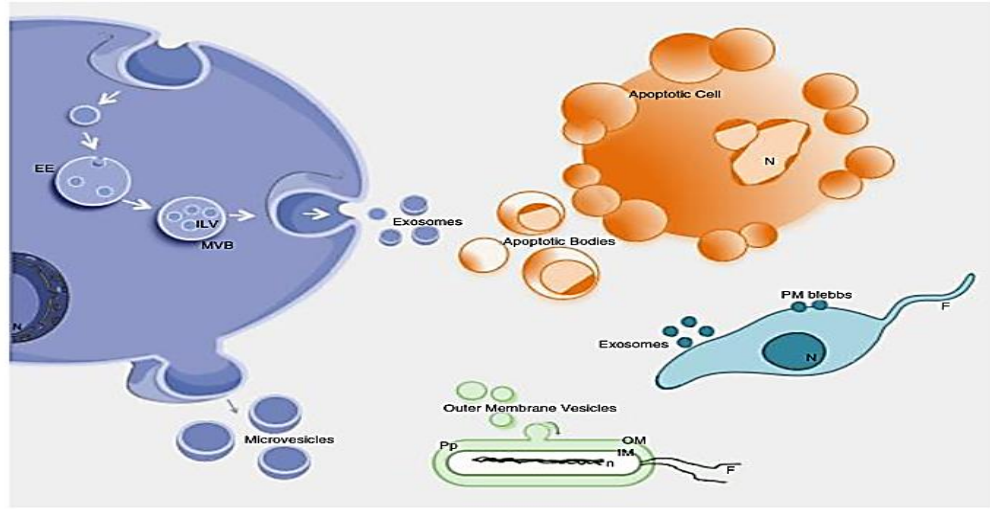


Şekil 2.11. EV'lerin hedef hücreye girişi (Mo ve Slijander, 2015).

EV'lerin hemen hemen her hücrede yer aldığı bilir ve kanser hücrelerinden türetilen EV'lerin, tümör mikro ortamını değiştirmede ve tümör ilerlemesini teşvik ettiği bilinmektedir. Kanser hücrelerinden elde edilen EV'lerin kanser malignitesine katkıda bulunan protein ve RNA'lar gibi çeşitli tümör moleküllerini taşımaktadırlar. Kanser hastalarında Ev'ler aracılığıyla hücreler arası iletişimin mekanizmasının bilinmesi, kanser tedavisi içinde yeni bir strateji olabilirler (Urabe ve Kosaka, 2019).

Hücre dışı veziküller genel olarak 3 sınıfa ayrılır (Şekil 2.12):

- Ektozomlar: plazma zarının dışı doğru tomurcuklanması ve fizyonuyla üretilir.
- Eksozomlar: endozomal ağ içinde oluşturulan ve çok damarlı cisimlerin plazma zarı ile füzyonu üzerine salınırlar.
- Apoptotik cisimler: apoptoza giren hücrelerin kabarcıkları olarak salınırlar (Mo ve Slijander, 2015).



Şekil 2.12. EV'lerin salınımı (Mo ve Slijander ,2015).

2.5.1. Apoptotik Cisimler

100-500 nm arasında bir çapa sahip olan apoptotik cisimler, hücre ölümü sırasında, plazma zarı kabarcıkları ve plazma zarından sivri uçlu çıkıntılar oluşturulmasıyla çevreye membran vezikülleri salırlar (Brien ve Breyne, 2020). Apoptotik cisimler, hücre temizliğine yardımcı olma ve bağışıklık düzenlenmesinde etkileri olan hücreler arası iletişim aracıdır. Vücuttaki birçok hücre apoptoza uğrar ve bunların büyük bir kısmı normal dönüşüm geçiren sağlık hücreler iken, inflamasyon, enfeksiyon, otoimmünite ve kanser gibi birçok immünolojik ve hastalık ortamında da meydana gelirler (Caruso ve Poon, 2018).

2.5.2 Ektozomlar

Doğrudan hücre zarından tomurcuklanan küçük zar vezikülleridir. 50-1000 nm arası bir çapa sahiptirler. mRNA, miRNA, ncRNA, DNA moleküllerini taşırlar. Heterojen ve düzensiz bir morfolojiye sahiptirler (Merchant ve Rood, 2018). Ektozomlar, bir uyaran (hipoksi, oksidatif stres gibi) plazma zarından mikro veziküllerin salınımına neden olan Ca_2^+ veya fosfolipit bağlayıcı proteinlerin aracılık ettiği bir tetiklenme sonucu aktif hale gelirler. Mikroveziküllerin oluşumunda görev alan, kalpain, floppaz, skramblaz, gelsolin ve flibbaz gibi enzimlerdir (Sadallah ve Eken, 2011).

2.5.3. Eksozomlar

Eksozomlar ilk olarak Harding ve arkadaşları tarafından olgunlaşan koyun retikülositlerinde ‘çöp kutusu’ olarak keşfedilmiştir. Eksozomlar, multiveziküler endozomlar veya multiveziküler cisimler içinde üretilen ve bu bölmelerin plazma membranı ile birleştiği zaman salgılanır (Cheng ve Zhang, 2017). 20-200 nm aralığında bir çapa sahip nanopartikül bir gruptur (Skotland ve Hessvik, 2019). Eksozomlar, istenmeyen hücrelerin atılması için basit bir kabul edilmiştir. MikroRNA, mRNA, lncRNA, DNA, Lipidler, peptitler ve çok çeşitli proteinler gibi farklı yükleri taşımaları hücre-hücre iletişimde önemli bir rol üstlenmesine neden olur (Whitford ve Guterstam, 2019). Eksozomların, immün hücreler, epitel hücreler, endotel hücreler, embriyonik hücreler, kanser hücreleri ve mezenkimal kök hücreler gibi birçok hücre tipi tarafından salındığı bilinmektedir. İdrar, kan, anne sütü, amniyotik sıvı, beyin omurilik sıvı, malign asitler, tükürük, safra ve lenf sıvıları dahil olmak üzere hem sağlık hem de hastalık koşullarında ortaya çıkan tüm vücut sıvılarında eksozom tespit edilir (Hade ve ark, 2020).

Eksozomları diğer EV’lerden ayırt etmek ve izole etmek için kesin yöntemler mevcut değildir. Tablo 2.5 ‘de eksozomlar ile EV’lerin karşılaştırılması sunulmuştur (He ve Zheng, 2018).

Tablo 2.5. Ekstrasellüler veziküllerin sınıflandırılması (He ve Zheng, 2018).

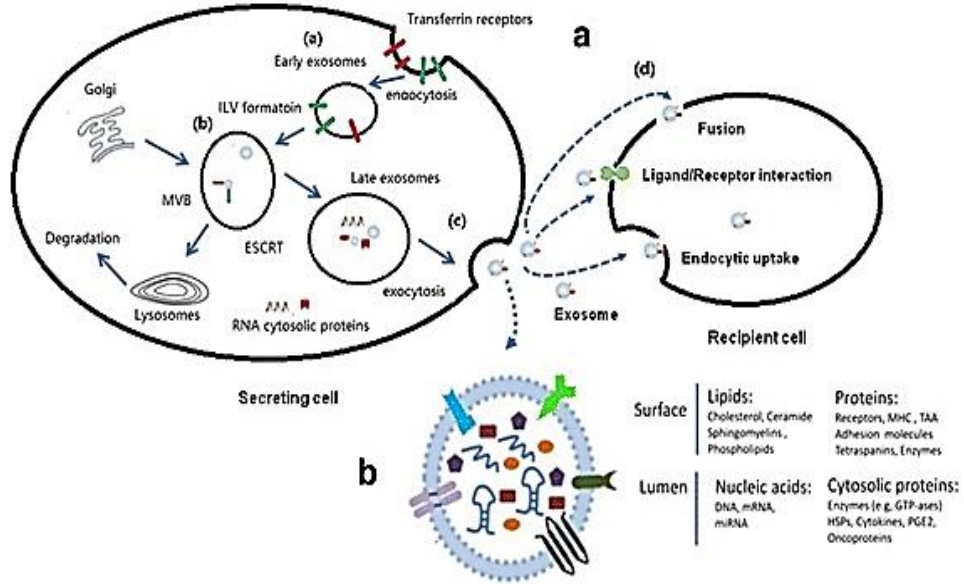
	Eksozomlar	Ektozomlar	Apoptotik cisimler
Boyut	30-150 nm	100-1000 nm	500-4000nm
Yoğunluk	1.13-1.16 g/mL	tanımlı değil	1.16-1.28 g/mL
Morfoloji	kupa şeklinde	heterojen	heterojen
Biyogenez	multiveziküler cisimcik içerisinde oluşumu ve multiveziküler plazmanın membran bileşimiyle içeriğin ortama salınımı	hücresinin membranından doğrudan dışarıya doğru tomurcuklanması sonucu salınımı	apoptoz, hücre ölümü sırasında gerçekleşme
Yüzey belirteçleri	Alix, TSG101, GTPaz, Anneskin, Flotilin, CD9, CD81	CD40 ,adenozin, difosfat ADP6, integrin, selektin	DNA parçaları, organel, histonlar
Bileşim	lipitler, proteinler, mRNA, miRNA	lipitler, proteinler, mRNA, miRNA	lipitler, proteinler, mRNA, miRNA, DNA

2.5.3.1. Eksozom Biyogenezi

Eksozomlar, hücre ile aynı topolojiye sahip olan tek zarlı 20-200 nm çapında salgılanan organellerdir. Eksozomlar, belirgin moleküler heterojenlik gösterir ve hem plazma hem de endozom zarlarında tomurcuklanarak oluşurlar (He ve Zheng, 2018). Eksozomlar klasik bir kap veya tabak morfolojisine sahiptirler. Exocarta verilerine göre, 9769, protein, 1116 lipit, 3408 mRNA ve 2838 miRNA organizmalarını bünyesinde barındırır (Li ve ark, 2017).

Multiveziküler cisimler (MVB'ler) veya geç endozomlar (lizozomal degradasyon yerine, küçük veziküllerin içe doğru tomurcuklanması ile MVB'ler bir gövdeye dönüşür), çapları 250-1000 nm arasında değişen endositik yolun bileşenleridir. MVB'lerin içinde, çapları 30-100 nm arasında değişen intraluminal veziküller (ILV'ler) bulunur. MVB'lerin plazma membranı ile kaynaşarak IVL'leri hücre dışı boşluğa bırakılması sonucu eksozom adını alırlar (Şekil 2.13) (Alenquer ve Amorim, 2015). Eksozomların MVB plazma zarı ile füzyonundan sonra salınmasıyla hücre dışına atılırlar. Hücre dışına atılan sıvılar biyolojik sıvılar içine geçebilirler ve alıcı hücreler

tarafından alınırlar. En iyi elektron mikroskobu ile görüntülenir. Tabak şeklinde bir görüntü oluştursalar da yuvarlak bir yapıya sahiptirler (Hessvik ve Llorente, 2018).



Şekil 2.13. Eksozom Salınım Mekanizması (Li ve ark, 2017).

Eksozomlar bilgiyi hedef hücreye 3 yolla aktarır:

1. Plazma zarı ile doğrudan füzyon
2. Reseptör ligand değişimi
3. Fagositoz yoluyla endositoz

ESCRT (taşıma için gerekli endozomal ayırma kompleksi proteinler) mekanizması, eksozom oluşum sürecinde önemlidir. ESCRT dört farklı protein kompleksinden oluşur bunlar; ESCRT-0, ESCRT -I, ESCRT -II, ESCRT -III ve ilişkili AAAATPase Vps4 kompleksidir. ESCRT-0, ubiquitin proteinlerinin sıralanması ve tanınması için gereklidir. ESCRT- I ve ESCRT- II plazma membranının tomurcuklanmasında görevlidir. ESCRT--III ise vezikülün ayrılmasını sağlamaktadırlar. ESCRT--III ile ilişkili bir görevi olduğu düşünülen ALIX'in endozomların vezikül içine doğru tomurcuklanmasında ve kargo yüklemesinde MVB'lerin alt tiplerini etkiler. Yapılan bazı çalışmalarda ESCRT proteinlerinin inhibe edilmesine rağmen eksozom oluşumunun durmadığı gözlenmiştir. Eksozom oluşumunda sadece ESCRT 'ların değil

MVB oluşum mekanizmalarının da etkili olduğu düşünölmektedir (Hessvik ve Llorente, 2018)

2.5.3.2. Eksozom İzolasyon Teknikleri

Eksozomlar, hücreler arası iletişim, antijen sunumu ve proteinlerin, RNA'ların ve diğerk moleküllerin taşınması gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynayan nano keseciklerdir (Wu ve Ouyang, 2017). Son yıllarda biyolojik işlevleri, ana hücrelerini pratik olarak yansıtmaları, eksozomların hastalık teşhisi ve prognozu için yeni biyobelirteçler olduğu düşünölmekte ve büyük ilgi görmektedirler (Xu ve Wu, 2019). Hücre dışı veziküllerin çalışılmasını ve aktif olarak uygulanmasını kolaylaştırmak için, eksozomların geniş bir hücresel yelpazeden özel olarak izole edilmesi gerekir. Eksozom izolasyonunda kullanılan tekniklerin yüksek verim sergilemesi ve çeşitli numunelerden izole edilmesi gerekir (Pin ve Kaslan, 2017). Eksozom izolasyonu genel olarak beş grupta toplanır. Bunlar; diferansiyel ultrasantrifüj tabanlı teknikler, boyut tabanlı teknikler, immünoafinite yakalama tabanlı teknikler, eksozom çökeltme ve mikro akışkan tabanlı tekniklerdir (Yang ve Zhang, 2020).

Tablo 2.6. İzolasyon tekniklerinin avantaj ve dezavantajları (Yang ve Zhang, 2020)

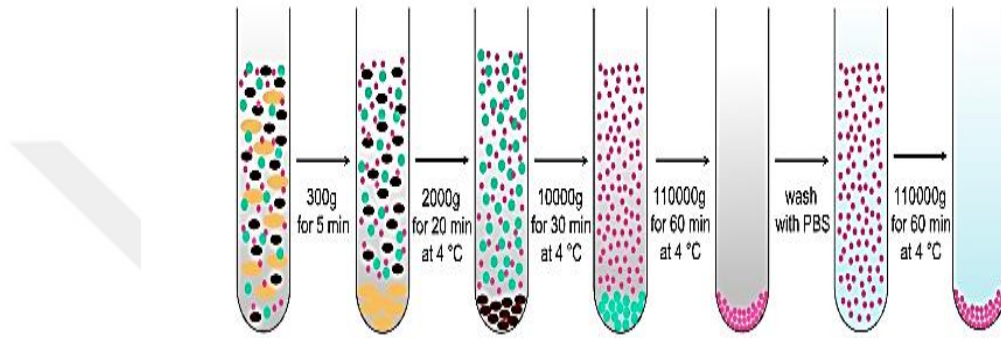
İzolasyon tekniği	İzolasyon Prensibi	Avantajları	Dezavantajları
Ultrasantrifüj Tabanlı Teknikler	Farklı yoğunluk ve boyutlara sahip parçacıklar, merkezkaç kuvveti altında farklı tortu hızları gösterir.	Düşük maliyet ve Ekstra izolasyon reaktifleri ile düşük kontaminasyon riski; büyük hacimli hazırlık için uygundur;	Yüksek ekipman maliyeti, Hantal ve uzun çalışma süresi ve yüksek santrifüjleme nedeniyle eksozomların zarar görmesi
Boyut Dayalı Teknikler	Eksozom izolasyonu yalnızca eksozomlar ve diğer partikül bileşenleri arasındaki boyut farkına dayanır	hızlı, özel ekipman gerektirmez, iyi taşınabilirlik	Tıkanma ve membran sıkışması nedeniyle olası kayıp
Eksozom Çökeltme	Yüksek hidrofilik su içermeyen polimerler, eksozomların çözünürlüğünü değiştirebilir	Kullanım kolay, özel ekipman gerekmez, geniş ve ölçeklenebilir numune kapasitesi	protein ve polimerik malzemeler gibi eksozomal olmayan kirleticilerinde çökmesi
İmmünoafinite Yakalama Tabanlı Teknikler	Eksozom belirteçleri ve hareketsizleştirilmiş antikorlar (ligandlar) arasındaki spesifik bağlanmaya dayalıdır.	Spesifik kökenli eksozomları ayırmak için uygundur, Yüksek safılıkta eksozomlar ve kullanımı kolay, kimyasal kontaminasyon yok	yüksek maliyet ve düşük kapasite, Eksozom elüsyonu için ekstra adım, doğal eksozom yapısına zarar verebilir
Mikroakışkan Tabanlı Teknikler	İmmün afinite, boyut ve yoğunluk dahil olmak üzere farklı prensiplere dayalıdır.	yüksek verimli, uygun maliyet, taşınabilir	düşük numune kapasitesi

2.5.3.2.1.Diferansiyel Ultrasantrifüjleme

Ultrasantrifüjleme, hücre kültürü süpernatından ve diğer biyoakışkanlardan ekstrasellüler veziküllerin izolasyonu için en yaygın kullanılan teknik olarak bilinmektedir. Yüksek santrifüj kuvvetlerinde art arda santrifüjleme, ölü hücrelerin ve hücresel atıkların ortadan kaldırılmasına ve EV'lerin pelletlenmesine (tanecikleştirmesine) izin verir (Willims ve Cabanas, 2018). Eksozom izolasyonu için diferansiyel ve yoğunluk gradiyent olmak üzere iki tür ultrasantrifüj yöntemi vardır.

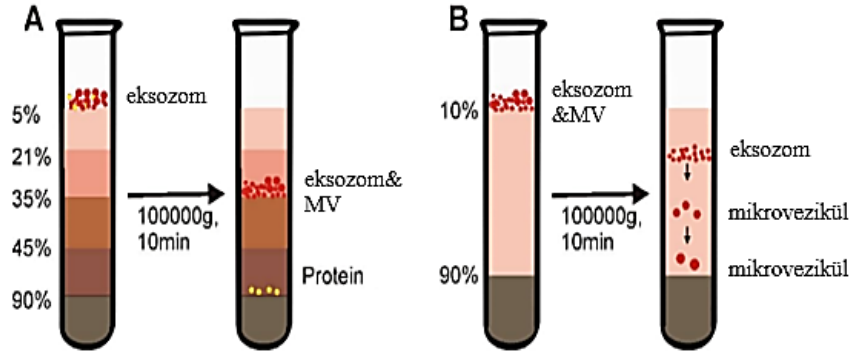
Diferansiyel santrifüjleme, eksozom izolasyon yöntemlerinde 'altın standart' olarak kabul görmektedir. Ardışık santrifüjleme parametreleriyle yüksek hızlı santrifüjleme

üzerine, ölü hücreler, hücresel kalıntılar ve apoptotik cisimler ortamdan çıkarılır (Şekil 2.14). Bu yöntem eksozomlar ve genellikle pelletleme için farklı santrifüjleme kuvvetleri ve süreleri gerektiren ve diğer bileşenler arasındaki boyut farklılıklarına bağlı eksozomları ayırt etmek için kullanılır (Zhu ve Sun, 2020). Bu yöntemin en büyük dezavantajı eksozomların yaşadığı yüksek kesme kuvvetleri nedeniyle potansiyel olarak hasarlı eksozomlar verebilirler (Emma ve ark, 2017).



Şekil 2.14. Eksozomların ultrasantifüj yöntemi ile izolasyonu (Lin ve Chne, 2017).

Yoğunluk gradiyent yöntemi, izole EV'lerin saflığını artırmak için yaygın olarak kullanılır. EV'lerin boyut, şekil ve yoğunluğuna bağlı olarak bölmelere ayrılır. Santrifüj işlemi sırasında numuneler, yoğunluğu aşağıdan yukarı doğru azalacak bir şekilde gerçekleşir ve 100,000 xg devir hızında santrifüjlenerek yoğunluk gradiyent ortamına doğru hareket eder. İşlem sonunda, protein kümeleri tüpün en altına çökerken, eksozom tanecikleri yoğunluğu 1.10-1,18 g/mL aralığında yer alan bölgede kalır (Şekil 2.15) (Lobb ve Becker, 2015).



Şekil 2.15. Gradyan yoğunluğu ultrasantrifüjleme tabanlı eksozom izolasyon şeması (Yang ve Zhang, 2020).

2.5.3.2.2. Boyut Tabanlı Teknikler

Bu teknik esas olarak, biyolojik numunelerdeki eksozomlar ve diğer bileşenler arasındaki boyut farkında dayalı olarak ayrılan ultrafiltrasyon ve boyut dışlama kromatografisine dayanır.

Ultrafiltrasyon (UF), eksozomların boyuta dayalı izolasyonunda sadece boyuta ve moleküler ağırlığa bağlıdır. Eksozomlar, tanımlanmış moleküler ağırlık veya boyut dışlama sınırlarına sahip membran filtreler kullanarak izole edilir. UF hızlıdır ve maliyetli ekipman gerektirmez. Ultrafiltrasyonun dezavantajı, kirletici proteinleri uzaklaştırmanın zor olmasıdır. Klasik ultrasantrifüjleme protokolü ile kıyaslandığında, kısa işlem süresinde yüksek eksozom verimini ve izolasyon verimliliğini artırır (Grunathan ve ark, 2019).

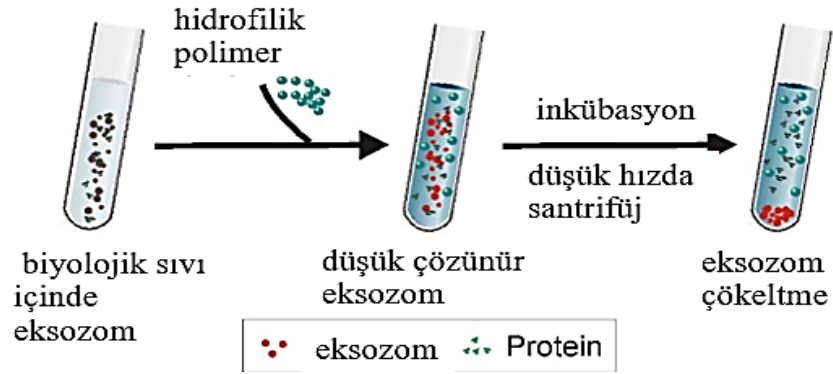
Boyut dışlama kromatografisinin (SEC) ayırma ilkesi, makro moleküllerin jel gözeneklerine girememesi ve gözenekli jeller ile hareketli faz arasındaki boşluklar boyunca elüe edilmeleri, küçük moleküllerin ise jel gözeneklerinde kalması ve sonunda elüe edilmesidir. SEC yönteminin yeniden üretilebilirlik, maliyet etkinliği ve tahribatsız sonuçları dahil olmak üzere birçok avantajı vardır. (Zhang ve Bi, 2020). Ultrasantrifüjleme veya SEC yoluyla izole edilen eksozomların boyut dağılımlarının benzerlik gösterir (Zu ve Sun, 2020).

2.5.3.2.3. İmmünoafinite Yakalama Tabanlı Teknikler

İmmünoafinite yakalama tabanlı teknikler, sıklıkla yüksek saflıkta eksozomlar üretmek için kullanılır. Yüzey proteinlerinin ekspresyonuna dayalı olarak spesifik eksozomların ayrılmasına dayalı bir sistemdir. Eksozomların yüzeyleri, antikor kaplı manyetik boncuklar kullanılarak zenginleştirilebilen CD9, CD63, ALIX ve Ep-CAM (anti-epitelyal hücre yapışma molekülü) gibi çeşitli zar proteinleri içerir (Zu ve Sun, 2020). Eksozomların immünoafinite yakalama yoluyla izolasyonu, numunenin yüzey proteinlerine karşı antikorlarla kaplanmış manyetik boncuklar veya altın yüklü demir oksit nano küpler ile inkübe edilmesiyle sağlanabilir (Kurian ve Banik, 2021). İmmünoafinite, izole edilmiş eksozomların saflığını artırmak için diferansiyel santrifüjleme ile birleştirilmiş ek bir adım olarak kullanılabilir. Bu metodolojinin dezavantajı ise, yalnızca antikor tarafından tanınan eksozomlar yakalandığından eksozom verimini azaltırken, izole edilmiş eksozomların daha yüksek saflıkta olmasıdır. Ayrıca antikorlar, çökeltme sonrası veziküllerden kolayca çıkamadığı sürece, eksozomların bütünlüğü zarar görebilirler (Kurian ve Banik, 2021).

2.5.3.2.4. Eksozom Çökeltme Teknikleri

Eksozom çökeltme işlemi için, polietilen glikol (PEG) gibi su içermeyen polimerler kullanılır. PEG'ler virüslerin ve diğer küçük parçacıkların çökeltilmesi için eskiden beri kullanılır (Zerringer ve Barta, 2015). Su içermeyen polimerler su moleküllerini bağlar ve daha az çözünür bileşenleri çözeltiden dışarı çıkmaya zorlar. Eksozom izolasyonu için en yaygın kullanılan ticari polimer çökeltme bazlı ürün, System Biosciences'dan ExoQuick'dir (Heravi ve ark, 2020) Eksozomları izole etmek için moleküler ağırlığı 8.000 Da olan PEG'den oluşan çözelti kullanılır. Çözelti ile eksozomlar içeren biyolojik sıvı birleştirilir ve gece boyunca 4°C' de inkübe edilir. Daha sonra santrifüjleme ve filtrasyon yoluyla izole edilir (Şekil 2.16). Ürün kullanımı basit, özel ekipman istemeyen ve uzun çalışma gerektirmez (Batrakova ve Kim, 2015).



Şekil 2.16. Polimer Çökeltme Şeması (Yang ve Zhang, 2020)

2.5.3.2.5. Mikroakışkan Tabanlı Teknikler

Eksozomların izole etmek için mikroakışkan teknolojiler, düşük verimleri ve yüksek hassasiyeti nedeniyle teşhis amaçlı kullanılır. 3 ana tekniği mevcuttur. Bunlar; immünoafinite, eleme ve gözenekli yapılar üzerinde eksozomları yakalama tekniğidir. İmmünoafiniteye dayalı mikroakışkan yaklaşımı, immünoafinite kromatografisi tekniğine benzerdir (Batrakova ve Kim, 2015).

Eksozomlar, çip olarak bilinen mikroakışkan cihazlar üzerinde hareketsiz hale getirilen antikorların eksozom belirteçlerine spesifik olarak bağlanmasıyla ayrılır. Eksozomları izole etmek için kullanılan yaygın bir cihaz, CD63 antikorlu ExoChip'tir. Diğer mikroakışkan cihazlar ise, CD9 antikorlu altın elektrotları, CD81 antikorlu grafen oksit/polidopain nanoara yüzü ve CD9 antikorlu balıksırtı cihazları içerir. Bu tekniğin en önemli avantajı, ortaya çıkan eksozomal pelletin yüksek düzeyde saflığı ile verimli ve hızlı işlemeyi içerir (Sidhom ve Obi, 2020)

2.5.3.3. Eksozomların Moleküler Bileşimi

Eksozomlar, farklı yapısal proteinler ve lipid içerirler. ExoCarta göre, farklı tipte hücre ve organizmalar, 4.563 protein, 1.639 mRNA, 764 miRNA bulunur.

- **Eksozom Lipid Bileşimi:** Kolesterol, digliseridler, sfingolipler, fosfolipitler, gliserofosfolipitler ve poligliserofosfolipitlerden oluşan bir lipid çift katmanlı zar içermektedir. Bazı enzimler membran füzyonu ve sinyal iletiminde görev alırken, bir kısmı da eksozomların sabit tutulması ve hücreler tarafından atılımını kolaylaştırma görevleri bulunur.

- **Zar Proteinleri:** En yaygın meydana gelen proteinler, tetraspaninler (CD63, CD9, CD81), ısı şoku proteinleri (Hspa8, Hsp90), GTPazlar (EEF1A1, EEF2) ve endozomal proteinlerdir. Eksozomlarda yaygın olarak bulunan diğer proteinler; hücre iskeleti proteinleri, metabolik proteinler, sinyal ve taşıyıcı proteinleri ve albümindir.
- **Moleküler Kargo:** Eksozomların doku tipine, salgılayan hücre popülasyonuna göre taşıdığı moleküler yük değişir. Örneğin, küçük boyutlu eksozomların ribozomlar ve mitokondri gibi organelleri yoktur. Daha büyük eksozomlara bakıldığında zaman, kanser türevli EV'lerin DNA içermesi dışında DNA eksozomlarda nadiren bulunur. Eksozomlar protein, enzim, transkripsiyon faktörleri içerebilirler. mRNA ve miRNA eksozomlarda varlığı tanımlanmıştır. Eksozomlarda bulunan mRNA'ların, anjiyogenez, hücre döngüsü ve histon modifikasyonunda görev aldığı bilinmektedir (İbrahim ve Marban, 2016).

2.5.3.4. Eksozomların Hedef Hücreye Alınımı

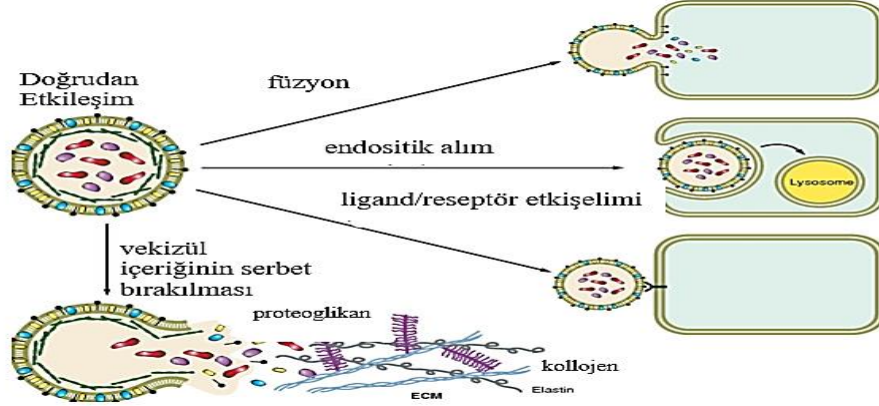
Eksozomlar hedef hücreye, füzyon, endositoz ve ligand-reseptör bağlanması yoluyla hedef hücrelere aktarılır (Şekil 2.17) (Yue ve Yang, 2020).

Membran füzyonu, eksozomların taşıdığı içerikleri alıcı hücrelerin plazmasıyla birleşerek içeriklerini aktarır (Turturici ve Tinnirello, 2014).

Endositoz, hücrelerin, molekülleri ve parçaları içe doğru aldığı süreçtir. Endositoz süreci fagositoz ve pinositoz olarak ayrılmıştır. Fagositoz büyük parçacıkların içselleştirilmesini içerir. Pinositoz tüm hücreler tarafından sergilenir ve klattrin bağımlı ve klattrin bağımsız endositoz ve makropinositoz olarak sınıflandırılır. Klattrin veziküllerin oluşumunda önemli bir rol oynayan protein ve üç klattrin ağır zincir ve üç hafif zincirden oluşan bir triskelion şekli oluşturur. Endositozun tomurcuklanma sürecini yürütmek için kendiliğinden sepet benzeri bir kafes halini alır (Wan ve Zhao, 2020).

Reseptör- Ligand Bağlanması, bu mekanizma eksozom yüzeyinde bulunan membran proteinleri ile alıcı hücrelerinin plazma membranında bulunan proteazların birleşmesi

ile gerçekleşir. Bu hücre yüzeyindeki reseptörlerin bağlandığı bölgelerde ligandlar açığa çıkar. Eksozomların taşıdığı içerikler lümen içerisine alınır (Ersöz ve Can, 2016).



Şekil 2.17. Eksozomların hedef hücreye transfer mekanizması (Turturici ve Tinnirello, 2014).

2.5.3.5. Eksozom Karakterizasyonu

Eksozom karakterizasyon teknikleri genel olarak, Elektron Mikroskobu (TEM), Dinamik Işık Saçılım teknolojisi, Nanoparçacık İzleme Teknolojisi (NTA), Western Blot (WB), Enzim bağlantılı immünosorbent analizi (ELİSA), Akış Sitometrisi'ni içerir.

Elektron Mikroskobu (TEM), eksozom morfolojinin tespitinde elektron ışınları kullanılan en yaygın yöntemdir. Karmaşık çalışma prensibi ve yüksek numune gereksinimleri nedeniyle çok sayıda numunenin hızlı ölçümü için uygun değildir.

Dinamik Işık Saçılım Teknolojisi, eksozomların boyutunu algılama amacıyla kullanılan lazer ışınının saçılmasına bağlı bir tekniktir. Işın yolunda bir parçacık olursa, lazer ışığı her yöne dağılır ve saçılır. Alt ölçüm limiti 10 nm'dir. Geniş boyut aralığına sahip eksozom örneklerinin ölçümü için uygun değildir ve kontamine proteinleri eksozomlardan ayırt etmek zordur.

Nanoparçacık İzleme Analizi (NTA), eksozomların boyutunu ve konsantrasyonunu tespit etmek için, süspansiyon halindeki partiküllerin Brownian hareketini takip etme yeteneğine dayanan bir tekniktir. NTA cihazında bulunan hidrolik bir pompa, numune süspansiyonunda bulunan parçacıkları, sabit bir akış hızında ölçüm odasına enjekte ederek dar bir lazer ışınına maruz bırakır ve aydınlatılan parçacıklar kamera tarafından

kaydedilir. Elde edilen video kaydından, her parçacığın yer değiştirmesi, iki boyutlu Stokes-Einstein denklemini uygulayarak parçacık boyut dağılımını sağlayan zamanın bir fonksiyonu olarak izlenir.

Western Blot (WB), eksozomal işaretleyici proteinlerin ekspresyonun tespitinde kullanılır. Hücre kültürü ortamında eksozomları analiz etmek kolaydır. Klasik yöntemlerden biri olan bu teknik marker proteinlerini kalitatif ve kantitatif olarak analiz edebilir.

Enzim bağlantılı immünosorbent analizi (ELİSA), eksozomal işaretleyici proteinlerin ekspresyonun tespitinde kullanılan, güçlü özgüllüğe ve hızlı algılamaya sahip, işaretleyici proteinleri niteliksel ve niceliksel olarak analiz edebilen yüksek verimli bir analiz tekniğidir. ELİSA'nın dezavantajı, işlemin karmaşık ve tekrarlanabilirlik iyi değildir.

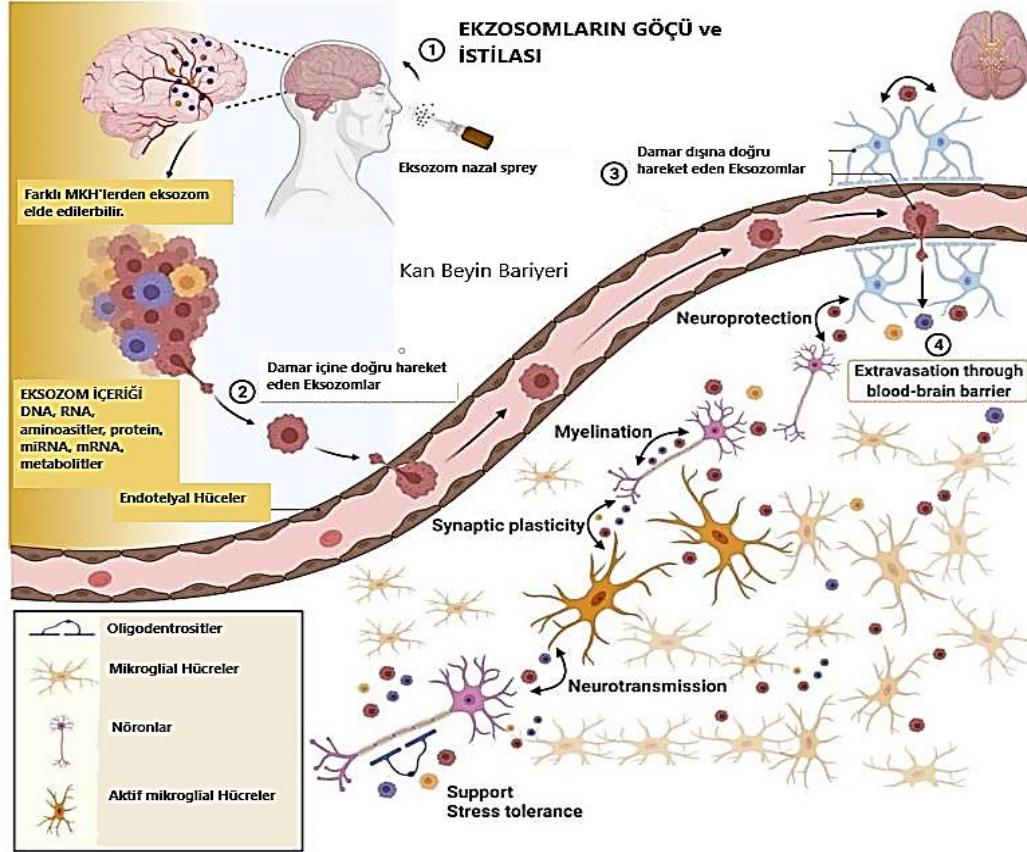
Akış sitometresi, eksozomların biyolojik belirteçlerinin tespitinde kullanılan bu yöntem, yüksek verimli bir tekniktir. Analiz yapılacak parçacıkların lazer ışını içerisinden geçirilerek saçılan ışınların detektörler yardımıyla algılanmasıdır. Zaman alıcı ve zahmetlidir. Tespit sınırı 40 nm'dir (Zhang ve Bi, 2020).

2.5.3.6. Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların İşlevleri

Eksozom salınımı, günümüzde hem komşu hücreleri hem de vücudun uzak kısımlarını etkileyen, hücreden hücreye iletişimin önemli bir mekanizması olarak kabul edilir (Lou ve Chen, 2017). Eksozomların işlevleri tam olarak bilinmese de hücreler arası iletişim için önemli olduğu ve klinik olarak, kanser immünoterapisinde lipozom aracılı ilaç dağıtımına alternatif bir kullanım sunacağı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra eksozomlar, mikroRNA ve mRNA içerikleri nedeniyle umut verici bir biyolojik gen dağıtım sistemidir (Hade ve ark, 2021). Eksozomlar, antijen sunan hücreler tarafından salındıklarında, fonksiyonel peptit- MHC kompleksleri taşıdıkları gözlemlenerek bağışıklık iletişimine aracılık ettiği anlaşılmıştır.

Eksozomların hücreler arası iletişimde taşıdığı rol, terapötik olarak kullanılabileceği sonucunu da ortaya çıkarır. Eksozomların terapötik potansiyeli, daha sonra tümör büyümesini baskılamak için tümör peptit dentritik hücreler tarafından salınan eksozomların kullanılmasıyla gösterilmiştir. Eksozomların hücre transplantasyonu

MKH 'lerden elde edilen eksozomlar beyin hasarı, felç gibi nöronal doku ve fonksiyonda hızlı ve akut hasara neden olan travmatik durumlarda önemli bir terapötik bir ajan olarak kullanılabilir. Beyin yaralanmalarının başarılı tedavisi, hızlı tanı ve kan beyin bariyerini kolay geçen terapötiklerin verilmesinde ki zorluklar nedeniyle sınırlıdır. MKH'ler kan beyin bariyerini geçemezken eksozomlar hem dolaşıma girerek uzak hedeflere kolayca ulaşır hem de merkezi sinir sisteminde kan beyin bariyerini geçerek nöronlar ve glial hücreler tarafından alınabilir. MKH 'lerden elde edilen eksozomlar, sadece intravenöz veya intra nazal uygulama ile kan beyin bariyerini geçmekle kalmaz, aynı zamanda kronik inflamasyonu tedavi etme ve sağlıklı iyileşmeyi teşvik eder (Şekil 19) (Forsberg ve ark, 2020).



Şekil 2.19. Eksozom fonksiyonlarının, nöral hücre iletişimde şematik gösterimi (Hade ve ark, 2021).

Genel olarak eksozomlara benzer şekilde MKH eksozomlarının, nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi birçok malzemeleri taşır. Kütle spektrometresi, antikor dizisi ve mikro dizi analizi yoluyla yapılan izlenimlerde MKH eksozomlarının 850 den fazla

gen ürünü ve 150 den fazla miRNA taşıdığı gösterilmiştir. Bu proteinler ve miRNA'lar işlevsel olarak karmaşık ve iletişim, bağışıklık düzenlemesi, doku onarımı ve rejenerasyon ve metabolizma gibi birçok biyokimyasal ve hücresel süreçte görev alır. Bu taşıdığı görevlerden dolayı MKH eksozomlarının, çeşitli hücresel tepkileri ortaya çıkarma ve çeşitli hücre tipleri ile etkileşime girme potansiyeli gösterir.

MKH 'den türetilen eksozomlar, MKH 'lerin doku içinde homeostazı sürdürmek ve dış uyaranlara yanıt vermek için stromal destek hücreleri olarak işlev görme kapasitesine aracılık etmede kilit rolü vardır. Bu rol, doku mikro çerçevesinin homeostazı hastalık veya yaralanma nedeniyle bozulduğunda özellikle önemlidir ve bu durum normal doku fonksiyonunu tehlikeye atar. Eksozomlarda bulunan proteinlerin çoğu, stokiyometrikten ziyade katalitik aktivitelere sahip enzimlerdir ve mikro ortamları tarafından belirlenir. Bu nedenle, eksozomların enzim merkezli özelliği terapötik ajanlar olarak kullanıldıklarında aşırı veya düşük doz riskini azaltabilir. MKH eksozomlarının önemli bir glikolitik enzim kümelenmesi özelliği bulunmuştur. Bu durum tedavi olarak verilirse MKH eksozomlarından gelen bu enzimlerin, glikolitik açığı iyileştirme ve potansiyel olarak reperfüze miyokard da glikolitik akışı ve ATP üretimini artırabilir.

Eksozomlar molekülleri korumak ve uygun hedefe ulaştırmak için uygun bir araçtır. Molekülleri zarları içinde kapsüllenerek eksozomlar enzimleri veya RNA'ları bozulmaya karşı korur ve eksozomların hücresel endositoz yoluyla hücre içi alımını kolaylaştırır. Eksozomların alımının mikro çevresel asitlik tarafından değiştirildiği rapor edilmiştir. MKH eksozomlarının parakrin ve endokrin sinyalleme yoluyla hem yakın hem de uzak alanlarda hücre iletişimine aracılık edebilir. Doku mikro ortamının homeostazını geri kazanma ve sürdürme kapasitesi, protein ve RNA kargolarının biyokimyasal potansiyeline bağlı olacaktır (Lou ve Chen, 2017).

2.6. Hücre Döngüsü

1953 yılında Howard ve Pelc, DNA sentezinin hücre bölünmesi sürecini kesin bir periyotta gerçekleştiğini ilk kez tanımlamak için oto radyografik çalışmalar yaptılar. Bu çalışmalar, ökaryotik hücre döngünü tanımlamaya yönelik temel çalışmalardan oluşur. Ökaryotik hücre döngüsü G1 (interfaz), G0 (Dinlenme Fazı), S (sentez) ve M (Mitoz) fazından oluşur.

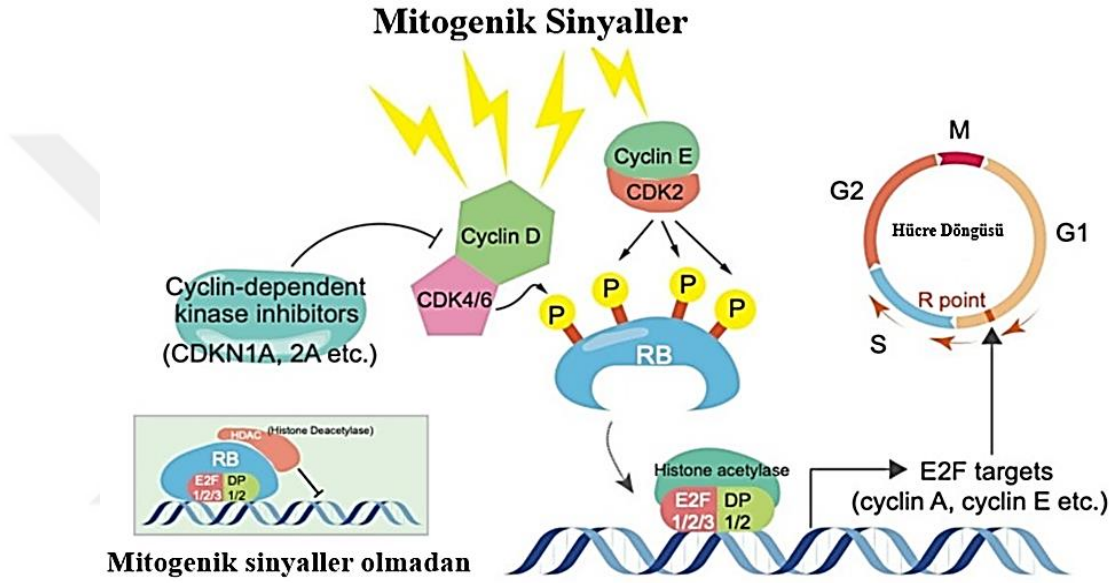
- G1 fazı hücrelerin büyümeye başladığı ve hücre döngüsü düzenleyicileri tarafından kontrol edilen fazdır.
- G0, hücrelerin durgun bir döneme girmeye karar verdiği, istirahat halinde olup, bölünme uyarısı gelene kadar bekledikleri fazdır.
- G2 fazı, hücrelerin mitoz fazı için hazırlık yaptığı aşamadır. Hücrelerin DNA replikasyonunu tamamlamadan M fazına geçişine izin vermezler.
- S fazı, DNA sentezinin gerçekleştiği yerdir.
- M fazı ise, hücrelerin genetik materyallerinin bölündüğü ve sitokinezin meydana geldiği fazdır. M fazında bulunan kontrol noktaları, iğ iplikçilerinin oluşması ve iğ iplikçilerinin sentromere kinetorlar yardımıyla tutunmasını sağlar. Replikasyon sırasında, iğ iplikçiklerinde kontrol dışı, DNA onarımında istenmeyen bir durum olursa bölünme durdurulur ve anormal durumların önüne geçilir (İnham ve ark, 2017).

2.6.1. Hücre Döngüsü Düzenleyicileri

Hücre döngüsünde, farklı fazlardan geçişte siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve CDK inhibitörleri ve RB geni tarafından kontrol edilir. CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6 hücre döngüsü ilerlemesinde önemli rol oynar. Siklin ve CDK kompleksleri, G1-S kontrol bölgelerinde görev yaparlar. Kanseri hücrelerinde siklin ve CDK kompleksleri, aşırı ekspre olurlarsa bir onkogen gibi davranırlar (Lucia ve ark, 2020).

Retinoblastoma (RB), tümör baskılayıcı aktivitesini, E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini modüle ederek hücre ilerlemesini G1/S geçişinin düzenlenmesi ile sağlar. RB tümör baskılayıcı aktivitesini uyguladığı kanonik yol, E2F transkripsiyon faktörleri ve histon deasetilazlar (HDAC), gibi çeşitli kromatin değiştiricileri ile bir transkripsiyonel baskı kompleksinin oluşumunu gerektirir. Bu kompleks, öncelikle E2F hedef genlerini kontrol ederek hücre döngüsünün ilerlemesi sırasında G1/S geçişini düzenler. Mitojenik sinyaller D tipi siklinlerin transkripsiyonel yukarı regülasyonu üzerinde birleşir ve daha sonra CDK4/6 dahil olmak üzere sikline bağımlı kinazları uyarır. D tipi siklin- CDK4/6 komplekslerini RB üzerinde mono-fosforilasyona teşvik eder ve bunun sonucunda E2F'lerin salınımını başlatarak erken G1 fonksiyonlarının

uygulanmasına izin verir. CDK2 ve CDK1 ile işbirliği içinde olan siklin E ve A dahil olmak üzere, E2F hedef genleri, 13. Bölgede RB'nin tam fosforilasyonundan sorumludur ve hücrelerin S ve M fazına geçişine izin verir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri RB fonksiyonunu aktive eden CDKN1A, CDKN1B ve CDKN2A genlerin, tümör baskılayıcı gen olarak hareket etmesini sağlar. CCND1 ve CDK4 gibi RB fonksiyonunu inhibe eden genlerin onkogen gibi hareket etmesini sağlar (Şekil 2.20) (Kitajima ve ark, 2020).



Şekil 2.20. Hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol eden kanonik RB işlevi (Kitajima ve ark, 2020).

Hücre döngüsünün ilerlemesi, negatif düzenleyiciler, INK4 ve mitojenik sinyallerin bir sonucu olarak CDK aktivitelerini engelleyebilen CİP/KİP tarafından kontrol edilir. INK4 protein ailesinin CDK4, CDK6'ya bağlanması, bu kinazların siklin D 'ye bağlanmasına müdahale eder ve pRB'yi hiperfosforile bir durumda tutar ve hücre döngüsünün durmasını sağlar (Lucia ve ark, 2020).

Siklin A, B, E, D'ye bağlı kinaz kompleksleri, CİP/KİP protein ailesi p21(CDKN1A), p27(CDKN1B) ve p57(CDKN1C) tarafından hedef alınır. CİP/KİP inhibitörleri, siklin CDK komplekslerini hedef alarak bunların substratları ile etkileşimini engeller. CDKN1A DNA hasarı durumunda indüklenir ve onarım gerçekleşene kadar siklin CDK komplekslerini kısıtlar (Sherr ve ark, 2020).

2.7. Apoptoz

Apoptoz mekanizması karmaşık ve tek düzenli ölüm mekanizması olduğu düşünülür. Apoptoz esas olarak proteaz ailesi üyesi olan, kaspazlar tarafından yürütülür. Hem başlatıcı kaspazlar (kaspaz -2, -8, -9, -10) ve yürütücü kaspazlar (kaspaz -3, -6) apoptoz mekanizmasında yer alır. Apoptozun temel mekanizması, BCL-2 ailesinin hem pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerinin, hem de başlatıcı kaspaz ve yürütücü kaspazlar arasındaki denge ile düzenlenen mitokondriden, sitokrom-c'nin salınmasıdır. Gelişen bu mekanizma sonucu, kaspaz-6 tarafından nükleer membranın parçalanmış ve bir çok hücre içi proteinlerin bölünmesi, genomik DNA'nın nükleozomal yapılara parçalanması ile sonuçlanır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein düzenleyicileri arasındaki denge, bir hücrenin apoptozu tercih edip, etmemesini belirlemek için önemli bir rol oynar. Prekanseroz lezyonlarda DNA hasarı sonucu apoptozun indüklenmesi, zararlı hücrelere dönüşme riski olanları, ortamdan uzaklaştırır ve tümör büyümesini bloke edebilir. Apoptozun deregülasyonu, kontrolsüz hücre çoğalması, kanserin gelişmesi ve ilerlemesine neden olacaktır (Bertheloot ve ark, 2021).

BCL-2 protein ailesi üyeleri apoptozun düzenlenmesinden sorumludur. Bu ailenin iki zıt grubu olan, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler, apoptozun düzenlenmesi görevini yerine getirir. BCL-2'nin BH1 ve BH2 alanları pro-apoptotik proteinlerle dimerizasyon için gerekli. BH3 alanı, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim için gereklidir. Anti-apoptotik alanlı grup, üç ile dört arasında BH alan içerir (BCL-2, BCL-xl, BCL-W, MCL-1, A1 ve BCL-1). Pro-apoptotik alan ise, BH1-BH2-BH3 içerir (Bax, Bak, Bok). Anti-apoptotikler, sitokrom-c yi bloke ederek, pro-apoptotikler ise aktive ederek apoptozu düzenler (Pistritto ve ark, 2016).

BCL-2 ailesi üyelerinin fonksiyonları şu şekildedir;

- Bcl-2: Apoptoz inhibitörü, Bax ve Bak'ı bağlar.
- Bcl-x: l formu inhibe eder, S formu apoptozu teşvik eder, Bax ve Bak'ı bağlar.
- Bax: Pro-apoptotik, Bcl-2, Bcl-x ve EIB1-9K'yı bağlar.
- Bak: Pro-apoptotik ve Apoptoz inhibitörü, Bcl-2, Bcl-x ve EIB1-9K'yı bağlar.
- MCL-1: Apoptoz inhibitörü.

- Ced-9: Nematodda apoptoz inhibitörü, Bcl-2 homologu.
- EIB1-9K: Adenovirüslerde apoptoz inhibitörü, Bax ve Bak'ı bağlar (Xu ve ark, 2019).

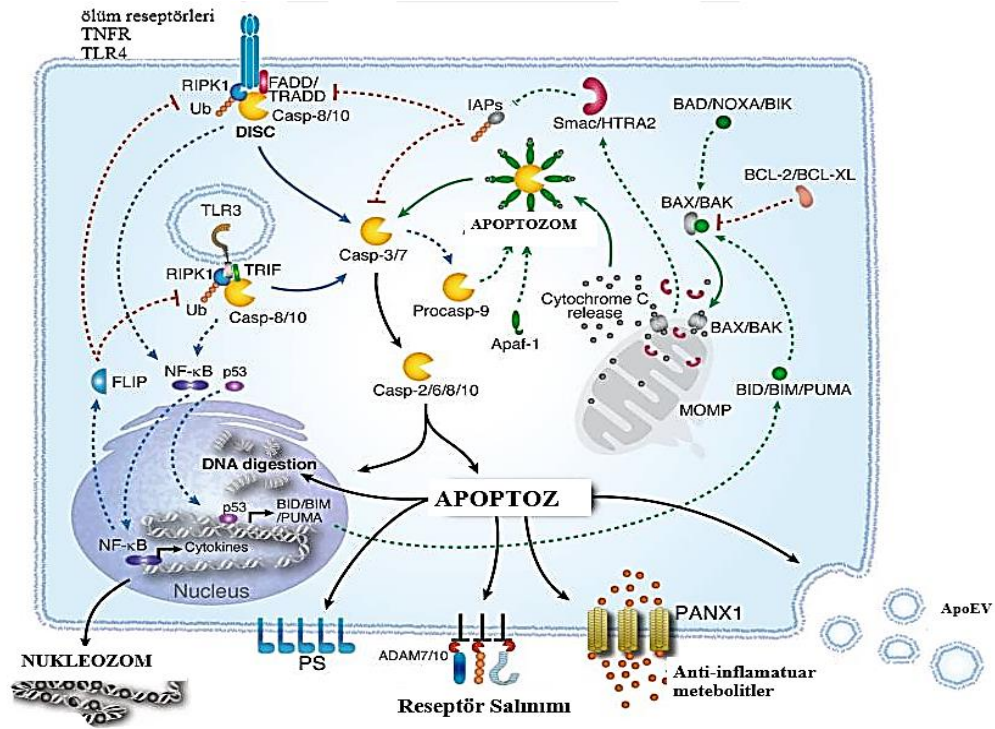
Kaspazların aracılık ettiği uygunsuz hücre yıkımını önlemek için, proteolitik bölünmenin kontrolü zorunludur. Kaspazların negatif düzenlenmesi apoptoz proteinlerin inhibitörü (IAP) tarafından sağlanır. IAP, sinyal yollarını bloke ederek ve hayatta kalmayı destekleyerek apoptozdan kaçınmada rolü vardır. IAP'lerinin, BIRC1/NAIP, BIRC2/cIAP1, BIRC3/cIAP2, BIRC4/XIAP, BIRC5/Survivin, BIRC6/Apollon, BIRC7/ML-IAP ve BIRC8/ILP2 olmak üzere 8 üyesi vardır. IAP antagonistleri, BIR alanına bağlanarak kaspaz-3 ve-9 ile etkileşimlerini azaltırlar. IAP proteinlerinin aşırı ekspere olması, tümör hücrelerin hayatta kalmasını sağlar ve hastalık ilerlemesine katkıda bulunur (Pistritto ve ark, 2016).

DNA hasarı, hipoksi ve onkoproteinlerin ekspresyonu gibi durumlarda, p53 apoptotik yolu aktive eder. P53, anti-apoptotikleri baskımlarken, pro-apoptotik faktörleri aktive eder. P53 tümör baskılayıcı bir gendir. DNA'nın onarımını indükleme gibi görevleri de vardır. Mutasyon gelişmesi durumunda görevini yerine getiremez ve tümörigenezin başlamasına neden olur (Pistritto ve ark, 2016).

Apoptotik süreçte içsel yol; BCL-2 ailesi proteinleri BAK ve BAX'ı oligomerizasyonu ile aktive eder. BAK ve BAX'ı oligomerleri, mitokondriyal dış zarda gözenekler oluşturur ve sitokrom-c'nin sitolize salımına sebep olur. BAK ve BAX aktivasyonu, pro-apoptotik BAD ve BID tarafından ya da anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir. Sitokrom-c, prokaspaz-9'u alan ve apoptozumu oluşturan Apaf-1'e bağlanır. Apoptozumda, kaspaz-9, otoproteolitik bölünme ile aktive edilir ve kaspaz, kaskatını başlatır (Şekil 2.21.) (Bertheloot ve ark, 2021).

Apoptotik süreçte dışsal yol; Tümör Nekroz Faktörü (TNF) reseptörü 1 (TNFR1), ölüm reseptörleri veya membran reseptörlerine (TLR Toll Like Receptor) bağlanması ile aktive olur. TNFR1 ile ilişkili ölüm alanı proteini (TRADD) veya Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD), reseptörleri ile etkileşime giren serin/treonin protein kinaz 1 (RIPK1) ve prokaspaz-8 içeren sinyal kompleks oluşumunu indükler. Apoptoz hücrel inhibitörü (cIAP) tarafından RIPK1 yaygınlaştırılır, kompleksi stabilize eder ve

hücrenin transkripsiyon faktörü, NFκB' nin aktivasyonunu sağlar. Aktifleşen ölümcül kaspazlar -2, -8,-6,-10, bir kez aktif olduğunda programlanmış hücre ölümü gerçekleşir. Apoptotik Hücre Dışı Vekizkülleri (ApoEV'ler) içerisinde yer alan, apoptotik hücreler, nükleozomal yapılar, anti-inflamatuar metabolitler paketlenmiş şekilde yer alarak, haberciler salarlar. Plazma zarının dış yüzeyinde açığa çıkan fosfatidlerin(PS) molekülleri, fagositlere 'beni ye' sinyalleri gibi işlev görür (Bertheloot ve ark, 2021).



Şekil 2.21. Apoptoz içsel ve dışsal yolları (Bertheloot ve ark, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada hücreler üzerinde gerçekleştirilen işlemlerin Klinik Araştırmalar Etiğine uygunluğu, Erciyes Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 19.01.2022 tarih ve 56 kayıt numaralı kararı ile in vitro çalışma yöntemi olması nedeniyle Etik Kurul onayına gerek olmadığı belirtilerek Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde (GENKÖK) gerçekleştirildi.

3.1. Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Canlandırılması

Dondurulmuş halde GENKÖK'ten temin edilmiş umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücreler (UK-MKH); %15 FBS + %1 penisilin/streptomisin + 2 mM L-glutamin içeren DMEM kompleks medyum içerisinde süspanse hale getirilerek 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edildi ve yeterli sayıya gelinceye kadar 3 güne bir medyum değiştirildi. Son 48 saat ise FBS içermeyen kompleks medyum içerisinde hücreler süspanse edildi. Bütün işlemler sonucunda hücrelerin bulunduğu medyumdan 20 ml alınarak eksozom izolasyonu için kısa bir süre için +4 °C' de bekletildi.

3.2. Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerden Eksozom (UK-MKH-Ekso) İzolasyonu

Eksozomları elde edilmek amacıyla presipitasyon yöntemi uygulandı. System BioSciences firması tarafından üretilen ExoQuick-TC (#EXOTC50A-1, System Biosciences, ABD) kiti kullanıldı. Eksozomlar üretimi için mezenkimal kök hücreler FBS içermeyen medyum içerisinde 48 boyunca inkübe edildi. 48 saat sonunda kite ait izolasyon solüsyonu kullanılarak eksozomlar izole edildi. Bu işlem için uygulanan protokol şu şekildedir:

- FBS içermeyen medyum içerisinde mezenkimal kök hücrelerin bulunduğu 1x175 cm²'lik flasktan 20 ml kültür besiyeri toplandı.
- Besiyeri 3000 x g de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek hücre ve hücreye ait atıklar çöktürüldü.
- Pellet kısmı atılarak süpernant yeni bir tüpe alındı. Süpernatant hacminin 1/5'i kadar eksozom solüsyonu (20ml besiyer için 4 ml solüsyon) eklendi. Homojen bir karışım elde edilmesi için vortekslendi.
- +4 °C'de 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler 1500xg'de 30 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj aşaması sonrasında süpernatant atılarak pellet kısmı 500 µl dPBS ile resüspanse edilerek -80 °C'ye kaldırıldı.

3.2.1. Eksozom Karakterizasyonu

İzolasyonu tamamlanan eksozomların, görüntüleme işlemi Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ile yapıldı. Eksozomların zeta potansiyeli zeta sizer analizatörü ile belirlendi. Eksozomların konsantrasyon ve parçacık boyut analizi Nanoparçacık İzleme Analizi (NTA) ile yapıldı.

3.2.1.1. Eksozomların Görüntülenmesi

Eksozom görüntüleme işlemi, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi'nde (TAUM) bulunan Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ile yapıldı. Eksozomlar Au/Pd ve Karbon Kaplama Cihazı ile iletkenliği sağlamak için, altın- palladyum ile kaplandı ve FE-SEM'de görüntülendi. Görüntüler Image J programı yardımıyla yaklaşık 9-10 farklı görüntülenmiş eksozomların çapı ölçülerek eksozom büyüklüğü hesaplandı.

3.2.1.2. Eksozomların Zeta Potansiyeli

Eksozomların elde edilmesinin ardından Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (ERNAM) bünyesinde bulunan Zeta Sizer cihazı kullanılarak hem eksozomların hem de çalışmamızın kararlılığı için zeta potansiyeline bakıldı.

3.2.1.3. Eksozomların Konsantrasyon ve Parçacık Boyut Analizi

Eksozomların konsantrasyon ve parçacık boyut analizi işlemi için, Erciyes Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan Nanosight NS300 model Nanopartikül İzleme Analizi (NTA) cihazı kullanıldı. NTA cihazı numunelerimizin, sıvı süspansiyonda nano parçacık boyut dağılımını elde etmek için ışık saçılımının hem de Brownian hareketinin özelliklerini kullanılarak eksozomların video ile izleme ve kaydetme yoluyla partikül boyut ve konsantrasyonunu analiz etmek için kullanıldı.

3.3. BE(2)-C Nöroblast Hücre Hattının Yetiştirilme Ortamı

Nöroblastoma BE(2)-C hücre hattı (CRL-2268), DMEM/F12 ve RPMI-1640 medyum 1/1 oranında hazırlandı ve %10 sıgır serumu (fetal bovin serumu, FBS), %1 antibiyotik, %1 glutamin içeren kompleks medyum içerisinde kültürlendi. Hücreler 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edildi.

Melatonin ve UK-MKH kaynaklı eksozomların BE(2)-C hücreleri üzerine terapötik etkilerinin değerlendirilmesi için XTT yöntemi ile % hücre canlılığı olarak değer hesaplanarak sitotoksik etkisi ve Anneksin V yöntemi ile apoptotik etkisi değerlendirildi.

3.4. BE(2)-C Hücrelerinde XTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

Melatonin ve umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomun BE(2)-C hücre hattı üzerindeki olası sitotoksik etkisi XTT ((2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) kiti ile üretici firmanın (Luminex) kullanım talimatına göre uygulandı. Yöntem XTT ajanı ile inkübe edilen hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır.

XTT Yöntemi

- 96 kuyucuklu plakalara 100 µl içerisinde 1×10^4 BE (2)-C hücre ekim yapılarak 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi.

- 24 saat sonunda BE(2)-C hücreleri FBS içermeyen kompleks medyum ile değiştirildi.
- FBS içermeyen normal büyüme ortamında 24 saat inkübasyondan sonra hücrelere farklı konsantrasyonlarda 1, 2,5 ve 5 mM melatonin ve 25, 50, 100 µg/mL UK-MKH-Ekso 24, 48 ve 72 zaman süresince uygulandı.
- 24, 48, 72 saat boyunca melatonin ve UK-MKH-Ekso ile muameleden sonra, 5 ml XTT solüsyonu içerisine 100 µl aktivasyon solüsyonu eklenmiştir. Bu kompleks hale gelen solüsyonda 50 µl her oyucuğa eklenerek 4 saat boyunca 37°C’ de inkübe edilmiştir.
- Plakalar, bir plaka çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandı.
- Inkübasyon sonucunda 450 nm’de Glowmax Elisa Raeder cihazında okutulmuştur.
- Tüm deneyler en az üç kültürde üç tekrar halinde yapıldı ve veriler, kontrole kıyasla canlılık yüzdesi belirlendi.

3.5. BE(2)-C Hücrelerinde Anneksin V ile Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

Melatonin ve eksozomların BE(2)-C hücre hattı üzerindeki apoptoz oranının ne ölçüde değiştiğini bulmak için Flow sitometri cihazında kit kullanarak okuma yapıldı. Anneksin V, hücre yüzeyinde bulunan ve apoptoz veya hücre ölümü gibi durumlarda kanıt olarak gösterilen fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) moleküllerini belirlemeye yarayan bir işaretçidir. Ayrıca bu kitin içinde ölü hücreleri boyamaya yarayan 7-AAD boyası ile ölü hücre yüzdeleri de belirtildi.

Tablo 3.1. Anneksin V ve 7-AAD boyalarına, hücrelerin verdiği yanıtlar

Hücreler	Anneksin V	7-ADD
Apoptotik Olmayan, Canlı	-	-
Erken Evre Apoptotik	+	-
Geç Evre Apoptotik ve Ölü	+	+
Nekrotik	-	+

Anneksin V Yöntemi

- Melatonin ve eksozomların BE(2)-C hücre hattı üzerindeki apoptoz oranının ne ölçüde değiştiğini bulmak için Anneksin V & Dead Cell Assay (Luminex) kiti kullanıldı.
- BE(2)-C hücreleri 6 kuyucuklu plakalar içerisinde her bir kuyuya 1 ml içerisinde 1×10^6 olacak şekilde 37°C ' de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi.
- 24 saat sonunda BE(2)-C hücreleri FBS içermeyen kompleks medyum ile değiştirildi.
- FBS içermeyen normal büyüme ortamında 24 saat inkübasyondan sonra hücrelere farklı konsantrasyonlarda 1, 2,5 ve 5 mM melatonin ve 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ UK-MKH-Ekso 24, 48 ve 72 zaman süresince uygulandı.
- Her 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda, tripsin ile kaldırılan hücreler 5 dakika boyunca $350 \times g$ 'de santrifüj edildikten sonra, iki kez soğuk fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı.
- Sonrasında, her bir hücre grubu Anneksin V & Dead Cell Assay kiti ile boyanarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika süreyle ile inkübe edildi.
- Boyama işlemi tamamlanan hücreler BD FACS Aria III flow sitometri cihazı ile analiz edildi.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

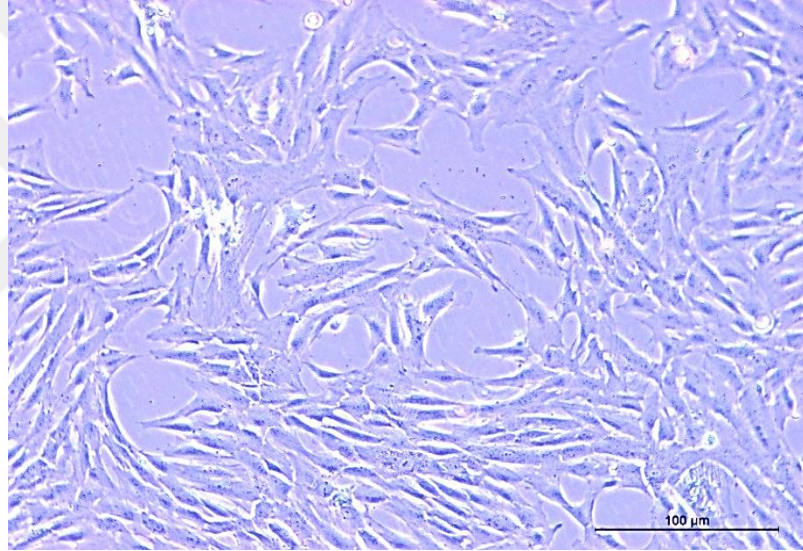
Apoptoz yöntemi veriler GraphPad Prism 8 programı ile grup analizi altında, Two way ANNOVA, Tukey's multiple comparisons test gruplar arası ve içi değerlendirilerek anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Sitotoksisite yöntemi verileri üç ayrı deneyden elde edildi ve ortalama $\pm$ standart sapması olarak sunuldu ve GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak eşleştirilmemiş t testi (unpaired t-test) one-way ANOVA ile değerlendirilerek anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojisi

Hücrelerin yer aldığı flasklar 48 saatin sonunda kontrol edilerek hücrelerin çoğalması gözlemlendi (Şekil 4.1). Hücre kültür kaplarının tabanına tutunma gösteren, iğsi yapıda morfolojik özellik gösteren MKH kullanılarak eksozom izolasyonuna geçildi.



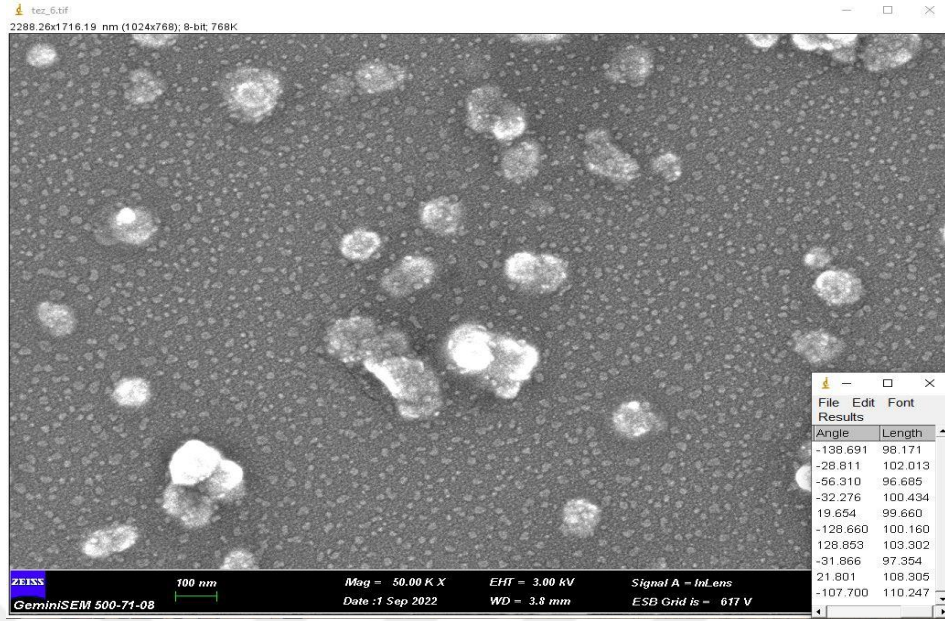
Şekil 4.1. İnsan umbilikal kord kaynaklı MKH 'lerin mikroskopik görüntüsü (Invert Mikroskop x10)

4.2. Eksozom İzolasyonu

4.2.1. Eksozom Karakterizasyonu Bulguları

4.2.1.1. Eksozomların Görüntülenmesi

İzolasyon metodu sonucunda; izole edilen eksozomların SEM analizine göre değerlendirildiğinde eksozomların membran yapılarının bütünlüğünü koruduğu, Image J programı ile eksozomların uygun boyutta dağılım gösterdikleri görülmüştür. Presipitasyon metodunda eksozomların ortalama boyutları $101,633 \text{ nm} \pm 4,5$ olarak bulundu.

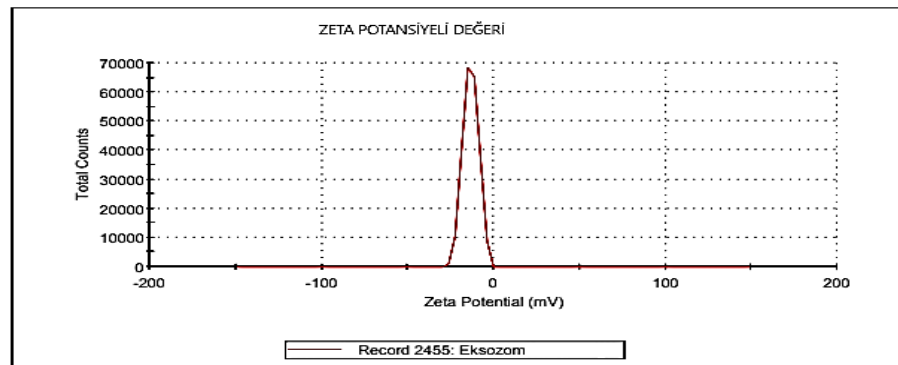


Şekil 4.2. Image J programı ile çapları ölçülmüş eksozomların SEM görüntüsü (Büyültme Ölçeği 100 nm)

4.2.1.2. Eksozomların Boyut Analizi

Presipitasyon yöntemi ile izolasyon sonucunda eksozomların zeta potansiyeli, zeta sizer cihazı tarafından değerlendirildiğinde eksozomların zeta potansiyeli -13,3 olarak ölçüldü. Zeta analizörü tarafından değerlendirilen sonuç eksozomların zeta potansiyelinin “good” olduğunu belirtti.

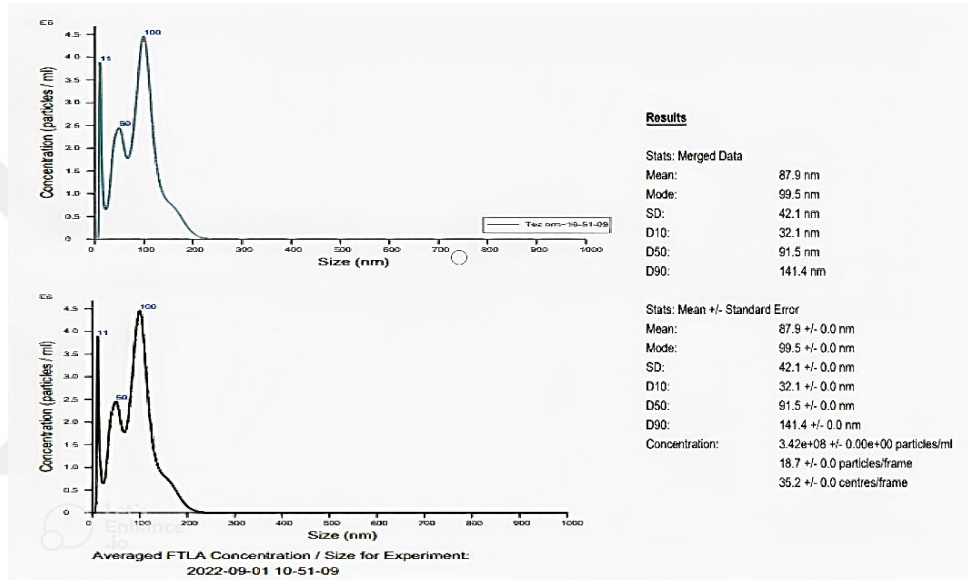
	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -13,3	Peak 1: -13,3	100,0	4,52
Zeta Deviation (mV): 4,52	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00176	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



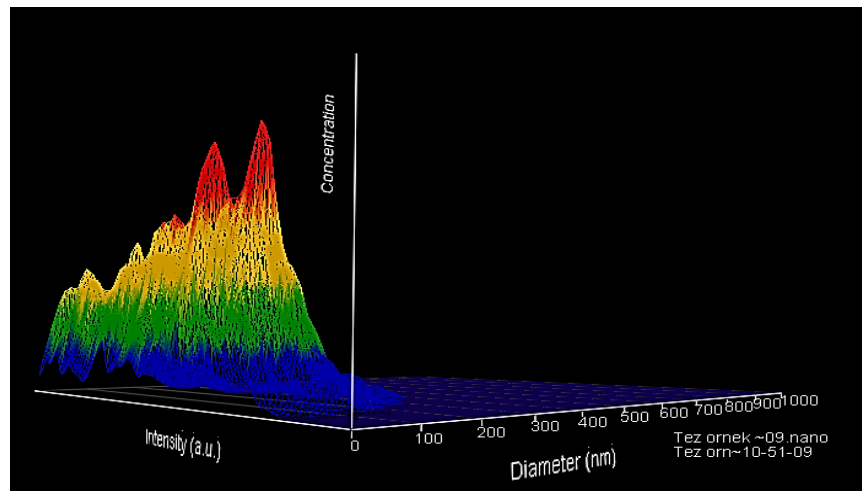
Şekil 4.3. Eksozomların zeta potansiyeli değerleri

4.2.1.3. Eksozomların Konsantrasyon ve Parçacık Boyut Analizi

NTA ile eksozomların hem boyut dağılımının hem de nispi konsantrasyonunun belirlenmesinde; presipitasyon metodunda eksozomların boyutunun yaklaşık 87.9 nm olduğu ve konsantrasyonunun 3.42×10^8 /ml olarak bulundu (Şekil 4.4.). Ayrıca nm aralıklarına göre eksozomların konsantrasyon ve boyut dağılım 3D grafiği de Şekil 4.5 'de verildi.



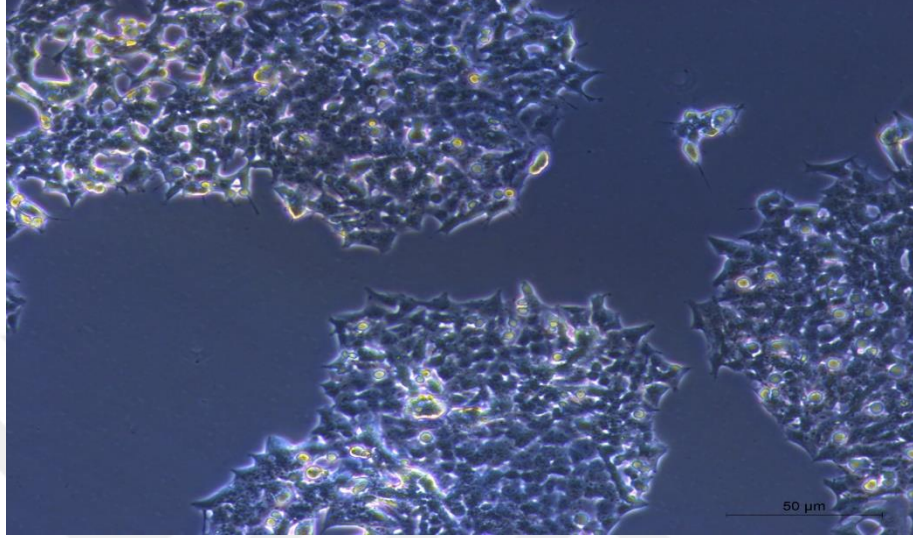
Şekil 4.4. NTA ile eksozomların boyut dağılımı ve konsantrasyonu.



Şekil 4.5. NTA ile eksozomların 3 boyutlu konsantrasyon ve boyut dağılımı grafiği

4.3. BE(2)-C Nöroblast Hücrelerinin Morfolojisi

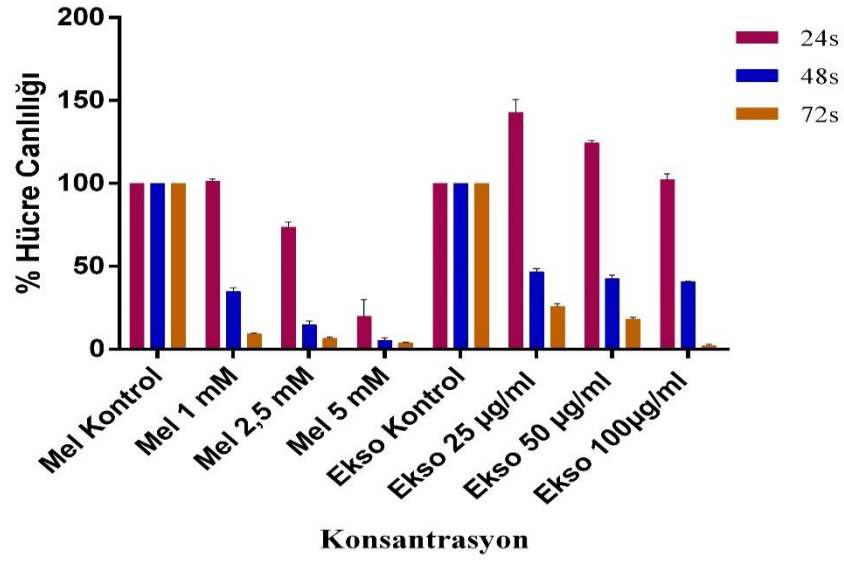
BE(2)-C nöroblast hücreleri flask tabanına tutunmuş bir şekilde invert mikroskop altında görüntülendi (Şekil 4.6).



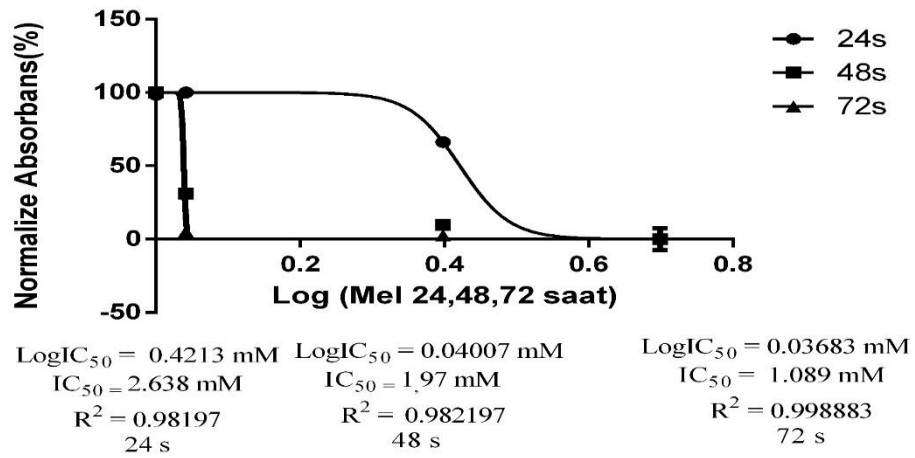
Şekil 4.6. BE(2)-C nöroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (x50µm)

4.4. BE(2)-C Hücrelerinde XTT Yöntemi ile Sitotoksikite Bulguları

UK-MKH-Ekso ve melatoninin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkilerinin XTT yöntemi sonuçları Tablo 4.1’de, karşılaştırmalı sonuç grafiği ise Şekil 4.7.’de verildi. Bu bulgular neticesinde, melatoninin yarı inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}); 24 saat için 2.68 mM, 48 saat için 1.097 mM ve 72 saat için 1,089 mM olduğu hesaplandı (Şekil 4.8.). Eksozomun IC_{50} için 24 saat için 69.4 µg/mL olarak bulundu. Her iki etken grubun sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde zamana bağlı olarak % hücre canlılığı kontrol grubu ve kendi aralarında değerlendirildiğinde anlamlı farklılıklar gösterdi ve P değeri 0.0085 olarak bulundu. Konsantrasyona bağlı olarak değerlendirildiğinde ise % hücre canlılığı kontrol grubu ve konsantrasyon grubunun kendi aralarında karşılaştırıldığında yine anlamlı farklılıklar gösterdiği ve P değerinin 0,0091 olduğu görüldü.



Şekil 4.7. BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 24, 48 ve 72 saat sonundaki hücre canlılığı yüzde değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.8. BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin 24, 48 ve 72 saat sonundaki IC₅₀ değerleri

Tablo 4.1. Melatonin ve eksozomun BE(2)-C hücreleri üzerine % canlılık değeri

BE(2)-C % Hücre Canlılığı					
MELATONİN	Konsantrasyon	Kontrol	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
	1 mM	%100	%102,60	%32,30	%8,50
	2,5 mM	%100	%70,40	%12,50	%6,50
	5 mM	%100	%27,40	%4,15	%3,70
UK-MKH-Ekso	25 µg/ml	%100	%151,10	%44,50	%27,60
	50 µg/ml	%100	%126,30	%41,10	%18,60
	100 µg/ml	%100	%105,92	%40,80	%1,80

4.5. BE(2)-C Hücrelerinde Anneksin V Yöntemi ile Apoptoz Bulguları

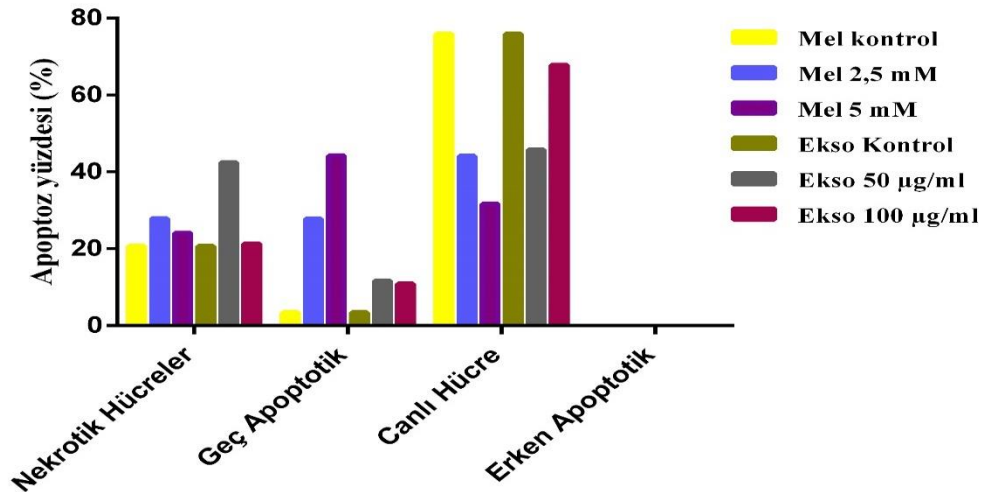
UK-MKH-Ekso ve melatoninin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak apoptotik etkileri, erken evre apoptoz, geç evre apoptoz ve nekroz olarak değerlendirilerek yüzde sayısal değerleri Tablo 4.2’de verildi. 24 saat süre sonunda BE(2)-C hücreleri üzerinde hem melatonin hem de eksozomun farklı konsantrasyonlarında anlamlı bir şekilde apoptotik indüklenme görülmemiştir.

Tablo 4.2. Melatonin ve eksozomun BE(2)-C hücreleri üzerinde yüzde apoptoz değerleri (%)

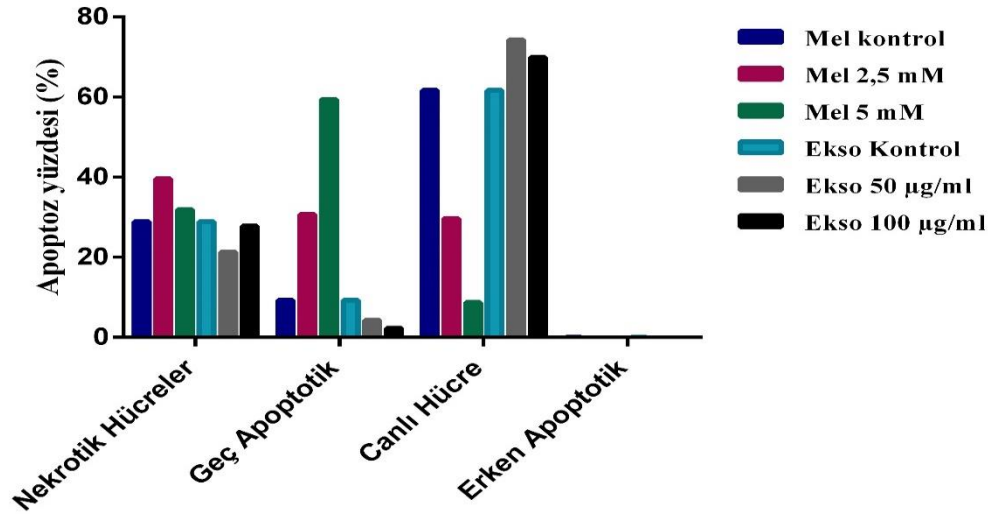
BE(2)-C 24 Saat	Kontrol	Mel 2,5 mM	Mel 5 mM	Ekso 50 µg/ml	Ekso 100 µg/ml
Nekrotik hücreler	18,4	12,7	13,5	21,1	17,7
Geç apoptotik hücreler	1,4	2,1	0,4	0,9	1,6
Canlı hücreler	80,2	85,1	86,1	78	80,7
Erken apoptotik hücreler	0	0	0	0	0
BE(2)-C 48 Saat					
Nekrotik	18,4	27,9	24,1	42,4	21,3

hücreler					
Geç apoptotik hücreler	3,4	27,8	44,2	11,7	10,9
Canlı hücreler	75,9	44,1	31,7	45,8	67,8
Erken apoptotik hücreler	0	0	0	0,0	0
BE(2)-C 72 Saat					
Nekrotik hücreler	28,9	39,6	31,9	21,3	27,8
Geç apoptotik hücreler	9,3	30,7	59,4	4,3	2,3
Canlı hücreler	61,7	29,7	8,7	74,3	69,9
Erken apoptotik hücreler	0,1	0	0	0,1	0

Melatonin ve UK-MKH-Ekso uygulanan 48 ve 72 saat zaman gruplarında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; konsantrasyonlar arası anlamlı bir fark gözlemlenemezken ($P>0,05$) uygulanan her bir konsantrasyonun değişen apoptoz değerlerinin, istatistiksel olarak kendi içinde ve kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde değiştiği gözlemlendi (** $P<0,0001$) (Şekil 4.9-10).

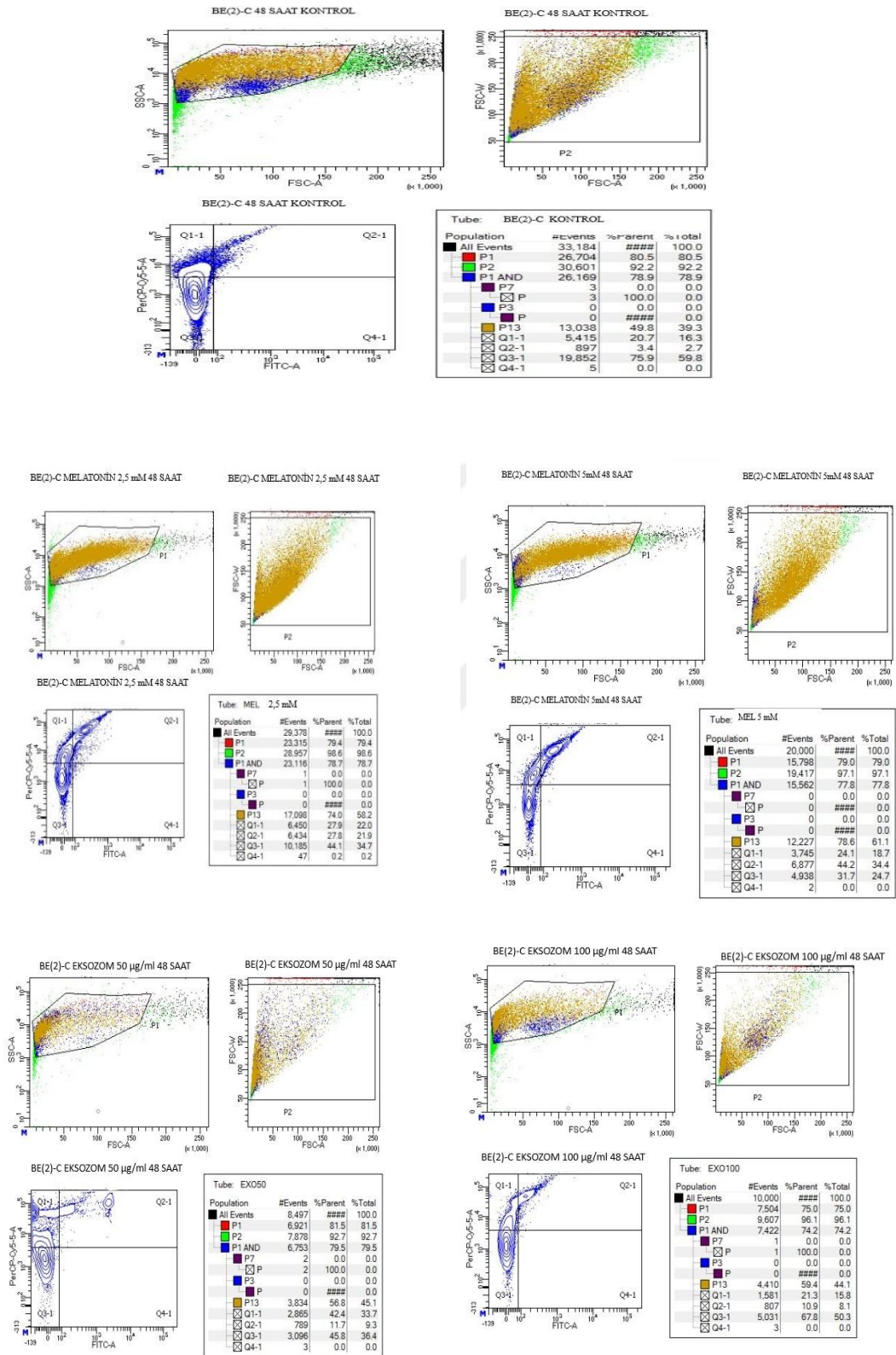


Şekil 4.9. BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 48 saat sonundaki apoptoz değerlerinin karşılaştırılması

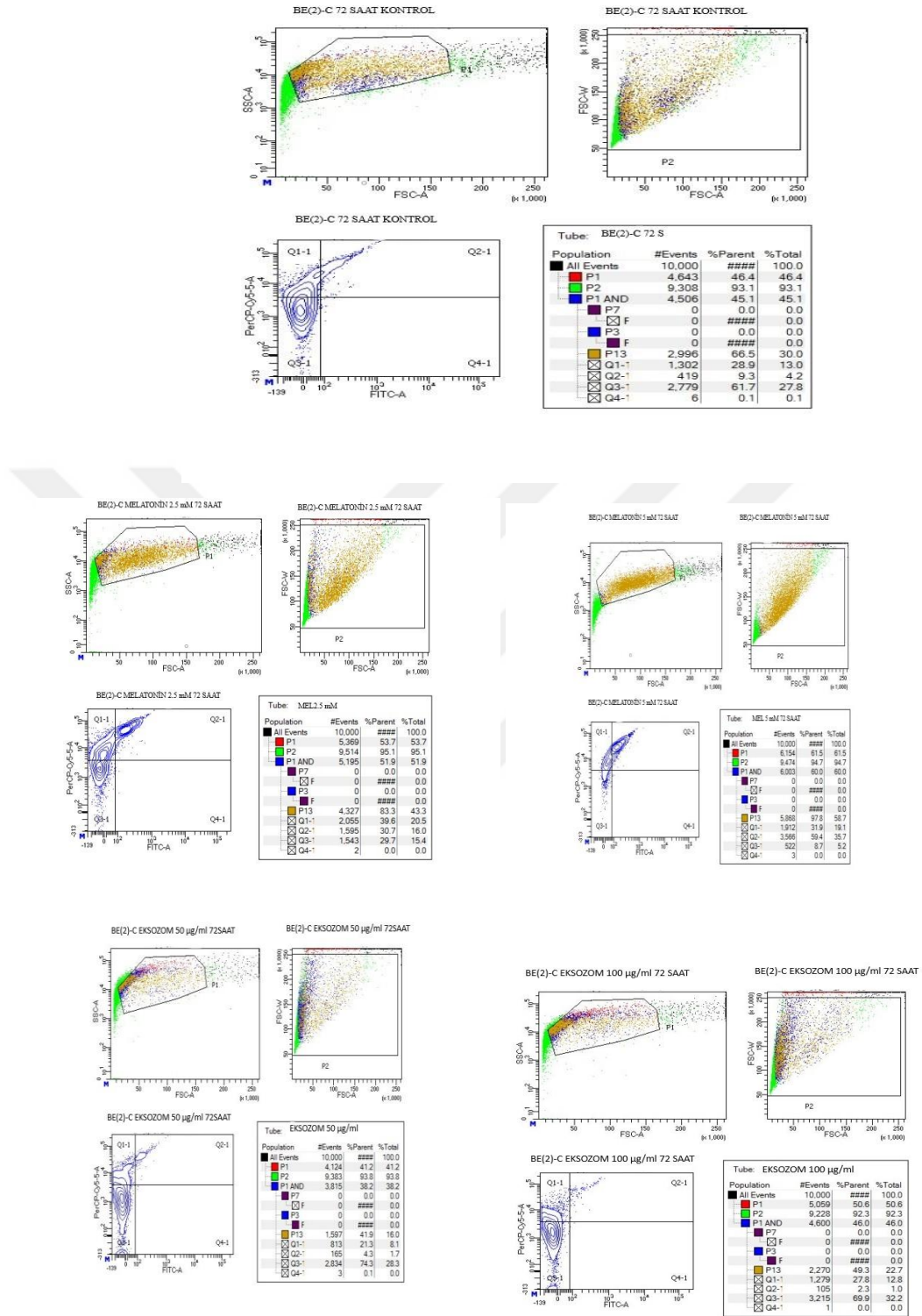


Şekil 4.10. BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 72 saat sonundaki apoptoz değerlerinin karşılaştırılması

Melatonin ve eksozomların BE(2) hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi, Anneksin V & 7-AAD yöntemi ile canlı hücreleri (Q3), erken evre apoptotik hücreleri (Q4), geç evre apoptotik hücreleri (Q2) ve nekrotik hücrelerin (Q1) yüzde değerini gösterdi. Melatonin ve eksozomların BE(2)-C hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyon ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediği tespit edildi.



Şekil 4.11. BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 48 saat sonundaki apoptoz değerlerinin flow sitometri sonuçları



Şekil 4.12. BE(2)-C hücreleri üzerinde melatonin ve eksozomun 72 saat sonundaki apoptoz değerlerinin flow sitometri sonuçları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nöroblastoma, embriyolojik olarak nöral krestin gelişim bozukluğuna bağlı ortaya çıkan sempatik sinirlerin ganglionlarından kaynaklanan bir kanserdir. Nöral krest, embriyogenezin 3. haftasında nöral tüpün dorsal yüzünden gelişen pluripotent hücrelerdir. Nöroblastoma, 8000 canlı doğumda birinde görülürken, tüm çocukluk çağı tümörlerin %6'sını kapsamaktadır. Nadir görülen bir hastalık olmasına rağmen, çocuklarda kansere bağlı ölümlerin %15'inden sorumludur. Klinik olarak nöroblastoma, tedavisiz spontan gerileyen yaygın tümörleri olan hastalardan, yoğun multimodal tedavi yaklaşımlarına rağmen metastatik yayılım gösteren, tedaviye dirençli tümörlere kadar değişen heterojen bir hastalık spektrumu ile karakterizedir.

Melatoninin kanserde anti-anjiyogenik etkiler göstereceğini Lissoni ve arkadaşları öne sürdüler. Melatoninin anjiyogenez üzerindeki etkileri pankreas, kolon, meme, akciğer kanserlerinde incelenmiştir (Garcia ve ark, 2013). SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı ilk olarak 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliği biyopsisinde elde edilip klonlanmış hücre hattıdır. VEGF'nin SH-SY5Y hücre hattında tümör genişlemesine ve büyümesine destek verdiği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada melatonin, SH-SY5Y hücrelerinin pro-anjiyogenik etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Çalışmada 1 mM'lık konsantrasyonlarda melatoninin hücre hattı üzerinde hücre proliferasyonu üzerinde inhibe edici olduğu, apoptozu ve anti-nöroinflamatuvar etkileri inhibe edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Gonzalez ve ark, 2017).

Melatonin, epifiz bezi tarafından sentezlenen, kan dolaşımına geçen ve uyku ve uyanma zamanlamasını sağlayan, kan basıncı kontrolü ve kahverengi yağ dokusu oluşumunu destekleyen bir hormondur. Melatonin spesifik melatonin reseptörleri olan MT1 ve MT2'yi bağlayarak hemeostazda görev alan güçlü bir antioksidandır. Bu etkileri bilenen melatonin ayrıca, tip 2 diabetes, obezite veya ileri yaşlarda görülen insulin direnci koşulu altında endoplazmik retikulum stresinin neden olduğu nöronal hücre ölümü sinyalleri üzerine düzenleyici etkisi bildirilmiştir. Yapılan çalışmada melatoninin insulin

stimülasyonu altında nöronal hücre ölümü sinyallerini önemli ölçüde zayıflattığı gösterilmiştir (Song ve Kim, 2017).

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, bağışıklık tepkilerindeki ölü beyaz kan hücreleri veya dış uyaranların neden olduğu mutasyonlara sahip istenmeyen hücrelerin temizlenmesine yardımcı olur. Hücre büyümesi, uyku hali, apoptoz arasındaki denge, homeostaziyi sürdürmek için büyük önem taşırken, bu uyumun bozulması tümörjenezin altında yatan mekanizmadır. Doğal onkostatik hormon olan melatonin, hücre ölümünü teşvik etme yeteneği birçok kanserde doğrulanmıştır. İnsan prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP hücrelerinin melatonin ile tedavi edilmesi Bax ve Cyt c'nin önemli bir yukarı regülasyonu ve hayatta kalma proteini Bcl-2'nin azalması ile apoptotik hücrelerin sayısını açıkça artırdığı gösterildi. Yapılan bu çalışmada melatoninin prostat kanseri hücrelerinin üstesinden gelmede yardımcı olduğu, melatoninin klinik kullanıma çevirmek için fazlaca çaba harcanması gerektiği vurgulanmıştır. (Shen ve ark, 2021).

Melatonin karaciğer kanserlerinde inhibe edici rolü, hücresel proliferasyonun azaltılması, hücre döngüsünün durdurulması, angiogenez ve metastazın sınırlandırılması ve hücresel ölümün teşvik edilmesi dahil olmak üzere bir dizi farklı moleküler ve hücresel süreci içerir (Palanca ve ark, 2021). CCA karaciğer kanser hatlarında 48 saat boyunca 0.5, 1, ve 2 mM konsantrasyonlarda melatoninin apoptoz yoluyla hücre ölümüne yol açan ROS ve sitokrom- c üretimini artırdığı gösterilmiştir (Laothong ve ark, 2015). Ayrıca melatoninin kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan bir antitümör molekülü olan sisplatinin pro apoptotik etkisini artırdığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada in vitro deneylerde sisplatinin ve 1 mM melatonin beraber kullanıldıklarında, Hep3B, HCC, Bel-7402 hücrelerinde apoptozun intrinsik yolunu artırdığı ve NF- κ B/COX-2 yollarını inhibe ederek terapötik etkinliği iyileştirdiği gösterilmiştir (Hao ve ark, 2017).

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), embriyogenezin gelişiminde mezodermden kaynaklanan multipotent kök hücrelerdir. MKH'ler ilk olarak kemik iliğinden keşfedildi ve daha sonra yağ, sinir dokusu, göbek kordonu ve amniyotik sıvı gibi çeşitli insan dokularında izole edildi (Zhan ve ark, 2019). Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler yüksek bir virüs kontaminasyonu olasılığı ve ilerleyen yaş ile birlikte hücre

sayısı, genişleme ve farklılaşma yeteneğinin düşmesi klinik kullanımlarını zorlaştırır. İnsan umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücreler (UK-MKH), göbek kordonundan elde ediliyor olması ve doğumdan sonra atılan bir ürün olarak görülmesi nedeniyle etik sorun taşımaması nedeniyle kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelere karşı daha avantajlıdır. UK-MKH'ler, morfolojik, immünofenotip, proliferasyon ve çok yönlü farklılaşma kapasitesi mevcuttur. UK-MKH'ler çeşitli MKH belirteçlerini (CD105, CD90 ve CD73) ifade eder ve yapışma molekülü belirteçleri (CD54, CD13, CD44 ve CD29) eksprese eder. UK-MKH'lerin düşük immünojenikliği ve immün düzenleyici aktivitesi, tümör hücrelerinin büyümesini inhibe etmesi, hematopoetik kök hücre transplantasyonundan sonra komplikasyonları iyileştirme, hematolojik hastalıklar için hematopoezi teşvik etme temel taşıyı sağlayan terapötik kullanım için ilgi çekici hale gelmiştir (Shang ve ark, 2021).

Burger hastalığı, küçük ve orta çaplı arter ve venleri tutan nonaterosklerotik segmental inflamatuvar ve obliteratif damar hastalığıdır. Ünal ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, mezenkimal kök hücre, periferik kan kök hücre ve kemik iliği MKH'lerin vasküler endotel hücrelere ve epidermal hücrelere dönüşebildiği ve yenilenen endotel ve epidermal hücreler, epidermis kalınlığını artırarak yara iyileşimini hızlandırdığı ortaya konulmuştur (Ünal ve ark, 2002).

MKH'lerin tümör destekleyici etkileri riskini en aza indirmenin ve sistemik olarak uygulanan MKH'lerin biyolojik olarak dağılımındaki sınırlamaların üstesinden gelmenin alternatif yolu, MKH'lerden türetilmiş hücre dışı veziküllerin kullanılmasıdır. İnsan MKH'lerden elde edilen hücre dışı veziküllerinin farelerde radyasyondan zarar görmüş kemik iliği ve akut böbrek hasarı alanlarına başarıyla ulaştığı gösterilmiştir. Ayrıca TRAIL tarafından tasarlanmış hücre dışı veziküllerin, bir melanom fare modelinde antitümör etki göstermiştir (Hochuheuser ve ark, 2021).

Kök hücrelerin nörolojik hastalıklarda mevcut sinir ağlarına zayıf bir şekilde göç etmesi ve eksozomların kan-beyin bariyerini geçiyor olması terapötik etkisinin hücre hücre etkileşimlerinden parakrin etkileşimlerine kaymıştır (Lee ve ark, 2021). Xin ve arkadaşları miR 17-92 içeren sıçan kemik iliğinden türetilen MKH eksozomlarını bir inme modeline intravenöz olarak uygulamış ve fonksiyonel iyileşme ile

oligodendrojenez, nörojenez ve nöroplastisitenin arttığı gösterilmiştir (Xin ve ark, 2017).

Bu tez çalışması sonucunda; melatonin ve umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının BE(2)-C nöroblast hücre hattında apoptotik ve sitotoksik terapötik etkileri sayesinde; BE(2)-C nöroblast hücrelerinin tedavisinde güçlü bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Kan-beyin bariyerini geçebilen eksozomlar ve melatoninin nöroblast hücreleri üzerinde güçlü terapötik potansiyelleri göz önünde bulundurularak hastalıkların tedavisinde etkin bir rol alacağı düşünülmektedir. Bu çalışmamızın in vitro koşullarda planlanıp yürütüldüğünden, net olarak uygun bir tedavi protokolünün belirlenebilmesi için daha kapsamlı in vivo çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu çalışma gelecekte bu alanda yapılacak olan çalışmalar için öncü durumundadır.

6. KAYNAKLAR

- Alenquer M, Amorim M, Exosome biogenesis, regulation and function in viral infection. *Viruses*, 2015;7(9):5066-5083.
- Al-ghadban S, Bunnell B, Adipose derived stem cells: immunomodulatory effects and therapeutic potential. *Pubmed*, 2020; 1;365(2):125-133.
- Bahar D, Farklı yöntemlerle izole edilmiş umbikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının protein konsantrasyonu ve eksozom miktarı açısından karşılaştırılması. 3.kök hücre ve hücresel tedaviler kongre kitabı, 2019:PS002,
- Batrakova E, Kim M, Using exosomes, naturally- equipped nanocarriers, for drug delivery. *HHS Puplic Access*, 2015;219:396-405.
- Bertheloot D, Latz E, Franklin B, Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular&Molecular İmmunology*, 2021; May; 18(5): 1106-1121.
- Bharti D, Shivakumar S, Comparative analysis of human wharrton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. *Cell Tissue Res*, 2018; Apr; 372(1):51-65.
- Brien K, Breyne K, RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nature puplic emergency collection*, 2020;26:1-22.
- Cable J, Fuchs E, Adult stem cell and regenerative medicine a symposium report. *HHS Public Access*, 2020;146(1):27-36.
- Caruso S, Poon İ. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: more than just debris. *Frontiers in Immunology*, 2018;9:1486.
- Charitos A, Ballini A, 2021. stem cells: a historical review about biological, religious and ethical issues. *Hindawi*, (Web page: 10.1155/2021/9978837), (Date accessed: 30 nisan 2021).

- Chen X, Shoudong Y, Stem cell maintenance by manipulating signaling pathway: past, current and future. *BMB Reports*, 2015; 48:12: 668-676.
- Chen F, Liu Y, Wong N, Xiao J, Oxidative stress in stem cell aging. *Sage Journals*, 2017;26(9): 1483–1495.
- Cheng L, Zhang K. Focus on mesenchymal stem cell – derived exosomes: opportunities and challenges in cell-free therapy. *Stem cell international*, 2017;63:05295.
- Chiru A, Popescu C, Gheorghe D, Melatonin and cancer. *Journal of Medicine and Life*, 2014; (15) 7839: 373-374.
- Colon N, Chung D. Neuroblastoma. *HHS Public Access*. 2011; 58(1): 297-311.
- Constantin A, Flippi A, Extracellular vesicles from adipose tissue stem cells in diabetes and associated cardiovascular disease; pathobiological impact and therapeutic potential. *Molecular sciences*, 2020;21(24):9598.
- Cosenza S, Toupet K, Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics*, 2018; 8(5):1399-1410.
- Çınar E, Vatanoğlu E, Dünyada kök hücre üzerine çalışan ilk bilim insanı: ORD. PROF.DR. Süreyya Tahsin AYGÜN. *Nobelmedicus*, 2018;14(1): 55-57.
- Dacidoff A. Neuroblastoma. *HHS Public Access*, 2012; 21(1): 2-14.
- Di Lascio, S, Saba, E. Phox2a and phox2b are differentially regulated during retinoic acid-driven differentiation of sk-n-be(2)-c neuroblastoma cell line. *Experimental Cell Research*, 2016; (342)19:62-71.
- Drösch A, Images of cell trees, cell lines and cell fates: the legacy of Ernst Haeckel and August Weismann in stem cell research. *Springer link*, 2014;36: 157-186(2014).
- Elçin M, Kök Hücrelere Bakış: tanımlar, kavramlar ve sınıflandırılması. *Darülfunun İlahiyat*, 2015; 2982: 287-307.
- Emma A, Goumans M. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size – exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine*, 2017.03.011.
- Ersöz E, Can O, Eksozomların kanserdeki rolü. *CBÜ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dergi*, 2016; 2(5):144-152.
- Fathi E, Charoudeh H. Telomere shortening as a hallmark of stem cell senescence. *Stem Cell Investigation*, 2019; 6(7): 21-25.

- Fetahu I, Mandl S, Neuroblastoma and the epigenome. *Cancer Metastasis Reviews*, 2021; 40(1): 173-189.
- Fish J, Grupp S. stem cell transplantation for neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant*, 2007;41(2): 159-165.
- Ford E, Pearlman J. Human pluripotent stem cells- based therapies for neurodegenerative diseases: current status and challenges. *MDPI*. 2020; 20;9(11):2517.
- Forsberg M, Kink J, Hematti P, Capitini C, Mesenchymal stem cell and exosomes: progress and challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020; 8: 665.
- Fouad Y, Aanei C, Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 2017;7(5): 1016-1036.
- Fredlund, E, Ringner, M, 2008. high myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma. *PNAS*, 2008. Sep 16; 105(37): 14094-14099.
- Fu X, Liu G, Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, 2019; 28;8(8):784.
- Fukada S, Akimoto T, Role of damage and management in muscle hypertrophy: different behaviors of muscle stem cell in regeneration and hypertrophy. *Science direct*, 2020; 1867(9):118742.
- Fukuoka H, Narita K, Hair regeneration therapy: application of adipose derived stem cells. *Current stem cell research&therapy*, 2017; 12(7):531-534.
- Galano A, Tan D, Reiter R. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules*, 2018; 23(3): 53-535.
- Gao Y, Xiao X, Zhang C. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing p13k/akt and nf-kb/inos signaling pathways. *Journal of Pineal Research*, 2016; 62(29): e12380.
- Garcia V, Gonzalez A. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res*, 2013; 87:25-33.
- George O, Stem cells and evolving notion of cellular identity. *The royal society publishing*, 2015; 370:20140376

- Gonzalez A, Gonzalez C, Menendez J. Melatonin inhibits angiogenesis in sh-sy5y human neuroblastoma cell by downregulation of vegf. *Oncology Rep*, 2017; 37(4): 2433-2440.
- Gonzalez A, Menendez M, Cos S. Melatonin inhibits angiogenesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells by downregulation of VEGF. *Oncology Report*, 2017: 5446: 2433-2440.
- Gonzalez C, Menendez J, Gonzalez A. Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in mcf-7 human breast cancer cells. *Int J. Oncology*, 2018; 52(2):560-567.
- Goodwin J, Laslett A. The application of cell surface markers to demarcate distinct human pluripotent states. *Experimental Cell Research*, 2020; 387(1):111749.
- Gurunathan S, Kang M. Review of the isolation, characterization, biological function and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells MDPI*, 2019; 8(4):307-312.
- Hade M, Suire N, Suo Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine. *Cells*, 2021; 10(8): 1959-1965.
- Han Y, Li X. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*, 2019; 8(8):886-891.
- Han Z, Wang Q. Basic biological characteristics of mesenchymal stem cell derived from bone marrow and human umbilical cord. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2013; 21(5):1248-55.
- Hao J, Zhang C, Li Z, Targeting NF- κ B/AP-2 β signaling to enhance antitumor activity of cisplatin by melatonin in hepatocellular carcinoma cells. *Am J Cancer Res*, 2017;7(1):13-27.
- Harvey A, Caretti G. Interplay between metabolites and epigenome in regulating embryonic and adult stem cell potency and maintenance. *Stemcell reports*, 2019 Oct 8;13(4):573-589.
- He C, Zheng S, Exosome theranostics biology and translational medicine. *Theranostics*, 2018; 8(1):237-255.
- Heravi F, Balaj L, Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *HHS public Access*, 2020; 394(10): 1253-1262.

- Hessvik N, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular And Molecular Life Sciences*. 2018;75(2):193-208.
- Hochheuser C, Kunze N, Tytgat G. The potential of mesenchymal stromal cells in neuroblastoma therapy for delivery of anti-cancer agents and hematopoietic recovery. *Journal of Personalized Medicine*, 2021; 11(3): 161-167.
- Horbinski C, Ligon K. The medical necessity of advanced molecular testing in the diagnosis and treatment of brain tumor patients. *Neuro- Oncology*, 2019; 21(12): 1498-1508.
- [https://www.shutterstock.com/tr/image-vector/cell-potency-totipotent-pluripotent-multipotent-unipotent-1528089593\(E.T.01.11.2022\)](https://www.shutterstock.com/tr/image-vector/cell-potency-totipotent-pluripotent-multipotent-unipotent-1528089593(E.T.01.11.2022))
- Huang C, Hsueh Y, Huang W, Patel S, Li S, multipotent vascular stem cells contribute to neurovascular regeneration of peripheral nerve. *Stem cell research&therapy*, 2019; 310(1):234-238.
- Huang J, Shan W, Li N, Melatonin provides protection against cisplatin- induced ovarian damage and loss of fertility in mice. *RBMO*, 2021;42(3): 505-519.
- Ilic D, Ogilvie C. Concise review: human embryonic stem cells- what have we done? what are we doing? where are we going?. *Stem Cells*, 2017;35(1):17-25.
- Inanır C, Ekici L. Eksozomlar:kompozisyonları biyolojik fonksiyonları ve biyoaktif bileşiklerin taşınmasındaki potansiyelleri. *Dergipark*, 2020; 3:421-432
- İbrahim A, Marban E. Exosomes: fundamental biology and roles in cardiovascular physiology. *HHs Puplic Access*, 2016:78:67-83
- Klar A, Zimoch J. Skin tissue engineering: application of adipose- derived stem cells. *Biomed research international*, 2017:9747010.
- Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cell regenerative medicine. *Thematic review series*, 2013;85(1):3-10
- Konstantinov I. In search of alexander maximov: the man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Johns Hopkins University Press*, 2000; 43(2): 269-276.
- Kuen J, Park S, Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating vegf expression in breast Cancer Cells, 2013;31;8(12):e84256.
- Kurian T, Banik S. Elucidating methods for isolation and quantification of exosomes: a review. *Molecular Biotechnology Springer*, 2021; 63(4): 249-266.

- Lai C, Sheng T, Lim, S. Mesenchymal stem cell exosomes a novel stem cell based therapy for cardiovascular disease. *Future medicine*. 2011; 6(4):481-492.
- Lai R, Tan S. Proteolytic potential of the msc exosome proteome implications for an exosome mediated delivery of therapeutic proteasome. *Hindawi*, 2012: 971907.
- Lai R, Yeo R. Mesenchymal stem cell exosomes. *Pubmed*, 2015;40;82-8.
- Laothong U, Hiraku Y, Oikawa S. Melatonin induces apoptosis in cholangiocarcinoma cell lines by activating the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Oncol Rep*, 2015; 33(3):1443-9.
- Lee B, Kang I, Yu. therapeutic features and updated clinical trials of mesenchymal stem cell (msc)-derived exosomes. *Journal of Clinical medicine*, 2021; 10(4):711.
- Li J, Xu S, Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow gingival tissue and umbilical cord. *Molecular medicine reports*, 2018; 1886:4969-4977.
- Li L, Pan Y. Melatonin inhibits the proliferation of human mg-63 osteosarcoma cell. *journal of china medical university*, 2017;12: 131-135.
- Li T, Yan Y, Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cell alleviate liver fibrosis. *Stem cell*, 2013;15:22(6):845-854.
- Li W, Li C. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Molecular Cancer*, 2017;16:145-152.
- Li W, Wang Z, Chen Y, Wang K, Melatonin treatment induces apoptosis through regulating the nuclear factor- κ b and mitogen activated protein kinase signaling pathways in human gastric cancer cells. *Oncology Letters*, 2017;13(4): 2737-2744.
- Li X, Liu L, Exosome derived from umbilical cord mesenchymal stem cell mediates MIR-181c attenuating burn induced excessive inflammation. *Elsevier*, 2016;8:72-82.
- Li X, Liu L, Yang J. Exosome derived from human umbilical cord mesenchymal stem cell mediates mir-181c attenuating burn-induced excessive inflammation. *Ebiomedicine*, 2016; 8: 72-82
- Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang J, Xu D, Li H. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*, 2017; 8(24): 39896-39921.

- Lin M, Chne S. Transfer of mammary gland-forming ability between mammary basal epithelial cells and mammary luminal cells via extracellular vesicles/exosomes. *Journal Of Visualized Experiment*, 2017;(124):55736.
- Liu G, David B, Advances in pluripotent stem cells: history, mechanims, techonologies and applications. *Springerlink*, 2019;16: 3-32.
- Lobb R, Becker M. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal Extracellular Vesicles*, 2015: 4:10:3402.
- Lois N. Marcel D. A history of the life sciences. 2002. p. 185
- Lou G, Chen Z. Mesenchymal stem cell derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Experimental&Molecular Medicine*, 2017: 49(6).e346.
- Louis C, Shohet J, Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *HHS Public Access*, 2015; 66: 49-63.
- Merchant M, Rood L, Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Iplications For Biomarker Discovery, 2018;13(12):731-749.
- Minciacchi V, Kumar, R. Chronic myeloid leukemia: a model disease of the past, present and future. *Cells*, 2021: 1081:117-121.
- Mirzaei H, Sahebkar A, Therapeutic application of multipotent stem cells. *Journal of cellular phsyiology*, 2017;233(4): 2815-2823
- Mo M, Slijander, P. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles open ecess*, 2015;4:10.3402-3407.
- Mortezaee K, Najafi M, Modulation of apoptosis by melatonin for improving cancer treatment efficiency: an updated review. *Life Sciences*, 2019;228: 228-241.
- Multhorff G, Vaupel P, Revisiting the warburg effect: historical dogma versus current understanding. *The Physiological Society*, 2020; 599(6): 1745-1757.
- Oliynyk G, Perez M, Alcolado L. Mycn-enhanced oxidative and glycolytic metabolism reveals vulnerabilities for targeting neuroblastoma. *Isience*, 2019; (22); 21: 188-204
- Ostrom Q, Fahmideh M, Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro- Oncolgy*, 2019; 21(11):1357-1375.
- Otte J, Dyberg C, Pepich A. Mycn function in neuroblastoma development. *Frontiers in Oncology*, 2020; 10: 624079.

- Palanca P, Blanco C, Fondevila F, Melatonin as an antitumor agent against liver cancer: an updated systematic review. *Antioxidants*, 2021; 10(1):103-109.
- Park J, Cheung N. Targets and antibody formats for immunotherapy of neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2020;38(16): 1836-1848.
- Park J, Eggert A, Caron H, Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2010;24(1): 65-86.
- Pegtel M, Gould S, Exosomes. *Annual review of biochemistry*, 2019;88:487-514.
- Pin L, Kaslan M, Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 2017; 7(3): 789-804.
- Pistritto G, Trisciuglio D. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Open-Access Impact Journal on Aging*, 2016; 8(4): 603-619.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends. *Pubmed*, 2013;18;200(4):373-83.
- Rios C, De Jesus O. Primitive neuroectodermal tumor. *Statpearls*, (Web page: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562165>), (Date Accessed: August 2021).
- Rippon H, Bishop A. Embryonic stem cells. *Online library*, 2004;37(1):23-34.
- Sadallah S, Eken C. Exosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clinical & experimental immunology*, 2011;163(1):26-32.
- Saenz S, Arias B. The limits of clinical findings in similar phenotypes, from capenter to atrx syndrome using a whole exosome sequencing approach: a case review. *Human Genomics*, 2021;15,49-55.
- Samsonra R, Raghunath M. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem cells translational medicine*, 2017; 6(12).2173-2185.
- Schulte J, Linder S. Mycn and alkf1174l are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cell. *Nature*, 2012; 32: 1059–1065.
- Shang Y, Guan H, Zhou F. Biological characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells and its therapeutic potential for hematological disorders. *Front Cell Dev Biology*, 2021; 9: 570179.

- Shen D, Ju L, Zhou F. The inhibitory effect of melatonin on human prostate cancer. *Cell Commun Signal*, 2021; 19:34-39.
- Si Z, Wang X. Adipose derived stem cells: sources, potency and implications for regenerative therapies. *Biomedicine& pharmacotherapy*, 2019;114:108765.
- Sidhom, K, Obi, P. 2020. a review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option?. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21(18):6466.
- Skog J, Würdinger T. Glioblastoma microvesicles transport rna and proteins that protome tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat cell biol*, 2008; 10(12):1470-6
- Skotland T, Hessvik N. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *Journal of lipid research*, 2019; 60(1):9-18.
- Sobhani A, Khanlarkhani N. Multipotent stem cell and current application. *Tehran University of medical sciences*, 2017;55(1).6-23.
- Song J, Kim O. Melatonin modulates neuronal cell death induced by endoplasmic reticulum stress under insulin resistance condition. *Nutrients*, 2017; 9(6): 593-597.
- Spees J, Lee R. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Sstem cell research&therapy*, 2016;7(1):125-131.
- Szatanek R, Krzyworzeka M. The methods of chorce for extracellular vesicles charecterization. *International journal of molecular sciences*, 2017;18(6):1153-1159.
- Talib W. Melatonin and cancer hallmarks. *Molecules*, 2018; 23(3):518-525.
- Talib W, Alyased A, Abuawad A, Daoud S. Melatonin and cancer treatment: current knowledge and future opportunites. *Molecules*, 2021; 25. 10.3390/molecules26092506.
- Tolbert V, Matthay K. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *HHS Public Access*, 2018;(372): 195-209.
- Torroella J, Khela H. Biomarkers and focused ultrasound: the future of liquid biopsy for brain tumor patients. *Journal of Neuro*, 2022;156(1):33-48.

- Touitou Y, Reinberg A, Touitou D. association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life Sciences*, 2015; 173: 94-106.
- Trela E, Glowacki S, Blasiak J. Therapy of myeloid leukemia: twilight of the imatinib era?. *ISRN Oncology*, 2014: 596483.
- Turturici G, Tinnirello R, Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *American Journal of Physiology*, 2014; 10:1152-1159.
- Urabe F, Kosaka N, Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Pubmed*, 2019; 1,318(1):C29-C30.
- Ünal A, Kaynar L, Emiroğulları H. 9. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı. Ocak 2002.
- Vimalraj S, Saravanan S, Raghunandhakumar S. Melatonin regulates tumor angiogenesis via mir-424-5p/vegfa signaling pathway in osteosarcoma. *Life Sciences*, 2020. 1;256:118011.
- Volarevic V, Markovic B. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International journal of medical sciences*, 2018: 15(1):35-45.
- Wan Z, Zhao L. Mononuclear phagocyte system blockade improves therapeutic exosome delivery to the myocardium. *Theranostics*, 2020: 10(1).218-230.
- Wang X. Stem cell in tissues, organoids and cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019;76(20): 4043-4070
- Whitford W, Guterstam P. Exosome manufacturing status. *Future science*, 2019 May;11(10):1225-1236.
- Willims E, Cabanas C. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations isolation techniques and diverse functions in cancer progression. *Frontiers in Immunology*, 2018;9:738-742.
- Wu G, Lei L. Totipotency in the Mouse. Springer. 2017: 95(7):687-694.
- Wu M, Ouyang Y, Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *PNAS*, 2017; 3:114(40):10584-10589.
- Xie Q, Liu R. What is impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment?. *Stem cell research&therapy*, 2020; 11(1):519.

- Xin H, Katakowski M, Wang F. MicroRNA cluster mir-17-92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats, 2017; 4883:747-753.
- Xu L, Wu U. Exosome an emerging source of biomarkers for human diseases. Pubmed, 2019;19(6):387-394.
- Xu X, Lai Y, Hua Z. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. Bioscience Reports, 2019 Jan 31; 39(1):21-25.
- Yamanaka S, Takahashi K, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined. Cell, 2006;126(4):663-76.
- Yanez A, Googridge H, identification and isolation of Oligopotent and lineage – committed myeloid progenitors from Mouse bone marrow. Journal of visualized experiment, 2018; (137):58061-58067.
- Yang D, Zhang W. Progress, opportunity and perspective on exosome isolation- efforts for efficient exosome based theranostics. Theranostics, 2020;10(8): 3684-3707.
- Yue B, Yang H. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNA in skeletal muscle myogenesis. Cell Proliferation, 2020; 53(7): e12857.
- Zafar A, Wang W, Liu G, molecular targeting therapies for, neuroblastoma: progress and challenges. Medicinal Research Reviews, 2021;41(2): 961-1021.
- Zakrzewski W, Dobrzynski M, 2019. stem cell: past. present and future. Springerlink, (Web page: doi: [10.1186/s13287-019-1165-5](https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5)), (Date accessed: 26 Feb 2019).
- Zerlinger E, Barta T. strategies for isolation of exosomes. CSH Protocols Cold Spring harbor Protocols, 2015; 10:1109.1110.
- Zhan X, Ashram S, Luo D. A comparative study of biological characteristics and transcriptome profiles of mesenchymal stem cells from different canine tissues. Comparative Study, 2019;20(6):1485-1487.
- Zhang Y, Bi J. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. Dovepress, 2020; 15: 6917-6934.
- Zhang Y, Bi J. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. Dovepress, 2020;15:6917-6934.
- Zhang Y, Xu J. Embryonic stem cell-derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effect of mesenchymal stem cells. Theranostics, 2019;(23):6976-6990.

Zhu, L, Sun, H, 2020. isolation and characterization of exosome for cancer research.
Journal Of Hematology Oncology, 2020:13:152.



MELATONİN VE UMBİLİKAL KORD KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ BE(2)-C NÖROBLASTOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDE TERAPÖTİK POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%6

İNTERNET KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%3

2

www.biyologlar.com

İnternet Kaynağı

%1

3

earsiv.atauni.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

4

dspace.yildiz.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

5

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<%1

6

hdl.handle.net

İnternet Kaynağı

<%1

7

78ef5166-5144-4ace-be93-42e8789b3b9f.filesusr.com

İnternet Kaynağı

<%1

8

www.scribd.com

İnternet Kaynağı

<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Ahmet ŞENGÜL

Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM

DERECE

KURUM

MEZUNİYET

Lisans Çanakkale 18 Mart Üniversitesi/ Acil Yardım ve Afet Yönetimi 2017

Lise Kadı Burhaneddin Sağlık Meslek Lisesi / Anestezi

İŞ DENEYİMLERİ

YIL

KURUM

GÖREV

2013-2022

Kayseri Şehir Hastanesi

Anestezi teknikeri

YABANCI DİL

İngilizce (Orta)