

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

MİKROAKIŞKAN SİSTEM İLE EKSOZOM
İZOLASYONU VE KANSER HÜCRELERİNİ HEDEFLEYEN
İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ

BENSU KOZAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Özge ÇEVİK

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ADÜ-TPF-23009 proje numarası ile ve TÜBİTAK tarafından 221S982 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2024

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığımdan beri bana her konuda destek olup tecrübesi ve enerjisi ile her zaman yanımda olan, bana çok emek veren, beni eğiten ve geliştiren, insanlığıyla ve bilimsel duruşuyla örnek alacağım, yollarımız kesiştiği için her zaman şanslı hissettiğim sevgili danışman hocam Prof. Dr. Özge Çevik'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu yola başlamam için ilk adımımı atmamı sağlayan ve her danışmamda yardımlarını eksik etmeyen sevgili hocam Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL'e teşekkür ederim. Bana öğrettiği her şeyle ve REDPROM'un bir üyesi yapan Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında, her koşulda yardımını esirgemeyen ve destek olan, insanlığı ve bilgisiyle her zaman örnek alacağım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ömer ERDOĞAN'a ve her şeyi paylaşabildiğim,engin bilgisi, tecrübesi ve güzel enerjisiyle çok değerli hocam Araş. Gör. Dr. Burçin İrem ABAS'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince bana çok şey katan, manevi olarak her zaman beni destekleyen yakın arkadaşlarım ADÜ REDPROM ailesinin her bir üyesine ayrı ayrı teşekkürler ederim.

Çalışmalarım boyunca beraber yol aldığımız tüm arkadaşlarıma ve ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Emeklerini ve haklarını ödeyemeyeceğim sevgili aileme teşekkürü borç bilirim. Bana her zaman güvenen, motivasyonunu duasını, güzel enerjisini eksik etmeyen canım annem Sibel KOZAN'a, çok zor zamanlarında bile hep destek olan sevgili babam Yılmaz KOZAN'a, tüm güzel enerjisi ve neşesiyle bana motivasyon veren sevgili kardeşim Yamaç KOZAN'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri	7
2.1.3. Meme Kanseri Tehşisi	8
2.1.4. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	10
2.1.4.1. Luminal Meme Kanseri	11
2.1.4.2. HER2 Pozitif Meme Kanseri	12
2.1.4.3. Normal Benzeri Meme Kanseri	12
2.1.4.4. Claudin-düşük Meme Kanseri	12
2.1.4.5. Bazal Benzeri Meme Kanseri	13
2.1.4.6. Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC)	13
2.1.4.6.1. TNBC Alt Sınıflandırması	14
2.2. Meme Kanseri Tedavileri	15

2.2.1. Cerrahi	16
2.2.2. Radyoterapi.....	16
2.2.3. Hormonal Tedavi.....	17
2.2.4. Hedefe Yönelik Tedavi.....	17
2.2.4.1. İmmünoterapi	18
2.2.5. Kemoterapi	19
2.2.5.1. Taksanlar- Paklitaksel (Taxol®)	20
2.2.5.2. Paklitaksel Etki Mekanizması	22
2.3. Ekstrasellüler Veziküller ve Sınıflandırılması.....	24
2.4. Eksozomlar, Yapısı ve Bileşimi	25
2.4.1. Eksozomların Biyogenezi.....	27
2.4.2. Eksozomların Alıcı Hücreler Tarafından Alınması.....	30
2.4.3. Eksozomların Biyolojik İşlevleri.....	32
2.4.4. Eksozomların İzolasyonu	41
2.4.5. Eksozomların Karakterizasyonu.....	43
2.4.6. Eksozomlara İlaç Yükleme Teknikleri.....	45
2.4.7. T hücreleri ve Eksozomlar.....	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	54
3.1. GEREÇ	54
3.1.1 Kullanılan Malzemeler	54
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	55
3.2. Yöntem	56
3.2.1. Hücre Kültürü.....	56
3.2.1.1. MDA-MB-231 Hücrelerinin Büyütülmesi, Çoğaltılması, Pasajlanması ve Dondurulması	57

3.2.1.2. Jurkat Hücrelerinin Büyütülmesi, Çoğaltılması, Pasajlanması ve Dondurulması	58
3.2.1.3. Hücrelerin Sayımı.....	58
3.2.2. Jurkat Hücrelerinden Eksozom Salınması ve İzolasyonu.....	59
3.2.3. Eksozom Boyut Ölçümü.....	60
3.2.4. Eksozomların Yüzey Belirteçlerinin Kontrolü	61
3.2.4.1. SDS-PAGE Elektroforezi	61
3.2.4.2. Blotlama İşlemi	62
3.2.5. Eksozomlara Paklitaksel Yüklenmesi	63
3.2.6. Exo-PTX Etkilerinin Belirlenmesi	64
3.2.6.1. MTT ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	64
3.2.6.2. Exo-PTX'ın MDA MB-231 Hücrelerinde Gen Ekspresyon Değişiklikleri ..	64
3.2.6.2.1. Total RNA izolasyonu ve Komplementer DNA (cDNA) sentezi	65
3.2.6.2.2. RT-PCR	67
3.2.6.3. Akış Sitometri ile Apoptozun Belirlenmesi	69
3.2.6.4. Mitokondrial Membran Potansiyelinin Belirlenmesi	69
3.2.6.5. Hücre Migrasyon Analizi	70
4. BULGULAR	72
4.1. Mikroakışkan Sistem Prototipi	72
4.2. Eksozomların Boyut ve Dağılım Sonucu	73
4.3. Eksozomların Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi	73
4.4. Hücre Canlılığı Sonuçları	74
4.5. JC-1 ve Annexin V-FITC-PI Bağlanma Sonuçları.....	76
4.6. Transwell Migrasyon Analizi	78
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	90

KAYNAKLAR.....	91
BİLİMSEL ETİK BEYANI	105
ÖZGEÇMİŞ.....	106



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	: Atomik güç mikroskopisi
BC	: Meme Kanseri
BL	: Bazal benzeri meme kanseri
CD47	: Tetraspanin 47
CD63	: Tetraspanin 63
CD81	: Tetraspanin 81
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CXCL12	: Kemokin ligand 12
CXCR4	: Kemokin reseptörü tip 4
DGUC	: Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DUC	: Diferansiyel ultrasantrifüjleme
ELISA	: Enzime bağlı immünosorbent tahlili
EMT	: Epitelyalden mezenkimal geçiş
ER	: Östrojen reseptörü
ESCRT	: Endozomal ayırma kompleksi
EV	: Ekstrasellüler veziküller

EXO	: İlaç yüklemesi yapılmayan eksozom
EXO-PTX	: Paklitaksel yüklü eksozom
FBS	: Fetal bovin serum
FCS	: Akış sitometrisi
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
HER 2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü iki
ILV	: İntralüminal veziküller
IM	: İmmünomodülatör meme kanseri
KBB	: Kan beyin bariyeri
LAR	: Luminal androjen reseptörü meme kanseri
M	: Mezenkimal meme kanseri
MF	: Mikroakışkan
MHC	: Majör doku uyumluluk kompleksi
MSL	: Mezenkimal kök benzeri meme kanseri
MTA	: Mikrotübül hedefleme ajanı
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MVB	: Multiveziküler cisimcikler
NTA	: Nanoparçacık izleme analizi
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PD-1	: Programlanmış hücre ölümü 1

PR	: Progesteron reseptörü
PTX	: Paklitaksel
RNA	: Ribo Nükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SEC	: Boyut dışlama kromatografisi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SIRPα	: Sinyal düzenleyici protein alfa
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri
UC	: Ultrasantrifüj
WB	: Western Blot
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. GLOBOCAN, 2022 verilerine göre Dünya genelinde 2022’de çeşitli kanser türlerinin her yaştaki (0-85) kadınlarda vaka görülme sıklığı.	5
Şekil 2. GLOBOCAN, 2022 verilerine göre Dünya genelinde 2022’de çeşitli kanser türlerinin her yaştaki (0-85) kadınlarda ölüm oranı	5
Şekil 3. GLOBOCAN, 2022 verilerine göre Türkiye’de 2022’de çeşitli kanser türlerinin her yaşta (0-85) kadınlarda vaka görülme sıklığı	6
Şekil 4. GLOBOCAN, 2022 verilerine göre Türkiye’de 2022’de çeşitli kanser türlerinin her yaşta (0-85) kadınlarda ölüm sıklığı.....	6
Şekil 5. İmmünohistokimyasal analiz baz alınarak meme kanserinin alt tiplendirmesi ..	11
Şekil 6. Üçlü negatif meme kanseri alt tiplendirmesi, karakteristik özellikleri ve bu alt tipleri temsil eden hücre hatları.....	14
Şekil 7. Erken evre BC ve Metastatik/ileri BC tedavisinde özet şema	20
Şekil 8. Paklitakselin kimyasal yapısı	21
Şekil 9. Mikrotübül dinamiğinin fizyolojik ve paklitakselin mikrotübül stabilitesini artırması ile meydana gelen patolojik durumu	23
Şekil 10. Kanser hücrelerinde paklitaksel etki mekanizması	24
Şekil 11. EV'lerin üç ana sınıflandırılması.....	25
Şekil 12. Eksozom yapısı ve bileşenleri	27
Şekil 13. Eksozom biyogenezi	29
Şekil 14. Eksozomların hücre alım yolları.....	32
Şekil 15. Eksozomların biyolojik işlevleri	33
Şekil 16. Farklı kanser türlerinde tümör kaynaklı eksozomların taşıdıkları protein ve RNA biyobelirteçlerinin özeti.....	38
Şekil 17. Doğal ve modifiye edilmiş hedefli eksozomların ilaç taşıyıcıları olarak kullanılması	40
Şekil 18. Eksozom izolasyon yöntemleri	43
Şekil 19. Eksozom karakterizasyonu için kullanılan yöntemler	44
Şekil 20. Eksozomlara çeşitli ilaç yükleme yöntemleri	47

Şekil 21. Eksozomların çeşitli dağıtım kargolarının eksozom yapısında bulunma yerleri	50
Şekil 22. T hücrelerinden salgılanan tipik bir eksozomun yapısı ve bileşenleri	53
Şekil 23. Jurkat eksozom izolasyonunun şematik gösterimi.	60
Şekil 24. Mikroakışkan sistem prototipi, ayırıştırma kanalları ve akustik ayırıştırma modülünün mikroskop altındaki görüntüleri.	72
Şekil 25. Eksozom boyut ve dağılım sonucu.	73
Şekil 26. Eksozomların western blot ile karakterizasyonu.	74
Şekil 27. MTT ile PTX hücre canlılık sonuçları	75
Şekil 28. MTT ile Exo-PTX hücre canlılık sonuçları	75
Şekil 29. PTX ve Exo-PTX 'in MDA-MB-231 hücreleri üzerinde etkisinin mikroskopta gösterimi	76
Şekil 30. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V-FITC-PI bağlanma sonuçları	77
Şekil 31. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde JC-1 analiz sonuçları.....	78
Şekil 32. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre migrasyon analiz sonuçları	79
Şekil 33. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde CXCR4 gen ekspresyon analiz sonuçları.	80
Şekil 34. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde CXCL12 gen ekspresyon analiz sonuçları.	80

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Hücre kültürü çalışmaları.....	56
Resim 2. MDA-MB-231 hücrelerinin sırasıyla 10X ve 20X büyütmede ışık mikroskobu görüntüleri.	57
Resim 3. Jurkat hücrelerinin sırasıyla 10X, 20X, 40X büyütmede ışık mikroskobu görüntüleri	58
Resim 4. Otomatik hücre sayacı kullanılarak hücrelerin sayımı.....	59
Resim 5. Eksozom izolasyon çalışmaları.....	60
Resim 6. Eksozom boyut ölçümünde kullanılan cihaz.	61
Resim 7. Western blot deney aşamaları	62
Resim 8. İlaç yükleme çalışmalarında kullanılan elektroporatör cihazı.	63
Resim 9. RNA düzeylerinin nanodrop cihazında ölçümü.....	65
Resim 10. cDNA sentezi için inkübasyon koşulları.....	66
Resim 11. cDNA düzeylerinin nanodrop cihazında ölçümü.....	67
Resim 12. RT-PCR deney düzeneğinin görüntüsü.	68
Resim 13. Migrasyon deneyi düzeneği, boyama işlemleri ve görüntülenmesi.....	71

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. 2022'den 2040'a kadar her iki cinsiyet her yaş grubu için (yaş kümesi 0-85) tahmini ölüm ve tahmini yeni vaka sayısı veri seti	4
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan malzeme ve kimyasal listesi	54
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazların listesi.	55
Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği.	66
Tablo 5. RT-PCR analizi için kullanılan reaksiyon içeriği.	67
Tablo 6. RT-PCR inkübasyon koşulları.	68
Tablo 7. RT-PCR deneyinde kullanılan primerlerin sekansı.	68

ÖZET

MİKROAKIŞKAN SİSTEM İLE EKSOZOM İZOLASYONU VE KANSER HÜCRELERİNİ HEDEFLEYEN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ

Kozan B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: Meme kanserinde, üçlü negatif meme kanseri agresif ve klinik kötü prognoza sahip alt tipidir. Eksozomlar, hücrelerin haberleşmek amacıyla doğal olarak üretildikleri küçük boyutlu veziküller olup ilaç taşıyıcı sistem olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada Jurkat T-hücrelerinden salgılanan eksozomların mikroakışkan (MF) sistemle izole edilebilirliği ve eksozomlara paklitaksel (PTX) yüklemesinin meme kanseri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Jurkat T-hücrelerinden eksozomlar salımı uyarılarak MF ve ultrasantrifüj ile izolasyonları yapıldı. Eksozomların boyut analizleri ve karakterizasyonları (CD63 ve CD81) yapıldıktan sonra elektroporasyonla PTX yüklendi. MDA-MB-231 hücreleri üzerinde Exo-PTX'in hücre canlılığı MTT yöntemi, apoptotik etkisi Annexin V-FITC-PI ve JC-1 boyaması ile flowsitometride analiz edildi. Exo-PTX'in migrasyon üzerindeki etkisi Boyden Chamber yöntemi ile ve kemokinler üzerindeki rolü CXCR4/CXCL12 gen ekspresyon analizi ile belirlendi.

Bulgular: Jurkat T hücrelerinden izole edilen eksozomların boyutlarının 100 nm altında olduğu ve CD63 ve CD81 belirteçlerini taşıdığı belirlendi. Exo-PTX'in (10µg/mL) ve PTX'in (15 nM) ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılıklarını anlamlı bir şekilde azalttığı, erken ve geç apoptozda ise anlamlı bir artış olduğu, migrasyon yeteneklerinin azaltığı CXCR4/ CXCL12'nin gen ekspresyon düzeylerini baskıladığı belirlendi.

Sonuç: T lenfositleri gibi süspanse olan hücrelerin MF sistemlerde sabit boyutta eksozom izolasyonu büyük avantaj sağlayabilir. Jurkat eksozomları kemoterapik ajanların etkinliklerini korumaları ve hücre içerisine girişini sağlamak için metastazik kanserlerin tedavisinde kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Eksozom, Jurkat T hücresi, Meme Kanseri, Mikroakışkan sistem, Paklitaksel



ABSTRACT

EXOSOME ISOLATION WITH MICROFLUIDIC SYSTEM AND DEVELOPMENT OF DRUG CARRIER SYSTEM TARGETING CANCER CELLS

Kozan B. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences Molecular Biotechnology Program, Master's Thesis, Aydın, 2024.

Objective: In breast cancer, triple negative breast cancer is an aggressive subtype with a poor clinical prognosis. Exosomes are small-sized vesicles produced naturally by cells for communication purposes, and they also attract attention as a drug carrier system. This study aimed to investigate the isolation of exosomes secreted from Jurkat T cells with a microfluidic (MF) system and the effects of paclitaxel (PTX) loading on exosomes on breast cancer.

Materials and methods: Exosomes were isolated from Jurkat T-cells by stimulating exosome release using MF and ultracentrifugation. After size analysis and characterization (CD63 and CD81) of exosomes were performed, PTX was loaded by electroporation. Cell viability of Exo-PTX on MDA-MB-231 cells was analyzed by MTT method, and its apoptotic effect was analyzed by flow cytometry with Annexin V-FITC-PI and JC-1 staining. The effect of Exo-PTX on migration ability was determined by the Boyden Chamber method and its role on chemokines was determined by CXCR4/CXCL12 gene expression analysis.

Results: Exosomes isolated from Jurkat T cells were determined to be below 100 nm in size and carry CD63 and CD81 markers. Exo-PTX (10µg/mL) and PTX (15 nM) and above concentrations significantly reduced cell viability, there was a significant increase in early and late apoptosis, decreased migration abilities and suppressed the gene expression levels of CXCR4/CXCL12 determined.

Conclusion: Isolation of exosomes of fixed size in MF systems from suspended cells such as T lymphocytes can offers an advantage. Jurkat exosomes can be used in the treatment of metastatic cancers to maintain the effectiveness of chemotherapeutic agents and ensure their entry into the cell.

Keywords: Exosome, Jurkat T cell, Breast Cancer, Microfluidic system, Paclitaxel



1. GİRİŞ

Meme kanseri (BC) dünyanın her ülkesinde kadınlarda en yaygın olmanın yanı sıra kanser kaynaklı ölümlerden önde gelenidir. Bu istatistiği değiştirmek için, ilk adım kadınların meme kanseri hakkında bilinçlendirilmesidir. Bununla birlikte, meme kanserinin tespitinden tedavisine kadar yeni yöntemlerin, öngörücü ve prognostik faktörlerin aranması için yeni çalışmalar ihtiyaç duyulmaktadır (Smolarz ve diğerleri, 2022). BC, klinik görünümleri, moleküler özellikleri, davranışları ve terapötik yanıt açısından farklılıklar gösteren geniş spektrumlu tümörleri içerir. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü iki (HER2) reseptörlerine sahip olmaması nedeniyle hormonlarla hedeflenemeyen, diğer alt tiplere göre daha agresif davranışlar sergileyen, daha kötü prognoz klinik seyrine sahip BC alt tipidir (Das ve diğerleri, 2023). TNBC için hedefe yönelik strateji yoktur ve kemoterapi standart tedavi olarak kabul edilir (Uscanga-Perales ve diğerleri, 2016). Taksanlar grubu en çok kullanılan kemoteraptiklerdir ve metastatik, erken evre BC ve TNBC hastalarında ilk başvuru tedavidir. Kemoterapinin en büyük sınırlayıcısı tedavi ile ortaya çıkan ağır yan etkilerdir.

PTX , mitoz bölünmenin inhibisyonunu ile kanser hücrelerinin ölmesini tetikleyebilen uzun süredir klinikte kullanılan mikrotübül hedefleme ajanıdır (MTA) (Zhao ve diğerleri, 2022). PTX mikrotübül stabilizasyona bağlı olarak mitotik tutuklamayı ve ardından hücre ölümünü indükler (Gallego-Jara ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte PTX hücre içi taşıma veya göç gibi mitozdan bağımsız fonksiyonları da etkileyerek bölünmeyen hücreler için de öldürücü olabilir (Čermák ve diğerleri, 2020). Bu nedenle geleneksel tedavi PTX'in spesifikliğinin ve seçiciliğinin artırılması, BC tedavisinin yönetiminde güncel bir bilimsel araştırma alanını temsil eder. BC hücrelerini hedef alan yeni taşıyıcıların geliştirilmesinde ilerleme kaydedilmelidir (Samaan ve diğerleri, 2019).

Eksozomlar hücre dışı veziküllerin (EV) en küçük üyesidir. Eksozomlar, çift lipit katmanlı ve organel taşımayan sitozole sahip DNA, RNA, proteinler ve lipitler gibi çeşitli kargo taşıyıcılarıdır. İçerdikleri kargolar donör hücrelerin metabolik durumunun canlı göstergesi olmakla beraber görev aldıkları roller taşıdıkları kargoları alıcı hücrelere aktarma yeteneklerine bağlıdır.

Mevcut bilgilerle eksozomların fizyolojik süreçlerde, kanserlerin gelişimi ve yayılması gibi patolojik süreçlerde görev aldıkları bilinmektedir (Gurunathan ve diğerleri, 2019; Gurung ve diğerleri, 2021). İlaç dağıtım sistemlerine yeni eklenen eksozomlar gösterdikleri minimum toksisite, düşük immünojenite, iyi biyoyararlanım, içerdikleri kargoları membran yapıları sayesinde bozunmadan korumaları, hücre/organ tropizmi sebebiyle potansiyel çalışma alanı olmuştur (Lim ve Kim, 2019). TNBC doğası sebebiyle metastas yapmasıyla bilinir. Beyne sıçrama yaşandıysa kemoterapiklerin kullanımı daha da sınırlayıcıdır çünkü çoğu KBB'yi geçemezler (Banerjee ve Rajeswari, 2023). Eksozomlar bariyerlerin üstesinden gelirler. Literatür, immün hücrelerinin fizyolojik ve hastalık durumunda immün düzenleyicileri olarak görev yapacak olan eksozomları sekrete ettiğini göstermiştir (Li ve diğerleri, 2019). Eksozomların immün tepkisini düzenleyen molekülleri taşıyarak bağışıklık düzenleyici görevleri üstlenirler (Lim ve Kim, 2019). T hücresinden üretilen eksozomlar, ana hücrelerin işlevini mimikri yaparak kanser immünoterapisinde antitümör işleve katkı sağladığı belirlenmiştir. Bu sebeple, T hücresi eksozomları kanserde etkili tedavi için potansiyeldir (Wang ve Shi, 2022; Zhou ve diğerleri, 2023).

Eksozomların elde edileceği kaynak, seçilen izolasyon yöntemi eksozomların etkinliği üzerinde büyük öneme sahiptir. Eksozomlar için bir çok saflştırma yöntemleri olsa bile bunların içinde tek bir yöntemin yüksek saflık ve verimde eksozomları elde etmesi zordur. Saflştırma sonrasında büyük ölçekli uygulamalarda kullanılmak üzere yüksek kalitede eksozomların eldesi için saflştırma tekniklerinin geliştirilmesi bir ihtiyaçtır. Bu noktada devreye mikroakışkan sistemler girer. Mikroakışkan sistemler eksozomların fizikokimyasal özelliklerini kullanarak mikro ölçeklerde izolasyonlarını yapan gelişmiş bir tekniktir (Omranı ve diğerleri, 2024). Mikroakışkan sistemlerle, tek bir çip üzerinde yapılan eksozom ayırma, yerinde tespit ve analiz örnek kaybını azaltarak, yüksek verimde ve saflıkta eksozom eldesi sağlayabilir (Kimiz-Gebologlu ve Oncel, 2022).

Bu tez çalışmasında, kemoterapi ajanının Jurkat hücrelerinden sekrete edilen eksozomlara yüklenebilirliği ve kanser hedefli nanotaşıyıcı potansiyeli araştırıldı. Eksozomların en büyük geliştirme alanı olan eksozom saflştırması konusunda tasarlanan mikroakışkan sistem potansiyel aday olarak araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri (BC) kadınlarda sık görülen, başlıca genetik, çevresel ve yaşam tarzı bileşenlerini içeren çok faktörlü kötü huylu maligniteden biridir. Görülme sıklığından dolayı küresel halk sağlığı açısından önemli bir sorun haline gelmiştir. Meme kanseri, meme hücrelerinde başlayan ve zamanla kontrolden çıkıp kötü huylu tümöre dönüşen bir grup kanser hücresidir. Bu kanser hücresi topluluğu istilacı olup yakındaki dokuya yayılma kabiliyetine sahiptir. Meme hücrelerini büyümelerini veya normal şekilde davranmalarını engelleyen ve meme karsinogenezine yönlendiren moleküler düzeyde değişikliklere uğrayabilir. Meme kanserinin alt grupları da bu değişikliklere göre sınıflandırılır. Bu değişiklikler iyi huylu yada kötü huylu tümörlerle sonuçlanabilir. Kanserli olmayan meme rahatsızlıkları atipik hiperplazi ve kistler bu değişikliklerden kaynaklanabilir. Ayrıca intraduktal papillomlar gibi iyi huylu tümörlere de neden olabilirler. Ancak meme kanseri meme hücrelerindeki bu değişikliklerden kaynaklanabilir (Obeagu ve Obeagu, 2024).

Meme kanserinin bir çok alt tipi vardır. Tipik olarak sütü bezlerden meme ucuna taşıyan süt kanallarında; duktal karsinom alt tipi yada memenin süt üreten lobüllerinde; lobüler karsinom alt tipi başlar (World Health Organization [WHO], 2024). Kanser hücrelerinin en erken formu in situdur ve yakın dokulara yayılmayıp, ortaya çıktığı bölgede dururlar. Bu noktada erken teşhis edilebilirler. Kanser hücreleri istilacı bir davranış sergileyip yakındaki dokulara yayılabilirler. Metastaz, hayatı tehdit edici invaziv kanser davranışdır ve meme dokusu yakınlarındaki lenf düğümleri ve yakın organlara yayılım gösterebilir (WHO, 2024). Meme kanseri daha az yaygın biçimlerde de kendini gösterebilir. Bunlar üçlü negatif meme kanserini (TNBC), meme Paget hastalığını ve inflamatuvar meme kanserini içerir. Nadir görülen meme kanserleri de Hodgkin olmayan lenfoma ve yumuşak doku sarkomudur (Obeagu ve Obeagu, 2024).

2.1.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünyanın her ülkesinde kadınlarda en yaygın olanı olmasının yanı sıra kanser kaynaklı ölümlerden önde gelenidir. Erkeklerde meme kanseri vakaları çok nadirdir (yaklaşık %0.5-1) ve ortalama tanı yaşı 67’dir. (WHO,2024; Łukasiewicz ve diğerleri, 2021). Meme kanseri, 2022’de 670.000 ölüme sebep olmuştur ve her iki cinsiyetten toplam 2.3 milyon yeni vaka tanımlanmıştır. Bununla birlikte Dünya genelinde 185 ülkeden 157’sinde kadınlarda en sık teşhis edilen kanser olmuştur (WHO, 2024; Arnold ve diğerleri, 2022) . Meme kanserlerinin yaklaşık yarısı, cinsiyet ve yaş dışında herhangi bir spesifik risk faktörü olmayan kadınlarda görülür. Meme kanseri ergenlik dönemi sonrasında her yaşta kadında görülebilir ancak ilerleyen yaşlarda bu oran artış gösterir (WHO, 2024).

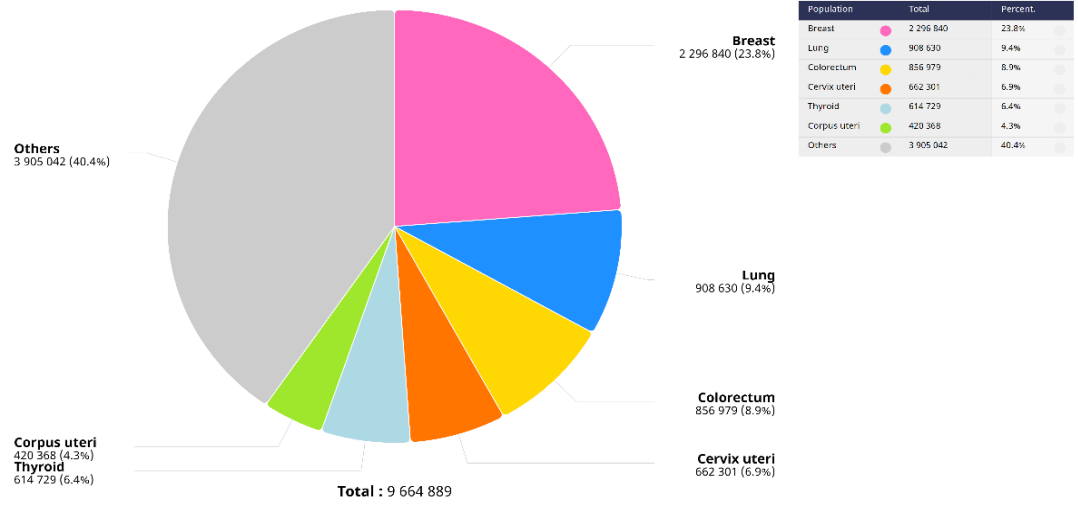
Meme kanseri %36’lık oranla onkoloji hastaları arasında hafife alınmayacak bir yer kaplar. Dünya çapında vakaların yaklaşık yarısı demografik olarak Kanada, Amerika Birleşik Devletleri gibi yüksek gelirli ve gelişmiş ülkelerdedir (Smolarz ve diğerleri, 2022). Görülme sıklığı (insidans) gelişmiş bölgelerde yüksek orandadır, ölüm oranı ise (mortalite) 2020 yılında Asya ve Afrika ülkeleri toplam ölümlerin,% 63’ünü oluşturur (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021). Meme kanserinin geleceği için, Küresel Kanser Gözlem Verisi (GLOBOCAN) veri tabanı baz alınarak 2040 yılında 3 milyondan fazla yeni vaka ve 1 milyona kadar ölüm oranı olarak tahmin edilmektedir (Arnold ve diğerleri, 2022). 2040 yılına kadar Dünyada ve Türkiye’de tahmini yeni vaka sayısı ve tahmini ölüm oranlarındaki artış Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. 2022'den 2040'a kadar her iki cinsiyet her yaş grubu için (yaş kümesi 0-85) tahmini ölüm (mortalite) ve tahmini yeni vaka sayısı (insidans) veri seti (Global Cancer Observatory [GCO], 2024).

	POPÜLASYON	YILLIK POPÜLASYON		SAYI		DEĞİŞİM ORANI
		2022	2040	2022	2040	
2022- 2040 tahmini ölüm (mortalite) veri seti	TÜRKİYE	43 330 753	46 587 483	7 360	10 885	+47.9 %
	DÜNYA	3 912 335 034	4 588 201 988	666 103	976 297	+46.6 %
		2022	2040	2022	2040	
2022- 2040 tahmini yeni vaka sayısı (insidans) veri seti	TÜRKİYE	43 330 753	46 587 483	25 249	33 113	+31.1%
	DÜNYA	3 912 335 034	4 588 201 988	2 296 840	3 158 168	+37.5 %

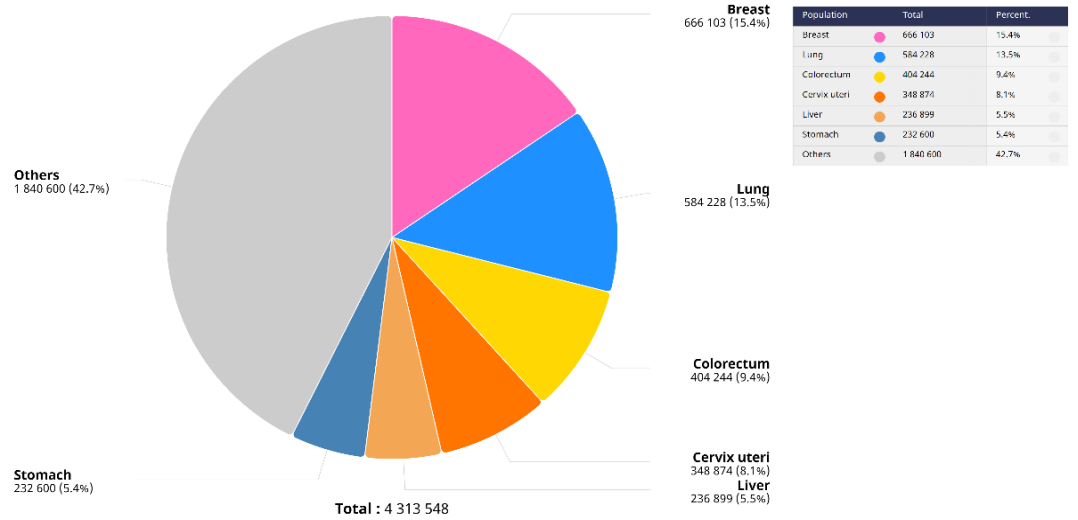
GLOBOCAN 2022 verilerine göre Dünyada'ki kanser türleri arasında meme kanseri vaka görülme sıklığı %23.8'lik, ölüm sıklığı %15.4'lük bir oran kaplamaktadır (Şekil 1 ve 2). GLOBOCAN 2022 verilerine göre Türkiye'deki kanser türleri arasında meme kanseri vaka görülme sıklığı %23.5'lik, ölüm sıklığı %15.6'lük bir oran kaplamaktadır (Şekil 3 ve 4).

Absolute numbers, Incidence, Females, in 2022
World



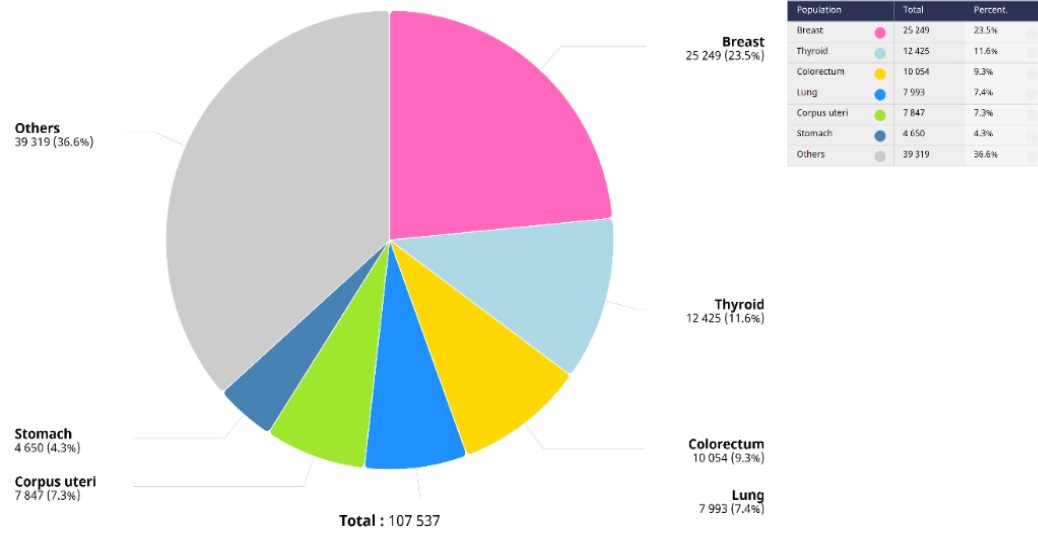
Şekil 1. GLOBOCAN, 2022 verilerine göre Dünya genelinde 2022'de çeşitli kanser türlerinin her yaştaki (0-85) kadınlarda vaka görülme sıklığı (insidans) (GCO, 2024).

Absolute numbers, Mortality, Females, in 2022
World



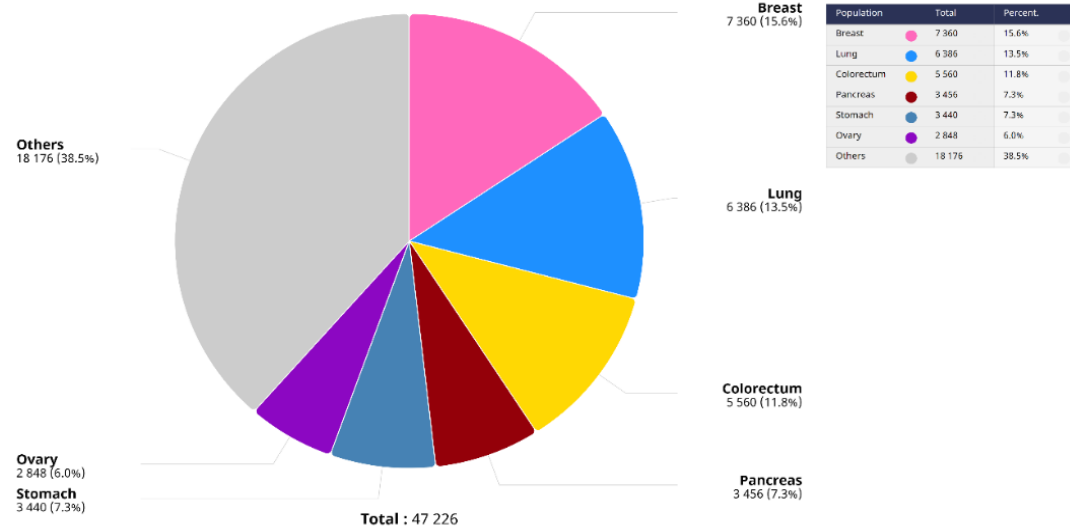
Şekil 2. GLOBOCAN, 2022 verilerine göre Dünya genelinde 2022'de çeşitli kanser türlerinin her yaştaki (0-85) kadınlarda ölüm oranı (mortality) (GCO, 2024).

Absolute numbers, Incidence, Females, in 2022
Türkiye



Şekil 3. GLOBOCAN, 2022 verilerine göre Türkiye’de 2022’de çeşitli kanser türlerinin her yaşta (0-85) kadınlarda vaka görülme sıklığı (insidans) (GCO, 2024).

Absolute numbers, Mortality, Females, in 2022
Türkiye



Şekil 4. GLOBOCAN, 2022 verilerine göre Türkiye’de 2022’de çeşitli kanser türlerinin her yaşta (0-85) kadınlarda ölüm sıklığı (mortality) (GCO, 2024).

Meme kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranları dünyanın her bölgesinde giderek artış göstermektedir. Bu istatistiğini değiştirmek için, temel adım kadınların meme kanseri semptomları ve riskleri, önleyici davranışlar hakkında bilinçlendirilmesidir. Böylece mevcut kanser ilerlemeden erken ve zamanında teşhis sağlanabilir. Bununla birlikte, meme kanserinin tespit ve tedavisinde yeni yöntemlerin, öngörücü ve prognostik faktörlerin aranması için yeni çalışmalar ihtiyaç vardır (Smolarz ve diğerleri, 2022).

2.1.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Kadınlarda meme kanserine yakalanma riski erkeklere oranla açık ara daha fazladır. Kansere yakalanma şansını arttıran her şey risk faktörüdür, bu iç ve dış faktörler kanserleşmeye katkıda bulunurlar. Bu risk faktörlerinden birine sahip olmayan kadınlarda da meme kanseri gelişebilmektedir. Meme kanserlerinin %5-10'u genetik mutasyonlar ve aile öyküsüne, %20-30'u ise değiştirilebilen faktörlere bağlanabilir (Obeagu ve Obeagu, 2024).

Erken tespit, klinik önleme ve etkin tedavi için bu risk faktörlerini incelemek önemlidir. Risk faktörleri şu şekilde sıralanabilir:

Bireyin meme kanseri hikayesi ve aile geçmişi: Geçmişte meme kanserine yakalanmış kadınlarda kanserin tekrar nüksetme riski yüksektir. Yakın akrabalarda meme kanserinin varlığı, riski artırır. Ortak yaşam tarzı, ebeveynlerden aktarılan genetik yada bu faktörlerin birleşimi meme kanseri için kaynaktır. Ancak meme kanseri tanısı alan kadınların çoğunda bilinen aile öyküsü yoktur (Obeagu ve Obeagu, 2024; WHO, 2024;).

Genetik Mutasyonlar: Çeşitli genetik mutasyonlar artan meme karsinogenezi riskiyle yüksek oranda bağlantılıdır (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021). Belirli genler mutasyonları ile meme kanserine zemin hazırlarlar. Ebeveynlerde sahip oldukları kalıtsal gen mutasyonlarını sonraki nesile aktarabilir. Diğer kadınlarla karşılaştırıldığında, bu kalıtsal mutasyonları taşıyanların, yaşamlarının erken dönemlerinde meme kanserine yakalanma riskleri daha yüksektir (Obeagu ve Obeagu, 2024). Meme kanserlerinin % 90'dan fazlası sporadik somatik mutasyonlar nedeniyle oluşur ve yalnızca %5-10 kalıtsal gen mutasyonlarından kaynaklanır. Bu, kanserle ilişkili yüksek penetrasyonla karakterize edilen ve tümör baskılayıcı olarak bilinen iki ana gen, Meme kanseri A1 (BRCA1) ve Meme kanseri A2 (BRCA2) mutasyonlarıdır. Bu gen mutasyonları meme kanseri hastalarının %3-5'inde görülür. BRCA1 gen ürünü genom stabilitesi sağlar ve mutasyonu üçlü negatif kanserle ilişkilidir. BRCA1, BRCA2 gen ürünü ile birlikte, çift DNA iplikçik kırıklarının onarılmasında rol oynar. BRCA2 geni mutasyonları östrojen reseptörüyle eksprese edilen meme kanseriyle ilişkilidir (Smolarz ve diğerleri, 2022; Łukasiewicz ve diğerleri, 2021) Kalıtımla bu iki gen mutasyonlarından birini alan kadınların yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski %85'tir (Obeagu ve Obeagu, 2024).

BRCA genleri dışında yine yüksek ve orta penetrantlı meme kanseri genleri arasında tümör proteini 53 (TP53) , fosfotaz ve tensin homologu (PTEN), serin/treonin kinaz (ATM) , kadherin 1 (CDH1), BRIP, kontrol noktası kinaz-2 (CHEK2) genlerinde görülen mutasyonlarda

meme kansinojenezine yatkınlık gösterir. Bu mutasyonların taşıyıcılarının bu malign tümörü geliştirme riski 2-3 kat daha fazladır (Smolarz ve diğerleri, 2022; Łukasiewicz ve diğerleri, 2021).

Üreme ve Hormonal Risk: Kadın cinsiyeti en önemli meme kanseri riskidir. (WHO,2024) . Östrojenler meme kanseri gelişiminin patogeneğinde önemli bir rol oynar. Bazı meme kanseri türleri, hormona bağımlıdır. Yüksek östrojen ve progesteron seviyelerine uzun süre maruz kalmak, kansere yakalanma olasılığını yükseltir (Smolarz ve diğerleri, 2022). Menapoz süreci yumurtalıkların östrojen ve progesteron hormonlarını üretmeyi bırakması ve vücudun hormon düzeyi düşmeye başlaması ile başlar. Bu da adet döngüsünün durması ile sonuçlanır. Ancak geç menapoza girmekle (55 yaş sonrası) birlikte, hücreler bu hormonlara daha uzun süre maruz kalır ve buda meme kanseri riskini artırır (Obeagu ve Obeagu, 2024).

Yaş: İlerleyen yaşla birlikte biriken hücresel değişim ve potansiyel karserojenlere maruz kalma süresi, meme kanserine yakalanma olasılığını artırır. Meme kanserinin görülme sıklığındaki artış tüm yaş gruplarını kapsar ancak en yaygın demografik grup 50-69 yaş arası kadınlardır (Obeagu ve Obeagu, 2024; Smolarz ve diğerleri, 2022) . Meme kanseri hastalarının yaklaşık %80'i 50 yaşın ve bunun yarısı da 65 yaşın üzerindeki bireylerden oluşur. Kanser moleküler bir alt tipi olan üçlü negatif meme kanseri en sık 40 yaşın altındaki gruplarda görülürken, 70 yaş ve üstü bireylerde luminal A alt tipi daha çok görülür (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021).

Ayrıca obezite (yüksek vücut kitle indeksi), alkol ve sigara gibi zararlı alışkanlıklar, yanlış diyet, önceden radyasyona maruz kalma meme kansinojenezine katkı sağlar ve olasılığı artırır (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021).

2.1.3. Meme Kanseri Tehşisi

Kanser erken evrelerinde herhangi bir semptom hissedilmeyebilir. Ancak erken teşhis hayatta kalma şansını artırır. Bu sebeple bireyin meme kanserine yatkınlığı olsun yada olmasın meme kanseri tarama programlarının önemi büyüktür. Meme kanserinin yaygın klinik görünümü genellikle kendi kendine muayene sırasında ele gelen meme kitlesidir ancak meme kitlelerinin hepsi kanser değildir. Erken evrelerde lokal ağrı ve meme ucundan gelen akıntı semptom olarak hissedilebilir.

Ancak kanser ilerlemişse yada metastaz durumunda göğüste şişlik, memenin boyutunda, şeklinde veya görünümünde değişiklik, kilo kaybı, kemik ağrısı gibi birden fazla semptom kombinasyonu hissedilebilir (Li ve diğerleri, 2021;WHO,2024).

Meme kanseri doğası gereği lenfatik ve hemolojik olarak yayılma eğilimindedir ve metastazında en yaygın tespit edilen yayılma bölgesi koltuk altındaki lenf düğümleridir. Zamanla kanserli hücreler beyin, akciğerler, kemikler ve karaciğer dahil yakın iç bölgelere yayılım gösterebilir (Obeagu ve Obeagu, 2024; WHO,2024).

TNBC tanısı için prosedür 2 aşamalıdır: Görüntüleme ve immünohistokimya (IHC).

1. Mamografi: Mamogram düşük radyasyon dozları uygulayarak memenin görüntüsünü oluşturan bir röntgen cihazıdır (Bhushan ve diğerleri, 2021). Tarama ve tanı için kullanılabilir. Taramada, semptomlar ortaya çıkmadan önce erken evrede tespit için yapılır. Tanıda, hissedilebilen semptomlar örneğin memede bir şişlik yaşaması durumunda kalsifikasyonların (beyaz lekeler), büyümenin veya tümör kitlesi varlığının tespit edilmesinde kullanılır (Bhushan ve diğerleri, 2021; Dass ve diğerleri, 2021). Mamografi taramasında şüpheli bir lezyon belirlenirse tamamlayıcı bir tarama aracı olan ultrason incelemesine geçilebilir ve eğer gerekli ise biyopsisi yapılarak tümör histopatolojik olarak incelenebilir (Smolarz ve diğerleri, 2022).

2. Ultrason: Geleneksel tıbbi görüntüleme yöntemi olan ultrason, yüksek frekanslı ses dalgalarını kullanarak görüntü oluşturur böylece hasta radyasyona maruz kalmamış olur. Memedeki kitlenin katı bir tümör mü yoksa kist mi olduğunu belirlemek için kullanılır (Obeagu ve Obeagu, 2024). İlk tanısal değerlendirme olarak malign katı kitlelerin karakterize edilmesinde etkilidir. Ultrason tekniği aynı zamanda biyopsiye de rehberlik eden bir araçtır. (Bhushan ve diğerleri, 2021; Li ve diğerleri, 2021).

3. Manyetik Resonans Görüntüleme (MRI): MRI, radyo frekans dalgaları ve manyetik alanı kullanarak meme iç yapılarının ayrıntılı görüntüsünü belirler. MRI ile diğer tekniklerle tam olarak tespit edilemeyen ancak şüpheli konumda olan meme malignitelerini tespit edilebilir (Bhushan ve diğerleri, 2021). Daha önce meme kanseri tanısı konmuş kadınlarda metastazı aramak, meme kanseri oluşumunu erken tespiti ve kanserin boyutunu belirlemek için kullanılan bir araçtır (Dass ve diğerleri, 2021).

4. Biyopsi: Biyopsi, laboratuvar incelemeleri için hastanın doku örneklerinin cerrahi prosedürle alınmasıdır. Meme kanserinin tam tanısı ancak biyopsi ile doğru bir şekilde konulabilir. Invaziv meme kanseri hücrelerinin tümörden ayrılarak yayılabilecekleri ilk yer koltuk altı lenf düğümleridir. Bunu belirlemek için minimal invazif prosedür olan Lenf nodu biyopsisi ile alınan örneğin mikroskop incelemesi yapılır. Lenf nodlarına metastaz olup olmadığı belirlenir (Obeagu ve Obeagu, 2024).

5. İnce iğne aspirasyonu: Minimal invazif bir prosedürdür. İşlem sırasında ultrason gibi görüntüleme tekniklerinin klavuzluğunda ince bir iğne ile kitleden az miktarda örnek alınır. Kitlenin bir kist mi yoksa katı bir tümör mü olduğunu belirlenir (Obeagu ve Obeagu, 2024).

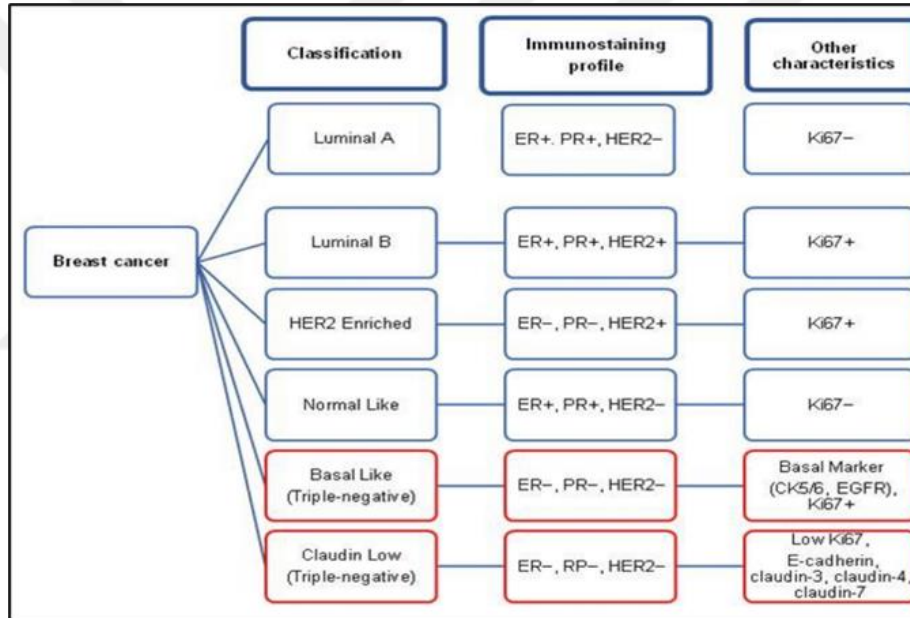
6. Pozitron Emisyon Tomografisi (PET): Kanser tanısını ve evresini belirlemek, tedaviye yanıtı değerlendirmek için kullanılır. Kanserli hücrelerin çoğalma hızı sağlıklı hücrelere göre hızlıdır ve artan glikoz metabolizmasına sahiptirler. Kullanılan PET radyotraktörleri hücrelere glukoz taşıyıcı yoluyla girer ve bu nedenle tümör hücreleri tarafından sağlıklı hücrelere göre daha büyük miktarlarda alınır. Böylece tümör metabolizması invazif olmayan bir şekilde incelenir (Bhushan ve diğerleri, 2021).

Klinik tanı için histolojik biyobelirteçler belirlenmiştir. Hormon reseptörü progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörü (ER) ve ayrıca insan epidermal büyüme faktörü reseptörü iki (HER2) biyobelirteçleri boyama yoluyla gerçekleştirilen meme karsinomu tiplemesi için IHC gereklidir. İlk IHC taramasından sonra tedaviyi belirleyecek herhangi bir potansiyel yanlış tanıyı ortadan kaldırmak için, floresan in situ (FISH) yoluyla ikinci bir doğrulama yapılabilir (Dass ve diğerleri, 2021).

2.1.4. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanserleri (BC), klinik görünüşleri, moleküler özellikleri, davranışları ve terapötik yanıt açısından farklılıklar gösteren geniş spektrumlu tümörleri içerir. Klinik uygulamadaki ana soru, belirli tedavilerden hangi hastalar fayda görebilir, hangi hastalar fayda sağlayamayabilir? Bu ayrım tedavinin kilit noktasıdır. Alt tiplendirme ile BC hastalarının sınıflandırılması yapılır ve en başarılı tedavi yanıtı için, tedavi bu tiplendirmeye göre uyarlanır. Farklı BC alt tipleri, immünohistokimyasal (IHC) bazlı belirteçlere ek olarak gen ekspresyon profili ile moleküler patoloji ve histopatoloji kullanılarak tanımlanmıştır (Mahmoud ve

diğerleri, 2022). Tüm meme kanseri tümörü tanısı süreci, kanser türünü ayırt etmek için immünohistokimya (IHC) kullanılarak rutin birincil belirteçler olan östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) ekspresyonlarının saptanmasıyla başlar (Dass ve diğerleri, 2021). Proliferasyon indeksi Ki-67 proteini, aktif olarak çoğalan tüm hücrelerde bulunur. IHC yöntemle değerlendirilir ve bu Luminal alt tipinin daha ileri tiplendirilmesi için gereklidir. (Smolarz ve diğerleri, 2022). Ayrıca bazal belirteçler sitokeratin 5/6 (CK5/6) ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) değerlendirilmesi, TNBC arasında Bazal benzeri meme kanserini tanımlamak için kullanılır (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021). Bu belirteçlere dayalı modern sınıflandırma meme kanserini luminal A, luminal B, HER2'ce zengin, normal benzeri, bazal benzeri ve claudin düşük olarak 6 farklı alt tipe ayırır (Şekil 5) (Dass ve diğerleri, 2021).



Şekil 5. İmmünohistokimyasal analiz baz alınarak meme kanserinin alt tiplendirmesi (Dass ve diğerleri, 2021).

2.1.4.1. Luminal Meme Kanseri

Memenin luminal (iç) epitelyal hücrelerinde gelişir (Dass ve diğerleri, 2021). Batı popülasyonlarındaki tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %70'ini oluşturur (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021). HER2 ekspresyonuna bağlı olarak, alt tiplene farklı klinik sonuçlara sahip luminal A ve luminal B olarak sınıflandırılır (Das ve diğerleri, 2023).

Luminal A meme kanseri, HER2 negatif (HER2-), östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) varlığı ile karakterizedir. BC'nin yaklaşık %60'ını temsil eder. Yavaş büyürler ve en iyi prognoza sahip olma eğilimindedirler (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021; Burguin ve diğerleri, 2021).

Luminal B ise HER2, ER ve PR pozitiflerdir. Bu alt tip proliferasyonla ilişkili genleri yüksek düzeyde eksprese ettiği için daha kötü prognoza sahiptir ve Luminal A'ya göre hızlı yayılır (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021; Das ve diğerleri, 2023). BC'nin %30' unu oluşturur ve proliferasyon belirteci ki67'yi (>%14) yüksektir. Ki-67 ekspresyonu, luminal A ve B tümörleri arasında ayırım yapmak için kullanılabilecek faktördür (Burguin ve diğerleri, 2021). ER varlığı luminal hastalığı luminal olmayanlardan ayırmak için kullanılır.

2.1.4.2. HER2 Pozitif Meme Kanseri

ER ve PR negatiftir ve HER2'nin yüksek ekspresyonu gözlenir. Meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. Bu alt tip, esas olarak proliferasyonla ilişkili genleri eksprese eder. Daha kötü prognoz ve lüminal kanserlere oranla yüksek bir büyüme oranıyla karakterizedir. HER2 hedefli tedavilerin kullanılmaya başlanmasından önce, alt tipler arasında en kötü prognoza sahipti (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021).

2.1.4.3. Normal Benzeri Meme Kanseri

Düşük oranda tümör hücresi tarafından taşınan proliferasyon gen ekspresyonu eksikliği ile karakterizedir (Dass ve diğerleri, 2021).

2.1.4.4. Claudin-düşük Meme Kanseri

Gen ekspresyon profilleri ile tanımlanan bir içsel tiptir ve aynı zamanda ER, PR ve HER2-negatif olarak karakterize edildiği için bazen üçlü negatif meme kanseri olarak da adlandırılan kötü prognozlu tümörlerdir (Dass ve diğerleri, 2021). Tüm invaziv meme kanserlerinin %7-14'ünü oluşturur.

Diğer alt tiplerle kıyaslandığında Ki-67'nin ve hücre-hücre yapışmasında rol oynayan genlerin (claudin 3, 4 ve 7, okludin ve E-kadherin) düşük ekspresyonu ile karakterizedir. Epitelyalden mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili genlerin ekspresyonunda artış ve kanser kök hücre benzeri gen ekspresyon modellerini gösterirler (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021; Das ve diğerleri, 2023)

2.1.4.5. Bazal Benzeri Meme Kanseri

Bazı kaynaklar Bazal benzeri ve TNBC alt tiplerini eş anlamlı kullansalar da, aslında TNBC'nin %70-80'inin bazal benzeri alt tip olarak sınıflandırılmıştır (Dass ve diğerleri, 2021).

2.1.4.6. Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC)

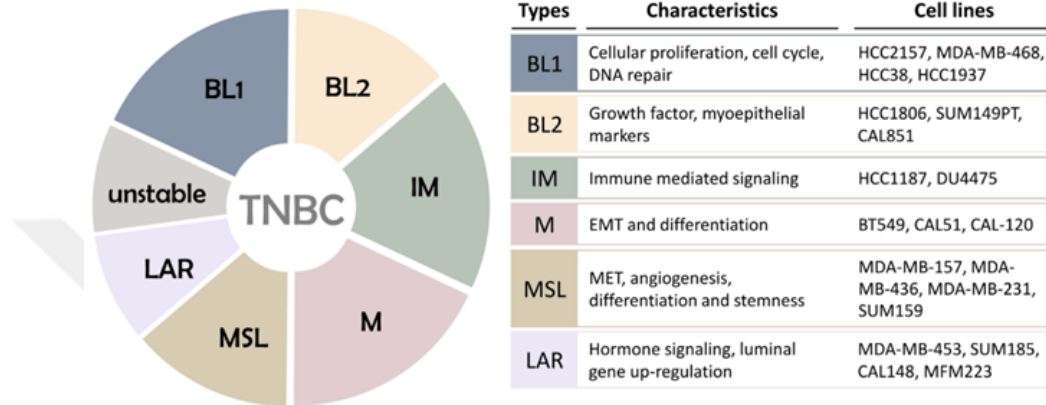
BC'nin %15-20'sini temsil eder. Diğer alt tiplerine göre yüksek oranda visseral ve sinir ,metastazı gibi agresif davranış sergiler ve daha kötü prognoza sahiptir. Bu alt tip tedaviden sonraki üç yıl içinde yüksek lokal tekrarlama oranı ve 5 yılda da yüksek ölüm oranıyla da ilişkilendirilmiştir (Burguin ve diğerleri, 2021; Uscanga-Perales ve diğerleri, 2016).

TNBC'nin yaş ve ırk istatistiklerine göre; 40 yaşın altındaki kadınlar ve Afrikalı-Amerikalı kadınlarda yaygındır. BRCA1 mutasyonundan kaynaklanan meme kanserlerinin yaklaşık %80'i TNBC'dir, tüm TNBC'lerin %11-16'sı ise BRCA1 veya BRCA2 mutasyonlarını barındırır. BRCA1 ile daha sık, BRCA2 ile daha az ilişkilidir (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021;Uscanga-Perales ve diğerleri, 2016).

TNBC ER, PR ve HER2 negatif olması nedeniyle hormonlarla hedeflenemez ve tedaviye direnç gösterir, bu sebeple yalnızca sitotoksik ilaçlarla tedavi edilebilir (Das ve diğerleri, 2023). TNBC, BC'nin oldukça heterojen bir davranışa sahip alt tipidir. Gen ekspresyonu analizinde TNBC kendi arasında 6 alt tipe ayrılabilir: bazal benzeri (BL1 ve BL2), mezenkimal (M), mezenkimal kök benzeri (MSL), immünomodülatör (IM) ve luminal androjen reseptörü (LAR), belirtilmemiş yada kararsız grup olarak (UNS) (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021). Bu iç sınıflar, hastalığın daha iyi anlaşılmasıyla birlikte tedavi için moleküler hedeflerin tespiti açısından yararlıdır.

2.1.4.6.1. TNBC Alt Sınıflandırması

TNBC alt tiplendirme çalışmalarında bulunan ilişkili sinyal yolları, potansiyel farmakolojik hedefler olarak görülür ve bu alt sınıflandırma, TNBC hastalarına daha doğru tanı ve kişiselleştirilmiş tedavi sağlayabilir (Li ve diğerleri, 2021; Uscanga-Perales ve diğerleri, 2016).



Şekil 6. Üçlü negatif meme kanseri alt tiplendirmesi, karakteristik özellikleri ve bu alt tipleri temsil eden hücre hatları (C. J. Li ve diğerleri, 2021).

Bazal benzeri alt tip (BL-1 ve BL-2): BL alt tipleri TNBC'nin yaklaşık %50'sini oluşturur. Yüksek düzeyde proliferasyon ve DNA hasar onarımı genleri eksprese ederler (Li ve diğerleri, 2021; Mahmoud ve diğerleri, 2022). Hücre döngüsü kontrolünün kaybıyla karakterize edilen BL1 alt tipi, hücre çoğalması ve DNA onarım genleri fazla eksprese ederek hızlı proliferasyon gösterir. Bu sebeple Ki-67 proteininin yüksek ifadesine sahiptir. BL2 alt tipi, büyüme faktörü sinyal yolu genlerinin artmış ifadesine sahiptir. Ve metabolik yollar olan glikoliz ve glukoneogenezin aktivasyonunu içerir. (Li ve diğerleri, 2021; Uscanga-Perales ve diğerleri, 2016).

İmmünomodülatör alt tip (IM): Bağışıklık tepkisi ile ilişkili genlerin aşırı ekspresyonunu gösterir (Das ve diğerleri, 2023). IM tümörleri, hiperaktif immün sinyalleme basamakları ve lenfositlerin tümöre infiltrasyonu ile tanımlanır (Mandapati ve Lukong, 2023).

Mezenkimal (M) ve mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) alt tip: M ve MSL, hücre hareketliliği, hücre dışı reseptör etkileşimi ve hücrel farklılaşma yollarıyla yani epitelyalden mezenkimal geçiş genlerinin fazlaca ekspresyonu benzerlikleri paylaşırlar (Mandapati ve Lukong, 2023; Das ve diğerleri, 2023).

M tümörleri adezyon/hareketlilik ve büyüme faktörü genleri ile ilgilidir. Karakteristik olarak epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) yer alan genleri belirteç olarak sunarlar (Mahmoud ve diğerleri, 2022). MSL alt tipi ise düşük mitotik indeks, hücre proliferasyon proteini ve sıkı bağlantı proteininin düşük ekspresyonu ile, mezenkimal kök hücre genlerinin yüksek ekspresyonu ile karakterizedir (Li ve diğerleri, 2021; Mandapati ve Lukong, 2023).

Luminal Androjen Reseptörü (LAR) Alt Tipi: Bu grup androjen reseptörlerinin (AR) ekspresyonu ile karakterizedir (Uscanga-Perales ve diğerleri, 2016). Bunlar ER negatiftir ancak steroid sentezi ve androjen reseptörü sinyal yolları dahil olmak üzere hormonal olarak düzenlenen çeşitli sinyal yolların aşırı ekspresyonu ile tanınır. (Das ve diğerleri, 2023) (C. J. Li ve diğerleri, 2021). Bu da aslında LAR hücrelerinin hormon sinyallemesine bağımlılığını açıklamaktadır (Mahmoud ve diğerleri, 2022).

Kararsız (UNS) tümör alt tipi ise diğer altı tipte bulunan genleri eksprese eden, daha da karakterize edilemeyen gruptur (Mahmoud ve diğerleri, 2022).

2.2. Meme Kanseri Tedavileri

Lokalize ilerlemiş ve metastaz yapmış meme kanseri (BC) hastalığının prognozu kötüdür. Metastatik BC'nin 5 yıllık sağkalım oranı alt gruplandırmadan bağımsız %29 ve metastatik TNBC için %12'dir (Burguin ve diğerleri, 2021). Bu oranlar açıkça metastatik TNBC'ye yönelik tedavi stratejilerinin iyi bir hayatta kalma oranı sağlamak için yeterli olmadığını gösterir. Bu sebeple metastatik BC ve TNBC için tedavisinde yeni strateji ve çözümler araştırılmalıdır. BC tedavisi hastalığın derecesine, evresine ve moleküler alt gruplandırmasına göre yapılır. TNBC alt tipi, diğer BC tiplerine göre tekrarlamaya, metastaza ve olumsuz sonuçlara daha yatkınlık gösterir. TNBC'den muzdarip hastaların tanı aldıktan sonraki 10 yıl içinde mortalite oranları, diğer BC alt tiplerinden muzdarip hastalara göre daha yüksektir (Mandapati ve Lukong, 2023).

Tüm BC alt tipleri için ortak tedaviler; cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi sayılabilir. BC için stratejik tedavi radyoterapi ve cerrahi operasyonla birlikte sistematik tedaviyi yani, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviyi içerir. Hedefe yönelik tedavide, hormon reseptörü eksprese eden BC için (HR+) hormonal tedavi ve HER2+ için ise anti-HER tedavisi uygulanır. TNBC için hedefe yönelik strateji yoktur. Metastatik BC için tümör yayılmasını

durdurmaya yönelik tedavi uygulaması önceliklidir. Sonrasında sistematik tedavi uygulamasına geçilir (Burguin ve diğerleri, 2021).

2.2.1. Cerrahi

Cerrahi operasyon, radyasyon ve kemoterapiye nazaran çevre dokulara daha az hasar verir. BC tanılı hastalarda iki tip ameliyat vardır; lumpektomi ve mastektomi. Lumpektomi, memenin korunması esas alınarak, sadece kanserli bölge ve yakın çevredeki sağlıklı dokuların çıkartılmasıdır. Mastektomi ise tümör ve çevre dokularla memenin tamamen alınması işlemidir (Subhan ve diğerleri, 2023; Pradhan ve diğerleri, 2023).

Koltuk altı lenf düğümlerinin çıkarılması operasyonu, kanserin yayılımını incelemek ve eğer yayılım göstermişse tedavi amaçlı faydalıdır. BC koltuk altı lenf düğümlerinde yayılmış ise, meme cerrahisine ek olarak kanser bölgesinden etkilenen lenf düğümlerinin çıkarılması işlemi sentinel lenf düğümü biyopsisi ve aksiller lenf düğümü diseksiyonu operasyonları da yapılabilir. Bu sayede hayattta kalma oranı da artırılır (Burguin ve diğerleri, 2021; American Cancer Society, 2023) .

2.2.2. Radyoterapi

Tüm kanserli hücrelerin yok edilmesi ve meme kanserinin nüks olasılığını minimuma indirmek için kullanılan koruyucu bir yöntemdir. BC'nin lokal tedavisidir ve genellikle cerrahi işlem veya kemoterapi sonrasında uygulanır. Yüksek enerjili ışınlar tüm meme bölgesine veya klinik duruma göre bir bölümüne, göğüs duvarına ve bölgesel lenf düğümlerine verilebilir. Radyoterapi hedefli tedavi ile örneğin, anti-HER2 yada hormonal tedavi ile paralel uygulanabilir. TNBC için hedefli tedavi olmadığı için radyoterapi uygulaması bu alt tip için daha önem taşır (Burguin ve diğerleri, 2021; Łukasiewicz ve diğerleri, 2021) .

2.2.3. Hormonal Tedavi

BC hücreleri östrojen ve progesterona bağlanarak kanserin büyümesini ve yayılmasını sağlayan reseptörler eksprese eder. Hormonlar ve reseptörlerin birbirine bağlanmasını bloke eden tedavilere hormon (endokrin) tedavisi denir (American Cancer Society, 2023). Endokrin tedavisi ile östrojen seviyeleri düşürülür yada BC hücrelerinin östrojen ile uyarılmasını önler (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021).

Hormon reseptörlerince pozitif olan BC alt tipleri östrojen ve progesteron gibi hormonlardan etkilenir ve hormonal tedavi bu hastalara yöneliktir. TNBC gibi hormon reseptörleri negatif olan BC'li kadınlara bu tedavi fayda sağlamaz. Endokrin tedavisi genelde cerrahi operasyon sonrası (adjuvan tedavi) nüks riskini azaltmak için yada operasyon öncesi (neo adjuvan tedavi) kullanılabilir (American Cancer Society, 2023).

Tedavi tümörün alt tipine göre karar verilir. Luminal A ve B tipi, ER'yi aşırı eksprese eder ve bu sebeple endokrin tedavisi için östrojen reseptör yolunun hedefidir (Mandapati ve Lukong, 2023). BC için çeşitli endokrin tedavi seçeneği vardır. ER'lerin bağlanmasını engelleyen ilaçlar seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM'ler) (tamoksifen) ve seçici östrojen reseptör Aşağı Düzenleyicileri (SERD'ler) (fulvestrant) sayılır. Östrojen seviyelerini azaltmayı hedefleyen tedavi seçeneği aromataz inhibitörleri (AI'ler) (letrozol) olarak sayılır (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021; American Cancer Society, 2023). Hormonal tedavi kemoterapi ile kombinasyon halinde de uygulanabilir.

2.2.4. Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik tedavide BC hücrelerinin büyümesine, metastazına katkı sağlayan hedef proteinlere yönelik ilaçlar uygulanır. Hedefe yönelik tedavi de HER2+ BC hastalarında, trastuzumab, pertuzumab gibi anti-HER2 monoklonal antikörleri kullanılır (Barzaman ve diğerleri, 2020). Bu antikörler spesifik bir hedefe bağlanmak için tasarlanmış bağışıklık sistemi proteinleridir. HER2+ BC alt tipi, büyümeyi teşvik eden HER2 proteinini fazlaca eksprese ettiğinden, Trastuzumab (Herceptin) buna bağlanarak hem ileri hem de erken evre BC'nin büyümesini durdurmayı hedefler. Genellikle kemoterapi ile birlikte kullanılır (American Cancer Society, 2024).

Antikor-ilaç konjugatları (ADC) moloklonal antikora bağı kemoterapi ilacından oluşan hedefe yönelik bir diğr tedavi olanağıdır. HER2’li BC tedavisinde anti-HER2 antikor, HER2 proteinine bağlanarak kemoterapi ilacını doğrudan hedefli kanser hücresine taşır. TNBC’den muzdarip hastalar için reseptörler ekspresyonu eksikliği sebebiyle hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi zorluğundan hedefe yönelik tedavi sınırlıdır (Mandapati ve Lukong, 2023). Bir antikor-ilaç konjugatı olan Sacituzumab govitecan (Trodelvy), antikor kısmı BC hücresi üzerinde eksprese edilen Trop-2 proteini hedefleyerek, anti-kanser ilacını hücreye taşır. Bu ADC, başka kemoterapi rejimleriyle tedavi denendikten sonra ilerlemiş TNBC'nin tedavisinde tek başına uygulanabilir (American Cancer Society, 2024).

Cerrahi ve kemoterapi TNBC'nin tedavisinde altın standart olmaya devam etse de, TNBC’li hastalar için hedefe yönelik tedaviler olan PARP inhibitörleri, immün kontrol noktası inhibitörleri ve antikor-ilaç konjugatları (ADC) dahil olmak üzere bu ajanlar araştırılmıştır. Bir diğr hedef tedavi, bağışıklık sistemini kanser hücrelerini tanıması ve bunlarla savaşması için uyararak çalışan immünoterapidir (Subhan ve diğrleri, 2023).

2.2.4.1. İmmünoterapi

Diğr alt tiplere nazaran TNBC'nin immünojenik olduğu belirlendi. İmmünoterapi ile kişinin bağışıklık tepkisinin güçlendirilmesi, kanser hücrelerinin daha etkili tanınması ve ortadan kaldırılması hedeflenir. Mevcut immünoterapi yaklaşımlarına örnek olarak, immün kontrol noktası blokajları PD-1/PD-L1 inhibitörleri, CTLA-4 inhibitörleri, sitotoksik T-lenfositlerin indüklenmesi yer alır (Pradhan ve diğrleri, 2023). Monoklonal antikorlar gibi immünoterapi ilaçları da hedefe yönelik tedavi olarak sayılabilir çünkü BC’nin büyümesini durdurmak için hücre üzerindeki spesifik proteinleri bloke ederler (American Cancer Society, 2023).

Bağışıklık sistemi hücreleri bağışıklık tepkisini kontrol etmek ve vücuttaki sağlıklı hücrelere saldırmamak için açılması ve kapanması gereken kontrol noktalarını kullanır. Bu kontrol noktaları hedef proteinlerdir. BC hücreleri bu kontrol noktalarını kullanarak bağışıklık sisteminden kaçabilir. Bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerine en baskın örnek PD-1’i hedefleyip inhibe eden Pembrolizumab (Keytruda)’dır . PD-1, T hücrelerinde bulunan ve normal şartlarda vücuttaki diğr hücrelere saldırmasını engelleyen bir proteindir. PD-1 blokajıyla bağışıklık tepkisi yeniden oluşturulur. Buda tümörün küçülmesini sağlayabilir.

PD-1 immünoterapisi TNBC'nin vücuda yayılması, lokal nüksü, ileri evrelerde tedavi etmek için kemoterapi ile paralel kullanılabilir (American Cancer Society, 2021).

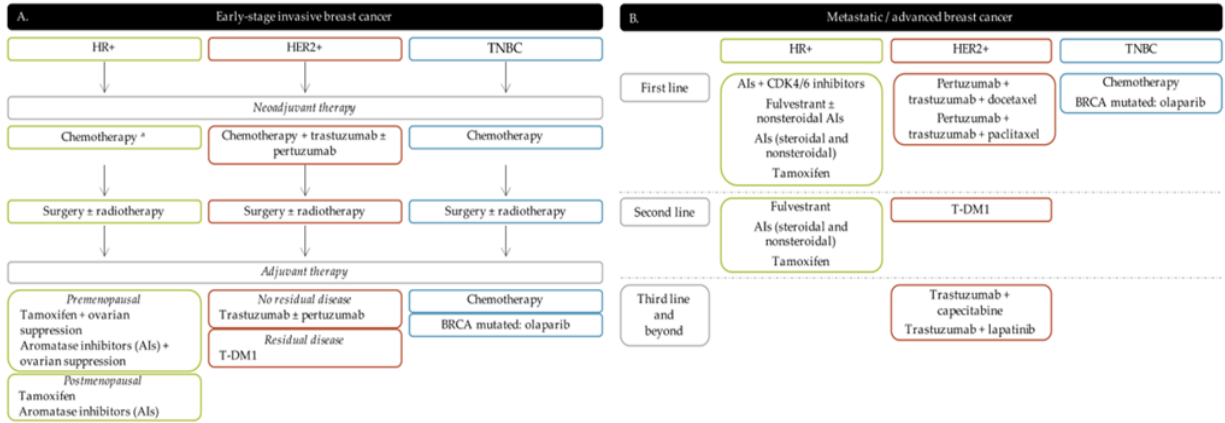
2.2.5. Kemoterapi

TNBC'den muzdarip hastalar hormonal tedavi yada HER2 proteini hedefli tedavileri alamamaktadır, bu nedenle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi seçenekleri vardır. Kemoterapi ise TNBC'nin standart tedavisi olarak kabul edilir (Uscanga-Perales ve diğerleri, 2016). TNBC tanılı vakalar kemoterapiden diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha fazla fayda sağlar. (Mandapati ve Lukong, 2023). Kemoterapi spesifik değildir ancak ana mantık olarak kanser hücrelerinin normal hücrelere göre sık mitoz bölünme geçirdiği ve bu sebeple kemoterapiden daha fazla etkilenebileceklerini varsayar. Ancak saç folikülleri, kemik iliği ve gastrointestinal sistem hücreleri gibi hızlı çoğalan sağlıklı hücrelere spesifik olmayan toksisite gösterir (Sharifi-Rad ve diğerleri, 2021).

TNBC'ye sahip hastalara kemoterapi ameliyat öncesi (Neoadjuvan) ve ameliyat sonrası (Adjuvan) uygulanabilir. Adjuvan kemoterapi hastalıksız sağkalımı artırır, lenf nodu metastası ve nüks riski yüksek olan hastalar için uygulanır (Pradhan ve diğerleri, 2023 ; Burguin ve diğerleri, 2021). Neoadjuvan kemoterapi, adjuvan kemoterapiyle karşılaştırılabilir derecede etkilidir (Łukasiewicz ve diğerleri, 2021). Daha küçük bir operasyonla tümörün alınabilmesi için tümörü küçültmeye çalışmak amacıyla neoadjuvan kemoterapi uygulanabilir. Ayrıca, neoadjuvan kemoterapi ile kanserin buna nasıl tepki verdiğini takip edilebilir. Çoğu durumda kemoterapi, aynı anda birden fazla ilaç paralel kullanıldığında daha büyük bir etkiye sahiptir (American Cancer Society, 2021) .

Kemoterapi tedavisinde antrasiklin (doksorubisin), taksanlar (paklitaksel veya dosetaksel), alkilleyici ajanlar (siklofosfamid), antimetabolitler (kapesitabin) ve platin bazlı ajanlar (karboplatin veya sisplatin) kullanılır (Subhan ve diğerleri, 2023). Taksanlar (PTX, Docetaxel) en çok kullanılan kemoteraptiklerdir ve antrasiklinlerle birlikte metastatik, erken evre ve TNBC hastalarında ilk başvuru tedavidir. PTX, farklı kanser türlerinin yanı sıra, HR-, HER2-, BRCA 1/2 germ hattı mutasyonu taşıyan BC tümörlerinin tedavisinde de yaygın olarak kullanılır (Samaan ve diğerleri, 2019; Mandapati ve Lukong, 2023).

Kemoterapi ajanları tek başına veya kombine halde uygulanabilir. Antrasiklinler ve taksanlar gibi kemoterapatik ilaçlarla, hedefe yönelik tedavi olan olaparib gibi PARP inhibitörleri ve atezolizumab gibi immünoterapinin kombine stratejisi uygulanabilir (Mandapati ve Lukong, 2023). Kemoterapinin en büyük sınırlayıcısı yorgunluk, anemi, kas ağrıları, zihinsel işlev bozukluğu kilo kaybı, enfeksiyonlara karşı hassasiyet, saç dökülmesi gibi yan etkileridir (Burguin ve diğerleri, 2021; Łukasiewicz vd ve diğerleri, 2021).



Şekil 7. (A) Erken evre BC ve (B) Metastatik/ileri BC tedavisinde özet şema
(Burguin ve diğerleri, 2021).

2.2.5.1. Taksanlar- Paklitaksel (Taxol®)

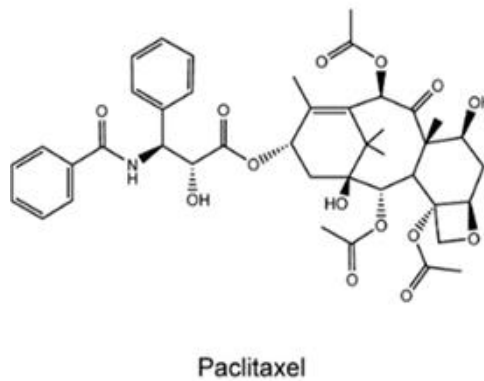
Üçlü negatif meme tümörü (TNBC) tedavide geleneksel reseptör hedefleri olan östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'yi eksprese etmez. Bu hedeflerin eksikliği bu tümörlerin agresif, çoğunlukla invaziv, dirençli doğasına katkı yaparak sınırlı terapötik hedeflemeye yol açar. TNBC için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı ilaç sayısı sınırlı olmasına rağmen, Taksan kemoterapötikleri, TNBC hastaları için geleneksel tedavi olarak bilinir (Mandapati ve Lukong, 2023). Günümüzde klinik uygulamada paklitaksel (PTX), ilerlemiş prostat ve meme kansinimleri, rahim ağzı kansinomu ve diğer çeşitli maligniteler içinde reçetelendirilebilir (S. Zhao ve diğerleri, 2022).

Taksan ailesine ait olan Paklitaksel, FDA tarafından ilk kez yumurtalık kanseri tedavisi için onay almıştır. Daha sonra ise meme kanseri, TNBC maligniteleri tedavisinde onaylanmıştır (Mandapati ve Lukong, 2023; Zhao ve diğerleri, 2022).

Kanserin erken veya ilerlemiş evrelerinde tek başına veya başka kemoterapi ilaçlarıyla kombine halde kullanılabilir. Bununla birlikte kanserin radyasyon ile kombine tedavisi, tekrarlayan malignitesi olan hastaların tedavisinde uygulanabilir (S. Zhao ve diğerleri, 2022). PTX ile tedavinin yanıt oranı çeşitli faktörlerden etkilense de metastatik meme kanseri için %56 olduğu düşünülmektedir (Gallego-Jara ve diğerleri, 2020).

PTX (Taxol®), mitoz bölünmenin inhibisyonunu ile kanser hücrelerinin ölmesini tetikleyebilen bitkisel türevli mikrotübül hedefleme ajanıdır (MTA) (S. Zhao ve diğerleri, 2022). İlk olarak 1971'de, Pasifik porsuk ağacı olan *Taxus brevifolia*'nın ekstraktından elde edildi. Ekstrakt üzerine yapılan çalışmalarda PTX'in antitümör özelliği tanımlandı ve Hela hücreleri üzerinde mikrotübül stabilizasyona bağlı olarak hücre bölünmesini azalttığı keşfedildi (Mandapati ve Lukong, 2023). 1992 yılında Bristol-Myers Squibb (BMS) şirketi tarafından Taxol ismiyle ticari olarak markalandırıldı (Samaan ve diğerleri, 2019).

Taxol®'un temel mekanizması, mikrotübül dinamiklerinin bozulmasına dayanır. Taxol bu ana etki mekanizmasıyla tübüline bağlanarak ve fizyolojik bir süreç olan mikrotübüllerin parçalanmasını inhibe ederek, mitotik tutuklamayı ve ardından hücre ölümünü indükler. (Gallego-Jara ve diğerleri, 2020). Tümör hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre çoğalmasında artış görülür ve hızlı bölünen kanser hücrelerinde taksanın stabilleştirme mekanizması, hücre bölünmesi, sinyalleşme ve göç için gereken mikrotübül dinamiklerini önemli ölçüde azaltır. Böylece hücre çoğalması ve hızlı mitoz bölünmeyi durdurabilir (Klein ve Lehmann, 2021; Mandapati ve Lukong, 2023) .



Şekil 8. Paklitakselin kimyasal yapısı (Čermák ve diğerleri, 2020).

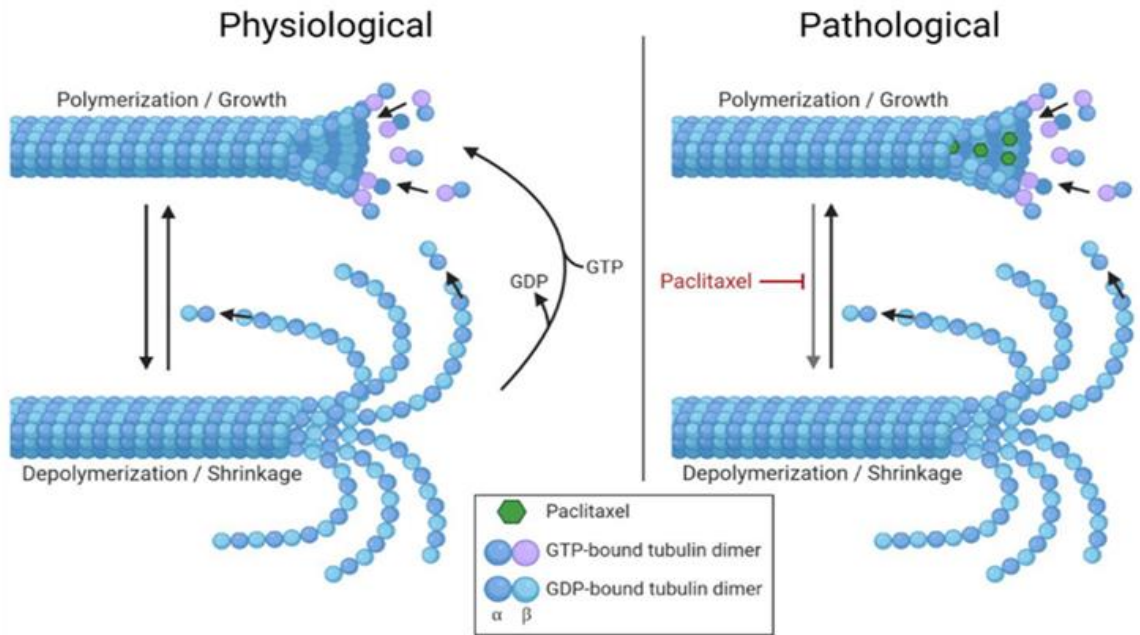
2.2.5.2. Paklitaksel Etki Mekanizması

Mikrotübüller tübülün heterodimerleridir ve hücre içi iskeletin bir bileşenidir. Hücre bölünmesinde, kromozomların oluşan yavru hücrelere ayrılması sürecinde, hücre polaritesinde görev alırlar. Hazırlık evresi adı verilen interfaz evresinde mikrotübüller kinesinler ve dineinler gibi moleküler motorlar için taşıma platformu görevi görür. Bunlar vezikülleri diğer hücre yüklerini mikrotübülün bir ucundan diğer ucuna doğru taşır (Klein ve Lehmann, 2021; Mandapati ve Lukong, 2023; Čermák ve diğerleri, 2020). Hücre için önemli bu yüklerin taşınması mikrotübüllerin sağlıklı işlevine bağlıdır. Dolayısı ile mikrotübüllerin fonksiyonları PTX’inde dahil olduğu Mikrotübül Hedefleme Ajanları (MTA'lar) için hedef niteliğindedir (Čermák ve diğerleri, 2020).

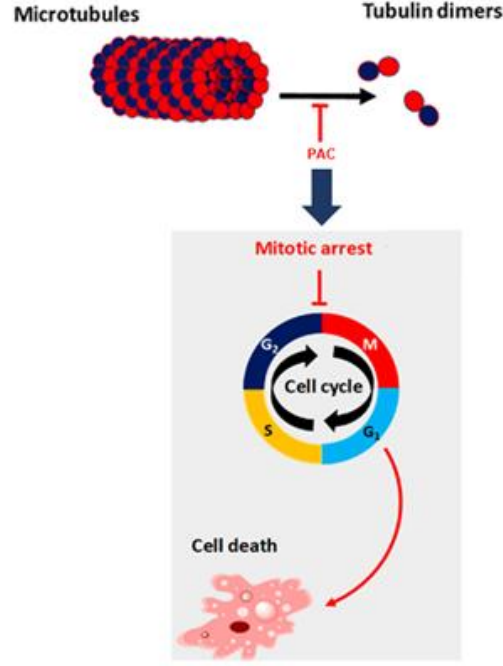
Her bir mikrotübül, içi boş silindirik bir merkez etrafında yanal olarak dizilen protofilamentlerden oluşur. Protofilamentler $\alpha\beta$ -tübülün heterodimerlerinden oluşur. Tübülünler, GTP bağlayıcı proteinlerdir ve tüm ökaryotik hücrelerde mevcuttur. Bunlar tübülünün GTPaz aktivitesi tarafından düzenlenir. (Mandapati ve Lukong, 2023; Čermák ve diğerleri, 2020). Mikrotübül fonksiyonu için temel olan dinamik kararsızlık yeteneğidir (Kellogg ve diğerleri, 2017). Dinamikliği polimerizasyon (büyüme) ve depolimerizasyon (küçülme) yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Böylece hücre, iskeletini hızlı bir şekilde yeniden düzenleyebilir. Fizyolojik durumda α - ve β -tubulin dimerleri, guanozin trifosfata (GTP) bağlanır. Bu dimerler, polimerizasyon esnasında büyüyen mikrotübül uçlarına eklenir. Büyüyen mikrotübül stabilize edici bir başlık oluşturur. α - ve β -tubulin dimerlerindeki konformasyon değişikliği, GTP'nin guanozin difosfata (GDP) hidrolize edilmesi ile gerçekleşir ve serbest kalan enerji mikrotübülleri dengesiz hale getirir. GTP-tübülün kapağının bozulması ile depolimerasyon gerçekleşir (Klein ve Lehmann, 2021).

PTX, bu dinamik süreçte mikrotübül aralıklardan β -tübüline bağlanabilir. Böylece, patolojik durum gerçekleşir (Klein ve Lehmann, 2021). Bitişik β -tubulin molekülleri ile etkileşimi stabilize edilir, dolayısıyla protofilament-protofilament etkileşimini güçlendirilmiş olur. (Mandapati ve Lukong, 2023). Sonuç olarak depolimerizasyon azalır ve mikrotübüller stabilize edilmiş olur (Şekil 9). Paklitakselin bu etkileşimiyle, kromozomal segregasyonun inhibe edilmesi hücre döngüsünün G2/M fazında metafaz ve anafaz arasında mitotik durma meydana gelir (Klein ve Lehmann, 2021). Bu duraklama mitotik kontrol noktası indüksiyonu ve apoptoz sonuçlanır.

Hücre döngüsünün durmasıyla hücre apoptozun indüklenmesi, taksanların kullandığı yaygın etki mekanizmasıdır. (Mandapati ve Lukong, 2023; Samaan ve diğerleri, 2019). PTX uygulanan bazı hücreler ilk mitozdan kayabilir, çok çekirdekli oluşumlar haline gelebilir ve sonraki hücre döngülerinde ölebilir. Bununla birlikte PTX hücre içi taşıma veya göç gibi mitozdan bağımsız fonksiyonları da etkileyerek bölünmeyen hücreler için de öldürücü olabilir (Čermák ve diğerleri, 2020). PTX, tüm ökaryotik hücrelerde mevcut ortak yapılar olan mikrotübülleri hedeflenmesinden dolayı tümör spesifik değildir. Mitotik hücreler PTX'e en duyarlı hücrelerdir (Samaan ve diğerleri, 2019). PTX gibi MTA ilaçlarının bu potansiyelinden dolayı, kanser hücrelerini seçici hedefleyecek, sağlıklı hücreleri hedeflemeyecek bir çözümün bulunması gerekir (Čermák ve diğerleri, 2020). Geleneksel tedavi olarak PTX'in yeni alternatiflerinin kullanılması, spesifikliğin ve seçiciliğinin artırılması, BC tedavisinin yönetiminde güncel bir bilimsel araştırma alanını temsil eder. BC kanser hücrelerini hedef alan yeni taşıyıcıların geliştirilmesinde ilerleme kaydedilmelidir (Samaan ve diğerleri, 2019).



Şekil 9. Mikrotübül dinamiğinin fizyolojik ve paklitakselin mikrotübül stabilitesini artırması ile meydana gelen patolojik durumu (Klein ve Lehmann, 2021).

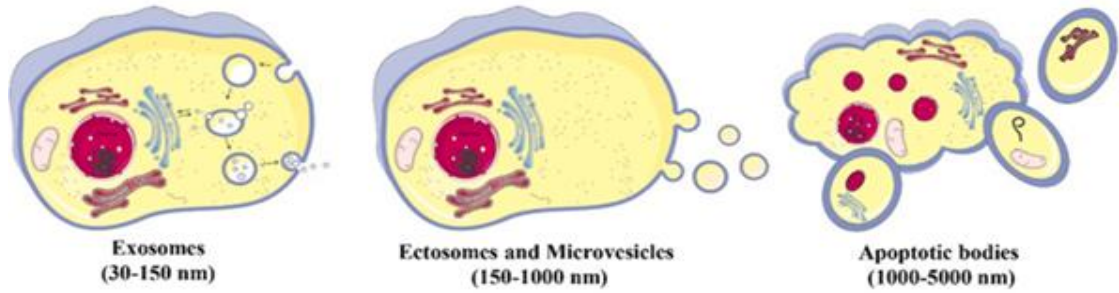


Şekil 10. Kanser hücrelerinde paklitaksel etki mekanizması. Paklitaksel uygulanan hücreler hücre döngüsünün G2/M fazında tutulur ve döngünün ilerlememesi ile ölüme sürüklenir (Gallego-Jara ve diğerleri, 2020).

2.3. Ekstrasellüler Veziküller ve Sınıflandırılması

Çok hücreli organizmalar, hücreler tarafından hücre dışı matrikse sekrete edilen faktörler aracılığıyla iletişimde olurlar. Ekstrasellüler veziküller (EV) neredeyse tüm hücreler tarafından hücre dışı matrikse sekrete edilen ve hücreler arası iletişime katılabilen doğal membranöz veziküllerdir. Alt gruplandırması biyolojik özelliklerine ve oluşum süreçlerine göre üçe ayrılır (Şekil 11) (Choi ve diğerleri, 2022). İlki endozomlardan köken alan eksozomlar (30-150 nm, ortalama ~100 nm), ikincisi plazma zarından tomurcuklanmayla oluşan mikropartiküller (MV) (150–500 nm) ve üçüncüsü EV'lerin en büyüğü olan, apoptoza uğrayan hücrelerden kabarcıklaşma ile salınan apoptotik cisimlerdir (500 nm–5 µm) (Ying Zhang ve diğerleri, 2022). Tüm EV'lerin ortak noktası lipitler, nükleik asitler, proteinler gibi karmaşık bir bileşime sahip olmalarıdır (Gurung, Perocheau, Touramanidou ve Baruteau, 2021). Apoptotik cisimler, ölmekte olan hücrelerden apoptozun geç evresi sırasında sekrete edilir içerik olarak hücresel organeller, mikronükleuslar ve kromatin kalıntıları içerir (Choi ve diğerleri, 2022).

MV'ler ise, çoğunlukla trombositlerin, endotel hücrelerinin ve kırmızı kan hücrelerinin partikülleri olarak karakterizedirler (Yuan Zhang, Liu, Liu ve Tang, 2019).



Şekil 11. EV'lerin üç ana sınıflandırılması (Moghassemi ve diğerleri, 2024).

2.4. Eksozomlar, Yapısı ve Bileşimi

Hücrelerden salgılanan eksozomların detaylı araştırmasından önce hücrenin hasar görmesinden kaynaklanan yada istenmeyen bileşenlerini hücreden dışarı atan hücresel atık olduğu düşünülüyordu. İlerleyen çalışmalarla birlikte eksozomların kargoları hedef hücrelere taşıyan, üstelik taşıdıkları hücreler tarafından seçici olarak alınıp o hücrelerde değişiklikler yapabilen doğal nanokaplar olduğu bulunmuştur (Zhang ve diğerleri, 2019; Gorshkov ve diğerleri, 2022).

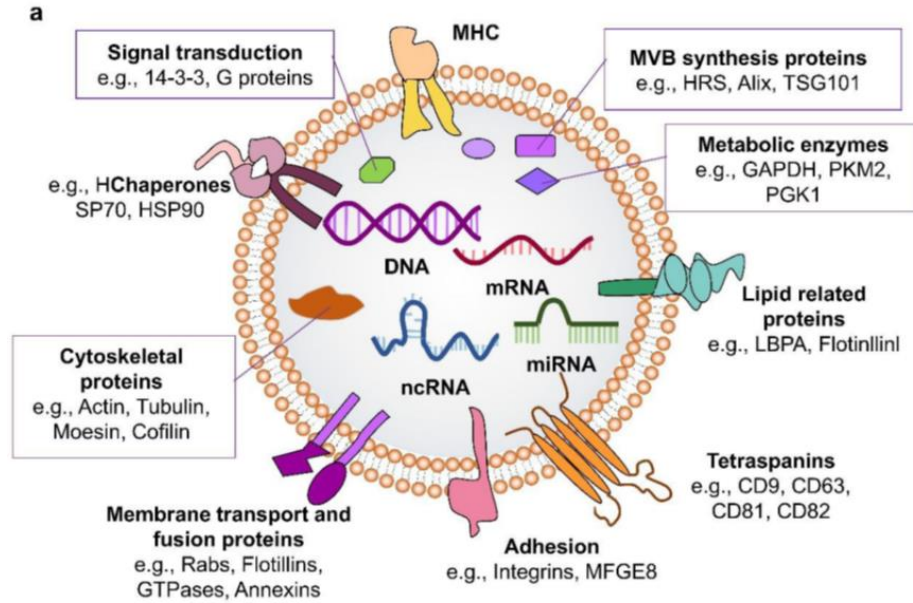
Eksozomlar, çift lipit katmanlı ve organeli olmayan sitozole sahip DNA, RNA, proteinler ve lipitler gibi çeşitli kargo taşıyıcılarıdır (Şekil 12). İçerdikleri kargolar donör hücrelerin metabolik durumunun göstergesidir. Eksozomlar temel olarak endozomlardan, plazma zarından ve sitozolden gelen proteinlere ek olarak çekirdek, mitokondri, endoplazmik retikulum ve Golgi cisimciği gibi organellerden gelen birtakım bileşenleri de içerirler. Eksozomların protein içerikleri, sekrete edildikleri hücre tipine de bağlıdır (Gurunathan ve diğerleri, 2019).

Eksozomlar idrar, tükürük, süt, serum veya plazma, ve meni gibi neredeyse tüm biyolojik sıvılarda, ayrıca B ve T hücreleri, kanser, dendritik, mast ve epitel gibi farklı hücre tiplerinden de salgılanır. Ayrıca tümör hücreleri sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla eksozom salgılası göstermiştir (Moghassemi ve diğerleri, 2024; Zhang ve diğerleri, 2022).

EV'lerin taşıdıkları protein kargoları, aynı türdeki EV'ler arasında bile heterojenlik gösterebilir ancak belirli proteinler, belirli EV türlerine sepsifiktir. Bu sayede EV'lerin grupları

arasında, protein profilleri araştırılarak ayırt edilebilir ve bu proteinler, EV karakterizasyonunda belirteçler olarak kullanılabilir (Lai ve diğerleri, 2022). Eksozomların karakteristik proteinleri, transmembran tetraspanin ailesine ait, membran füzyonunda, sinyalleşmede ve protein trafiğinde rol oynayan CD9, CD63 ve CD81'dir. Moleküler şaperonlar olan ısı şoku proteinleri (HSP70 ve 90), CD63, eksozom biyogenezinde görevli ESCRT ve ilişkili proteinler, eksozom oluşumunda rol alan proteinler TSG101 ve ALIX, membran taşınması ve füzyonundan sorumlu proteinler (anneksinler ve Rab) ve hücre iskeleti aktin-miyozin gibi proteinler tüm eksozomlar arasında ortaktır. Bu proteinler, eksozomları diğer EV'lerden ayıran belirteçler olarak hizmet eder ve eksozom tespiti, izolasyonu için kullanılabilir (Zhang ve diğerleri, 2019; Lai ve diğerleri, 2022). Bunlara ek olarak eksozomlar ayrıca sitoplazmik enzimler olan laktat dehidrojenaz, GAPDH, peroksidaz, piruvat kinazları taşırlar. Donör hücreye bağlı olarak spesifik proteinler majör doku uyumluluk kompleksi MHC Sınıf I ve II'i de içerebilirler (Lyu, Sun, Sun, Liu ve Wang, 2024). Fizyolojik ve patolojik durumlarda mRNA ve mikroRNA (miRNA), hücre iletişimde yaygın olarak taşınır. Örneğin, virüsün enfekte ettiği hücrelerden salınan eksozomlar viral genetik materyal içerirken, kanser hücrelerinden salınan eksozomlar, sağlıklı hücrelerden salınan eksozomlardan farklı nükleik asit profiline sahiptir. Eksozomun iç kargosu DNA, mRNA ve eksozomal RNA türleri (ribozomal RNA (rRNA), uzun kodlamayan RNA (lncRNA), transfer RNA (tRNA) gibi çeşitli nükleik asitleri içerir. Nükleik asitlerden mRNA ve miRNA, mikropartiküller ve eksozomlarda zenginken ribozomal RNA (rRNA), apoptotik cisimler de zengindir (Lai ve diğerleri, 2022; Gurung ve diğerleri, 2021).

Eksozomlar çift katmanlı fosfolipid, sfingomiyelin, kolesterol, seramidler ve doymamış lipidlerden oluşan membrana sahiptir. Bu lipidler eksosomların sekresyonu, yapılarını ve sinyalleşmesini etkiler (Gurung ve diğerleri, 2021). Eksozom zarlarının iç ve dış kısımlarında lipidlerin eşit dağılmaması eksozom stabilitesine katkı sağlarken, lipidlerin donör hücreye göre daha fazla bulunması membranlarını sertleştirir ve kargolarını taşıırken bozunmalara karşı direnç kazandırır. Lipid içeriği aynı hücre hattından sekrete edilen eksozomlar arasında daha az farklılık sergilerken, eksozom ve donör hücreleri arasında daha büyük farklılık gösterir (Lai ve diğerleri, 2022). Eksozom veritabana göre mevcut toplam 9769 çeşit protein, 3408 çeşit mRNA, 2838 çeşit miRNA ve 1116 çeşit lipid güncel veri girişi vardır (Lyu ve diğerleri, 2024).



Şekil 12. Eksozom yapısı ve bileşenleri (Peng ve diğerleri, 2020).

2.4.1. Eksozomların Biyogenezi

Çeşitli hücreler tarafından salınan eksozomlar, yakın veya uzaktaki alıcı hücreler tarafından içselleştirilip ve hedef hücrelerin kaderini etkilerler (X. Zhao ve diğerleri, 2020). Eksozomlar endozomal kökenli, devamlı üretilen ve ekzositoz yoluyla hücre dışına sekrete edilen veziküllerdir.

Eksozom biyogenezi üç adımda oluşur;

- 1) Endozom oluşumu,
- 2) Oluşan endozomdan intralüminal veziküllerin (ILV) oluşturulması ve multiveziküler cisimciklerin (MVB) oluşumu,
- 3) MVB'lerin plazma zarı füzyonu ile eksozomların salınması (Gurunathan ve diğerleri, 2019).

Plazma zarının ilk içeri girinti yapmasıyla, hücre yüzeyi ve hücre dışındaki proteinleri içeren yuvarlak fincan şeklinde erken endozom adı verilen bir yapı oluşur. Erken endozomlar geç endozomlara olgunlaşırken MVB'ler oluşur ve Trans-Golgi ağı, mitokondri, endoplazmik retikulum gibi organeller içeriğe katkı sağlayabilir. Geç endozomun membran zarının içe girinti yapmasıyla ILV'ler oluşturulur. ILV'leri içeren bu geç endozomlar MVB'ler olarak adlandırılır (Kalluri ve LeBleu, 2020).

Bu sırada, birtakım proteinler membrana dahil edilirken, sitoplazmadaki protein, nükleik asit gibi biyoaktif moleküllerde ILV'ler tarafından entegre edilir (Yuan Zhang ve diğerleri, 2019). Bu bileşenlerin ILV'ler tarafından içe alınması gelecekteki eksozomların yükünün daha da değiştirilmesine yol açabilir. Çünkü ILV'ler aslında hücre dışına sekrete olacak eksozomlardır (Kalluri ve LeBleu, 2020).

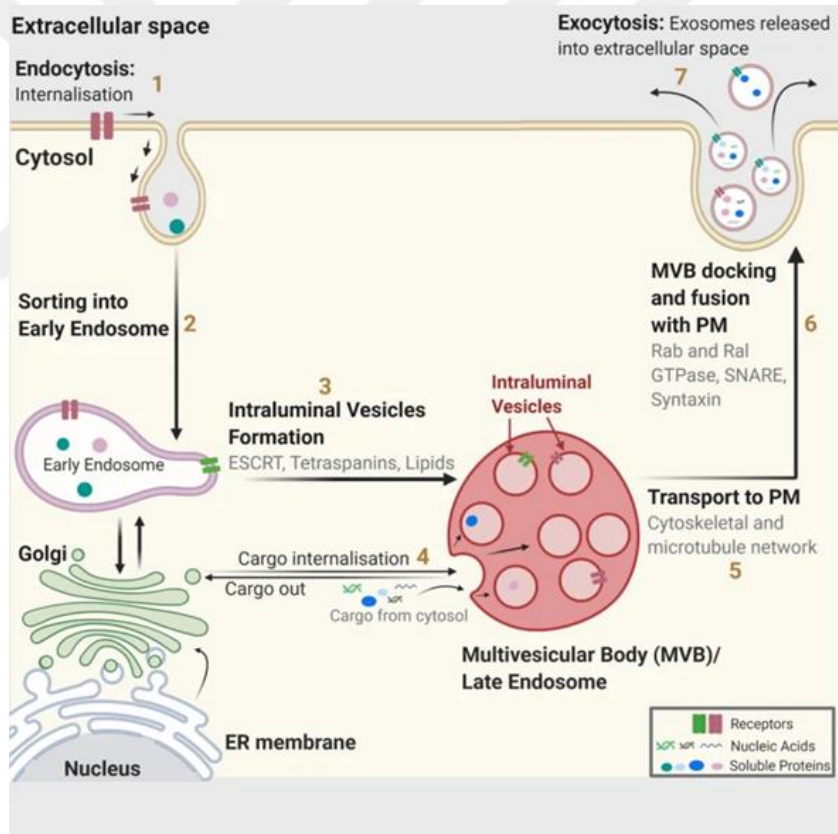
MVB'ler oluşuktan sonra 2 kaderi vardır. İlki, otofagozomlarla yada lizozomlarla birleşip, içerikleri lizozomlarda degradasyona uğrayabilir. Degradasyon ürünleri hücreler tarafından geri dönüştürülebilir (Kalluri ve LeBleu, 2020). İkinci kader ise MVB'ler, aktin ve mikrotübül hücre iskeleti ağıyla hücre yüzeyine taşınıp, plazma membranı ile birleşirler. Eksositoz yoluyla eksozomlar olarak salınırlar. Eksozomların salınımı sürecinde MVB'lerin membrana kenetlenmesi Rab GTPaz'lar tarafından düzenlenir. Membran füzyonuna, SNARE kompleksi proteinleri aracılık eder. MVB'nin bu iki kaderini belirleyen moleküler mekanizmalar tamamıyla belirlenememiştir. Ancak lizozom ve eksozom üretimi arasında sıkı bir etkileşim olduğu bilinmektedir (Gorshkov ve diğerleri, 2022).

Şu anda literatür, eksozom biyogenezinin hücre tipi kökenine bağlı olarak çeşitli şekillerde gerçekleştiğini belirtir (Yuan Zhang ve diğerleri, 2019). ESCRT'ların dahil olduğu aktif mekanizma ve seramid-CD63 bazlı pasif mekanizma ile iki eksozom oluşma yolu açıklanmaktadır (Gorshkov ve diğerleri, 2022).

MVB oluşumu, vezikül tomurcuklanmasını ve protein sınıflandırması ve taşımacılığı için koordineli çalışan proteinler endozomal ayırma kompleksi (ESCRT) olarak adlandırılır ve dört ayrı proteinden ESCRT (0, I, II ve III) oluşur (Y., Zhang ve diğerleri, 2019). ESCRT'larla birlikte VPS4, VTA1 ve ALIX (apoptoz bağlantılı gen 2-etkileşimli protein X) gibi birkaç ilişkili aksesuar bileşende bu görevlerde yer alır (Gorshkov ve diğerleri, 2022). ESCRT-0, tirozin kinaz substratı (HRS), yardımıyla klatrin ile birlikte ubikuitinlenmiş proteini tanır ve onlara özgü endozomal membran alanlarına bağlanır ve böylece ESCRT mekanizmasını başlatır (Kar ve diğerleri, 2023). Bu başlatmanın ardından ESCRT-0 ve ubikuitinlenmiş proteinler, geç endozomlarda ikincil girintilerin oluşumuna neden olan ESCRT-I ve ardından ubikuitinlenmiş proteinlerin ILV'lere hareketini destekleyen ESCRT-II ile etkileşime girer ve ardından tüm kompleks ESCRT-III'e bağlanır. Bu da sonuçta vezikül tomurcuklanması destekler. Bu noktada, Tümör duyarlılık geni 101 (TSG101), ubikuitinlenmiş proteinlerle etkileşime girer ve ESCRT-II aktivasyonuna katılır (Kar ve diğerleri, 2023; Gorshkov ve diğerleri, 2022).

ESCRT-II, MVB oluşumunun son aşamasına, yani ILV'lerin tomurcuklanması sürecine katılan ESCRT-III' ü görevlendirir. MVB'lerin oluşumundan sonra ESCRT kompleksini ayırmak için, bir ayırma proteini olan Vps4 ile gerçekleştirir (Kar ve diğerleri, 2023; Gorshkov ve diğerleri, 2022).

Literatür, ESCRT'tan bağımsız bir yolda tanımlamıştır. Bu, sfingolipitleri (seramid), tetraspanin CD63'ü ve ısı şoku proteinlerini kullanır (Gorshkov ve diğerleri, 2022). Bu, eksozomların yanal olarak ayrılması için sal benzeri alanlara bağlı gibi görünmektedir. Bu sallar, seramid oluşumu için gerekli enzimler olan sfingomiyelinazlar ile zenginleştirilmiştir. Seramide bağımlı yolda, seramidlerin yanal faz ayrımı indüklediği ve aynı zamanda seramidlerin yapılarından dolayı tomurcuklanma sürecine yardımcı olarak plazma zarının kendiliğinden eğrilmesine teşvik eder. Bu mekanizma, eksozom oluşumunda lipidlerin önemli rolünü göstermektedir (Zhang ve diğerleri, 2019; Kar ve diğerleri, 2023).



Şekil 13. Eksozom biyogenezi (Gurung ve diğerleri, 2021).

Eksozomların biyogenezi ortamdaki faktörlere ve hücre tipine bağlıdır. Örneğin, olgunlaşmamış dendritik hücrelerden sınırlı sayıda vesikül salgılanırken, mezenkimal kök hücrelerden çok sayıda salgılanır.

Eksozom biyogenezi kanser hücrelerinde düzensizdir bu da kanser hücrelerinden sekrete edilen eksozom miktarının artışına sebep olur (Giordano ve diğerleri, 2020). Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin konfluensi eksozom oluşumu ve salgılanmasında önemli bir faktördür. Hücreler arasındaki kontak inhibisyon eksozom sekresyonunu azaltabilir, çünkü hücreler aktif olarak çoğalmama eğilimi sergilerler. Hücre ortamındaki hipoksi ve açlık gibi stres faktörleri uyarıcıdır ve eksozom salgılanmasını indükleyebilir. Açlık, hücreleri büyütmek için besiyerine eklenen serum (FBS) yokluğudur, bu yokluğun hücreler üzerinde stresi, eksozomların kargo içeriğindeki değişikliklere ve aynı zamanda normal ortamda kültürlenmiş hücrelerle karşılaştırıldığında, eksozom sekresyonunda artışa neden olur (Gurunathan ve diğerleri, 2019).

2.4.2. Eksozomların Alıcı Hücreler Tarafından Alınması

Çeşitli hücre türlerinden salınan eksozomların farklı alıcı hücrelerce yakalanması ve alımı rastgele gerçekleşmez. Eksozomlar hedef hücreye ulaştığında, hücreye üç yoldan girebilir: eksozomal doğrudan etkileşme, hücre zarı ile birleşme veya endositoz (Krylova ve Feng, 2023). Hücre eksozomları her zaman tek bir alım yoluyla içselleştirmeyebilir. Aynı hücrede eksozomların içselleştirilmesi için bu alım yollarından bir arada yararlanılabilir. Örneğin, kemik iliği kök hücreleri tarafından eksozomların alınması esas olarak kaveolin bağımlı yol, kısmen makropinositoz ve membran füzyonu ile gerçekleştirilir (Gurung ve diğerleri, 2021). İçselleştirmenin moleküler mekanizmalarının hala araştırılmaya ihtiyacı vardır (Giordano ve diğerleri, 2020). Hedef hücre için eksozom alım mekanizmalarının detaylı bilinmesi, eksozom tabanlı dağıtım araçlarının geliştirilmesi için önemlidir. Eksozomlar spesifik hedef hücrelere özgül olarak bağlama ve kargo içeriğine göre biyokimyasal değişiklikleri indükleme yeteneğine sahiptir. Bu özgül bağlanma, hem eksozom hem de alıcı hücrenin membranında bulunan proteinlerden kaynaklanır (Gorshkov ve diğerleri, 2022).

Doğrudan etkileşim: Eksozom membran proteinleri aracılığıyla plazma zarı reseptörleriyle doğrudan etkileşime girerek, hücre içi sinyalleşmeyi indükleyebilir. Doğrudan etkileşim yolu immünomodülatör ve apoptotik fonksiyonlara aracılık etmek için yaygın kullanılır (Gurung ve diğerleri, 2021). Eksozomların hücre ligand sunumlarına göre tasarlanması aynı zamanda reseptör aracılı doku hedeflemenin geliştirilmesini sağlar (Kalluri ve LeBleu, 2020; Krylova ve Feng, 2023).

Doğrudan füzyon: Eksozomlar hedef hücre membranı ile birleşip kargolarını doğrudan hücrelerin sitoplazmasına aktarır. Doğrudan füzyon, eksozomların kargolarının salımında etkili yol olsa da, literatür eksozomların hücre içine alınmasının baskın mekanizmasının endositoz olduğunu göstermektedir (Krylova ve Feng, 2023).

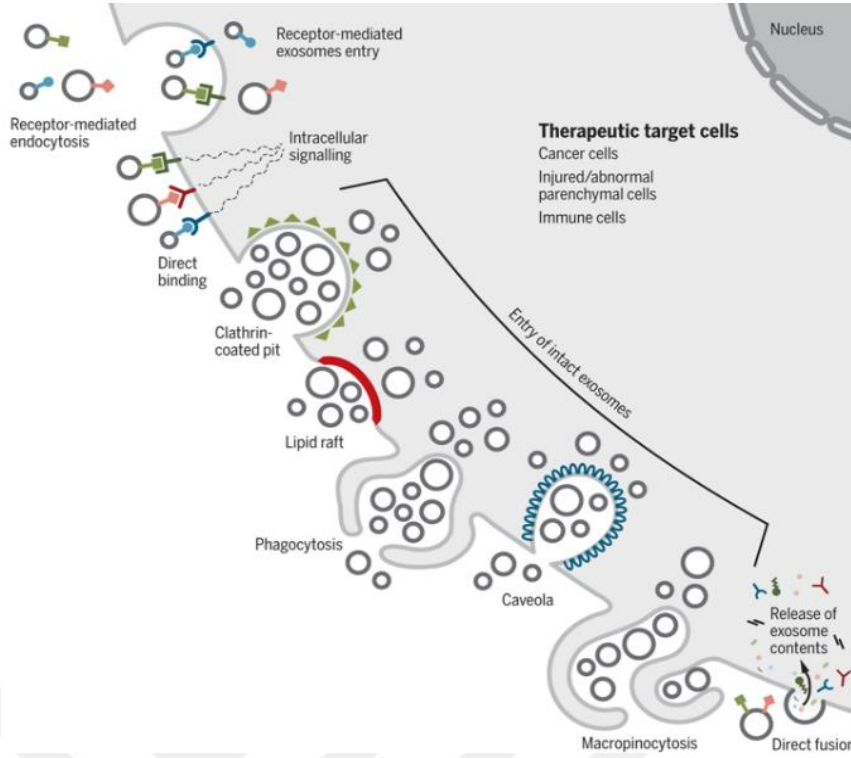
Eksozomların bir diğer hücre içine giriş yolu, endositozdur. Endositoz; fagositoz, mikropinositoz, lipid salı klatrin ve kaveolin aracılı endositoz gibi farklı yolları kapsar.

Klatrin aracılı endositoz: Çeşitli transmembran reseptörleri ve ligandlarının birleşimi ile klatrin proteinleriyle kaplı veziküller oluşturan endositoz yoludur. İçeri alınan eksozomlar endozomlarla birleştirilmek üzere kaplamadan çıkar. Makrofajlar, epitelyal, ve sinir hücreleri gibi farklı hücre tipleri bu endositoz yolunu kullanır. Ayrıca kanser hücrelerinde, transferrin reseptörünün fazlaca ifadesi eksozom alımının artmasını destekler (Gurung ve diğerleri, 2021).

Lipit salı aracılı endositoz: Lipid salları, kolesterol, sfingolipidler gibi lipidlerin ve bunlarla ilişkili proteinlerin bulunduğu membran mikro alanları olarak tanımlanır. Lipid salları tarafından eksozom alımı, bu lipidlerin inhibe edilmesiyle negatif yönde etkilenir. Örneğin, hücre içi kolestrol trafiğine müdahale eden metil- β -siklodekstrin bileşiği, meme kanseri hücrelerine eksozom alımını azalttığı bildirilmiştir (Gurung ve diğerleri, 2021).

Kaveolin bağımlı endositoz: İntegral zar proteinleri olan kaveolin aracılığı ile kaveola adı verilen küçük bir şişe şeklinde plazma zarı girintilerinin oluşması ile gerçekleşen alınma yoludur (Gurung ve diğerleri, 2021).

Fagositoz ve makropinositoz yolları hücre iskeleti üyesi aktinleri kullanır. Fagositozda, fagozom oluşumu, hücre iskeleti üyesi olan aktinin polimerizasyonuna bağlı bir mekanizmadır. Makropinositoz sırasında, plazma zarı çıkıntıları aktin filamentleri tarafından indüklenir ve küçük parçacıklar birlikt hücre dışı sıvıyı spesifik olmayan bir şekilde endositozlar (Giordano ve diğerleri, 2020).



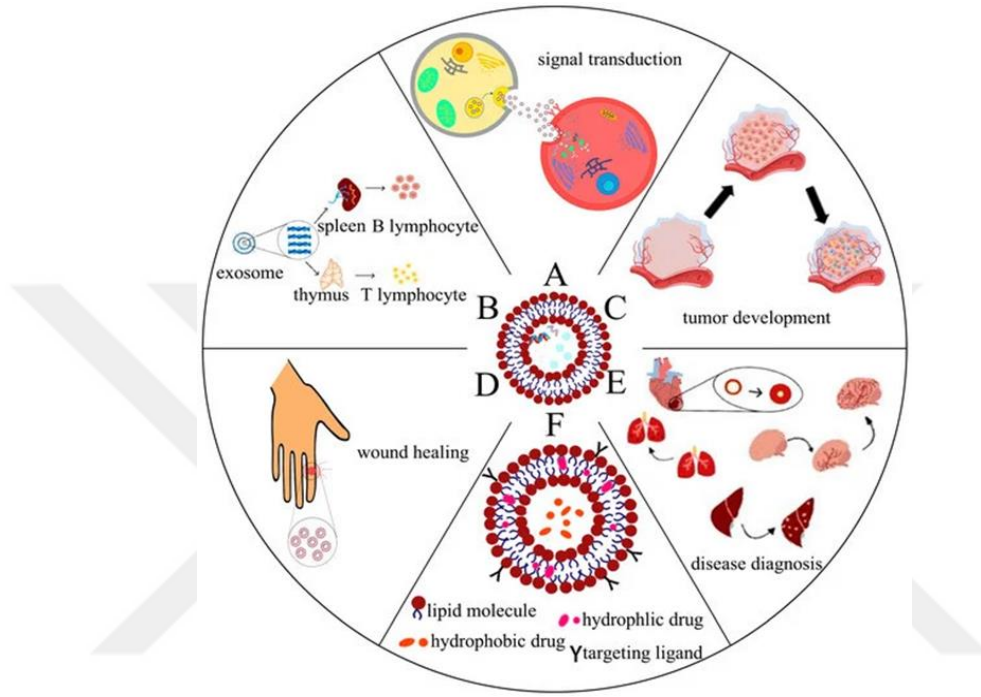
Şekil 14. Eksozomların hücresel alım yolları (Kalluri ve LeBleu, 2020).

2.4.3. Eksozomların Biyolojik İşlevleri

Eksozomlar immün sistem hücreleri (mast, dendritik, B-T lenfosit) nöronlar, kanser hücreleri, endotel ve epitel hücreler tarafından sekrete edilebilen fizyolojik ve patolojik durumlarda kan, amniyotik sıvı, idrar, beyin-omurilik sıvısı (BOS), süt, tükürük gibi birçok vücutsal sıvıda tespit edilmiştir (Lim ve Kim, 2019). Eksozomların genç kırmızı kan hücrelerin olgunlaşması sırasında artık kullanılmayacak olan transferrin reseptörleri gibi membran proteinlerini uzaklaştırmak için sekrete ettiği gösterildikten sonra eksozomların sadece istenmeyen molekülleri hücreden uzaklaştırmada görevli olduğu düşünüldü. Ancak biriken kanıtlarla eksozomların en temel görevinin hücreler arası iletişim olduğu, bununla birlikte hem fizyolojik hem de patolojik bir çok süreçte rol üstlendiği keşfedildi (Şekil 15). Eksozomlar kaynak aldıkları hücrelere ve taşıdıkları kargolara bağlı olarak hücreler üzerinde zıt etkilere yol açma potansiyeline sahiptirler (Rashed ve diğerleri, 2017).

Mevcut bilgilerle eksozomların fonksiyonları çeşitlidir; emzirme, anjiyogenez, nöronal fonksiyon antijen sunumu, apoptoz, hücre proliferasyonu, doku onarımı, hücresel dengenin sağlanması, bağışıklık tepkisi gibi fizyolojik süreçlerde, diyabet, karaciğer ve otoimmün

hastalıklar, nörodejenerasyon, kanserlerin gelişimi ve yayılması gibi patolojik süreçlerde rol oynarlar (Gurunathan ve diğerleri, 2019; Rashed ve diğerleri, 2017). Eksozomların görev aldıkları roller taşıdıkları kargoları (RNA, protein, lipid) aktarma yeteneklerine bağlıdır ve bu kargolar sayesinde eksozomlar, hastalık tanısında biyobelirteçler ve tedavide terapötik kargo taşıyıcıları olarak araştırılmaktadır (Gurung ve diğerleri, 2021).



Şekil 15. Eksozomların biyolojik işlevleri: (A) hücreler arası iletişim, (B) bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi, (C) tümör gelişimi, (D) yara iyileşmesi, (E) hastalıklarda tanısal biyobelirteç olarak kullanımı, (F) terapötik kargoları taşıma gibi işlevleri vardır (Zeng ve diğerleri, 2023).

Kan dolaşımındaki eksozom popülasyonlarının büyük bir yüzdesi bağışıklık hücrelerinin sekrete ettiği eksozomlardır. Eksozomların immün tepkisini düzenleyen molekülleri taşıyarak bağışıklık düzenleyici görevleri üstlenirler. Örneğin, Dentritik hücreler, sekrete edilen eksozomların etkisiyle T hücresi yanıtlarını ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin fonksiyonlarında modülasyon görevi üstlenir (Lim ve Kim, 2019). Eksozomlar sinir sisteminde olduğu gibi bağışıklık sisteminin iletişiminde dahildir. Antijen sunan hücrelerden sekrete edilen eksozomlar, $CD8^+$ ve $CD4^+$ T hücrelerinin membranlarında farklı immünomodülatör etkiler oluşturmada görevli MHC sınıf I ve II moleküllerini taşıyabilir (Kimiz-Gebologlu ve Oncel, 2022). 1996 yılında Rasopo ve diğerleri, insan ve fare B lenfositlerinin eksozomlarında MHC II içerdiğini ve eksozomların in vivo olarak antijen sunumunda görev aldıklarını, T

hücresi çoğalmasını uyararak tümör büyümesini inhibe edebildiklerini gösterdiler. (Raposo ve diğerleri, 1996). Eksozomların immünomodülatör etkiler çift taraflıdır; immünsüpresif veya immün-aktif (Jan ve diğerleri 2019).

Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesine ait tümör nekroz faktörüne bağlı apoptoz indükleyici ligandlar (TRAIL), CD40 ve Fas ligandları (FasL) gibi proteinler, hedef hücrede ölümünü tetikleyen kaynak hücrelerin sekrete ettiği eksozomlar üzerinde taşınabilir (Lyu ve diğerleri, 2024). Ayrıca virüsün enfekte ettiği hücrelerden salınan eksozomlarda paketli viral patolojik kargoların (viral RNA'lar, proteinler) yayılmasını sağlayarak viral enfeksiyonlara katkı sağladığına dair kanıtlar bulunmaktadır. (Omrani ve diğerleri, 2024). Eksozomlarda taşınan insan immün yetmezlik virüsünde (HIV) ile ilişkili faktörlerin , yeni HIV enfeksiyonu oluşturmasını etkilediği gösterilmiştir. Negatif düzenleyici faktör (Nef) HIV ile enfekte olmuş hücrelerden eksozom sekresyonuyla hücre dışına çıkan bir aksesuar proteinidir. Salınan Nef proteinleri, HIV'in ilk saldırı hedefi olan CD4⁺ T hücrelerinin apoptozunu indükleyerek, immünosupresyon sürecine katılır (Lenassi ve diğerleri, 2010) .

Eksozomlar ve kanser ilişkisi mevcut araştırmaların odak noktasıdır. Eksozomlar kanserleşmenin hemen hemen her aşamasında sürece dahil olurlar. Tümör eksozomları, hücre-hücre iletişimiyle kanserin başlatılmasında, ilerlemesinde ve tedavi rezistansında görev alırlar. Dolayısıyla eksozomlar kanserde biyobelirteç olarak tümörün ilerlemesinin gerçek zamanlı göstergesidir (Kar ve diğerleri, 2023; Lim ve Kim, 2019). Kanser bölgesi tümör hücrelerinin farklı alt gruplarını ve bağışıklık hücrelerini içeren karmaşık asidik ve hipoksi mikroçevreye sahiptir. Bu çevrede tümör büyümesi ve göçü için iletişim eksozomlar, sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleriyle sağlanır (Lyu ve diğerleri, 2024). Eksozomlar bağışıklık ve tümör hücreleri arasındaki iletişimde çift taraflı köprü görevi görür. Hem bağışıklık hücrelerinin aralarında iletişim kurmasında ve bağışıklık tepkisi aktivasyonuna hem bağışıklık hücrelerinin tümör büyümesine davet etmek için immün sistemini düzenleyebilir (Lyu ve diğerleri, 2024). Eksozomlar, tümörün gelişmesi ile ilişkilendirilen birden fazla miRNA ve proteinlerle ilişkilidir. Kanser eksozomları hücre dışı matrisi degrade eden matris metaloproteinazları (MMP) etkileyerek hücrelerin sabit halden hareketli hale gelmesini sağlar. Böylece kanser hücrelerinin mezenkimal geçişinde (EMT) sorumlu olurlar. Metastazlar rastgele değildir, eksozom membran integrin proteinleri rehberliğinde organa özgü metastazlarda rol oynar (Kar ve diğerleri, 2023). Kanser hücresinden kaynak alan eksozomların taşıdıkları içerik malign olmayan hücreler tarafından alınması tümör oluşumunu tetikler (Bozkurt, 2018).

Örneğin Kia ve diğerleri (2019) yaptığı çalışmada agresif ve metastatik insan BC hücre hattı olan MDA-MB-231'den izole edilen eksozomların metastatik olmayan insan BC hattı MCF-7 hücreleri ile inkübasyonu sonucunda büyüme, göç ve invazyon gibi yeteneklerinde artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar eksozomların malign transformasyonu tetikleyebileceği göstermiştir (Kia ve diğerleri, 2019).

Kanser hücrelerinin gelişmesi ve yayılmaları için kan damarlarından besin ve oksijen sağlanması gerekir, bu patolojik anjiyogenez sürecinde de eksozomların düzenleyici rolü vardır. Örneğin Umezu ve diğerlerinin (2013) yaptıkları çalışmada anjiyogenez düzenleyicisi olan miR-92a ile transfekte edilmiş lösemi hücrelerinin (K562) sekrete ettikleri eksozomlar aracılığıyla hücre-hücre iletişimin, insan göbek kordonu endotel hücrelerinin (HUVEC) anjiyojenik süreçleri olan endotel göçünü ve tüp oluşumu artırıcı yönde düzenlediğini buldular (Umezu ve diğerleri, 2013).

Yara iyileşmesinde hücre proliferasyonunu ve anjiyogenez sürecini teşvik etmesi sebebiyle özellikle kök hücrelerin eksozomları üzerinde durulmaktadır. Kök hücre eksozomları yara iyileşmesiyle ilişkili stromal hücreden türetilmiş faktör 1 (SDF1), hepatosit (HGF), sinir (NGF), insülin benzeri 1 (IGF1) büyüme faktörlerinin ekspresyonunu artırır. Ayrıca AKT, ERK ve STAT3 gibi iyileşme sinyal yolları da bu eksozomlar tarafından aktive edilir. Kolajen üretimi ve yeni damar gelişmesi desteklenerek yara iyileşmesi desteklenir (Rahmati ve diğerleri, 2020).

Borges ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada böbrek hasar modelinde yaralanan epitel hücrelerinden fibroblastları aktive eden, dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1) mRNA'ları içeren eksozomların salgısının arttığını ve bunun fibroblast proliferasyonunu, kolajen üretimini teşvik ettiğini buldular. TGF- β 1 mRNA'larının yaralanma sonrası doku onarımına yanıt oluşturduğu bildirdiler (Borges ve diğerleri, 2013).

Li ve diğerleri insan göbek kordonu kanından izole edilmiş endotel progenitör hücrelerinin (EPH) eksozomları endotel hücreler tarafından içselleştirilip bu hücrelerde göç, çoğalma ve anjiyogenezle ilgili genlerin ekspresyonunu arttırdığı belirlendi. İn vivo çalışmalarda EPH eksozomlarının vasküler yaralanma modeli yapılan sıçanlarda endotelizasyonu hızlandırdığı gözlemlendi. Sonuç olarak EPH eksozomları yaralı bölgeler tarafından alınıp, vasküler rejeneratif tepkiler ortaya çıkarabilir (X. Li ve diğerleri, 2016).

Sinir sisteminde eksozomların görevleri çift taraflıdır. Nöronlar ve mikroglialar tarafından sekrete edilen eksozomlar hücre iletişimde rol alır, sinir ve nöron yenilenmesine

katılarak nöroprotektif etkiler gösterirken aynı zamanda prionlar, β -amiloid peptitler gibi patojenik proteinleri taşıyarakta nörodejeneratif hastalıkları şiddetlendirmektedir (Jan ve diğerleri, 2019). Başka bir avantajı kan-beyin bariyerini (KBB) geçebilmeleri ile terapötik ilaç taşıyıcıları olarak potansiyel kullanımıdır.

Emmanouilidou ve diğerlerinin (2010) yaptıkları çalışmada Parkinson hastalığının gelişmesinde rol oynayan α -Sinükleinin eksozomlar tarafından nöron hücrelerden sekrete edilerek patolojisinin yayılmasını sağladığı ve çevre nöronlarında sağlığını etkilediğini bildirmişlerdir (Emmanouilidou ve diğerleri, 2010).

Xin ve diğerlerinin (2012) yaptığı çalışmada multipotent mezenkimal stromal hücrelerden (MSC) sekrete edilen eksozomlardaki miR-133b'nin sıçan sinir hücrelerine iletilebildiğini ve bunun felç sonrası iyileştirmeyi tetiklediğini gözlemlediler (Xin ve diğerleri, 2012).

Kanser teşhisinde geleneksel biyopsilerde alınan doku parçası kanserin histopatolojisini verse de, tümörün küçük bir alanını yansıtır ancak kanserin birincil ve metastas bölgesinin tüm doğasını, tümör heterojenliğini ve farklı genomik profillerini yansıtamaz. Tedavi süresince ve sonrasında tedavi yanıtını tespit etmek için tekrar örnekleme yapılmalıdır. Ancak tedavi cerrahi operasyonla müdahale edilmiş tümörün doku biyopsisi ile izlenmesi olası değildir. Kanserlerin erken tanısı, ilaç direnci, tekrarlaması yada gerilemesini, tedavi yanıtı ve ayrıca mikroçevresinin anlaşılmasına yönelik yeni yaklaşım olan sıvı biyopsi daha avantajlıdır . (Halvaei ve diğerleri, 2018; Lim ve Kim, 2019) . Metastatik kanserlerde tümör hücreleri ve eksozomları, kitleden ayrılıp, kan dolaşımı gibi biyosıvılara göç eder. Tükürük, kan, idrar ve BOS gibi biyosıvılarda bulunan kanser kaynaklı eksozomlar tümörler hakkında potansiyel bilgi sağlayıcılarıdır (Andre ve diğerleri, 2024; Halvaei ve diğerleri, 2018).

Sıvı biyopsilerden elde edilen eksozomlar kanser mikroçevresini etkileyen ve kanserin patolojisinde rol oynayan, kaynaklandıkları hücrelerin nükleik asit ve protein profillerini taşır. Bu kargolar kanserin tespiti için potansiyel tanı aracı olabilir (Andre ve diğerleri, 2024). Eksozomlar kargolarını membranlarının koruyucu etkisiyle uzun mesafelerde ve sürelerde dolaşımda ve diğer vücut sıvılarında biyolojik aktivitesini bozmadan taşır. Bu sebeple yeni sıvı biyopsilerinde tümör kaynaklı eksozomların nükleik asitlerinin kullanımı, geleneksel sıvı biyopsi de kullanılan dolaşımdaki serbest tümör DNA'ya göre miktar ve stabilite açısından daha avantajlıdır (Andre ve diğerleri, 2024; Mehryab ve diğerleri, 2020).

Rontogianni ve diğerlerinin (2019) meme kanseri eksozomlarının proteom profilini çıkarmak için dokuz farklı meme kanseri hücre hattı, bir sağlıklı meme hücre hattından salgılanan EV'leri izole edilerek, kütle spektrometresi ile analiz etti.

TNBC eksozomları, anjiyogenez ve metastatik süreç ilişkili proteinler açısından zengin, HER2+ eksozomları hücre çoğalmasında görevli proteinler açısından zengin olduğunu buldular. Çalışmada tanımlanan alt tipe özgü BC biyobelirteçleri, aynı zamanda HER2+ ve TNBC tanısı konmuş hastaların serum örneklerinde de mevcut olduğu bulundu. Bu veriler, BC alt tiplendirmesinde eksozom protein biyobelirteçlerinin kullanılma potansiyelini göstermiştir (Rontogianni ve diğerleri, 2019).

Jang ve diğerlerinin (2021) yaptıkları çalışmada erken meme kanserli ve sağlıklı kadınlardan toplanan plazma örnekleri arasında toplam dokuz aday miRNA ekspresyon düzeyini karşılaştırdı. Belirlenen miRNA'lardan iki ve fazla miRNA'nın kombinasyon halinde, örneğin miR-1246, miR-206, miR-24, miR-373, tek bir biyobelirteç kullanımına göre %97 doğrulukla tespit edebildiği bulundu. Bu sonuçlara göre, miRNA'nın erken meme kanseri teşhisinde belirteçler olarak kullanılabileceği belirtildi (Jang ve diğerleri, 2021).

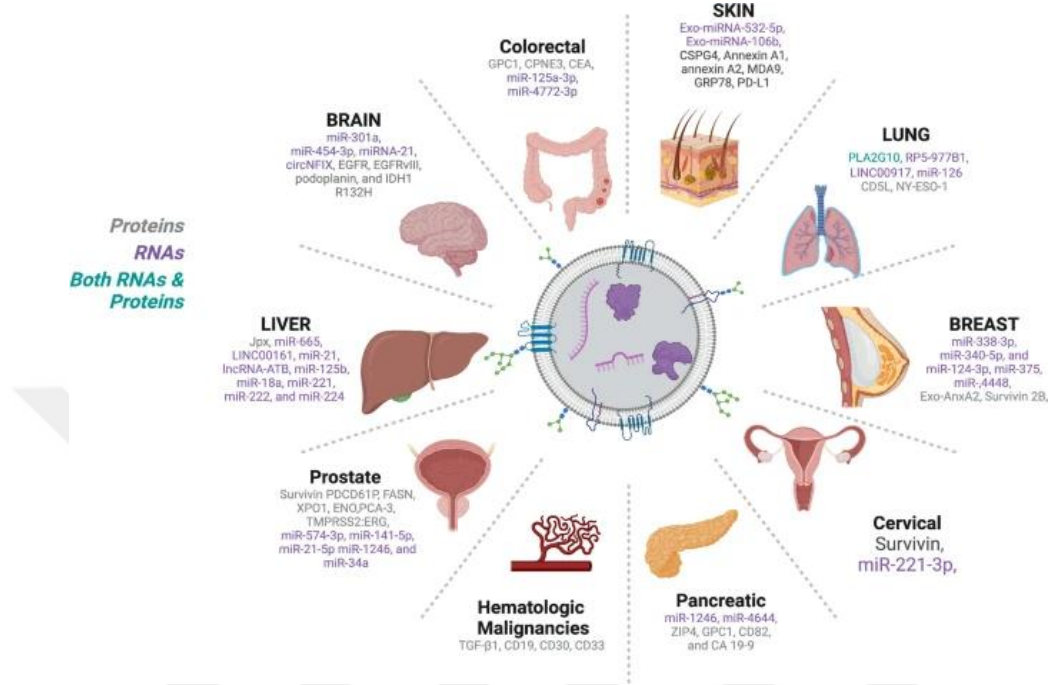
Vücuttaki hücrelerden sekrete edilen eksozomların büyük bir kısmı hücreler arası sıvıya ve kana karışır. Bu sebeple, kan plazması eksozomları kanser ve kanser dışındaki diğer hastalıkların biyobelirteç çalışmaları açısından önemli bir kaynaktır. Bir diğer kaynak olan idrar eksozomları üreme sistemi ve böbrek kanserlerinde çalışılan potansiyel biyobelirteçlerdir (Thomas ve diğerleri, 2022).

Kuwabara ve diğerlerinin (2011) yaptıkları çalışmada, kardiyovasküler hastalarının Serum miRNA (miR)-1 ve miR-133a seviyelerinin artışının potansiyel miyokardiyal hasar belirteci olduğunu gösterdiler (Kuwabara ve diğerleri, 2011).

Srivastava ve diğerlerinin (2018) yaptığı çalışmada endometriyal kanserli hastaların idrar örneklerinden saflaştırılan eksozomlarda bulunan farklı miRNA seviyeleri değerlendirildi ve üriner eksozomlarda hsa-miR-200c-3p'nin zenginleşmesinin potansiyel biyobelirteç olarak endometriyal kanserli teşhisinde kullanılabileceği belirtildi (Srivastava ve diğerleri, 2018).

Eksozomlar farklı kanserlerin hatta aynı kanser türünün alt tiplerini ayırt etmek ve ilerlemesini eş zamanlı izlemek için potansiyel niteliğindedirler (Thomas ve diğerleri, 2022). Örneğin, Stevic ve diğerlerinin yaptığı çalışmada 435 BC hastasının dahil olduğu 45 miRNA paneli çalışıldı. HER2+ ve TNBC hastaları arasında sağlıklı donörlere göre miRNA desenleri

faklıydı. HER2+ ve TNBC'leri ayırt etmeye yarayan eksozomal miRNA'lar rapor edildi. Bununla birlikte bu miRNA'lar ilgili alt gruplardaki agresifliği ve klinikopatolojik özelliklerle ilişkili olduğu sonucuna varıldı (Stevic ve diğerleri, 2018).



Şekil 16. Farklı kanser türlerinde tümör kaynaklı eksozomların taşıdıkları protein ve RNA biyobelirteçlerinin özeti (Andre ve diğerleri, 2024).

Klinikte TNBC tedavisi, spesifik reseptörlerin yokluğundan dolayı sınırlı tedavi seçeneğine sahiptir. Kemoterapi ajanlarının kombine kullanımı küçük bir terapötik çözüm oluştururlar. TNBC doğası sebebiyle yakın bölgelere metastas yapmasıyla bilinir. Beyne sıçramış TNBC için kemoterapiklerin kullanımı daha da sınırlayıcıdır çünkü çoğu KBB'yi geçemezler (Banerjee ve Rajeswari, 2023). Mevcut kanser ilaçları hedeflemeden yoksundur, bu da sağlıklı hücrelerde de istenmeyen toksisiteye sebep olur. İlaç, protein ve nükleik asit kargolarının teslimat aracı olarak eksozomların kullanılması hücrelere güvenli dağılım ve istenilen hücre içi sürekli salınımı sağlar (Koh ve diğerleri, 2023). Diğer ilaç dağıtım sistemlerine örnek olarak nanopartiküller, lipozomlar, miseller, örnek olarak verilebilir ancak ilaç biyoyararlanımının düşük olması ve sistematik toksisite göstermeleri gibi dezavantajların üstesinden gelemediler. İlaç dağıtım sistemlerine sonradan eklenen eksozomlar ise gösterdikleri minimum toksisite, düşük immünojenite, iyi biyoyararlanım, içerdikleri kargoları membran yapıları sayesinde bozunmadan korumaları, hücre/organ tropizmi sebebiyle ilgi çeken yeni alternatifler olmuştur (Lim ve Kim, 2019).

Geleneksel tedavi olarak doğrudan verilen ilaçla kıyasla eksozomda paketlenmiş ilaç, sağlıklı dokulara verilen toksisitesi azaltıp, terapötik etkinliği arttırabilir.

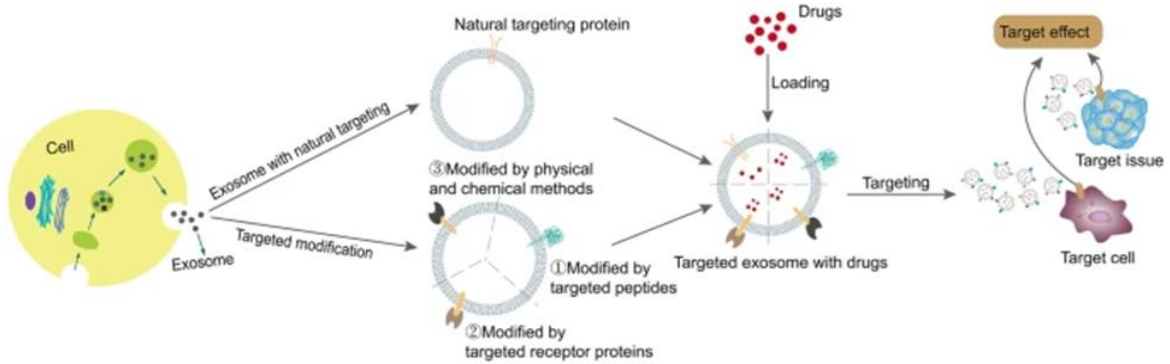
Tedavi süresinde eksojen verilen maddelerin vücudun savunma sistemi ve fiziksel bariyerleri sebebiyle istenilen bölgelere ulaşması engellenebilir (He ve diğerleri, 2022). Eksozomlar ayrıca vücudun bağışıklık sisteminden de kaçabilirler. CD47, tümör hücrelerinde fazlaca eksprese edilen bağışıklık kontrol noktasıdır. Eksozomların membranında bulunan tetraspin proteinlerinden CD47 sinyal düzenleyici protein alfaya (SIRP α) bağlanır ve "beni yeme" sinyalini göndererek makrofaj fagositozdan kargosunu korur. Bu özellik eksozomun kanda yarılanma ömrünü uzatır. KBB nedeniyle çoğu ilaç beyin lezyonlarına etkili bir şekilde ulaşp bölgede birikemezken eksozomlarla bu bariyer aşılabılır (He ve diğerleri, 2022; Lyu ve diğerleri, 2024). Eksozomların hücrelerden türetilmesi ve alıcı hücrenin yapısına benzemesi vücuttaki çeşitli hücreler tarafından içselleştirilmesine kolaylık sağlar (Peng ve diğerleri, 2020).

Eksozomların içine sadece kemoterapik ilaçlar değil, proteinler ve miRNA, siRNA, mRNA gibi nükleik asitlerde yüklenebilir. Çalışmalar eksozomlar diğer nanoparçacıklara kıyasla en etkili RNA taşıyıcıları olduğu göstermiştir (Kar ve diğerleri, 2023). Son zamanlarda eksozomların hedef spesifikliğini arttırmak için yüzey modifikasyonları geliştirilmiştir. Yüklü doğall eksozomlar doğall tropzimi kullanarak pasif hedefleme ile yada eksozom membranının yüzey modifikasyonları ile aktif hedefleme yapılabilir. Aktif hedefleme ile spesifikk bölgede ilaçların konsantrasyonu arttırılabilir (Choi ve diğerleri, 2022; Kar ve diğerleri, 2023).

Pasif hedeflemede eksozom yüzeyinde bulunan yüzey proteinlerinin doğall tropziminden yararlanılır. Örneğinn tümörün metastası rastgele değildir, tümörden salınan eksozomlar onko gen ve proteinleri taşıyarak, metastaz organlarına bağlanması ve bölgeye metastazı hedefler. (He ve diğerleri, 2022). Bu bilgi, kanser hücresi eksozomlarının ilaçla yüklenerek kaynak hücrelerine ve diğer tümör hücrelerine hedeflenmesinde kullanılabileceğii fikrini verir (Choi ve diğerleri, 2022).

Eksozomların doğuştan gelen homing yeteneğinn spesifikk antikorlar, hedefleme peptitleri gibi yüzey modifikasyonları ile geliştirilip bunlara ilaç yüklenmesiyle hedef dokuya spesifikk hedeflemeyi arttırılabilir, böylece klinik etki daha da iyileştirilebilir (Şekil 17) (Banerjee ve Rajeswari, 2023). Hedefleme eklentileri, tıklama kimyası adı verilen yöntemlerle eksozom yüzeyine etiket yapılabilir yada eksozom donörünün membran proteinlerine kaynaşık

olarak hedefleme peptitlerini eksprese etmesi için genetik yollarla yapılabilir (Choi ve diğerleri, 2022).



Şekil 17. Doğal ve modifiye edilmiş hedefli eksozomların ilaç taşıyıcıları olarak kullanılması (He ve diğerleri, 2022).

Tian ve diğerlerinin (2014) yaptıkları çalışmada hedefleyici eklerle modifiye edilen ilaç yüklü eksozomların terapötik dağıtım sistemi olarak kullanımı araştırıldı. DOX'un toksisitesini azaltmak adına spesifik hedefleme için, dendritik hücrelerinin eksozom membran proteini olan Lamp2b ile kaynaşık av integrin spesifik iRGD peptidi eksprese edecek şekilde tasarlanan eksozomlar üretildi. İn vitro çalışmalarda DOX yüklü modifiye eksozomlar meme kanseri hücre hattında yüksek ilaç iletimi gösteridi. Hayvan çalışmalarında ilacı spesifik tümör dokularına hedefleyebildiğini ve tümör büyümesini inhibe ettiğini buldular (Y. Tian ve diğerleri, 2014).

Agrawal ve diğerlerinin (2017) oral yoldan alınabilecek PTX yüklü inek sütü eksozomlarını tasarladılar. Farelere oral yolla verilen ilaç sistematik toksisiteyi azalttı ve akciğer kanserine karşı önemli tümör büyümesi inhibisyonu gösterdi. Bununla birlikte farelere aynı dozda intraperitoneal PTX verilmeside etki gösterdi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuç olarak oral eksozom PTX, geleneksel intravenöz (iv) PTX uygulamasındaki immünolojik tepkilerini aşabileceği belirtildi (Agrawal ve diğerleri, 2017).

Qiao ve diğerlerinin (2020) yaptığı çalışmada DOXil (DOX içeren lipid küre formülasyonu) membran ekstrüzyonu yoluyla fibrosarkom (HT1080) ve rahim ağzı kanseri (HeLa) eksozomlarına dahil edildi. İn vitro çalışmalarda her iki formülasyonunda HT1080 hücrelerince içeri alınmasına rağmen, Doxil içeren HT1080 eksozomlarının alımı daha fazlaydı ve en az alım serbest Doxildi. Yapılan in vivo çalışmada, farelerde HT1080 tümör modeli oluşturuldu ve Doxil yüklü HT1080/HeLa eksozomlarını iv olarak enjekte edildi. Doxil-

HT1080 eksozomları tercihen tümör dokusuna lokalize oldu ve ayrıca tek Doxil'e kıyasla tercihli alımıyla tümör dokulara etkili şekilde ulaşp, tümör büyümesini engellediği gösterildi.

Bu sonuçlarla, kanser hücrelerinden türetilen eksozomların, hücre tipi tropizmi gösterdiği, ve ilaç yüklü kanser eksozomlarının hedefe yönelik kanser tedavileri için kullanılabileceği gösterildi (Qiao ve diğerleri, 2020).

2.4.4. Eksozomların İzolasyonu

Eksozomların elde edileceği kaynak, seçilecek izolasyon yöntemi ve yöntemin etkinliği üzerinde büyük öneme sahiptir. Eksozomların izolasyon kaynakları geniştir. Hücre kültürü ortamı, kan, idrar, süt bu kaynaklara örnek olarak sayılabilir. Hücre kültürü çalışmalarında eksozomların besiyerine salınması sonrası toplanan kültür ortamı, eksozom seri üretimi için uygun ve yaygın bir kaynaktır. Hücre kültürü ortamı, serum veya plazma gibi kaynaklardan daha yüksek bir eksozom verimi sağlayabilir. Diğer biyolojik sıvılar örneğin, kan plazması benzer boyutta ve özellikte diğer MV'leri ve plazma proteinlerinden oluşan karmaşık bir kaynaktır. Buda eksozom izolasyonunu zorlaştırır (Lai ve diğerleri, 2022).

Tüm bu saflaştırma yöntemleri içinde tek bir yöntemin yüksek saflık ve verimde eksozomları elde etmesi zordur. Saflaştırma sonrasında büyük ölçekli uygulamalarda kullanılmak üzere yüksek kalitede eksozomların eldesi için saflaştırma tekniklerinin geliştirilmesi bir ihtiyaçtır. Saflaştırma yöntemlerinden beklenti, güvenilir, uygulaması kolay, hızlı, eksozomların doğal yapısına zarar vermeyen, yüksek verimde ve saflıkta eksozom eldesidir (J. Li, ve diğerleri, 2023). İdeal izolasyon yöntemi, küçük boyutlu eksozomları diğer hücre kalıntıları, mikrovesiküller ve proteinler gibi kirletici bileşenlerden ayırtmalıdır. İzolasyon teknikleri geleneksel ve gelişmiş olarak 2 temel gruba ayrılabilir. Geleneksel teknikler: Ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon, boyut dışlama kromatografisi, immünoanaliz iken, gelişmiş teknikler mikroakışkan sistemlerdir (Şekil 18) (Moghassemi ve diğerleri, 2024; He ve diğerleri, 2022).

Ultrasantrifüjleme (UC) mevcut altın standart tekniktir. Yöntem numunedeki eksozomları ve safsızlıkları yoğunluklarına göre ayırır. Bu teknikle eksozomlar $100.000 \times g$ ile $210.000 \times g$ arasında merkezkaç kuvvetine maruz kalır. Yüksek hız, eksozom saflığını iyileştirebilir ama eksozom yapısına zarar verme riskinde taşır (Lai ve diğerleri, 2022). Bu

teknik, büyük ölçekli üretimlere uygundur. Dezavantajları olarak, zaman alıcıdır ve spesifik olmayan saflaştırma ile sonuçlanabilir. Ultrasantrifüj pahalı bir ekipmandır (Moghassemi ve diğerleri, 2024; Li ve diğerleri, 2023).

UC'ye iki alternatif, diferansiyel ultrasantrifüjleme (DUC) ve yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjlemedir (DGUC). DUC, kademeli artan hız ve süre adımları ile ayırma yaparken daha fazla çaba ve süre alır. DGUC, ayırma için yoğunluk katmanları ve merkezkaç kuvvetini kullanır. Tekniğin mantığı, belirli hızda numunedeki bileşenlerin yoğunluklarına göre uygun bölgede toplanmasıdır. Daha yüksek saflıkta ancak düşük verimde membran bütünlüğünü korumuş eksozomlar elde eder (Li ve diğerleri, 2023).

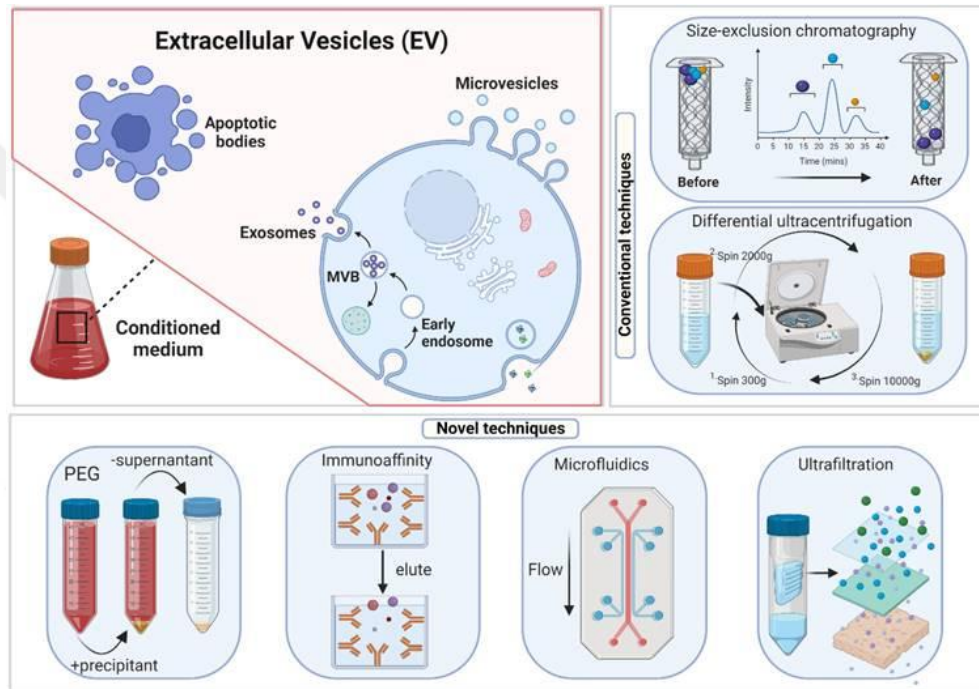
Ultrafiltrasyon, eksozomları numunenin farklı gözenek boyutlarına sahip membranlardan basınç uygulayarak geçirilmesiyle boyutuna göre izole eder. Eksozomlar için boyut dışlama aralığı 20-200 nm'dir. Gözenek boyutları daha büyük yada daha küçük olan membranlar, diğer istenmeyen parçacıkların uzaklaştırılması ek adımlarda kullanılabilir (Lai ve diğerleri, 2022). Ultrafiltrasyon kolay ve hızlıdır. Ancak filtredeki membranının tıkanması ve eksozomun filtreye sıkışarak kaybı; ayrıca vesikül boyutundaki heterojenlik bu yöntemi sınırlar (Moghassemi ve diğerleri, 2024). Filtrasyon ve ultrasantrifüj teknikleri kombine kullanılabilir. Santrifüj öncesi yapılan filtreleme büyük kalıntıları uzaklaştırır ve filtrat ultrasantrifüjle daha da saf hale getirilebilir (Omrani ve diğerleri, 2024).

Boyut dışlama kromatografisi (SEC): UC'ye bir alternatif SEC'dir. Bu yöntemde yerçekiminden yararlanılır, dolayısıyla eksozom bütünlüğüne ve biyolojik aktivitesine verilen zarar minimumdur. İzole edilen eksozomların saflığı yüksektir ancak uzun izolasyon süresi dezavantajdır. (Lai ve diğerleri, 2022) Numune gözenekli bir jel filtrasyon polimeri içeren kolona yüklenerek, sırasıyla boyutlarına ve moleküler ağırlıklarına bağlı olarak büyük parçacıkların, ardından daha küçük keseciklerin elüsyonunu sağlar. Farklı aşamalarda toplanan eluentler farklı boyutlarda içeriklere sahiptirler (Li ve diğerleri, 2023).

İmmunoafinite tekniği, manyetik boncukların eksozomların membranlarında bulunan protein belirteçlerine hedefli antikorlarla kaplanıp, eksozomları spesifik olarak yakalanmasına dayanır. Tetraspanin ailesi üyeleri CD9, CD63 ve CD81, ALIX ve ısı şoku proteinleri immün yakalamada kullanılır. Saflık yüzdesi yüksek olmasına rağmen yakalanan eksozomları antikorlardan ayırmak için ekstra adımlar uygulanır ve bu aşamalarda eksozomların bütünlüğünü tehlikeye atabilir. Büyük hacimler için pahalı bir tekniktir (Kimiz-Gebologlu ve Oncel, 2022; Omrani ve diğerleri, 2024).

Mikroakışkan sistemler eksozomların fizikokimyasal özelliklerinden yararlanarak mikro ölçekte izolasyonlarını yapan gelişmiş bir tekniktir. Mikroakışkan sistemlerle, tek bir çip üzerinde eksozom ayırma, yerinde tespit ve analizi yapılır.

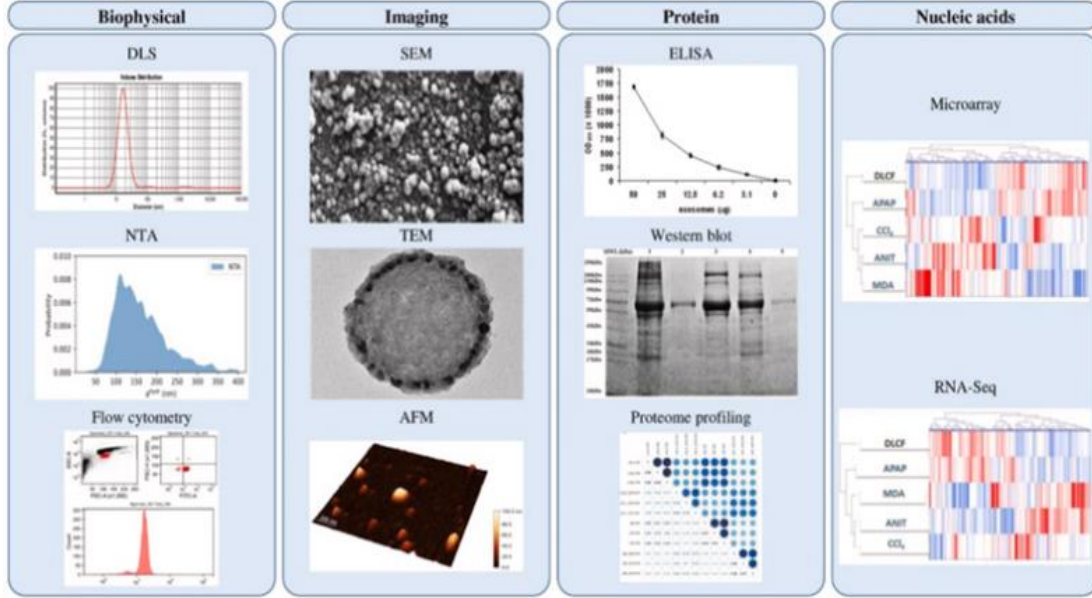
Bu şekilde örnek kaybı azaltılarak, yüksek verim sağlanabilir. Bu sistemler etiketli yada etiketsiz olarak kullanılabilir. Etiketli sistem, eksozomları spesifik olarak ayırmak için immün afiniteyi baz alırken, etiketsiz yöntemler, boyut farklılıklara dayalı olarak eksozomları saflaştırır (Omranı ve diğerleri, 2024). Daha yüksek saflıkta ve verimle eksozom eldesi sağlar fakat büyük ölçekli üretime şimdilik uygun değildir (Kimiz-Gebologlu ve Oncel, 2022).



Şekil 18. Eksozom izolasyon yöntemleri (G. Yang ve diğerleri, 2023).

2.4.5. Eksozomların Karakterizasyonu

Eksozomların izolasyonundan sonra klinik ölçekte uygulama aşamasına geçmeden önce izolasyon sürecini değerlendirmek, eksozom saflığını, eksozomun taşıdığı protein ve nükleik asit kargosunun karakterize edilmesi gerekir. Karakterizasyon için kullanılan teknikler biyofiziksel özelliklerin belirlenmesi için nanoparçacık izleme analizi (NTA), dinamik ışık saçılımı (DLS), akış sitometrisi (FCS), elektron mikroskobu (EM), protein içeriği için Western blotlama (WB), enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA), DNA/RNA içeriği sekanslama yöntemleri içerir (Şekil 19).



Şekil 19. Eksozom karakterizasyonu için kullanılan yöntemler (Moghassemi ve diğerleri, 2024).

Dinamik ışık saçılımı (DLS): eksozom boyutu hakkında bilgi verir. Prensip olarak, lazer ışını süspansiyona gönderilir ve süspansiyondaki Brownian hareketi yapan parçacıklardan saçılma yoğunluklarındaki dalgalanmaları analiz edilerek numunedeki vesiküllerin çap aralığı belirlenir (Gurunathan ve diğerleri, 2019). DLS ile paralel kullanılan bir diğer karakterizasyon yöntemi de uygulanan elektrik alanında hareket eden partikülün yüzey potansiyelini ölçen zeta potansiyeldir (Moghassemi ve diğerleri, 2024).

Nanoparçacık izleme analizi (NTA): DLS ile benzer olmasına rağmen NTA’da lazer gönderilen numunedeki partiküllerin Brownian hareketi, cihazda optik mikroskoba hassas kamera ile kaydedilir ve görüntü analizi yoluyla parçacık boyutu ilişkilendirilir. DLS yönteminde ölçüm minimum alt çapı 30 nm’dir. (Szatanek ve diğerleri, 2017). NTA partikül ortalama boyut ve boyut dağılımı, miktarını ve fenotipi verir. (Gurunathan ve diğerleri, 2019).

Akış sitometresi (FCM): FCM eksozomların yüzey proteinlerine göre ayırım yapar. Bu teknikte, eksozomlarda eksprese spesifik yüzey işaretleyicileri kullanarak heterojen bir topluluk olan eksozomların alt popülasyonları belirlenebilir (Moghassemi ve diğerleri, 2024). Diğer yöntemlerle kıyaslanırsa FCM, klinik örneklerin tekrarlanabilir analizi için uygun bir tekniktir (Mahgoub ve diğerleri, 2020). Akış sitometresi ile aynı okumada bir çok farklı parametre bakılabilir. Dezavantajları arasında 300 nm altındaki boyutları belirlenemezken diğer EV’ler tespit edilebilir. Eksozomlar boyutlarından dolayı belirlenemezken, membran antijenlerine hedefli bağlanan floresan boya etiketli antikorlarla bu aşılabilir.

Tekniğin mantığı, sıvı akışıyla birlikte numunedeki partiküllerin lazer ışınından geçirilmesi ve bu partiküllerin ışığı dağıtmasına dayanır. Cihaz dedektörleri etiketli parçacıkların floresan yoğunluğunu ve saçılan ışığı ölçer (Panigrahi ve diğerleri, 2022; Miron ve Zhang, 2024).

Eksozomların hem boyutları hem de morfolojilerinin incelenmesinde 2 farklı mikroskop tekniği, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılır. EM'nin mantığı, elektron sağlayıcısı materyal ile kaplanmış numunenin üzerine ışın uygulanmasıyla oluşan ikincil elektronların cihaz merceği tarafından toplanıp, morfolojik tanımlama yapılmasıdır. (Panigrahi ve diğerleri, 2022). EM çalışmaları sonucunda eksozomların küreselliği, diğer EV'lerin ise heterojen şekillerde görüldüğü belirlenmiştir (Szatanek ve diğerleri, 2017).

Eksozom proteinlerinin karakterizasyonunda ilk adım nispeten daha basit yöntemler olan kolorimetrik Bradford yada bisinkoninik asit (BCA) yöntemi ile total protein miktar tayinlerini yapmaktır. Western blot (WB) ve enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA), ikinci adım yöntemlerdir (Pelissier Vatter ve diğerleri, 2020). WB işleminde hücresel kökenden gelen ve eksozomların karakteristik yüzey belirteçleri kabul edilen CD9, CD63, CD81, ve TSG101 varlığı bunlara spesifik antikorlar kullanılarak testpit edilir. WB ile işlemi vezikülün kimliği belirlenir (Mehryab ve diğerleri, 2020). ELISA, yaygın bir immün etiketleme tekniğidir. ELISA mantığı, hücre kültürü yada vücut sıvıları gibi örneklerden önceden kit plakasının tabanına sabitlenmiş antijene spesifik antikorlarla eksozomların seçici yakalanmasıdır. Tutulan eksozomlarla miktar tayini yapılmış sağlanır (Szatanek ve diğerleri, 2017) Bu teknik eksozom profili oluşturma ve teşhis için kullanılır (Lai ve diğerleri, 2022). Eksozomların taşıdıkları bir diğer yükte nükleik asitlerdir. Eksozom karakterizasyonu için nükleik asitlerde tanımlanabilir. DNA/RNA içeriği mikrodizi analizi, yeni nesil dizileme (NGS), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analiz edilebilir. (Miron ve Zhang, 2024).

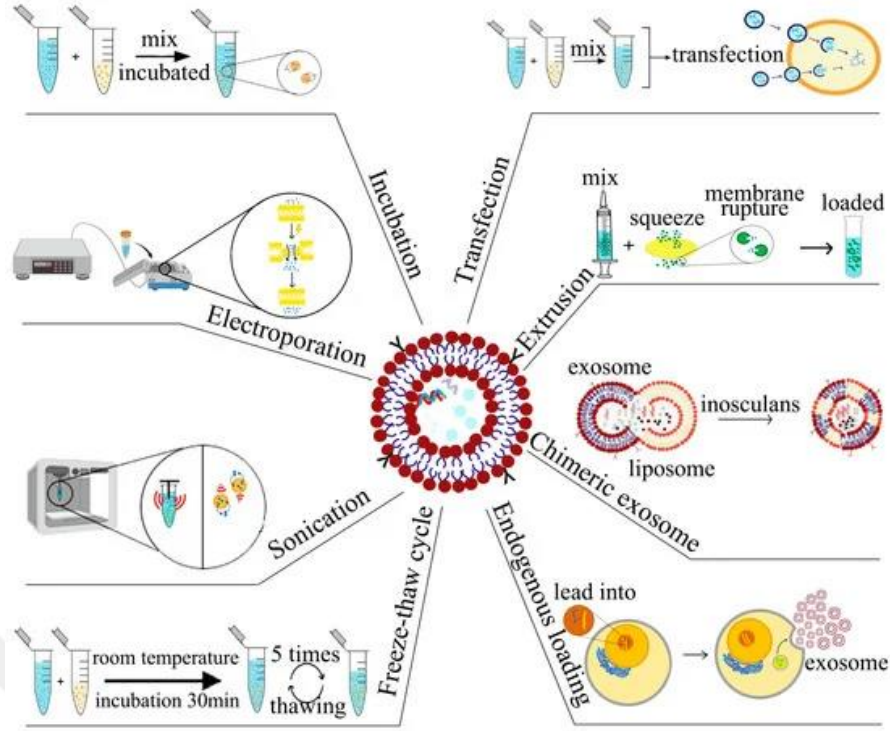
2.4.6. Eksozomlara İlaç Yükleme Teknikleri

Eksozomlar hücreler arası taşınarak, nükleik asit, protein ve terapötik ilaçları alıcı hücrelere yükleyerek bilgi ve madde alışverişi sağlarlar. Dolayısıyla, hücrelerin mevcut fizyolojisini değiştirebilirler. Literatürde, ilaçlarla yüklü eksozomların umut vaat edici terapötik etkilerine değinilmiştir. Ancak eksozomlara ilaç yüklemenin belirli bir kapasitesi ve nispeten

düşük verimi vardır. Bu verimin artırılması üzerine çalışılmalıdır (Zeng ve diğerleri, 2023). Eksozomların gelecek araştırmaları, özellikle etkili ilaç dağıtımına ve bunun klinik etkisine odaklanmalıdır. Bu noktada yüklü eksozomların oluşturulması için gelişmiş ilaç yükleme teknikleri anahtar rol oynar. Şu anda terapötik ilaçların, nükleik asitlerin ve proteinlerin eksozom kapsülasyonu için iki grup vardır: Eksozom eldesi sonrasında yükleme (eksojen), eksozomun hücre içi biyogenezi sırasında (endojen) yükleme (X. Zhao ve diğerleri, 2020).

Endojen yükleme yönteminde, eksozomda paketlenilmesi istenilen kargonun donör hücreye aktarılması ilk adımdır. Donör hücrede eksozom biyogenezinde dolaylı olarak istenilen kargolu eksozomlar paketlenir ve salınır (Han ve diğerleri, 2021). Salınan eksozomlar sonraki uygulamalar için toplanır. Bu yükleme için en çok kullanılan yöntemler; inkübasyon, transfeksiyon ve elektroporasyondur (Şekil 20). En büyük dezavantajı eksozomlara yüklenen kargo miktarının kontrolsüz olmasıdır. Ayrıca tüm kargolar kolayca hücrelere giremez ve salıncak eksozomlara dahil edilemez (X. Zhao ve diğerleri, 2020).

Eksojen yükleme yöntemi, donör hücrelerden eksozomların izole edilmesinden sonra bu eksozomlara kargoların çoğunlukla elektroporasyon, sonikasyon, inkübasyon yöntemleri ile, bazende donma-çözme, saponin aracılı geçirgenleştirme veya ekstrüzyon yöntemleri ile paketlenmesidir (X. Zhao ve diğerleri, 2020). Endojen yüklemeye göre daha verimli kabul edilirken, dezavantaj olarak seçilen yükleme yöntemine göre eksozomların membran bütünlüğünde değişikliğe sebep olabilmesi ve ayrıca kargoların aktivitesi etkilenebilmesidir (Han ve diğerleri, 2021).



Şekil 20. Eksozomlara çeşitli ilaç yükleme yöntemleri (Zeng ve diğerleri, 2023).

Birlikte inkübasyon, ilaç ve eksozomların inkübasyonu yada ilacın donör hücre ile inkübe edilerek hücrede yoğunlaşması sonrası ilaçla yüklenmiş eksozom olarak sekrete edilmesidir. Hidrofobik ilaçların, hidrofobik eksozom zarı lipidleri ile etkileşime girmesinden dolayı bu ilaçlar inkübasyon yönteminde daha sık kullanılmıştır, hidrofilik ilaçlarla uyumlu değildir (Peng ve diğerleri, 2020; Xi ve diğerleri 2021). İnkübasyon yöntemi eksozom zarı stabilitesini bozmayan ve basitliği ile en çok çalışılan yöntemdir. Dezavantajı ise yükleme oranının yüksek olmamasıdır (Mehryab ve diğerleri, 2020). Yang ve diğerlerinin (2015) paklitaksel ve doksorubisin terapötiklerinin eksozomal formülasyonlarının beyin kanseri tedavisi için KBB' yi geçip beyne girdiğini gösterdiler. Eksozom ve ilaçlar, 2 saat süreyle 37 °C'de inkübe edilmesinin ardından doksorubisinin eksozomlara paklitakselden 18 kat daha fazla yüklendiğini bulmuşlardır (T. Yang ve diğerleri, 2015).

Elektroporasyon, etkili yükleme yöntemlerden biridir. Kısa ve yüksek voltajda elektrik akımı ile eksozomların membranında küçük gözeneklerin oluşması sağlanır ve istenilen kargolar geçirgenliği artmış membrandan difüze olarak içeri yayılır. Eksozomun membran bütünlüğü, elektroporasyon sonrasında bir süre inkübasyonla geri kazanılır (Xi ve diğerleri, 2021). İlaç yükleme verimliliği elektroporasyon parametrelerine göre değişkenlik gösterir.

Kondenser kapasitesi, voltaj, atım darbe sayısı ve süresi gibi parametreleri eksozomların membran tipleriyle ilişkili olduğundan farklı hücre kökenli eksozomlar için farklı koşullarda optimize edilmelidir (Kimiz Gebologlu ve Oncel, 2022). Çeşitli çalışmalarda yaygın olarak uygulanan parametre değerleri 350 V yada 400 V ve $\sim 150 \mu\text{F}$ kapasitedir (Mehryab ve diğerleri, 2020). Elektroporasyonun sınırlaması yüksek elektrik alanla eksozomların agregasyonunun artması ile verimin azalmasıdır (Xi ve diğerleri, 2021). Tian ve diğerlerinin (2014) yaptığı bir çalışmada MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri ile oluşturulmuş meme kanseri tümörü taşıyan farelerde, dendritik hücrelerinden türetilmiş eksozomlara 350 V/150 μF 'da yüklenen Dox ilacının antitümör etkileri değerlendirilmiştir. Elektroporasyonla ilaç kapsülleme verimliliğinin %20 olduğu bulunmuştur (Y. Tian ve diğerleri, 2014).

Sonikasyon yönteminde eksozom ve ilaç karışımına homojenizasyon probu ile ultrasonik dalgalar verilmesidir. Sonikasyonla eksozom zarı deforme olur ve kargolar içeri yayılır. Bu yöntem sonrası membran zar bütünlüğünün sağlanması adına eksozomlar bir süre inkübasyona bırakılır (Xi ve diğerleri, 2021). Sonikasyonun zar bütünlüğüne verdiği zarar ve eksozomların agregasyonu sebebiyle olumsuz etkileri olsa da, optimizasyonu ile ilaç yüklemede yüksek verim sağlayabilen yaygın bir yöntemdir (Zeng ve diğerleri, 2023).

Kim ve diğerlerinin (2016) yaptığı bir çalışmada PTX, RAW 264.7 hücrelerinden türetilmiş eksozomlara yüklemek için sonikasyon, elektroporasyon ve inkübasyon yöntemlerini karşılaştırıldı. Sonikasyon en iyi yükleme kapasitesini sağlarken bunu elektroporasyon ve inkübasyon takip etti. Sonikasyon yöntemi için %20 genlikte, üç dakika süresince 30 saniyelik 6 döngü uygulandı. Her döngüde bir soğutma arası verildi, ardından membranın toparlanması için 37 °C'de 60 dakika inkübasyon yapıldı. Elektroporasyon yöntemi için protokol olarak 1000 kV, 5 ms elektroporasyon, ardından 37 °C'de 30 dakika inkübasyon uygulandı. İnkübasyon yöntemi için karışım 37 °C'de 1 saat çalkalanarak inkübasyon yapıldı (Kim ve diğerleri, 2016). Aynı grubun 2018 yılında yaptığı diğer çalışmada akciğer kanseri hücrelerinin aşırı eksprese ettiği sigma reseptörünü hedeflemek için yüzey modifikasyonlu PTX yüklü makrofaj hücrelerinden türetilmiş eksozomlar geliştirildi. Sonikasyon yöntemi ile yüklenen eksozomların PTX yükleme kapasitesi %33 olarak belirlendi (Kim ve diğerleri, 2018).

Donma-çözme, hızlı sıcaklık değişimleri ile kargoların eksozomlara doğrudan yüklenmesi yöntemidir.

Protokol olarak eksozom ve ilaçların oda sıcaklığında inkübasyonu yapılır, -80 °C'de yada sıvı nitrojende dondurulur. Ardından karışım oda sıcaklığında çözündürülür. Verimlilik açısından bu adımlar en az 3 kere döngüler halinde tekrarlanır (Kar ve diğerleri, 2023).

Plazma zarı bu sıcaklık değişimleri ile yırtılıp onarılır, bu döngüler sırasında ilaç eksozom içine yayılır. Eksozomlar düşük sıcaklıklarda stabil kalabildiğinden, don-çöz döngüleri eksozomun biyolojik aktivitesine ve zar yapısında dönüşümsüz zarar vermez ancak eksozomların bir araya toplanması sınırlayıcı olabilir (Zeng ve diğerleri, 2023). Yöntem uygulama açısından basit olmasına rağmen, ilaç yüklemedeki performansı sonikasyonla karşılaştırıldığında düşüktür (Kar ve diğerleri, 2023).

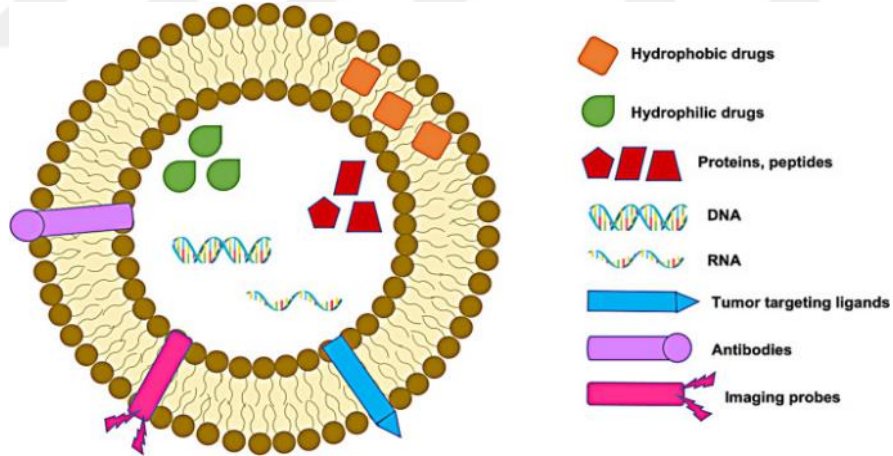
Saponin aracılı yükleme yönteminde bir yüzey aktif molekül olan saponin, eksozom membranında bulunan kolesterol ile kompleks yapı oluşturur. Bu membran geçirgenliğini artırarak ilacın eksozom içine girmesi sağlanır. Hidrofilik, hidrofobik ve molekülce ağır olan ilaçlar bu yöntemle yüklenebilir. Ortamdaki saponinler eksozomların morfolojisini etkilemez ancak yükleme ardından saponinler in vivo toksisite nedeniyle ek saflaştırma ile uzaklaştırılmalıdır. Prosedür basittir, eksozomlar saponinin ve ilaçla kısa süreli inkübe edilmesinin ardından saponin uzaklaştırılır (Peng ve diğerleri, 2020; J. Tian ve diğerleri, 2023). Fuhrmann ve diğerlerinin (2015) yaptıkları bir çalışmada Saponin aracılı yöntemle farklı hücrelerden elde edilen eksozomlara porfirinler oda sıcaklığında 10 dakika süreyle 0,1 mg/mL konsantrasyonda saponin ile inkübe edilmesiyle başarıyla yüklenmiştir. Birlikte inkübasyon yöntemiyle karşılaştırıldığında yükleme verimliliğinde 11 kat artış sağladığı bulundu. Buna ek olarak eksozoma yüklü ilacın, serbest ilaca göre hücresel alımında ve terapötik etkisinde artış gözlemlendi (Fuhrmann ve diğerleri 2015).

Ekstrüzyon yönteminde ilaç yükleme için eksozom ve ilaçlar karıştırılır, ardından karışım farklı gözenek boyutlarında (100-400 nm) şırınga bazlı membranlarla donatılmış bir lipit ekstruderden geçirilir (Zeng ve diğerleri, 2023). Tekrarlanan adımlardan sonucunda eksozom zarı deformasyonu ile ilaçların eksozomun içine girmesi sağlanır. En sonunda içeri giremeyen ilaçlar santrifüjleme veya filtreleme ile uzaklaştırılır. Hidrofobik, lipo-çözünür, düşük moleküler ağırlıklı ilaçlar bu yöntem için uygun türde ilaçlardır (J. Tian ve diğerleri, 2023). İlaç yükleme verimliliği yüksek olmasına rağmen kullanılan basınçla eksozomların membran bütünlüğünü bozması dezavantajdır (Peng ve diğerleri, 2020). Zhang ve diğerlerinin (2021) yaptıkları bir çalışmada insan göbek kordonundan elde edilen mezankimal kök hücrelerden toplanan eksozomlara don-çöz ve ekstrüzyon yöntemiyle başarılı bir şekilde PTX

yüklemesi yapıldı. Ekstrüzyon yöntemi için, PTX ve eksozom karışımı, 100 nm gözenekli lipit ekstrüderinden 11 kez geçirildi ve yüklü eksozomlar eksozom saflaştırma kiti ile toplandı. PTX'in ekstrüzyon ile yükleme verimliliği, don-çöz yöntemine kıyasla daha yüksekti (L. Zhang ve diğerleri, 2021).

İlaçların eksozomlara yüklenmesindeki verimliliği çeşitli parametreler etkiler. Bunlar ilaç türü, eksozom ilaç oranı ve eksozomun yapısıdır. Eksozom ilaç oranı ilacın özelliğine bağlı olarak, literatürde çoğunlukla aynı oranda yada eksozom miktarı ilaç miktarına göre daha yüksek oranda kullanılmıştır (Mehryab ve diğerleri, 2020).

Eksozomlar çift lipit katmanlı membranla çevrelenmiş, hidrofilik bir çekirdekten meydana gelir. İlaçların hidrofiliklik/hidrofobik özelliğine göre uygun yükleme yöntemi belirlenmelidir. Eksozomun çift katmanlı lipit yapısına paklitaksel, dosetaksel gibi hidrofobik/lipofilik ilaçlar dahil edilebilir ve membrandan kolayca salınamaz. Böylece istenilen sürekli salınım profili sergilenir. Doksorubisin ve 5-FU gibi hidrofilik ilaçlar ise çekirdeğe yüklenebilir. (Kimiz-Gebologlu ve Oncel, 2022; Mehryab ve diğerleri, 2020).



Şekil 21. Eksozomların çeşitli dağıtım kargolarının eksozom yapısında bulunma yerleri (Kimiz Gebologlu ve Oncel, 2022).

2.4.7. T hücreleri ve Eksozomlar

İmmün sistem çeşitli bağışıklık hücrelerini barındıran karmaşık bir sistemdir. İmmün sistem hücreleri 2 kategoriye bölünür: nötrofiller, makrofajlar, doğal öldürücü ve dendritirik hücreler olarak doğuştan gelen bağışıklık ve T, B hücrelerini içeren adaptif bağışıklık (Chen ve diğerleri, 2023).

Bunların içinde T hücreleri, kanser hücrelerini tanıyıp onları yok etme potansiyeliyle T hücre bazlı terapi olarak kanserle savaşta devrim yarattı. Kanser immünoterapisi kişinin kendi immün sistemini kanseriyle savaşmak için kullanmak olarak özetlenebilir (Want ve diğerleri 2023). T hücreleri kemik iliğinden üretilen çok potansiyelli kök hücrelerdir. Farklı görevlere sahip heterojen lenfositleri temsil eder. Timusta olgunlaşarak görev yapacağı immün aktiviteye sahip T hücrelerine evrilir. Antijenle aktive edildiğinde farklılaşıp, sayıca çoğalır ve immün görevine başlar (Wang ve Shi, 2022). T hücreleri iki ana grupta kategorize edilir; yardımcı T ($CD4^+$) ve sitotoksik T ($CD8^+$) hücreleri. $CD4^+$ T hücreleri immün tepkilerinin neredeyse hepsinde ana rol oynayan heterojen T hücreleri grubudur ve kısa yada uzun süreli enfeksiyon ve tümörlere cevap olarak çeşitli alt gruplara farklılaşabilir; foliküler yardımcı T hücreleri (T_{fh}), Th (1, 2, 9, 17, 22), ve düzenleyici T hücreleri (Treg). Anormal T hücresi immünitesi, otoimmün hastalıkları teşvik edebilir (Lu ve diğerleri, 2018; Sun ve diğerleri, 2023).

Literatür, immün hücrelerinin fizyolojik ve hastalık durumunda immün düzenleyicileri olarak görev yapacak olan eksozomları sekrete ettiğini göstermiştir (Q. Li ve diğerleri, 2019). Bu eksozomlar diğer immün hücrelerini aktive edebilir, antijen sunabilir, immün tepkilerini baskılayabilir ve böylece immün regülasyonunu sağlarlar (Hazrati ve diğerleri, 2022; Y., Zhang ve diğerleri, 2019).

Bağışıklık hücrelerinden sekrete edilen eksozomlar, kaynak aldıkları hücre işlevlerinin çoğunluğuna sahiptirler. T hücreleri, hedeflerini doğrudan öldürmek, $CD8^+$ T hücrelerinin tümör yada enfekte olmuş hücrelerle savaşmasına, B hücrelerine yardımcı olmak yada inhibasyonunu sağlamak, sitokin üretmek gibi işlevlerini yansıtan eksozomlar salgılar. T hücresinden üretilen eksozomlar, ana hücrelerin işlevini mimikri yaparak kanser immünoterapisinde antitümör işleve katkı sağladığı belirlenmiştir. Bu sebeple, T hücresi eksozomları kanserde etkili tedavi için potansiyeldir. (Zhou ve diğerleri, 2023; Wang ve Shi, 2022).

CD8+ T hücreleri viral savunmada ve anti-tümör immünitesinde ana savunma hattı olarak tümör hücrelerini ortadan kaldıracaktır. Çalışmalar, CD8 + T eksozomlarının, immün ve tümör hücreleri arasında bilgi alışverişinde rol aldığı ve böylece tümörün tümör oluşumu ve gelişiminde çift taraflı düzenleyici rolünü ortaya çıkardı (Zhou ve diğerleri, 2023).

CD4 + T hücreleri ise immün yanıtlarının düzenlenmesi de çok yönlü roller oynar. Tümöre karşı anti-tümör etki, T hücrelerinin bölgeye infiltrasyonuna ve T hücre aktivasyonuna bağlıdır.

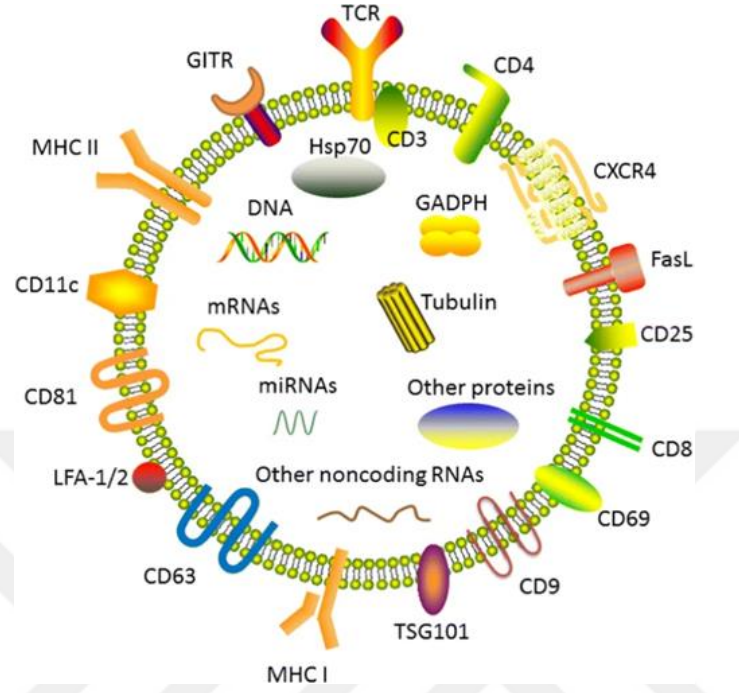
CD4+ T eksozomları, CD8+ T hücrelerinin çoğalmasını ve daha aktif olmalarını sağlayabilir, böylece CD8+ T hücrelerinin anti-tümör etkisini artırabilir. (Chen ve diğerleri, 2023). Bununla birlikte, CD4 + T eksozomları , kendi çoğalmasını ve CD8 +T hücresi tepkilerini spesifik olarak inhibe edebilir. Buda da, CD4 + T eksozomları immün sistemi engellediği için, otoimmün hastalıkların tedavisinde olasılık oluşturur (Lu ve diğerleri, 2018).

Yapılan çalışmalarda T hücresinden üretilen eksozomlarda, hücrelerin aktivasyonu, çoğalması, farklılaşması ve antijen sunumu gibi rolleri olan moleküller eksprese edildir. Ve aynı zamanda bu moleküller kaynak T hücresinde de tespit edilmiştir (Lu ve diğerleri, 2018).

Zebrowska ve diğerlerinin (2022) yaptıkları çalışmada kan plazmasından eksozomlar izole edildi. Daha sonra T hücresinden sekrete edilen CD3(+) ve CD3(-) özellikli eksozomları seçici olarak saflaştırmak için anti-CD3 Ab'ler ile immün yakalama yöntemi kullanıldı. Ardından iki grup içinde metabolomik ve proteomik analizler yapıldı. CD3(+)/(-) eksozom fraksiyonlarında artan proteinlerin bağışıklıkla ilgili süreçler ve stres tepkisiyle ilişkili olduğu belirlendi. CD3(+) eksozomların keseciklerinde artan protein ifadesi lökosit aktivasyonu ve göçü ile ilişkilendirilirken, CD3(-) fraksiyondaki eksozomların artan ifadesi nötrofillerle ilişkilendirildi. Kolesterol ve sfingolipidlerin T hücrelerinin fizyolojik işleyişinde rol oynayan plazma membranlarının temel bileşenleri olduğu bilinmektedir. Çalışmada da izole edilen CD3(+) fraksiyonunun lipid bileşimi de , T hücrelerinin membran özelliklerini taşıyordu. Sonuç olarak izole edilen eksozomlar kaynaklandıkları T hücrelerinin özelliklerini taşıyordu. insan kanından izole edilen eksozomların T hücresi biyopsisi olarak işlev görebileceği belirtildi. (Zebrowska ve diğerleri, 2022).

Hedef alıcı hücre, farklı vericilerden alınan T hücrelerinin membran reseptörlerine karşı immün tepki oluşturabilirse, bu eksozomlar boyutlarının çok küçük olmasından dolayı yabancı olarak algılanamazlar. Bu sebeple yüzey reseptörleri çoğunlukla antijenik özellikler

göstermezler. (Sovunjoy ve diğeri, 2023) Bu tezde kullanılan Jurkat hücre hattı, CD4+, CD8-
'tir, fazlaca olgun TCR eksprese eder ve MHC sınıf II içermez (Roose ve diğeri, 2003).



Şekil 22. T hücrelerinden salgılanan tipik bir eksozomun yapısı ve bileşenleri (Lu ve diğeri, 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1 Kullanılan Malzemeler

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan malzeme ve kimyasal listesi

MALZEME	MARKA
MDA-MB-231 hücre hattı	ATCC (HTB-26)
Jurkat hücre hattı	ATCC (TIB-152)
RPMI-1640 besiyeri	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) Besiyeri	Sigma
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma
Fetal Bovin Serum (FBS)	Capricorn
%25 Trypsin-EDTA	GIBCO
Penicilin-Streptomycin	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS)	Sigma
Kemilüminesans Reaktif	Santa Cruz (sc-2048)
Ultrasantrifüj tüpü	Beckmann Coulter
Total RNA izolasyon kiti	PureLink RNA mini kit, Ambion (12183018A)
cDNA sentez kiti	applied biosystems (4368814)
SYBR Green master mix	ELK Biotechnology, EnTurbo SYBRGreen PCR SuperMix (EQ001)
Paklitaksel	Sigma
Anti CD-81 antikor	Ray Biotech (119-15801)
Anti CD63 antikor	Fine Test (FNab01490)
Anti-rabbit IgG HRP-linked	Cell Signaling (#7074S)

Kemilüminesans reaktif	Santa Cruz sc-2048
mini-PROTEAN TGX pre-cast jel	Biorad
Prestained Protein Ladder	ThermoScientific
Watmann filtre kağıdı	Watmann
FITC Annexin V Kiti	BD Pharmingen (2293683)
JC-1 boyama Kiti	BD Pharmingen (551302)
Transwell Permeable membrane 6.5mm çaplı insert, 0.4 µm	Costar (3470)

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazların listesi.

KULLANILAN CİHAZ	MARKA
Hücre Kabini	BIOBASE
CO2 İnkübatör	Nüve EC 160
Mikroplaka Okuyucu	BioTek Epoch
RT-PCR cihazı	Applied Biosystems, StepOnePlus
SDS-PAGE ekipmanları	BioRad
Western Blotlama Cihazı	BioRad, Transblot Turbo
Mikroskop	Zeiss Axio Vert1
Orbital Çalkalayıcı	ThermoScientific
Santrifüj	Nüve / NF 800R
Elektroporasyon cihazı	BioRad Gene-Pulser Xcell
Ultrasantrifüj	Beckman Coulter
Zeta-sizer Nano ZS	Malvern
Görüntüleme Cihazı	Syngene GBox
Nanodrop	Nabi
pH Metre	Mettler Toledo
Vorteks	ISOLAB

Hassas Terazı	Shimadzu
EVE otomatik hücre sayacı	NanoEnTek
0.22 µm CA filtre	ISOLAB
Akış sitometri cihazı	Agilent, NovoCyte

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmalarda insan meme kanseri MDA-MB-231 (HTB-26) ve insan akut T hücresi lösemisi Jurkat (Clone E6-1,TIB-152) hücre hatları kullanılmıştır. MDA-MB-231, TNBC'nin mezankimal alt tipini temsil eden 51 yaşında invazif duktal karsinomlu bir kadın hastanın plevral efüzyonundan izole edilmiş aderent hücre hattıdır. Agresif doğaya sahip olduğu için geç evre meme kanserlerini modellemek üzere çalışmalarda kullanılmıştır.

Jurkat, 14 yaşında erkek akut T hücreli lösemi hastasının periferik kanından elde edilmiş T lenfoblast süspanse hücre hattıdır. Bu hücre dizisi, bağışıklık sistemi bozukluğu araştırmalarında ve T hücresi sinyalleme, ve immünonkoloji araştırmalarında kullanılabilir.

Hücreler Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilip, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyokimya bölümü Prof. Dr. Özge ÇEVİK' e ait stoklardan kullanılmıştır.

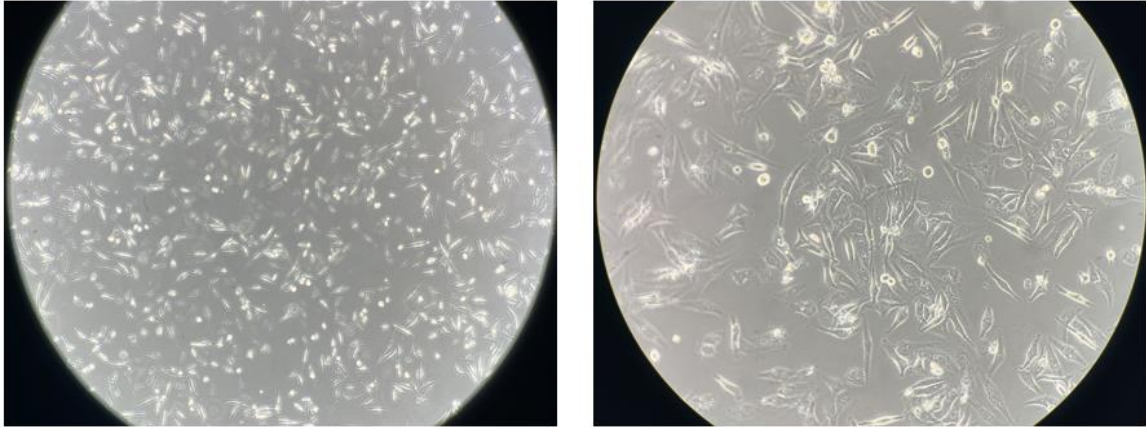


Resim 1. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.1.1. MDA-MB-231 Hücrelerinin Büyütülmesi, Çoğaltılması, Pasajlanması ve Dondurulması

MDA-MB-231 hücreleri T-25 hücre kültürü flasklarına ekildi. Ekilen hücreler, % 10 FBS + %1 penisilin/streptomisin ve NaHCO_3 içeren DMEM besiyerinde, 37°C ' de, % 5 CO_2 içeren ortam koşullarda büyütüldü.

MDA-MB-231 hücre hattı için flask taban yoğunluğu % 80-90'a ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Pasaj için öncelikle besiyeri çekildi ve taban 2 defa DPBS ile yıkandı. Sonrasında tabanda aderent halde bulunan hücreleri süspanse yapmak için Tripsin-EDTA solüsyonundan (1 mL) eklendi ve 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 2 dakika inkübe edildi. Süre sonunda aderent hücreler tabandan ayrıldı ve Tripsin etkisini inaktive etmek için FBS içeren besiyeri (1:3) eklendi ve pipetaj yapıldı. Hücreler hücreler 15 mL' lik falkonlara alındı ve 1350 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atıldı ve pellet kısmı, besiyerinde süspanse edildi. Çözelti halindeki hücreler kurulacak deney planına göre kuyucuklu plakalara ve kültür flasklarına geri ekildi. Hücreleri dondurma aşamasında pasajlama prosedürü kullanıldı ve hücreler cryovial tüplerde dondurma besiyeri içerisinde aşamalı olarak -80°C ' deki dolaba ardından -196°C ' deki sıvı azot tankına kaldırıldı.



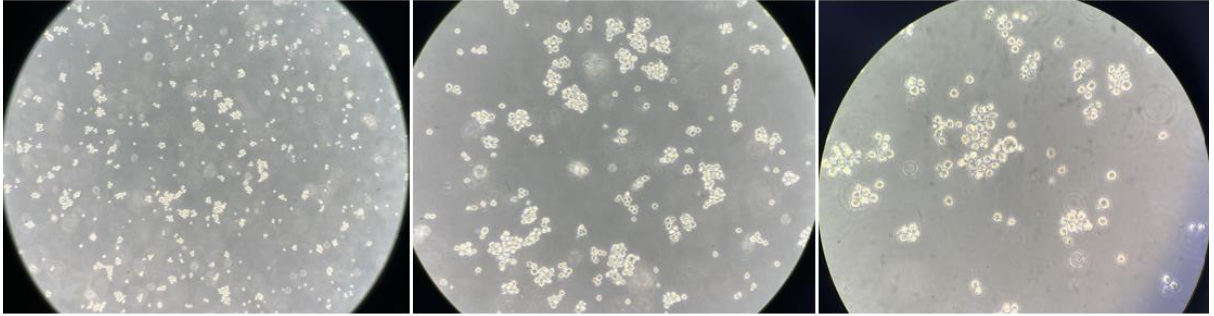
Resim 2. MDA-MB-231 hücrelerinin sırasıyla 10X ve 20X büyütmede ışık mikroskobu görüntüleri.

3.2.1.2. Jurkat Hücrelerinin Büyütülmesi, Çoğaltılması, Pasajlanması ve Dondurulması

Jurkat hücreleri T-75 hücre kültürü flasklarına ekildi. Ekilen hücreler, % 10 FBS + %1 penisilin/streptomisin ve NaHCO_3 içeren RPMI-1640 besiyerinde, 37°C ' de, % 5 CO_2 içeren ortam koşullarında büyütüldü. Her iki günde bir besiyerinden çekilerek ve taze RPMI-1640 eklenerek ortam değiştirildi.

Jurkat hücre hattı için flastaki besiyeri yoğunluğu % 90'a ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Flastaki tüm besiyeri çekilerek, 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatat kısmı atıldı ve pellet kısmı RPMI besiyerinde süspanse edildi. Çözelti halindeki hücreler kültür flastlarına geri ekildi. Çalışma süresinde hücreler stok almak için belli aralıklarla sayım yapılarak donduruldu.

Hücreleri dondurma aşamasında pasajlama prosedürü kullanıldı ve hücreler cryovial tüplerde dondurma besiyeri içerisinde aşamalı olarak -80°C ' deki dolaba ardından -196°C ' deki sıvı azot tankına kaldırıldı.

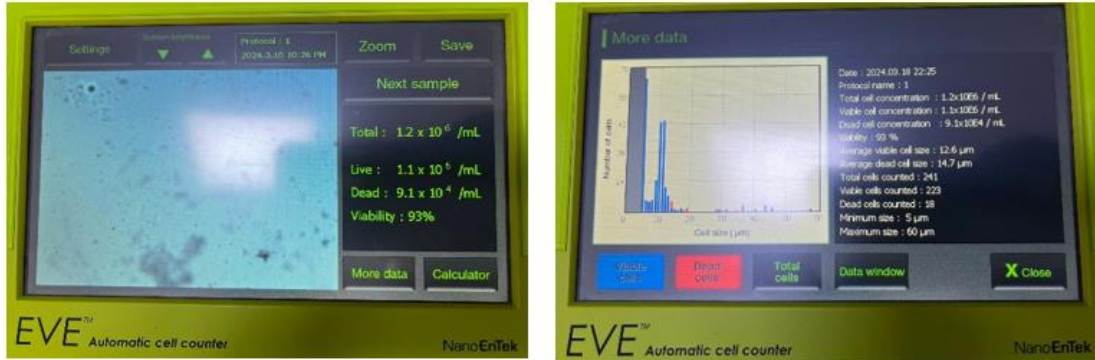


Resim 3. Jurkat hücrelerinin sırasıyla 10X, 20X, 40X büyütmede ışık mikroskobu görüntüleri.

3.2.1.3. Hücrelerin Sayımı

Hücreler kuyucuklara ve flastlara ekim yapılmadan önce, her kuyucuğa önerilen hücre sayısı kadar ekebilmek için hücre pasajlaması sonrası otomatik hücre sayacı (EVE, NanoEnTek) cihazı ile hücre sayımı yapıldı. Sayım işlemi için 1:1 oranda 10 μL süspanse edilmiş hücre ve 10 μL Tripan Mavi boyası karıştırıldı, 2 dakika oda sıcaklığına bekletildi. 10 μL sayım slaydına konuldu. Hücrelerin Tripan mavisi ile sayımında ölü olan hücreler boyayı içine alıp mavi renkte görünürken, beyaz kalan hücreler yaşayan hücrelerdir. Boyanmamış

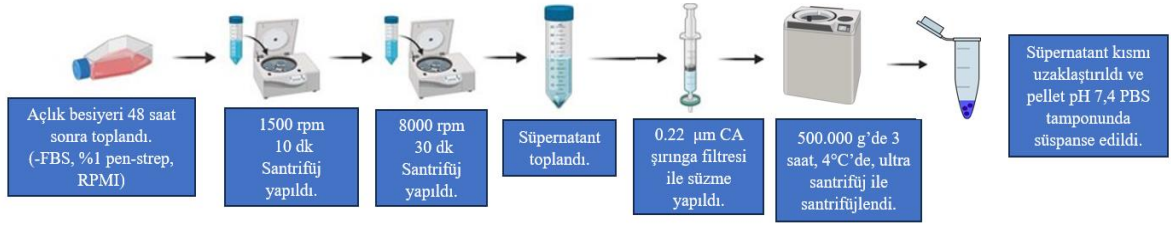
hücrelerin sayılması sonucunda mL başına düşen canlı hücre sayısı hesaplanır. Böylece hücre plaklarındaki her bir kuyucuğa ekilecek olan hücre miktarı belirlenir.



Resim 4. Otomatik hücre sayacı kullanılarak hücrelerin sayımı.

3.2.2. Jurkat Hücrelerinden Eksozom Salınması ve İzolasyonu

Jurkat hücreleri T-75 flasklara ekildi. 37 °C,%5 CO₂ içeren ortamda ve %10 FBS ve %1 penicillin-streptomisinli RPMI besiyerinde kültüre edildi. Hücreler %80-90 yoğunlukta iken tüm besiyeri çekilerek, 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı ve pellet kısmı RPMI’da süspanse edildi. Çözelti halindeki hücreler eksozom salınımı için FBS içermeyen (açlık besiyeri), sadece %1 penicillin-streptomisin içeren RPMI besiyerinde 48 saat inkübe edildi. Açlık besiyerinden 48 saat süresince salınan eksozomları toplamak için, besiyeri çekildi. Toplanan besiyerlerindeki ölü ve yaşayan hücreleri uzaklaştırmak için 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Ultrasantrifüj öncesi toplanan numunelerdeki hücre kalıntısı, protein agregatlarını uzaklaştırmak için önden 8000 rpm’de 4°C’de, 30 dakika santrifüjleme ve ardından 0.22 µm ISOLAB CA (selüloz asetat) şırınga filtesi ile süzme yapıldı. Süzüntüler rotora uyumlu ultrasantrifüj tüplerine doldurularak, ultrasantrifüj cihazında (Optima MAX-XP Ultrasantrifüj, Beckman Coulter) 4°C’de 500.000 g’de 3 saat santrifüj edilerek eksozomların çöktürülmesi sağlandı. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve elde edilen pellet pH 7,4 Fosfat tampounda süspanse edilerek sonraki deneyler için -80°C de muhafaza edildi.



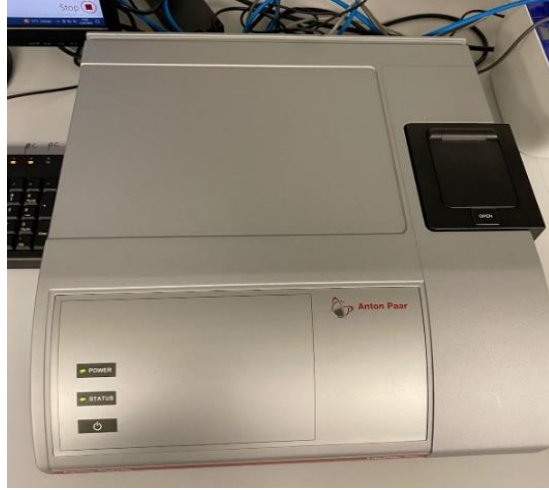
Şekil 23. Jurkat eksozom izolasyonunun şematik gösterimi.



Resim 5. Eksozom izolasyon çalışmaları **A)** Eksozom içeren hücre besiyerinin ultrasantrifüj tüplerine doldurulması **B)** Ultrasantrifüj rotoru **C)** Eksozom izolasyonu için kullanılan ultrasantrifüj cihazı **D)** Ultrasantrifüj sonrası çöken eksozom pelleti.

3.2.3. Eksozom Boyut Ölçümü

Eksozomların boyut analizi dinamik ışık saçılımı prensibi ile Anton Paar Litesizer 500 instrument kullanılarak yapıldı. Eksozomlar 1/100 dilüsyon yapılarak sıvı haldeki formları 90°'lik lazer ortamında ölçüldü. Bu ölçüm yönteminde gönderilen lazer, parçacıklar tarafından kırılarak saçılır, saçılan ışığın yoğunluğundaki dalgalanma dedektörler tarafından yakalanır ve sinyal, boyut dağılımına dönüştürülür.



Resim 6. Eksozom boyut ölçümünde kullanılan cihaz.

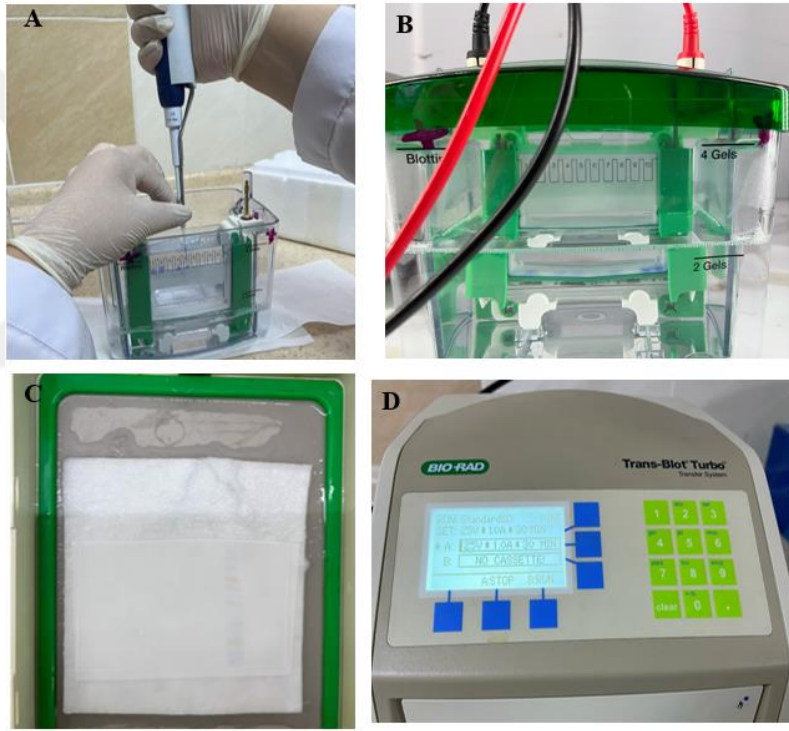
3.2.4. Eksozomların Yüzey Belirteçlerinin Kontrolü

3.2.4.1. SDS-PAGE Elektroforezi

Eksozomları karakterize etmenin bir yöntemi de eksozomlara özgü yüzey belirteçlerinin kontrolüdür. Bunun için izole edilmiş eksozomların western blot yöntemi ile CD81 ve CD63 belirteçleri araştırıldı. PBS'te süspanse edilmiş eksozom pelletleri 1:1 oranda hazırlanan 2X örnek hazırlama tamponu (%4 SDS, %20 gliserol, %10 β -merkaptoetanol, % 0.004 bromfenol mavisi ve 0.125 M Tris HCl, pH 6.8) ile karıştırılıp, termal blokta 95°C'de 5 dakika süre denatüre edildi. SDS-PAGE için %8-16 Biorad mini-PROTEAN TGX pre-cast jel, kullanıldı. Örnekler BCA kiti ile protein miktarı ölçüldükten sonra, her kuyu 5-10 μ g protein içerecek şekilde yükleme yapıldı. Yüklemede kontrol olarak aynı oranda hücre lizatları kuyulara yüklendi. Referans için bir kuyuya 3 μ l protein marker (ThermoScientific, Prestained Protein Ladder) yüklendi. Jeller elektroforez yürütme çözeltisinde (5 mM Tris, 38.4 mM Glisin, % 1 SDS) 1-2 saat 100 volt sabit akımla, 4°C'de buz dolabında yürütüldü.

3.2.4.2. Blotlama İşlemi

Elektroforez sonrası jel çıkartıldı ve transfer çözeltisine alındı. Jelde yürümüş olan proteinlerin membrana aktarılması için yarı kuru yöntemle immuno blotlama yapıldı. Bunun için PVDF membran %100 metanolde 5 dakika bekletilerek aktifleştirildi. Ardından transfer tamponu (5 mM Tris, 38,4 mM Glisin, %15 Metanol) ile ıslatılmış Watmann filtre kağıdının üstüne yerleştirildi. Ardından SDS-jel ve üstüne transfer çözeltisiyle ıslatılmış ikinci Watmann filtre kağıdının yerleştirilerek transfer için sandviç haline getirildi. Western blotlama cihazında (Bio-Rad, Transblot Turbo) standard program 25 Volt, 1 Amper akımda ve 30 dakika prosesi seçildi ve blotlama işlemi gerçekleştirildi.



Resim 7. Western blot deney aşamaları **A)** Örneklerin kuyucuklara yüklenmesi, **B)** elektroforez işlemi, **C)** membran ve jelin yarı kuru transfer kasetine yerleştirilmesi, **D)** Transfer işlemi.

Membran transferinin ardından, membran TBST (20 mM Tris, 154 mM NaCl, % 0.1 Tween 20) içerisinde hazırlanmış % 2' lik BSA ile oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcıda 1 saat 15 dakika bloke edildi. Ardından %2 lik BSA çözeltisi içerisinde taze hazırlanan 1.cil antikorlar 1:500 oranında dilue edildi (Ray Biotech 119-15801, Fine Test FNab01490).

4°C’de 16 saat boyunca orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında membran yıkama tamponu TBST ile 3 kez 5’er dakika yıkandı. Membran, %2 lik BSA çözeltisi içerisinde taze hazırlanan 2.cil antikorlarla (1:2000, Anti-rabbit IgG HRP-linked Cell Signaling #7074S) oda sıcaklığında orbital karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından TBST ile tekrar 4 defa 5’er dakika yıkandı ve kemilüminesans çözeltisi Santa Cruz Immuno Cruz™ Western Blotting Luminol Reagent (sc-2048) membran üzerine eklendi, 1 dakikalık karanlıkta inkübasyon sonrası görüntüleme cihazı (Syngene G:Box) ile farklı sürelerde ışılan bantların dansitometrik analizi ImageJ programı değerlendirildi.

3.2.5. Eksozomlara Paklitaksel Yüklenmesi

İzole edilen Jurkat eksozomlara kemoterapik ilaç olan paklitaksel yüklemesi için elektroporasyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde içinde iletken bir çözeltide süspanse edilmiş eksozomlara elektrik akımı uygulayarak zarında geçici küçük gözenekler açılması sağlanır. Bu gözeneklerden istenilen kemoterapik ilaç eksozomların iç kısmına girebilir. 0.2 mm’lik elektroporasyon kuvetine (Sigma) süspanse edilmiş eksozom ve Paklitaksel (1µM) eklendi. Elektroporasyon (Bio-Rad, Gene Pulser Xcell) cihazında 400V, 125 µF protokol ayarlandı ve 2 pulse akım verildi. Sonrasında eksozom zarının yeniden intak olması için 30 dakika 37°C ’de bekletildi. Ardından aşamalı olarak ultra santrifüj yapıldı. Böylece yüklenmemiş paklitaksel ve paklitaksel yüklü eksozomlar (Exo-PTX) saflaştırıldı. İlaç yükleme miktarı spektrofotometrik olarak PTX ölçümü ile aşağıda yer alan formüle göre hesaplandı ve eksozomlara PTX yüklemenin % verimliliği değerlendirildi.

$$\text{Yükleme verimi (\%)} = (\text{Toplam PTX-Süpernatant PTX}) / (\text{Toplam PTX}) \times 100$$



Resim 8. İlaç yükleme çalışmalarında kullanılan elektroporatör cihazı.

3.2.6. Exo-PTX Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.6.1. MTT ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

MTT, hücrenin metabolik aktivitesini dolaylı olarak hücre canlılığını ölçen kolorimetrik bir yöntemdir. Metabolik olarak aktif yani yaşayan hücreler sarı tetrazolyum tuzunu (MTT) mitokondriyal enzim oksidoredüktaz enzimleri sayesinde mor formazan kristallerine indirger. DMSO'da çözünen kristaller, spektrofotometre kullanılarak 500-600 nanometrede absorbans ölçülerek ölçülür. Hücre ne kadar metabolik aktivite gösteriyorsa o kadar tetrazolin tuzunu indirgenir ve daha yüksek absorbans beklenir, daha koyu renk gözlenir.

Exo-PTX ve PTX'ın sitotoksik etkileri insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerinde IC-50 konsantrasyonları MTT yöntemi ile belirlendi. Hücreler 96 kuyucuklu plate içine, her kuyuda 100 µL'de 10.000 hücre olacak şekilde ekildi, 24 saat boyunca 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Exo-PTX (0-16 µg/mL) ve PTX'ın (0-60 nM,) farklı konsantrasyonları 2 tekrar şeklinde kuyucuklara eklendi. 24 saat boyunca 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda, 5 mg/ml olacak şekilde MTT çözeltisinden her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren ortamda 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı, tabanda çözünmeyen formazan kristalleri DMSO eklenerek plaka çalkalayıcıda çözdürüldü. Elisa okuyucusunda 570 nm' de ölçüm alındı. İnhibisyon konsantrasyonları (IC-50) hesaplandı.

3.2.6.2. Exo-PTX'ın MDA MB-231 Hücrelerinde Gen Ekspresyon Değişiklikleri

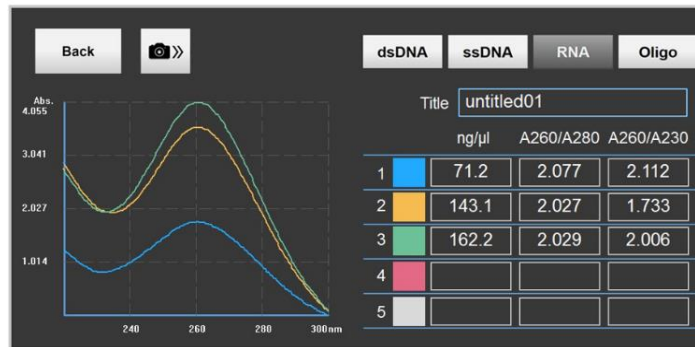
MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara ekildi, 24 saat boyunca 37 °C, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. PTX (15 nM) ve Exo-PTX (10 µg/mL) besiyerlerine eklendi, 24 saat aynı koşullarda inkübe edildi. Sonrasında besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler 2 defa DPBS ile temizlendi ve kitte bulunan RNA liziz bufferı ile pelletler toplandı ve -20°C'de saklandı. Daha sonra aşağıda yer alan aşamalarla RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Spesifik primerler kullanılarak SYBR Green ile gen ekspresyon düzeyleri incelendi.

3.2.6.2.1. Total RNA izolasyonu ve Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Total RNA, Total RNA izolasyon kiti PureLink RNA mini kit, Ambion (İnvitrogen, Cat no: 12183018A) kullanılarak üretici firmanın önerilerine uygun olarak izole edildi.

Total RNA izolasyon protokolü:

1. Lizatların üzerine 600 µl % 70' lik etanol eklendi ve vortekslendi.
2. Toplama tüpü ve kolon birleştirildi. Kolona 1. Adımda hazırlanan örnekler eklendi.
4. Oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 saniye santrifüjlendi. Santrifüj sonrası kolondan toplama tübüne akan sıvı döküldü.
5. Kolona 700 µl yıkama tamponu I eklendi ve oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 saniye santrifüjlendi. Santrifüj sonrası kolondan toplama tübüne akan sıvı döküldü.
6. Kolona 500 µl yıkama tamponu II eklendi ve oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 saniye santrifüjlendi. Kolondan çıkan sıvı uzaklaştırıldı. 6. Adım 1 kere daha tekrarlandı.
7. Kolondaki membranı kurutmak için 12.000 g' de 2 dakika santrifüj yapıldı.
8. Kolon yeni bir Ependorf tüpe alındı ve üzerine 60 µl RNaz içermeyen su eklendi.
9. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında >12.000 g' de 2-3 dakika santrifüj edilerek RNA elüte edildi.
10. Total RNA miktarları nanodropta ölçüldü. cDNA sentez adımına geçildi.



Resim 9. RNA düzeylerinin nanodrop cihazında ölçümü.

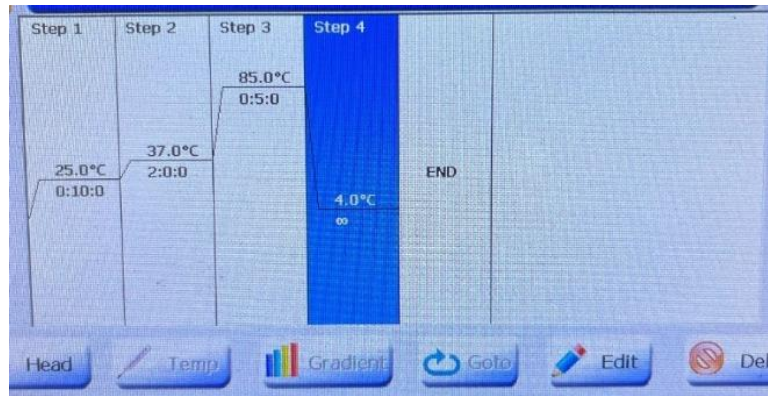
RNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi için cDNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. İzole edilen kalıp olarak kullanılan RNA'lardan, revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlendi. Kit

(applied biosystems, high capacity cDNA Reverse Transcription Kit,Thermo Fisher Scientific, 4368814) protokolünde yazdığı gibi her bir tüp içerisinde RNA miktarı maksimum 2 μ g / μ L ve total reaksiyon hacmi 20 μ L olacak şekilde cDNA sentezi yapıldı. Her bir reaksiyon için aşağıdaki tabloda (Tablo 4) verilen bileşenler kullanılarak master mix hazırlandı.

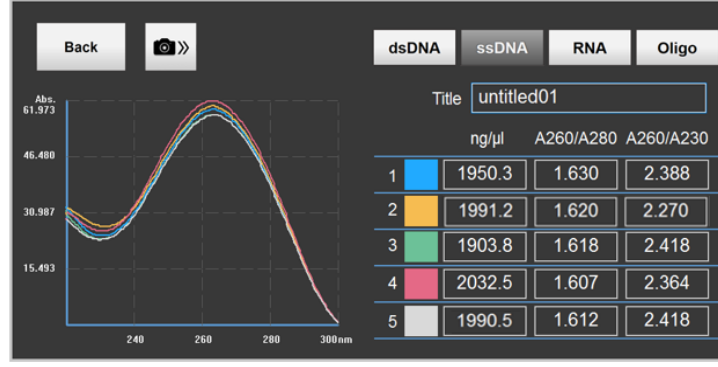
Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği.

Bileşen	20 uL reaksiyon için volüm (1 örnek için)
10X RT Buffer	2 uL
25X dNTP mix (100 mM)	0.8 uL
10X RT Random primerler	2 uL
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 uL
Nükleaz-free su	4.2 uL
RNA template	değişken (kitte belirtilen 10 uL)

Tüpler hazırlandıktan sonra PCR makinasında aşağıdaki resimde (Resim 10) belirtilen inkübasyon koşulları uygulandı. İnkübasyon sonrasında cDNA miktarları nano drop cihazında ölçüldü. Elde edilen cDNA'lar, qPCR çalışmalarında kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı.



Resim 10. cDNA sentezi için inkübasyon koşulları.



Resim 11. cDNA düzeylerinin nanodrop cihazında ölçümü.

3.2.6.2.2. RT-PCR

CXCR4, CXCL12 ve house keeping gen GAPDH ekspresyonları Real-time PCR ile analiz edildi. kullanılarak yapıldı. Elde edilen cDNA'lar son konsantrasyon 20 μ l reaksiyon hacminde 100 ng olacak şekilde dilüe edildi. SYBR Green PCR Master Mix hazırlanması kit (ELK Biotechnology, EnTurbo SYBRGreen PCR SuperMix, EQ001) prosedürüne uygun olarak yapıldı (Tablo 5). Her bir gen 3 tekrar çalışıldı. Hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metod kullanıldı.

Tablo 5. RT-PCR analizi için kullanılan reaksiyon içeriği.

20 μ l Reaksiyon hacmi	Volüm (1 örnek için)
2x SYBR Green PCR Master Mix	10 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
50x ROX Dye (opsiyonel)	2 μ l
Template	8 μ l, 12 ng/ μ l cDNA dilüsyonlarından alındı.
RNase-Free Distilled Water	20 μ l'ye kadar tamamlanır.

Tablo 6. RT-PCR inkübasyon koşulları.

	Süre (saniye)	Derece (°C)	Döngü
Ön denatürasyon	30	95	1X
Denatürasyon	5	95	40X
Yapışma	30	57	
Uzatma	30	72	
Melt-curve	15	95	tut- step and hold

Tablo 7. RT-PCR deneyinde kullanılan primerlerin sekansı.

Primer	Sekans
CXCR4	F 5'-TGACGGACAAGTACAGGCTGC -3' R 5'-CCAGAAGGGAAGCGTGATGA -3'
CXCL12	F 5'-TGCCAGAGCCAACGTCAAG-3' R 5'-CAGCCGGGCTACAATCTGAA-3'
GAPDH	F 5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3' R 5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'



Resim 12. RT-PCR deney düzeneğinin görüntüsü.

3.2.6.3. Akış Sitometri ile Apoptozun Belirlenmesi

MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara ekildi. 24 saat boyunca 37 °C' de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Ardından hücreler üzerine PTX (15 nM) ve Exo-PTX (10 µg/mL) eklendi ve hücreler tekrar 24 saat 37 °C' de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında apoptozun değerlendirilmesi için Annexin V-FITC-PI kiti prosedürüne uygun olarak yapıldı (BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I,2293683,BD Biosciences). Kit prosedürü yazıldığı gibi uygulanmıştır: Hücrelerin üst besiyerleri atıldı ve hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Trypsin-EDTA solüsyonu ile aderent hücreler kuyulardan kaldırıldı ve toplandı. 1350 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet 1 x 10⁶ hücre/mL konsantrasyonunda olacak şekilde 1X Bağlama tamponunda yeniden süspanse edildi. 100 µL süspanse edilen hücrelerin (1 x 10⁵ hücre) üstüne 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl PI eklendi. Düşük hızda vortekslendi ve karanlıkta, oda sıcaklığında (yaklaşık 25°C), 15 dakika inkübe edildi. Her tüpe 400 µL 1X Bağlama Tamponu eklendi. 1 saat içinde akış sitometrisi (Attune Flow Cytometer, Agilent USA) ile okumalar yapıldı.

3.2.6.4. Mitokondrial Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara ekildi. 24 saat boyunca 37 °C' de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Ardından hücreler üzerine PTX (15 nM) ve Exo-PTX (10 µg/mL) eklendi ve hücreler tekrar 24 saat 37 °C' de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında mitokondriyel membran potansiyelinin değerlendirilmesi için JC-1 boyama kiti prosedürüne uygun olarak yapıldı (BD™ MitoScreen Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit, 551302).

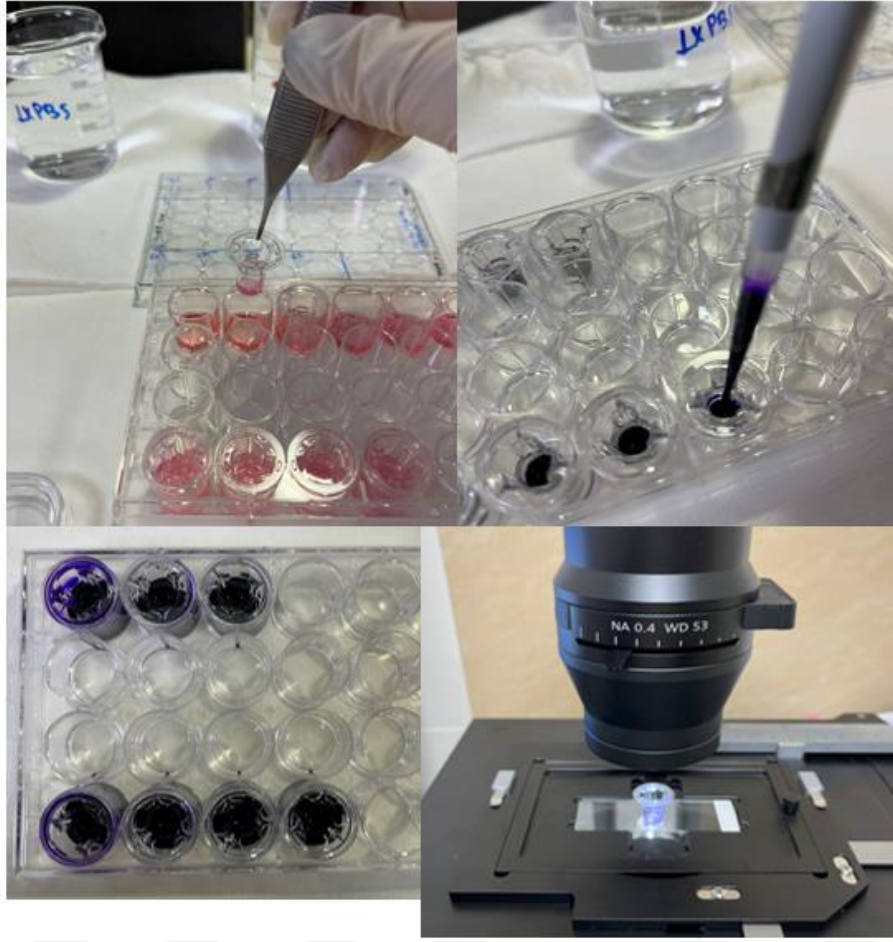
Hücrelerin üst besiyerleri atıldı ve hücreler soğuk DPBS ile iki kez yıkandı. Trypsin-EDTA solüsyonu ile aderent hücreler kuyulardan kaldırıldı ve toplandı. 1350 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 500 µL taze hazırlanmış JC-1 çalışma solüsyonu eklendi ve vortekslenerek hücreler süspanse edildi. Süspanse edilmiş hücreler 10 dakika 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Sonrasında 2 yıkama adımı yapılır. İlk yıkama: Hücre süspanسیونlarına 2 ml 1× analiz tamponu eklendi ve vorteks ile süspanse edildi. Ardından 400 g' de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 2. Yıkamada,

hücre pelletine 500 uL 1× analiz tamponu eklendi ve vorteks ile süspanse edildi. Hücreler bekletilmeden akış sitometrisi ile analiz edildi.

3.2.6.5. Hücre Migrasyon Analizi

Hücrelerin migrasyon analizi Boyden Chamber Assay metoduna göre yapıldı. MDA MB231 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara ekildi. 24 saat boyunca 37 °C’ de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Ardından hücreler üzerine PTX (15 nM) ve Exo-PTX (10 µg/mL) eklendi ve hücreler tekrar 24 saat 37 °C’ de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Chamberlar için kullanılacak yeni bir 24 kuyucuklu plakalara deney düzenine göre MDA-MB-231 hücreleri ekildi, 24 saat boyunca 37 °C’ de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. PTX ve Exo-PTX ile 24 saat inkübe edilen kuyulardaki hücreler, DPBS ile iki kez yıkandı. Trypsin-EDTA solüsyonu eklenerek, aderent hücreler kaldırıldı ve toplandı. 1350 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet kısmı FBS içermeyen DMEM besiyerinde süspanse edildi, sayımları yapıldı. Her bir migrasyon kuyucuğuna (Transwell Permeable Supports, 6.5 mm çaplı chamber, 0.4 µm por büyüklüğü, poliester membran, Corstar) 50.000 MDA-MB-231 hücresi, 100 µL olacak şekilde eklendi.

Chamber altındaki kuyuya 600 µL FBS içeren DMEM eklendi. 24 saat boyunca 37 °C’ de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Chamber ve tabanlardaki besiyeri uzaklaştırıldı, 1x PBS ile 2 kere yıkandı. Pamuk uçlu bir aplikatör kullanarak, migrate olmamış hücreleri chamberdaki membranının apikal tarafından yavaşça kazındı. Fiksasyon solüsyonu (%75 saf metanol ve %25 asetik asit) ile membrandaki ve tabandaki hücreler 5 dakika inkübe edildi. 1X PBS ile yıkandı. Kristal violet solüsyonundan (%0.5 CV) membran ve tabanların üstü kaplanacak şekilde eklendi. 20 dakika, oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Boya uzaklaştırıldı, bir kez 1x PBS ile, boya tamamen uzaklaşana kadar ultra pure saf su ile yıkandı. Gece boyu kurumaya bırakıldı. Ertesi gün beyaz ışıktaki mikroskop görüntüsü alındı (Zeiss Axio Vert1). Filtrenin alt yüzeyinde migrate olmuş hücreler sayıldı.

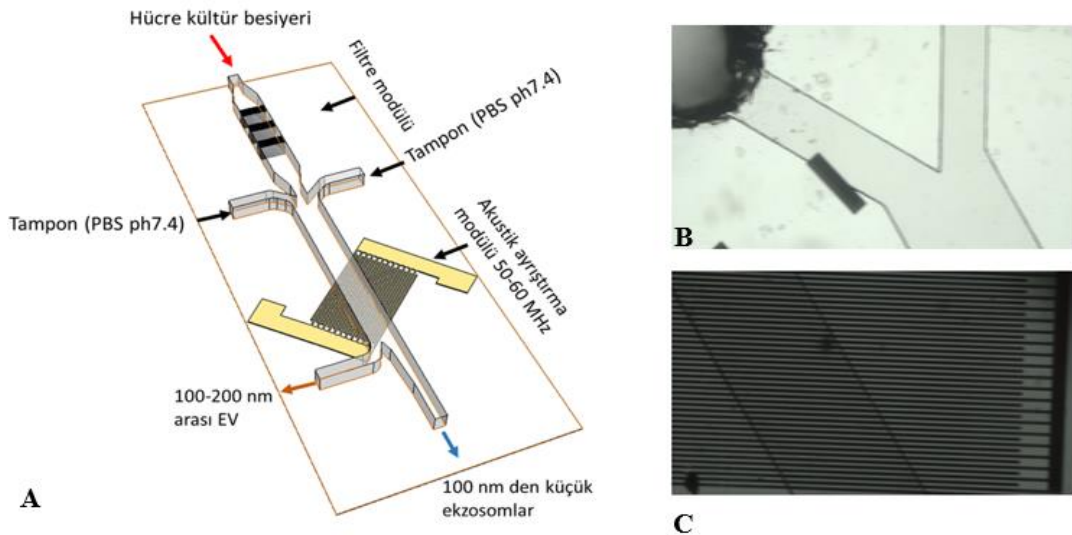


Resim 13. Migrasyon deneyi düzeneği, boyama işlemleri ve görüntülenmesi.

4. BULGULAR

4.1. Mikroakışkan Sistem Prototipi

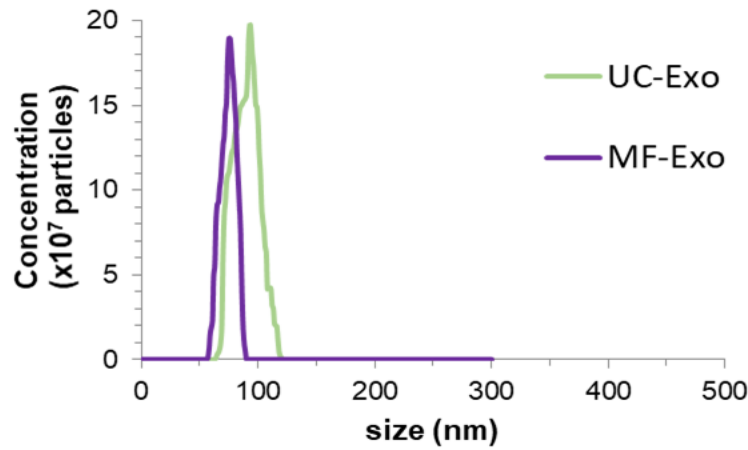
Akustik dalgalar kullanılarak tasarlanan mikroakışkan sistemin prototip görüntüsü Şekil 24'te yer almaktadır. PDMS tabanlı mikroakışkan sistem Prof. Dr. Özge Çevik ve Doç. Dr. Adem Özçelik tarafından TÜBİTAK 221S982 projesi ile geliştirilen prototiplerden biri olup tez çalışmasında Jurkat hücre eksozomları izolasyonu için kullanılmak için tasarlanmıştır. Geliştirilen mikroakışkan sistemin akustik bileşenleri bölümü daha önce araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada yayınlanmıştır (Ozcelik ve diğerleri, 2024). Lityum niyobat üzerine akustik dalga oluşturmak için metal elektrodlar tasarlandı ve vakum altında altın ve krom film kaplaması yapıldı. Fotolitografi işlemi ile master kalıplamada mikrokanaal desenlerine göre UV maskeleme ve kimyasal işlemlere göre çıkarıldı, SU8 photoresist reçinesi kullanılarak bastırıldı. Bu master kalıplarda PDMS yüzeyde kanal boşlukları oluşturuldu. PDMS yüzeylerini oksijen plazma kullanılarak lityum niyobat üzerine yerleştirildi. Akustik modülde frekanslar 50-60 MHz aralığında verilerek numunelerde 100 nm altında eksozom ayırımları gerçekleştirildi.



Şekil 24. (A) Mikroakışkan sistem prototipi, (B) ayırma kanalları ve (C) akustik ayırma modülünün mikroskop altındaki görüntüleri.

4.2. Eksozomların Boyut ve Dağılım Sonucu

Ultrasantrifüj (UC) ile saflaştırmada boyut dağılımı biraz geniş olmakla birlikte eksozom elde edilme miktarı açısından daha verimli bir yöntemdir. Mikroakışkan (MF) izolasyon yönteminde ise sabit boyutta eksozom izolasyonu yapmak ve saflık açısından önemlidir, bu noktada boyut dağılımı daha dar aralıkta olur, ayrıca eksozom miktarı açısından kısıtlayıcılığı olmaktadır. UC ve MF sistem ile izole edilen jurkat eksozomların boyut analizleri yapıldığı zaman UC-Exo'nun 92 ± 24 nm boyutunda, MF-Exo'nun 75 ± 8 nm boyutunda olduğu tespit edildi (Şekil 25). MF ile hücre kültür besiyerinden jurkat eksozomlarının izole edilmesinde belirli boyutta izolasyon başarısı yüksek olduğu tespit edildi.



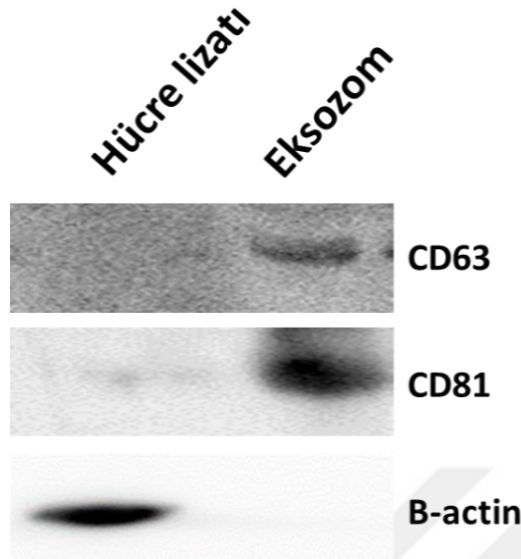
Şekil 25. Eksozom boyut ve dağılım sonucu.

4.3. Eksozomların Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi

Jurkat hücreleri besiyerinden ultrasantrifüj ile izole edilen eksozomların karakterizasyonları western blot yöntemi ile yapılarak eksozom yüzey belirteçlerinden CD63 ve CD81 ekspresyonları kontrol edildi (Şekil 26). Eksozomların yüzey belirteçleri Jurkat eksozom numunelerinde bantların yoğunlukları tespit edilirken, Jurkat hücre lizatı numunelerinde bantların eşit miktarda yükelenen proteinlerinde daha az eksprese olduğu ve bantlarda CD63 ve CD81 proteinlerin ekspresyon düzeylerinin düşük olduğu tespit edildi.

Hücre lizatlarında kontrol amaçlı bakılan β -aktin düzeylerinin ise yoğun bir bant şeklinde olduğu gözlenirken eksozom numunelerinde bu bantlara rastlanılmadı. Jurkat

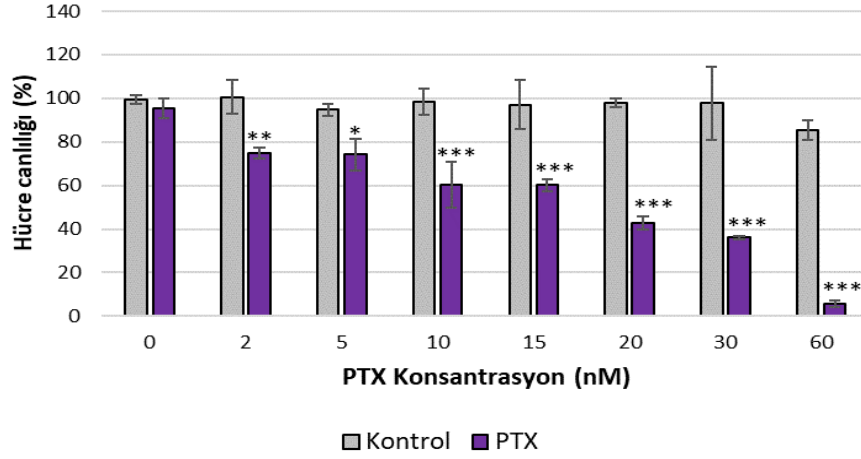
hücrelerinden salınan ekstrasellüler veziküller içerisinde izole edilen yapıların yapılan analizle eksozom olduğu belirlendi.



Şekil 26. Eksozomların western blot ile karakterizasyonu.

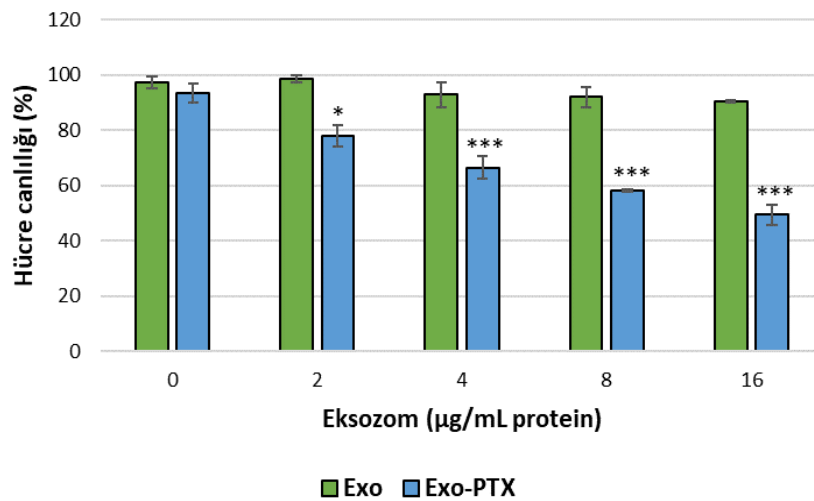
4.4. Hücre Canlılığı Sonuçları

MDA-MB-231 hücreleri üzerine PTX konsantrasyon hesabı ve hücre canlılığı üzerindeki etkisinde dozların tespit edilmesinde MTT testi uygulandı (Şekil 27). PTX 0-60 nM konsantrasyonda 24 saat MDA-MB-231 hücreleri ile inkübe edilerek canlılıklar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. PTX'in 2 ve 5 nM konsantrasyonda hücre canlılığı %20 azalırken 10-15 nM konsantrasyonda %40 azaltmaktadır. PTX'in 15 nM ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılıklarını %60 oranında üzerinde azalttığı görülmüş ve bu azalışlar anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$). PTX konsantrasyonları yapılacak uygulamalarda sınır olarak 15 nM olarak belirlenmiş ve ilaç yükleme çalışmalarında da bu oran dikkate alınmıştır.

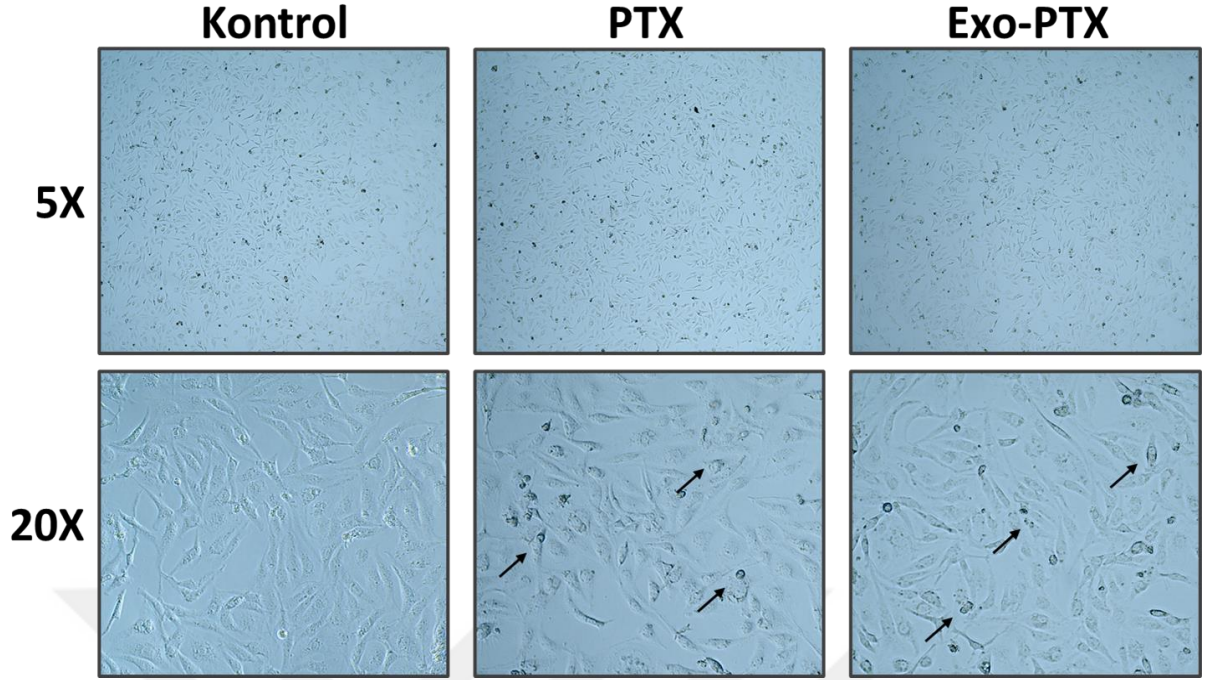


Şekil 27. MTT ile PTX hücre canlılık sonuçları

Jurkat hücrelerinden izole edilen eksozomlara yüklenen PTX'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini tespit etmek amacıyla ortama Exo ve Exo-PTX farklı konsantrasyonlarda konularak 24 saat inkübe edildi. Hücre canlılık grafikleri şekil 28'de yer almaktadır. MDA-MB-231 hücreleri üzerine ilaç yüklü olmayan Jurkat Exo'ların konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını değiştirmedığı tespit edilmiştir. 16µg/mL konsantrasyonda Exo'nun hücre canlılığını kontrol grubuna göre bir miktar düşürdüğü görülsede bu azalış anlamlı bulunamamıştır. Hücreler Exo-PTX uygulandığı zaman kontrol grubuna göre 2µg/mL'den ($p<0.05$) başlayarak artan dozlarda 4µg/mL, 8µg/mL ve 16µg/mL ($p<0.001$) hücre canlılığını azalttığı ve bu azalışın anlamlı olduğu görülmektedir.



Şekil 28. MTT ile Exo-PTX hücre canlılık sonuçları (* $p<0.05$, *** $p<0.001$ Exo grubu ile karşılaştırıldığında).



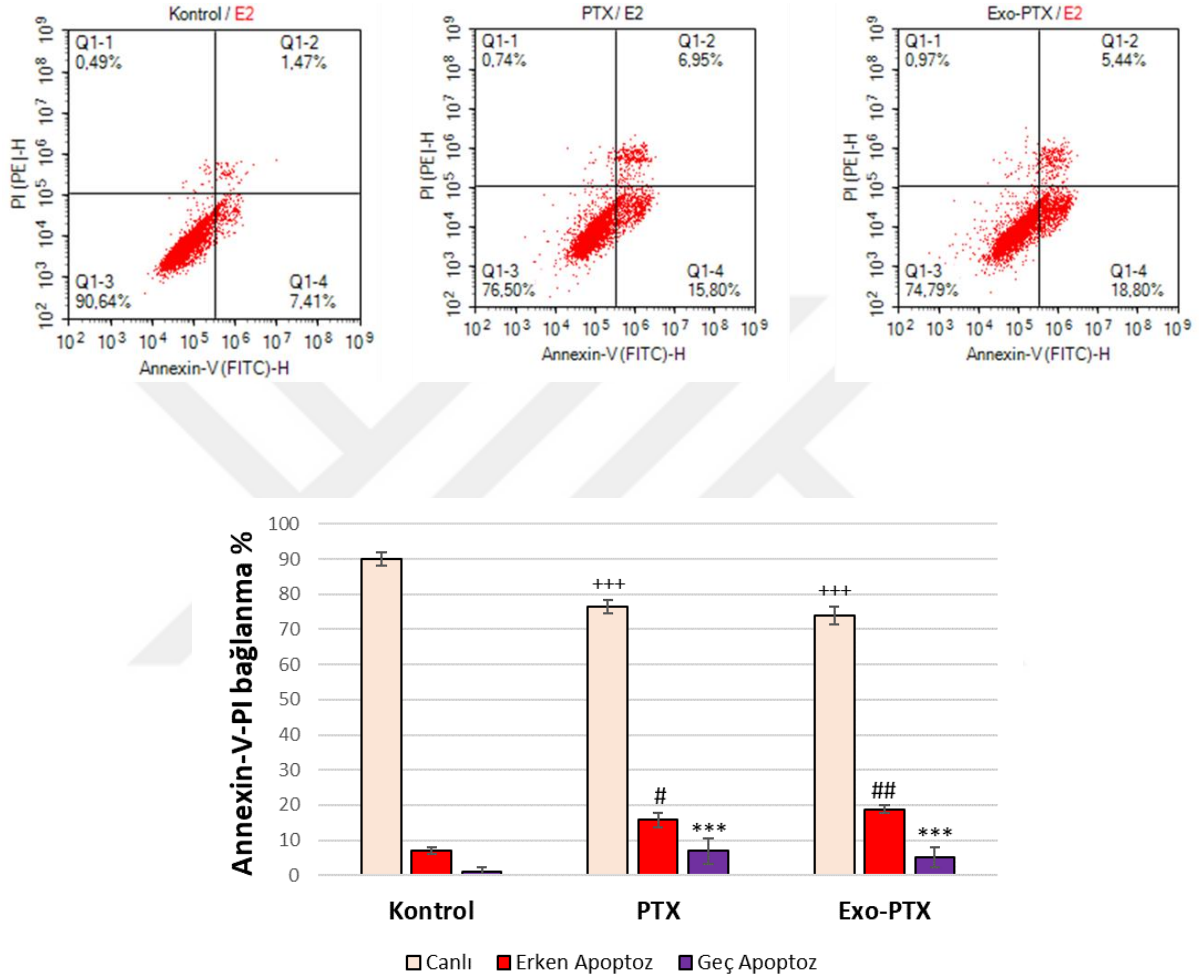
Şekil 29. PTX ve Exo-PTX 'in MDA-MB-231 hücreleri üzerinde etkisinin mikroskopta gösterimi (5X ve 20X büyütme)

MDA-MB-231 hücrelerinin Jurkat hücrelerinden izole edilerek elde edilen Exo-PTX ve PTX ile 24 saat inkübasyonu sonrasında invert mikroskopta beyaz ışık altındaki görüntüsü Şekil 29'de yer almaktadır. Hücreler kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığı zaman PTX ve Exo-PTX'in apoptotik hücreleri arttığı, hücrenin adhezyon yeteneğini azalttığı gözlemlendi (şekilde siyah oklar ile belirtilmiştir). Hücrelerde tedavinin hem PTX hemde Exo-PTX uygulamasında çekirdek yapısının bozulduğu ve epitelloid morfolojiyi kaybettiği tespit edildi.

4.5. JC-1 ve Annexin V-FITC-PI Bağlanma Sonuçları

Jurkat eksozomları kullanılarak elde edilen Exo-PTX ve PTX'in MDA-MB-231 hücreleri üzerinde apoptotik etkisi flowsitometri ile Annexin V-FITC-PI bağlanma düzeylerine bakılarak tespit edildi (Şekil 30). Hücrelerde canlı (Q1-3), erken (Q1-4) ve geç apoptoz (Q1-2) panelleri değerlendirilerek apoptotik hücre sayıları ölçüldü. MDA-MB-231 hücrelerinde PTX'in canlı, erken ve geç apoptoz değerleri kontrol grubu canlı, erken ve geç apoptoz değerleri ile karşılaştırıldığında canlı hücre sayısında anlamlı bir azalışın olduğu ($p<0.001$),

erken ve geç apoptozda ise anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p<0.05$, $p<0.001$). Benzer şekilde Exo-PTX'in grubu hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında canlı hücre sayısında anlamlı bir azalışın olduğu ($p<0.001$), erken ve geç apoptozda ise anlamlı bir artış olduğu bulundu ($p<0.01$, $p<0.001$).

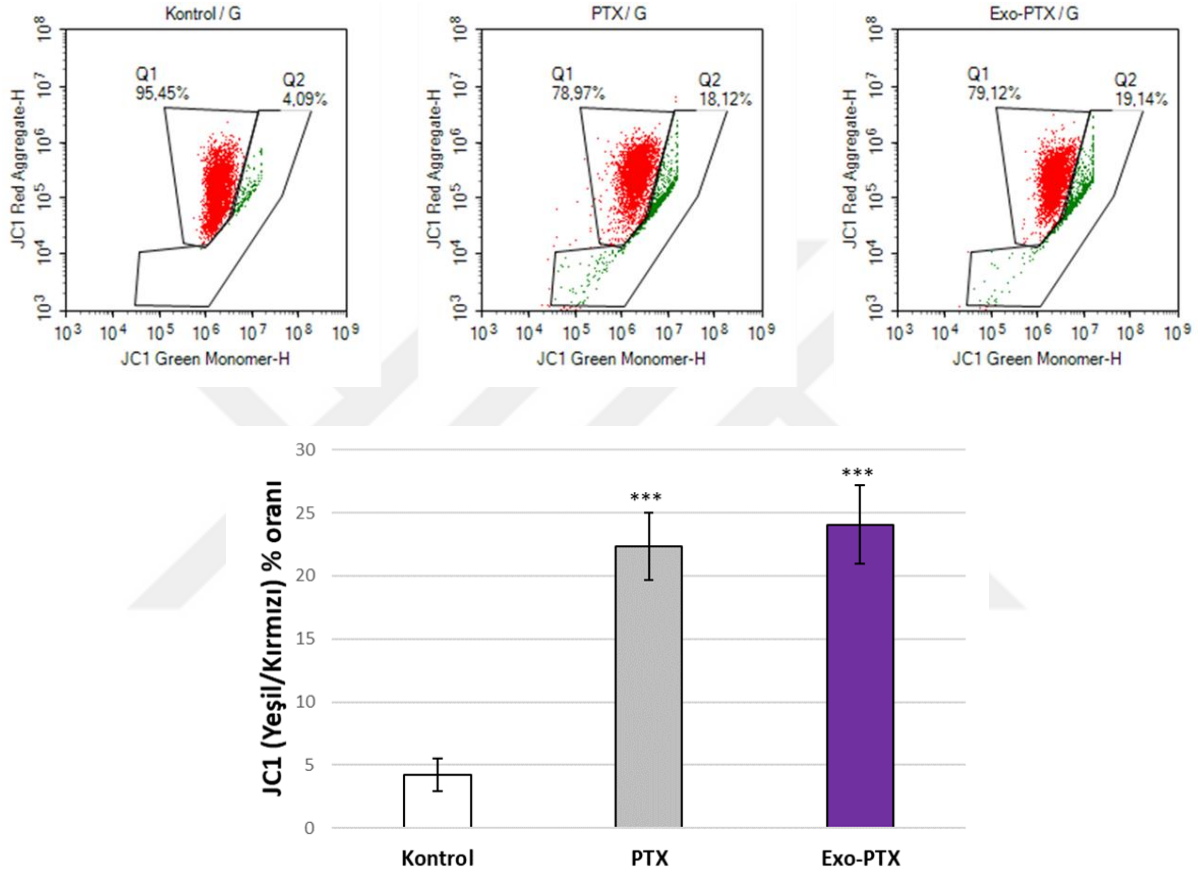


Şekil 30. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde Annexin V-FITC-PI bağlanma sonuçları

Hücrelerde apoptotik aktivitelerin hücre içerisinde mitokondride meydana gelen membran potansiyeli değişikliklerine bağlı olarak tespit edilmesinde kullanılan JC1 boyaması ile jurkat eksozomlarının PTX yüklemesi ile etkisi MDA-MB-231 hücrelerinde flowsitometri ile analiz edildi. JC1 boyası mitokondride biriktiği zaman kırmızı, mitokondri membranı

bozulup salındığı zaman yeşil ışığa veren bir boyadır. Bu nedenle boyanın hücreler üzerindeki formu verdiği floresan ışığa ile kolaylıkla tespit edilebilir.

Bu çalışmada JC1 boyasının yeşil/kırmızı oranı değerlendirildi. MDA-MB-231 hücrelerinde PTX'in ve Exo-PTX'in kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mitokondri membran potansiyelini değiştirerek mitokondri depolarizasyonu anlamlı derecede arttırdığı gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 31).

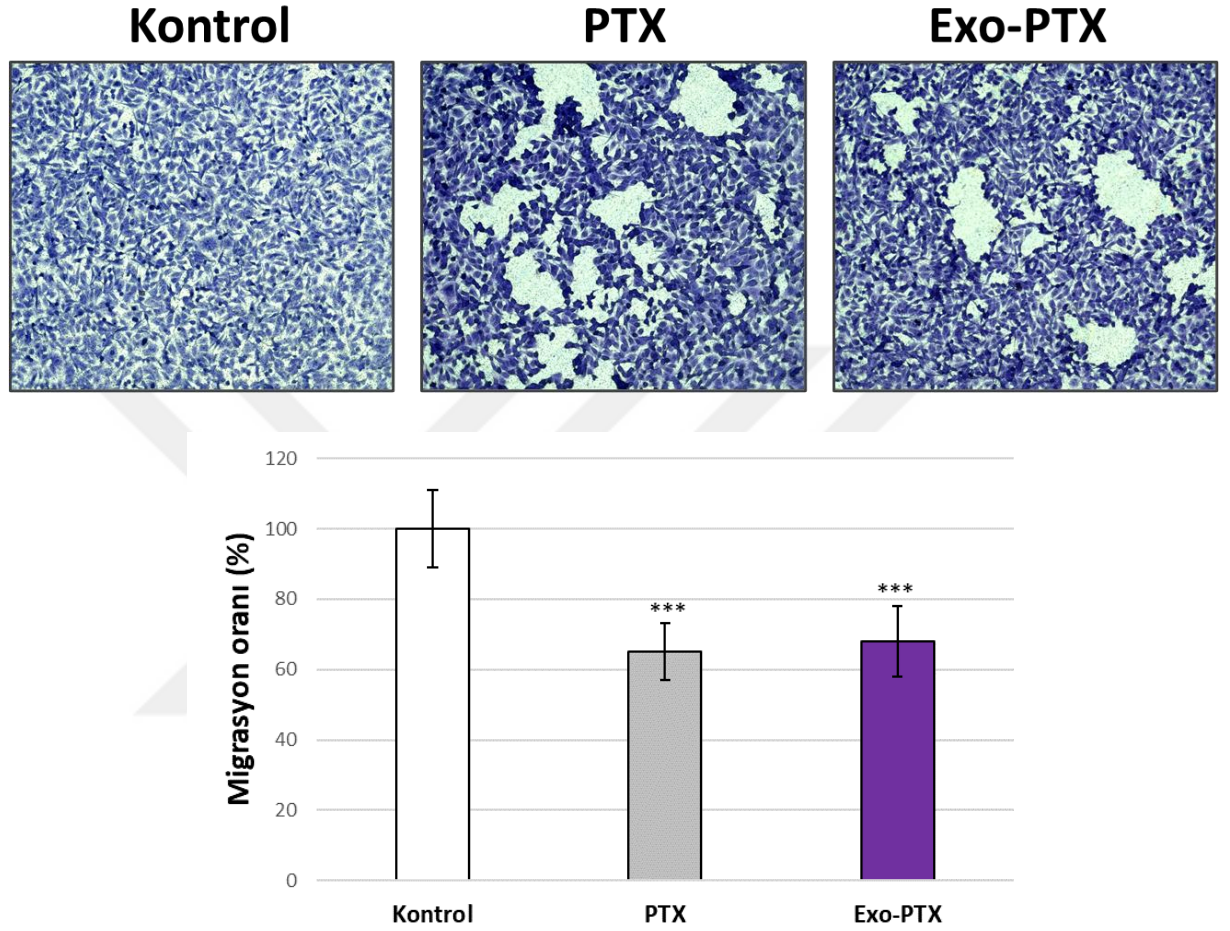


Şekil 31. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde JC-1 analiz sonuçları (** $p<0.001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

4.6. Transwell Migrasyon Analizi

Jurkat eksozomlarından elde edilen Exo-PTX ve PTX MDA-MB-231 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrasında transwell içerisinde yer alan insertlerde tekrar inkübe edilerek hücrelerin migrasyon yeteneklerini kaybedip kaybetmedikleri tespit edildi (Şekil 32).

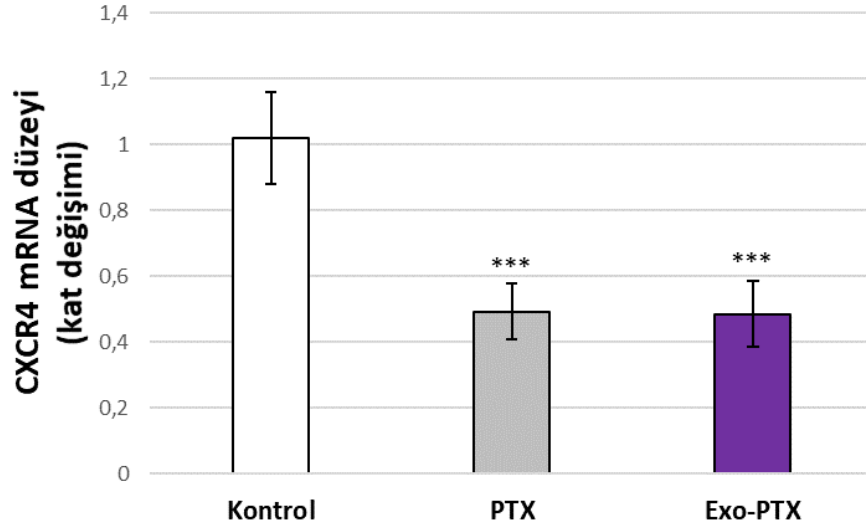
Hücre migrasyon insertleri mikroskop altında incelendiği zaman PTX ve Exo-PTX uygulamasında boşluklar oluştuğu ve hücrelerin yüzeyde tutunamadığı, birbirleri ile etkileşimlerinin azaldığı tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre migrasyon düzeyleri PTX ve Exo-PTX grubunda anlamlı derecede azaldı ($p<0.001$).



Şekil 32. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre migrasyon analiz sonuçları (***) $p<0.001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

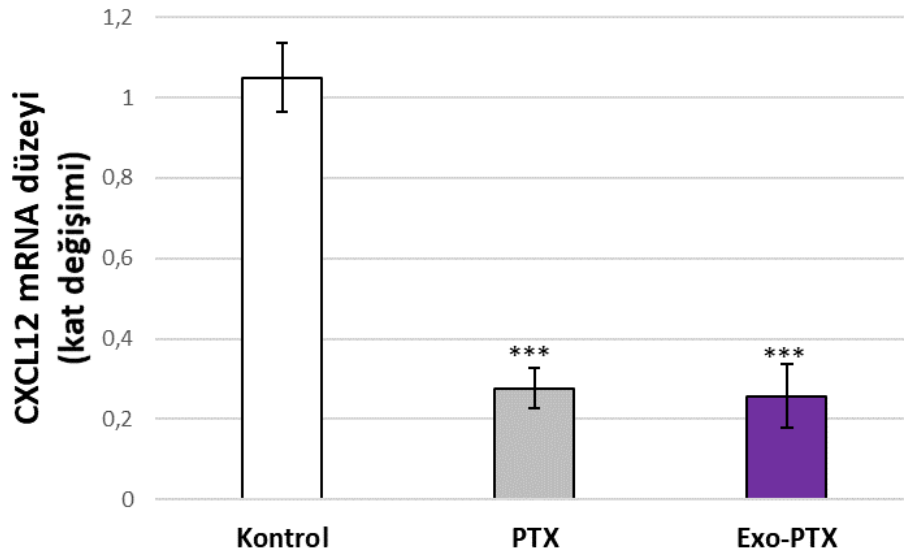
4.7. CXCR4/ CXCL12 genlerinin Ekspresyon Sonuçları

Jurkat eksozomlarından elde edilen Exo-PTX ve PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde kanser metastazında önemli rol oynayan kemokin ailesi üyesi olan CXCR4 gen ekspresyon üzerindeki etkisi sonuçları şekil 33'te görülmektedir. Exo-PTX ve PTX grupları MDA-MB-231 hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CXCR4 gen ekspresyon düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.001$).



Şekil 33. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde CXCR4 gen ekspresyon analiz sonuçları.

Jurkat eksozomlarından elde edilen Exo-PTX ve PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde kanser metastazında önemli rol oynayan kemokin ailesi üyesi olan CXCL12 gen ekspresyon üzerindeki etkisi sonuçları şekil 34'te görülmektedir. Exo-PTX ve PTX grupları MDA-MB-231 hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CXCL12 gen ekspresyon düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.001$).



Şekil 34. PTX ve Exo-PTX'in MDA-MB-231 hücrelerinde CXCL12 gen ekspresyon analiz sonuçları.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri (BC) başlıca genetik, çevresel ve yaşam tarzı bileşenlerini içeren çok faktörlü kötü huylu malignitelerden biridir. BC, meme hücrelerinde başlar ve zamanla kontrolden çıkıp kötü huylu tümöre dönüşen bir grup kanser hücresi olarak tanımlanır. Meme tümörleri klinikte östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epitelial büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) taşıyıp taşımasına göre temel üç gruba ayrılır: ER+, HER2+ ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC). TNBC, BC'lerin %15-20'sini oluşturur ve hedefe yönelik tedavinin uygulanmadığı tek BC alt tipidir. TNBC HER2, ER ve PR negatiftir, klinikte yaygın olarak invaziv duktal karsinom olarak ortaya çıkar. TNBC tümörleri daha sık ve erken yenilenme ile agresif klinik seyir izler ve yüksek proliferatif kanser tipidir, BC alt tiplerine göre en kötü prognoza sahiptir. Özellikle akciğer, lenf düğümleri ve beyinde erken yenileme ve metastaza eğilimlidir (Nolan, Lindeman ve Visvader, 2023; Zagami ve Carey, 2022).

BC tedavisi farklı alt tiplere sahip heterojen bir hastalık olduğundan, klinikte aşılması gereken büyük zorluklarından biridir. Cerrahi operasyonla tümör alımı, radyoterapi, hormonal tedaviler ve kemoterapi gibi çeşitli tedavi seçenekleri olmasına rağmen TNBC için kemoterapi başlıca seçenektir (Kaveh Zenjanab ve diğerleri, 2024).

BC'nin alt tipi olan TNBC hastaları kemoterapiden diğer BC tipli hastalarına oranla daha fazla yarar sağlar (Mandapati ve Lukong, 2023). Ancak kemoterapi spesfikliği olmayan bir tedavidir. Kemoterapik ajanlardan Paklitaksel (Taxol®, PTX) klinikte yumurtalık, meme, mide, pankreas ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi geniş spekturumdaki kanserler için FDA onaylı en yaygın kullanılan anti-mitotik ilaçlardan biridir. Metastatik ve agresif kanserlerde, ilk iki basamak tedavide, neo-adjuvan yada adjuvan tedavide kullanılır. Yanıt oranı kanser çeşidi dahil olmak üzere bir çok faktöre göre değişebilsede en çok kullanılan iki kanser türlerinde metastatik meme kanserinde %56 kanserinde ve yumurtalık kanserinde %30 olduğu düşünülmektedir (Gallego-Jara ve diğerleri, 2020; Ying ve diğerleri, 2023). Hücredeki mikrotübüllerin ana görevi mitotik bölünme sırasında iğ ipliği oluşumu olsada, hücre içi trafiği, hücrenin hareketliliği gibi görevleri de üstlenirler. PTX, mikrotübül alt birimi olan β -tubulini hedefler ve mikrotübül depolimerasyonunu engelleyerek mitozu bozar, sonuçta hücre apoptoza

sürüklenir (Kaveh Zenjanab ve diğerleri, 2024; Sharifi-Rad ve diğerleri, 2021). PTX yüksek dozda yan etkileri nedeniyle anti-mitotik özelliğini korunurken dozunun azaltılması hedeftir.

Düşük dozlarda PTX'in etkisi bazı çalışma grupları tarafından araştırılmıştır. PTX'in etkisi hücre içindeki dozuna bağlıdır.

Giannakakou ve diğerlerinin (2001) yaptığı çalışmada 12nM üzerindeki PTX konsantrasyonları meme kanseri (MCF-7) ve akciğer karsinomu hücrelerinin (A549) hücre döngüsünde G2/M fazında durmasıyla çoğalmasının durduğunu bulmuşlardır. Düşük PTX konsantrasyonları (3-6 nM) uygulaması sonrası ise A549 ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu mitotik durdurma olmadan inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Düşük PTX konsantrasyonları PTX'in p53 ve p21 proteinlerini indükleyerek A549 ve MCF7 hücrelerinde G1 ve G2 fazında durmaya sebep olmasına yeterli olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak çoğu hücre hattı PTX'e cevap olarak p53'ü indükleyemeyebilir ve PTX uygulanması sonrasında sadece mitoz bölünme durdurulabilir (Giannakakou ve diğerleri, 2001).

Tran ve diğerlerinin (2009) yaptığı çalışmada hücre çoğalması üzerinde bir etkisi olmayan 10 nM düşük doz PTX'in uygulanması ile iki istilacı MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattında göç ve invazyon yetenekleri araştırılmıştır. Lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiş olan voltaja bağımlı sodyum kanalları (NaV 1.5) MDA-MB-231 hücrelerinde fazlaca eksprese edilirken MDA-MB-468' de edilmez. Bu kanallar MDA-MB-231 hücrelerinin invazyon yeteneğini artırıcı yönde etkiler. PTX uygulaması sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinin transwell invazyonunda %40 oranında azalma gözlenirken, MDA-MB-468'de gözlenmemiştir. Sonuç olarak, hücre çoğalmasına bir etkisi olmayan düşük dozda PTX'in hücre istilası gibi anti-tümöral etki gösterebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Tran ve diğerleri, 2009). Çalışmamızda MDA-MB-231 hücreleri üzerinde PTX'in 15 nM konsantrasyonda hücre bölünmesini durdurarak hücrelerin çoğalmasını engellediği ve anti tümöral etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu PTX'in farklı hücrelerde ve farklı uygulamalarla düşük konsantrasyonlarda bile hücrelerin proliferasyonunu baskıladığını ve kemoterapide doza bağlı olarak çalışmalar yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. PTX'in etki mekanizmasının mantığı daha sık mitoz geçiren kanser hücreleri gibi hücrelerin normal dokulara göre ilaçtan daha çok etkileneceğidir. PTX'in kanser hücrelerine seçici olmaması, düşük biyoyararlanımı (öne sürülen oran %10-30), dolaşımdan hızlı temizlenmesi, çözünürlüğünün düşük olması ve kullanımıyla ilgili ortaya çıkabilecek alerjik reaksiyonlar, saç dökülmesi, nörotoksisite gibi olumsuz etkileri klinik kullanımı için yeni stratejiler bulmaya yönlendirmiştir (Sharifi-Rad ve

diğerleri, 2021; S. Zhao ve diğerleri, 2022). Bununla birlikte, PTX tedavisinde diğer ilaçlarla kombine terapi tek ilaç toksisitesinin azaltılması için bir strateji olabilir.

PTX'in suda çözünürlüğünün iyi olmaması sebebiyle intravenöz uygulamasında çözücü olarak yeni formülasyonlar geliştirilmeye devam etmektedir, bunlardan güncel olanlardan biri Cremophor®EL(CrEL)'dir. Cremophor bir lipid bazlı solventtir, içeriği hint yağı ve susuz etanolden oluşur (Samaan ve diğerleri, 2019). Ancak bu formülasyon şiddetli duyarlılığa, nöro ve nefrotoksositeye, eritrosit agregasyonuna sebebiyet verir. Kemoterapinin yan etkilere ek olarak CrEL PTX'i infüzyonla alan hastalarda ek yan etki el ve ayaklarda periferik sinir dejenerasyonu sebebiyle uyuşukluk meydana gelir. Bu sınırlamalarla yeni PTX formülasyonları için nano dağıtım sistemlerinin önemini vurgulamaktadır (Ying ve diğerleri, 2023).

Nanotaşıyıcıların temel amacı, en az yan etki ile toksisiteyi azaltarak tedavi uygulamaktır. Klinikte etkili nanotaşıyıcılar; biyolojik olarak bozunabilen bileşenlerden oluşmalı, hedef bölgeye ulaşip orada birikebilmeli ve böylece normal dokulara minimum toksisite göstermeli, immün tepkisini tetiklememelidir. Ayrıca nanotaşıyıcılarla daha az miktarda ilaç daha etkili şekilde taşınır (Torres Quintas ve diğerleri, 2023). Nano ilaç dağıtım formülasyonları, daha iyi salınım davranışı ve ilaç kinetiği ile daha iyi terapötik sonuçlar etme potansiyeline sahiptir. PTX tedavisindeki zorluk, oldukça fazla olan yan etkilerin azaltılması ve ilaç etkinliğinin artırılmasıdır. Bu noktada albümine bağlı PTX formülasyonu olan Abraxane® meme kanseri için FDA ve Avrupa ilaç ajansı (EMA)'dan onay almıştır. Abraxane® formülasyonunda CrEL'in çıkarılmasıyla PTX'e kıyasla daha yüksek konsantrasyonda güvenle kullanılabilme avantajı sağlanmıştır. Nab-PTX formülasyonunun mantığı, reseptör aracılı taşıma yoluyla albüminin kanser hücrelere dağıtımını arttırmaktır (Samaan ve diğerleri., 2019). Sonraki yıllarda küçük hücreli akciğer kanseri olan hastalarda ilk basamak tedavisi için, metastaz yapan pankreas kanserinde tedavisinde gemsitabin kemoterapik ilacı ile kombine birinci basamak tedavisi için onay almıştır (Gallego-Jara ve diğerleri, 2020; Ying ve diğerleri, 2023). Bu gelişmelerle, PTX'in nano taşıyıcı formülasyonları ilerlemiş, Polimerik lipid nanopartikül (PICN®), Lipozomal (Lipusu®), polimerik misel (Nanoxel® ve Paclical®) gibi farklı ülkelerde onaylanmış yada klinik deneme aşamasında olan yeni alternatifler ortaya çıkmıştır. Nab-PTX %33'lük yanıt oranıyla,%25'lik yanıt oranı PTX ile kıyaslanınca en başarılı olandır (Gallego-Jara ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte ilk oral PTX formülasyonu CrEL gibi çözgen gerektirmeden yağda çözünen ve vücut tarafından abserbe edilebilen emülsiyon DHP107 (Liporaxel®) Güney Kore'de mide kanseri tedavisi için onaylanmıştır. Bu formülasyonların

dezavantajlarından biri KBB'ni geçememeleridir. KBB aşılması ise beyindeki PTX dozunun 4-6 kat artmasını sağlar (Ying ve diğerleri, 2023).

Son zamanların popüler nanotaşıyıcıları eksozomlar KBB sorununun üstesinden gelebilirler. Eksozomlar tüm canlı hücrelerden doğal olarak salınabilen hemen hemen her biyolojik sıvıda bulunan lipozomlara benzeyen küçük boyutlu çift katmanlı fosfolipid vezikülleridir. İlaç taşıma aracı olarak değerlendirilen eksozomların bir avantajı da kanser hedefli ilaç dağıtımı için kargo içeriklerinin ve membran yüzey modifikasyonlarının modifiye edilme kolaylığıdır. Eksozomlar küçük boyutları ile (30-150 nm, ortalama ~100 nm), hem mebranlarında hem de çekirdeklerinde taşıyabildikleri kargolarla, kimyasal ve fiziksel olarak modifiye edilebilmeleriyle, hücreler tarafından verimli olarak içselleştirilebilmeleri ve kargolarını hücre içinde salabilme gibi özellikleriyle ilaç dağıtım stratejisi olarak potansiyel taşıyıcılardır (Raguraman ve diğerleri, 2023). Eksozomalar hali hazırda hastanın kendi hücreleri tarafından endojen salındığı için istenmeyen immün tepkilerine ve toksisiteye, alerjilere yol açma olasılığı az olacaktır. Bu sebeple, özellikle kanser tedavisinde ilaç dağıtım aracı olarak potansiyele sahiptir. Bununla birlikte vücut sıvılarındaki stabilitesi ve çeşitli kaynaktan bol elde edilmesi avantajlar sağlamaktadır (Khan ve diğerleri, 2022). Şimdiye kadar PTX taşıma aracı olarak lipozomlar, nanopartiküller ve miseller gibi sentetik araçlar kullanılmış olsada sitotoksik ve immünojenik etkiler göstermeleri gibi dezavantajları hala aşılamamıştır. Eksozomlar ise doğal oldukları için biyoyumlu, sepsifik dokuları hedefleyerek kargolarının o bölgede birikmesini sağlayan ve CD47 membran proteini olan eksozomlar bunu sunarak fagositozla yok edilmekten kaçmaları için "beni yeme" sinyalleri veren araçlardır. Böylece kandan temizlenme süreleri uzatılarak stabilitesi artırılır (Khan ve diğerleri, 2022).

Tümör hücreleri kaynaklı eksozomlar tümör mikroçevrelerinde toplanma eğilimindedirler. Ayrıca yapılan çalışmalarda, bir hücre tipinden kaynaklanan eksozomların çoğunlukla aynı türden hücrelerce alınabildiği de bilinmektedir (Khan ve diğerleri, 2022). Klinik öncesi yapılan çalışmalar kemoterapötiklerin eksozom aracılı taşınmasının ve içselleştirilmesinin in vitro ve in vivo olarak antikanser aktivitesi gösterebileceği belirlenmiştir.

Kim ve diğerlerinin (2016) yaptıkları çalışmasında RAW 264.7 hücrelerinden salınan eksozomlara PTX yüklemesi karşılaştırma amacıyla elektroporasyon, oda sıcaklığında birlikte inkübasyon ve sonikasyon yöntemleri ile yüklenmiştir. Yükleme verimliliği değerlendirildiğinde 3 yöntemle oda sıcaklığında inkübasyon < elektroporasyon << sonikasyon olarak etkinlikleri tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada eksozomların hücrelerce

alınma yeteneği, lipozomlar ve polistiren nanopartiküllerle (NP) ile karşılaştırıldığında ve eksozomların sentetik NP'lerden 30 kat daha fazla hücreye alındığını, sınırlı sayıda lipozom ve NP alımının olduğu belirlenmiştir.

Exo-PTX çoklu ilaca dirençli Madin-Darby köpek böbrek (MDCK MDR1) hücrelerinde PTX'e göre 50 kat daha yüksek ilaç sitotoksitesine sahip olduğunu ve ayrıca Lewis akciğer karsinomu akciğer metastası modelinde eksozomların in vivo olarak hedeflenip, %97'sinin metastaz bölgesinde lokalize olup derin anti-kanser etkilerini gösterdiği bulundu (Kim ve diğerleri, 2016).

Munagala ve diğerlerinin (2016) yaptıkları çalışmada, inek sütünden elde edilen eksozomların in vitro hücre içselleştirmesi insan akciğer kanseri (H1299) hücrelerinde 8 saat boyunca zaman bağlı artışla alınmış ve 16 saatte bir platoya ulaşmıştır. Eksozomların stabilitesi insan akciğer kanseri (A549) taşıyan fareler kanında farklı zaman aralıklarında takip edilerek, 24. saatte en yüksek sinyalle, 6. Güne kadar giderek azalan eğimle gözlemlenmiştir. PTX'in eksozomdan salınım kinetiği, 2, 3, 5 ve 7 saat sonra sırasıyla %22, 29, 45 ve 55 idi ve ilacın %96'sı 24 saat sonra salınmıştır. Exo-PTX'in insan akciğer (A549 ve H1299) ve meme (MDA-MB-231 ve T47D) kanser hücre hatlarında anti-proliferatif etkisi incelendi. A549 hücrelerinde IC₅₀ değerleri 72 saat sonunda, Exo-PTX için 1.56 nM, PTX için 3.12 nM'dı. Ekip bu çalışma ile süttten üretilen eksozomların ilaç dağıtım aracı olarak kullanılabileceğini ve biyolojik olarak uyumlu oldukları için oral yolla alınabileceğini gösterilmiştir. Kullanılan eksozomal formülasyonların, eşdeğer konsantrasyondaki ilaçtan daha güvenli ve daha güçlü anti-proliferatif etkiler gösterdiği in vitro olarak belirlenmiştir (Munagala ve diğerleri 2016).

Abas ve diğerlerinin yaptığı çalışmada (2022) mezenkimal kök hücrelerden (MSC) türetilen eksozomlara PTX yükleyerek rahim ağzı kanserine (Hela) etkileri belirlenmiştir. PTX, MSC eksozomlarına elektroporasyonla %62 ilaç yükleme oranında yüklenmiştir. İlaç yükleme sonrası eksozom boyutunda artış olduğu tespit edilmiş ve MSC-exo'nun 100 µg/mL konsantrasyonda Hela ve L929 hücrelerinde hücre canlılığını arttırıcı etkisinin olduğu bununla beraber Exo-PTX'in Hela hücrelerinde 10 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda 24 saatte, 1 ila 100 µg/mL konsantrasyonlarında 48 saatte hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, exo-PTX'in Hela hücrelerce içselleştirilerek serbest PTX'le aynı etkiler gösterebildiği kanıtlanmıştır. Ayrıca Exo-PTX, Hela hücrelerinde apoptozu indükleyebildiğini ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) proteinlerini ve göç yeteneklerinin bastırıldığı belirtilmiştir (Abas ve diğerleri, 2022). Bizim çalışmamızda PTX yükleme

verimliliğinin %56 olduğu tespit edildi. Exo-PTX uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde artan dozlarda (2µg/mL-16µg/mL) hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Bu azalışın hücrede apoptozu indükleyerek mitokondri membran potansiyelinin değişikliğine neden olarak bu ölümü gerçekleştirdiği tespit edilmiştir.

Eksozomlara ilaç yükleme çalışmalarında önemli unsur yapısı bozulmamış ve saflığı yüksek eksozom izole edilmesidir. Ancak bu izolasyonda yüksek miktarda izolasyon oldukça önemlidir. Eksozom izolasyonunda altın yöntem kabul edilen ultrasantrifüj zaman alıcı ve pahalı ekipmanlara ihtiyaç duymasıyla dezavantaj olarak kabul edilsede yüksek miktrada izolasyon için en verimli yöntemlerden biridir. Alternatif olarak yeni nesil mikroakışkan teknolojisi, entegre çiplerle eksozomların ayrılmasını, zenginleştirilmesini ve tespitini sağlayabilmek son yıllarda önemli araştırma konuları içerisinde (Wu ve diğerleri, 2022). Mikroakışkanlar, mikro ölçekteki kanallarla az miktarlardaki numuneleri manipüle edebilen sistemlerdir. Entegre edilmiş mikroakışkan çiplerin yapısında ayırma bölgesi ve tespit bölgesi bölmeleri bulunur. Klinik açıdan eksozomaların hızlı tespitinde çok faydalı bu çipler, çip dışı işlemleri azaltıp zaman kazancı sağlar (Raju ve diğerleri, 2022; Wu ve diğerleri, 2022).

Bu çalışmada eksozom izolasyonlarının kolaylıkla yapılması için mikroakışkan sistem tasarımı kullanılmıştır. UC ve MF sistemlerinden izole edilen eksozomların miktar ve boyut açısından karşılaştırma yapılmıştır. İlaç yükleme çalışmaları için MF sistemlerinden izole edilen eksozomların saflığının yüksek ancak miktar açısından düşüklüğü bu konuda yeni çalışmaların yapılmasının gerekliliğini göstermektedir. Özçelik ve diğerlerinin (2024) yaptığı çalışmada mikroakışkan sistemler ve ultrasantrifüj kullanılarak serum ve MDA-MB-231 hücrelerinden salınan eksozomlar arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir. Sistem üzerinde izolasyon ile birlikte hem yükleme yapabilen bir lab-on-chip teknolojisi geliştirilmiştir. Geliştirilen çipte akustik eksozom izolasyonunu takiben elektroporasyon ile birlikte PTX yüklemesi yapıldığında PTX yüklemesinin başarısının arttırıldığı gösterilmiştir (Ozcelik ve diğerleri, 2024).

Bu tez çalışmasında akustik dalgalar ile Jurkat T lenfosit hücrelerinden sekrete edilen eksozomların ayrılması mikroakışkan sistem ile gerçekleştirildiğinde benzer şekilde yüksek saflıkta izolasyon verimliliğinin gerçekleştiği görüldü. Ayrıca Jurkat T lenfosit hücrelerinden izole edilen eksozomlarının boyut açısından daha küçük olması nanotaşıyıcı işlevleri noktasında avantaj sağladığını göstermektedir. İmmün sistemde Jurkat hücreleri sıvı kültür içerisinde yetiştirilmesi açısından mikroakışkan sistemlere uyum sağlayabilecek yapıdadır,

CD4⁺, CD8⁻ olması ile enfeksiyon veya kanser gibi durumlarda bağışıklık sağlayarak kanser hücrelerinin yok edilmesinde görev yapmasına kolaylık sağlar (Roose ve diğerleri, 2003). Jurkat hücreleri ve mikroakışkan sistemler hem tedavide hemde tümör baskılayıcı işleviyle beraber kanser bağışıklık düzenlemesi sürecinde de görev yaparak tümörün immünojenitesini şekillendirdiği için gelecekte yeni araştırmalar için önemli konulardan biri olma potansiyelini taşımaktadır (Hamdan ve Cerullo, 2023).

İmmün sistem hücrelerinden salgılanan eksozomlar kaynaklandıkları hücreleriyle aynı işlevlerin çoğuna sahip oldukları için tümör tedavisinde potansiyel olarak görülürler (Hazrati ve diğerleri, 2022). Ayrıca eksozomlarının belirli lenf nodlarını ve seçici tümörleri hedefleme, bağışıklığı aktive etme gibi avantajları da bilinmektedir (Chen ve diğerleri, 2023). Bu durumda sitokinlerin kullanılması, kanser aşılı, antikor kullanımı, kontrol noktası inhibitör tedavisi gibi immüno terapilere ek olarak güvenilir, fiziksel engelleri aşabilen, ve doğal hedefleme yeteneğiyle avantajlı olan immün sistemini uyarıp güçlendirecek, tümör gelişimini negatif yönde etkileyecek immün sistem eksozomlarının tedavide kullanılması potansiyeli olan bir düşüncedir. Seo ve diğerlerinin (2018) bu çalışmasıyla aktifleştirilmiş CD8⁺ T hücrelerinden salgılanan EV'lerin tümör stromal hücrelerinin azalmasıyla tümörün gelişmesini ve invaziv özelliklerini zayıflatabildiği gösterilmiştir (Seo ve diğerleri, 2018). CD8⁺ T eksozomlarının, tümör hücreleri ile immün hücreleri arasında karşılıklı bilgi alışverişi sağladığı ve tümörün gelişiminde düzenleyici rolü olduğu bildirilmiştir (Zhou ve diğerleri, 2023). Çünkü T hücreleri tümör mikroçevre açısından önemli rolleri vardır ve saldıkları eksozomlar aracılığı ile de tümör mikroçevrede değişiklikleri sağladıkları bilinmektedir. Bu tez çalışmasında Jurkat eksozomları izole edilerek MDA-MB-231 hücreleri üzerinde tümör mikroçevrede etkiside incelenmiştir.

Tümör mikroçevrede kemokinler ve ligandları, TNBC'nin yaşamasını, büyümesini regüle eder ve immün baskılamasında, anjiyogeneze, bölgeye yönelik metastazda büyük rolü vardır. (Mehraj ve diğerleri, 2022). Kemokin reseptörü tip 4'ün (CXCR4), ligandı kemokin ligand 12 (CXCL12) ile birlikte CXCL12/CXCR4 eksenini oluşturur ve TNBC'de en çok incelenen kemokin yollarından biridir. CXCR4 çoğunlukla hücre membranında lokalize olup CXCL12 soluble halde bulunabilir ve CXCL12/CXCR4 yolağı tümör immünosupresyonu, anjiyogenezi, inflamasyonu destekler yönde çalışır (C. J. Li ve diğerleri, 2021; Mortezaee, 2020). Kemokinler tümör hücrelerini kemotaksi ile çeker (Mortezaee, 2020). BC'de CXCR4 taşıyan tümör hücreleri lenf düğümleri, kemik iliği, akciğer, karaciğer gibi CXCL12 ligandının daha bol bulunduğu organlara metastaz yapar (Özkara ve diğerleri, 2020).

Müller ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada CXCR4 reseptörü ve ligandı CXCL12'nin in vivo meme kanseri fare modelinde metastazda birlikte rol aldıklarını, CXCL12'nin meme kanseri metastazının ilk hedefleri olan akciğer ve karaciğerden daha fazla bulunduğunu göstermişlerdir.

Yaptıkları çalışmada CXCL12/CXCR4 yolunun durdurulmasıyla, meme kanserinin lokal lenf düğümlerine ve akciğer metastazını bozduğunu bildirmişlerdir (Müller ve diğerleri, 2001). Bhardwaj ve diğerlerinin (2014) yaptıkları çalışmada CXCL12/CXCR4 yolağının bir taksan grubu üyesi olan DTX kaynaklı mikrotübül stabilizasyonunda ve G2/M mitotik durdurmaya etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Prostat kanseri (PCa) hücrelerinde CXCR4 ve düşük düzeyde CXCL12 ürettiğini gözlenirken ve sağlıklı prostat epitelyal ekspresyon belirlenememiştir. PCa hücrelerine CXCR4 yolağında DTX in G2/M mitotik tutuklanmasına neden olarak CXCL12 düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir (Bhardwaj ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda MDA-MB-231 hücrelerinde Jurkat eksozomlarından geliştirilen Exo-PTX'in CXCR4 baskılanmasını sağladığı ve CXCL12 iletişimini bloke ederek hücrelerin migrasyonunu baskıladığı tespit edildi. PTX'in kanser hücrelerinde migrasyonu baskıladığı bilinmekte ancak kemoterapide zamanla direnç gelişimine neden olduğu bilinir. PTX'in eksozom ile taşınması gelecekte bu ilaç direncinin aşılmasına katkılar sunabilir. CXCR4 ve CXCL12 aracılı sinyal yolağının ve hücre migrasyon düzeylerinin azaltılmasında Jurkat eksozomlarının tek başına yeterince etki göstermemesi PTX ile fonksiyonel hale getirildiğinde etkinliğinin olması tümör mikro çevre çalışmaları açısından önemli bulgulardır.

Bu tez çalışmasında, hücre içerisinde mikrotübüllere giriş sağlayarak hücrelerin bölünme aşamasını durdurmada etkili olan TNBC hastalarının tedavisinde taksan ailesine ait kemoterapik ilaç olan Paklitakselin (PTX), jurkat hücrelerinden salınan eksozomlar içerisine yüklemesi yapılarak taşıyıcı sistem olma potansiyeli değerlendirildi. Sitotoksik kemoterapi ilaçlarının eksozomlar ile spesifikliğinin arttırılması, hedef bölgeye ulaşp, bölgede verimli ilaç salınımı yapması ile bu sitotoksisiteyi sağlıklı dokularda minimum, tümör dokularında maksimum hale getirmesi önemli bir unsurdur. Süspansiyon hücre halinde bulunan Jurkat hücrelerinin mikroakışkan sistemde eksozom izole edilmesi, bu sistemlerin daha büyük ölçekte izolasyon kapasitesine sahip araçların geliştirilmesi ve ilaçların yüklemelerinde etkin olan yöntemlerin tespit edilmesi için bu tez çalışması gelecekte yapılacak araştırmalarda ışık tutacaktır.

Bu tez çalışmasında Jurkat T hücrelerinden salgılanan eksozomların, tasarlanan mikroakışkan (MF) sistemle izole edilebilirliği, eksozomlara paklitaksel yüklemesi ile TNBC alt tipi MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkiliği tespit edilmiş olup, kanser tedavisinde kullanılabileceği bulguları elde edilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kanser tedavisinde yaygın kullanılan bir kemoterapi ajanı olan paklitakselin (PTX) Jurkat T hücrelerinden salınan eksozomlara yüklenmesiyle yeni nano taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Exo-PTX sistemiyle PTX'in eksozom aracılı hücre içine alınıp, daha düşük dozlarda meme kanserinde anti tümör etki gösterdiği, bununla beraber mikroakışkan (MF) sistemlerle eksozomların daha homojen boyutlarda toplayabildiği gösterildi. MF sistemlerinin eksozomları saflaştırma ve yükleme yeteneklerinin büyük ölçekte genişletilmesi ve klinikte kişiselleştirilmiş tedavi olarak kullanılabilmesi için bu tez çalışması literatüre katkı sağlayacaktır. Jurkat eksozomlarını nanotaşıyıcı olarak kullanmak ve tümör mikroçevre üzerinde etkilerini arttırmak konusunda bu tez çalışması eksozomları fonksiyonelleştirerek anti-kanser ajanların geliştirilmesi noktasında pre-klinik çalışmaların önemini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abas, B. I., Demirbolat, G. M. ve Cevik, O. (2022). Wharton jelly-derived mesenchymal stem cell exosomes induce apoptosis and suppress EMT signaling in cervical cancer cells as an effective drug carrier system of paclitaxel. *PLoS ONE*, 17(9). doi:10.1371/journal.pone.0274607
- Agrawal, A. K., Aqil, F., Jeyabalan, J., Spencer, W. A., Beck, J., Gachuki, B. W., ... Gupta, R. C. (2017). Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(5), 1627-1636. doi:10.1016/j.nano.2017.03.001
- American Cancer Society, (2024). *Chemotherapy for Breast Cancer*. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/types/breastcancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html> adresinden erişildi.
- American Cancer Society, (2024). *Hormone therapy for breast cancer*. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/hormone-therapy-for-breast-cancer.html> adresinden erişildi.
- American Cancer Society, (2024). *Immunotherapy for Breast Cancer*. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/immunotherapy.html> adresinden erişildi.
- American Cancer Society, (2024). *Surgery for breast cancer*. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer.html> adresinden erişildi.
- American Cancer Society, (2024). *Targeted Drug Therapy for Breast Cancer*. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/targeted-therapy-for-breast-cancer.html> adresinden erişildi.
- Andre, M., Caobi, A., Miles, J. S., Vashist, A., Ruiz, M. A. ve Raymond, A. D. (2024). Diagnostic potential of exosomal extracellular vesicles in oncology. *BMC Cancer*, 24(1). doi:10.1186/s12885-024-11819-4

- Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., ... Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast*, 66, 15-23. doi:10.1016/j.breast.2022.08.010
- Banerjee, M. ve Rajeswari, V. D. (2023). Critical Review on the Different Roles of Exosomes in TNBC and Exosomal-Mediated Delivery of microRNA/siRNA/lncRNA and Drug Targeting Signalling Pathways in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecules*, 28(4). doi:10.3390/molecules28041802
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., ... Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84. doi:10.1016/j.intimp.2020.106535
- Bhardwaj, A., Srivastava, S. K., Singh, S., Arora, S., Tyagi, N., Andrews, J., McClellan, S., Carter, J. E., ve Singh, A. P. (2014). CXCL12/CXCR4 signaling counteracts docetaxel-induced microtubule stabilization via p21-activated kinase 4-dependent activation of LIM domain kinase 1. *Oncotarget*, 5(22), 11490–11500. doi: 10.18632/oncotarget.2571
- Bhushan, A., Gonsalves, A. ve Menon, J. U. (2021). Current state of breast cancer diagnosis, treatment, and theranostics, 13(5). *Pharmaceutics*. doi:10.3390/pharmaceutics13050723
- Borges, F. T., Melo, S. A., Özdemir, B. C., Kato, N., Revuelta, I., Miller, C. A., ... Kalluri, R. (2013). TGF- β 1-Containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(3), 385-392. doi:10.1681/ASN.2012101031
- BOZKURT, S. (2018). Eksozomlar ve Kanserdeki Roller. *Dicle Tıp Dergisi*, 45(2), 209-217. doi:10.5798/dicletip.424986
- Burguin, A., Diorio, C. ve Durocher, F. (2021). Breast cancer treatments: Updates and new challenges. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8). doi:10.3390/jpm11080808
- Čermák, V., Dostál, V., Jelínek, M., Libusová, L., Kovář, J., Rösel, D. ve Brábek, J. (2020). Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *European Journal of Cell Biology*, 99(4). doi:10.1016/j.ejcb.2020.151075

- Chen, J., Zhang, G., Wan, Y., Xia, B., Ni, Q., Shan, S., ... Liang, X. J. (2023). Immune cell-derived exosomes as promising tools for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 364, 508-528. doi:10.1016/j.jconrel.2023.11.003
- Choi, H., Yim, H., Park, C., Ahn, S. H., Ahn, Y., Lee, A., ... Choi, C. (2022). Targeted Delivery of Exosomes Armed with Anti-Cancer Therapeutics. *Membranes*, 12(1). doi:10.3390/membranes12010085
- Das, K., Paul, S., Ghosh, A., Gupta, S., Mukherjee, T., Shankar, P., ... Parashar, D. (2023). Extracellular Vesicles in Triple–Negative Breast Cancer: Immune Regulation, Biomarkers, and Immunotherapeutic Potential. *Cancers*, 15(19). doi:10.3390/cancers15194879
- Dass, S. A., Tan, K. L., Rajan, R. S., Mokhtar, N. F., Adzmi, E. R. M., Rahman, W. F. W. A., ... Balakrishnan, V. (2021). Triple negative breast cancer: A review of present and future diagnostic modalities. *Medicina (Lithuania)*, 57(1). doi:10.3390/medicina57010062
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., ... Vekrellis, K. (2010). Cell-produced α -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *Journal of Neuroscience*, 30(20), 6838-6851. doi:10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010
- Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R. ve Stevens, M. M. (2015). Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *Journal of Controlled Release*, 205, 35-44. doi:10.1016/j.jconrel.2014.11.029
- Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R. A., Cánovas-Díaz, M. ve Puente, T. de D. (2020). A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules*, 25(24). doi:10.3390/MOLECULES25245986
- Giannakakou, P., Robey, R., Fojo, T., ve Blagosklonny, M. V. (2001). Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene*, 20(29), 3806–3813. doi:10.1038/sj.onc.1204487

- Giordano, C., Camera, G. La, Gelsomino, L., Barone, I., Bonofiglio, D., Andò, S. ve Catalano, S. (2020). The biology of exosomes in breast cancer progression: Dissemination, immune evasion and metastatic colonization. *Cancers*,12(8). doi:10.3390/cancers12082179
- Global Cancer Observatory [GCO], 2024. Global Cancer Observatory: Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today/home> adresinden erişildi.
- Global Cancer Observatory [GCO], 2024. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en> adresinden erişildi.
- Gorshkov, A., Purvinsh, L., Brodskaya, A. ve Vasin, A. (2022). Exosomes as Natural Nanocarriers for RNA-Based Therapy and Prophylaxis. *Nanomaterials*, 12(3). doi:10.3390/nano12030524
- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M. ve Kim, J. H. (2019). Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, 8(4). doi:10.3390/cells8040307
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L. ve Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*,19(1). doi:10.1186/s12964-021-00730-1
- Halvaei, S., Daryani, S., Eslami-S, Z., Samadi, T., Jafarbeik-Iravani, N., Bakhshayesh, T. O., ... Esmaeili, R. (2018). Exosomes in Cancer Liquid Biopsy: A Focus on Breast Cancer. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 10. doi:10.1016/j.omtn.2017.11.014
- Hamdan, F. ve Cerullo, V. (2023). Cancer immunotherapies: A hope for the incurable? *Frontiers in Molecular Medicine*, 3. doi:10.3389/fmmed.2023.1140977
- Han, Y., Jones, T. W., Dutta, S., Zhu, Y., Wang, X., Narayanan, S. P., ... Zhang, D. (2021). Overview and update on methods for cargo loading into extracellular vesicles. *Processes*, 9(2). doi:10.3390/pr9020356
- Hazrati, A., Soudi, S., Malekpour, K., Mahmoudi, M., Rahimi, A., Hashemi, S. M. ve Varma, R. S. (2022). Immune cells-derived exosomes function as a double-edged sword: role in disease progression and their therapeutic applications. *Biomarker Research*, 10(1). doi:10.1186/s40364-022-00374-4

- He, J., Ren, W., Wang, W., Han, W., Jiang, L., Zhang, D. ve Guo, M. (2022). Exosomal targeting and its potential clinical application. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(10). doi:10.1007/s13346-021-01087-1
- Jan, A. T., Rahman, S., Khan, S., Tasduq, S. A. ve Choi, I. (2019). Biology, pathophysiological role, and clinical implications of exosomes: A critical appraisal. *Cells*, 8(2). doi:10.3390/cells8020099
- Jang, J. Y., Kim, Y. S., Kang, K. N., Kim, K. H., Park, Y. J. ve Kim, C. W. (2021). Multiple microRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis. *Molecular and Clinical Oncology*, 14(2), 1-9. doi:10.3892/mco.2020.2193
- Kalluri, R. ve LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478). doi:10.1126/science.aau6977
- Kar, R., Dhar, R., Mukherjee, S., Nag, S., Gorai, S., Mukerjee, N., ... Thorat, N. D. (2023). Exosome-Based Smart Drug Delivery Tool for Cancer Theranostics. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 9(2). doi:10.1021/acsbiomaterials.2c01329
- Kaveh Zenjanab, M., Alimohammadvand, S., Doustmihan, A., Kianian, S., Sadeghzadeh Oskouei, B., Mazloomi, M., ... Jahanban-Esfahlan, R. (2024). Paclitaxel for breast cancer therapy: A review on effective drug combination modalities and nano drug delivery platforms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 95. doi:10.1016/j.jddst.2024.105567
- Kellogg, E. H., Hejab, N. M. A., Howes, S., Northcote, P., Miller, J. H., Díaz, J. F., ... Nogales, E. (2017). Insights into the Distinct Mechanisms of Action of Taxane and Non-Taxane Microtubule Stabilizers from Cryo-EM Structures. *Journal of Molecular Biology*, 429(5), 633-646. doi:10.1016/j.jmb.2017.01.001
- Khan, S. U., Khan, M. U., Gao, Y., Khan, M. I., Puswal, S. M., Zubair, M., ... Hussain, N. (2022). Unique therapeutic potentialities of exosomes based nanodrug carriers to target tumor microenvironment in cancer therapy. *OpenNano*, 8. doi:10.1016/j.onano.2022.100091
- Kia, V., Mortazavi, Y., Paryan, M., Biglari, A. ve Mohammadi-Yeganeh, S. (2019). Exosomal miRNAs from highly metastatic cells can induce metastasis in non-metastatic cells. *Life Sciences*, 220, 162-168. doi:10.1016/j.lfs.2019.01.057

- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., ... Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(3), 655-664. doi:10.1016/j.nano.2015.10.012
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Yuan, D., Deygen, I., Klyachko, N. L., ... Batrakova, E. V. (2018). Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(1), 195-204. doi:10.1016/j.nano.2017.09.011
- Kimiz-Gebologlu, I. ve Oncel, S. S. (2022). Exosomes: Large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake. *Journal of Controlled Release*, 347. doi:10.1016/j.jconrel.2022.05.027
- Klein, I. ve Lehmann, H. C. (2021). Pathomechanisms of paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Toxics*, 9(10). doi:10.3390/toxics9100229
- Koh, H. B., Kim, H. J., Kang, S. W. ve Yoo, T. H. (2023). Exosome-Based Drug Delivery: Translation from Bench to Clinic. *Pharmaceutics*, 15(8). doi:10.3390/pharmaceutics15082042
- Krylova, S. V. ve Feng, D. (2023). The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). doi:10.3390/ijms24021337
- Kuwabara, Y., Ono, K., Horie, T., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., ... Kimura, T. (2011). Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(4), 446-454. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.958975
- Lai, J. J., Chau, Z. L., Chen, S. Y., Hill, J. J., Korpany, K. V., Liang, N. W., ... Shen, W. T. (2022). Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development. *Advanced Science*, 9(15). doi:10.1002/advs.202103222
- Lenassi, M., Cagney, G., Liao, M., Vaupotič, T., Bartholomeeusen, K., Cheng, Y., ... Peterlin, B. M. (2010). HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4⁺ T cells. *Traffic*, 11(1), 110-122. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.01006.x

- Li, C. J., Tzeng, Y. D. T., Chiu, Y. H., Lin, H. Y., Hou, M. F. ve Chu, P. Y. (2021). Pathogenesis and potential therapeutic targets for triple-negative breast cancer. *Cancers*,13(12). doi:10.3390/cancers13122978
- Li, J., Zhang, Y., Dong, P. Y., Yang, G. M. ve Gurunathan, S. (2023). A comprehensive review on the composition, biogenesis, purification, and multifunctional role of exosome as delivery vehicles for cancer therapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 165. doi:10.1016/j.biopha.2023.115087
- Li, Q., Wang, H., Peng, H., Huyan, T. ve Cacalano, N. A. (2019). Exosomes: Versatile nano mediators of immune regulation. *Cancers*, 11(10). doi:10.3390/cancers11101557
- Li, X., Chen, C., Wei, L., Li, Q., Niu, X., Xu, Y., ... Zhao, J. (2016). Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Cytotherapy*, 18(2), 253-262. doi:10.1016/j.jcyt.2015.11.009
- Lim, W. ve Kim, H. S. (2019). Exosomes as Therapeutic Vehicles for Cancer. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(3). doi:10.1007/s13770-019-00190-2
- Lu, J., Wu, J., Tian, J. ve Wang, S. (2018). Role of T cell-derived exosomes in immunoregulation. *Immunologic Research*, 66(3). doi:10.1007/s12026-018-9000-0
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R. ve Stanisławek, A. (2021). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. *Cancers*,13(17). doi:10.3390/cancers13174287
- Lyu, C., Sun, H., Sun, Z., Liu, Y. ve Wang, Q. (2024). Roles of exosomes in immunotherapy for solid cancers. *Cell Death and Disease*, 15(2). doi:10.1038/s41419-024-06494-z
- Mahgoub, E. O., Razmara, E., Bitaraf, A., Norouzi, F. S., Montazeri, M., Behzadi-Andouhjerdi, R., ... Babashah, S. (2020). Advances of exosome isolation techniques in lung cancer. *Molecular Biology Reports*, 47(9). doi:10.1007/s11033-020-05715-w

- Mahmoud, R., Ordóñez-Morán, P. ve Allegrucci, C. (2022). Challenges for Triple Negative Breast Cancer Treatment: Defeating Heterogeneity and Cancer Stemness. *Cancers*, 14(17). doi:10.3390/cancers14174280
- Mandapati, A. ve Lukong, K. E. (2023). Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(7), 3701-3719. doi:10.1007/s00432-022-04189-6
- Mehraj, U., Mushtaq, U., Mir, M. A., Saleem, A., Macha, M. A., Lone, M. N., ... Wani, N. A. (2022). Chemokines in triple-negative breast cancer heterogeneity: New challenges for clinical implications. *Seminars in Cancer Biology*, 86. doi:10.1016/j.semcancer.2022.03.008
- Mehryab, F., Rabbani, S., Shahhosseini, S., Shekari, F., Fatahi, Y., Baharvand, H. ve Haeri, A. (2020). Exosomes as a next-generation drug delivery system: An update on drug loading approaches, characterization, and clinical application challenges. *Acta Biomaterialia*, 113. doi:10.1016/j.actbio.2020.06.036
- Miron, R. J., ve Zhang, Y. (2024). Understanding exosomes: Part 1-Characterization, quantification and isolation techniques. *Periodontology 2000*, 94(1), 231–256. doi:10.1111/prd.12520
- Moghassemi, S., Dadashzadeh, A., Sousa, M. J., Vlieghe, H., Yang, J., León-Félix, C. M. ve Amorim, C. A. (2024). Extracellular vesicles in nanomedicine and regenerative medicine: A review over the last decade. *Bioactive Materials*, 36. doi:10.1016/j.bioactmat.2024.02.021
- Mortezaee, K. (2020). CXCL12/CXCR4 axis in the microenvironment of solid tumors: A critical mediator of metastasis. *Life Sciences*, 249. doi:10.1016/j.lfs.2020.117534
- Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J. ve Gupta, R. C. (2016). Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Letters*, 371(1), 48-61. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.020
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., ... Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), 50-56. doi:10.1038/35065016

- Nolan, E., Lindeman, G. J. ve Visvader, J. E. (2023). Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*, 186(8). doi:10.1016/j.cell.2023.01.040
- Obeagu, E. I. ve Obeagu, G. U. (2024). Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine*, 103(3), E36905. doi:10.1097/MD.00000000000036905
- Omran, M., Beyrampour-Basmenj, H., Jahanban-Esfahlan, R., Talebi, M., Raeisi, M., Serej, Z. A., ... Ebrahimi-kalan, A. (2024). Global trend in exosome isolation and application: an update concept in management of diseases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 479(3). doi:10.1007/s11010-023-04756-6
- Ozcelik, A., Demirbolat, G. M., Erdogan, O., Kozan, B., Akkoyun, F., Cevik, E., ... Cevik, O. (2024). Lab-on-a-chip system for small extracellular vesicle isolation and drug loading for small extracellular vesicle-mediated drug delivery for treatment of cancer patients. *Emergent Materials*. doi:10.1007/s42247-024-00666-5
- Özkara, G., Öztürk, O. ve Aydoğan, H. Y. (2020). Cancer and Metastasis: Importance of Cell Adhesion Molecules and Cell Junctions. *Experimed*, 10(1). doi:10.26650/experimed.2020.0003
- Panigrahi, A. R., Srinivas, L. ve Panda, J. (2022). Exosomes: Insights and therapeutic applications in cancer. *Translational Oncology*, 21. doi:10.1016/j.tranon.2022.101439
- Pelissier Vatter, F. A., Lucotti, S. ve Zhang, H. (2020). Recent Advances in Experimental Models of Breast Cancer Exosome Secretion, Characterization and Function. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 25(4). doi:10.1007/s10911-020-09473-0
- Peng, H., Ji, W., Zhao, R., Yang, J., Lu, Z., Li, Y. ve Zhang, X. (2020). Exosome: a significant nano-scale drug delivery carrier. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(34). doi:10.1039/d0tb01499k
- Pradhan, R., Dey, A., Taliyan, R., Puri, A., Kharavtekar, S. ve Dubey, S. K. (2023). Recent Advances in Targeted Nanocarriers for the Management of Triple Negative Breast Cancer. *Pharmaceutics*, 15(1). doi:10.3390/pharmaceutics15010246
- Qiao, L., Hu, S., Huang, K., Su, T., Li, Z., Vandergriff, A., ... Cheng, K. (2020). Tumor cell-derived exosomes home to their cells of origin and can be used as Trojan horses to deliver cancer drugs. *Theranostics*, 10(8), 3474-3487. doi:10.7150/thno.39434

- Raguraman, R., Bhavsar, D., Kim, D., Ren, X., Sikavitsas, V., Munshi, A. ve Ramesh, R. (2023). Tumor-targeted exosomes for delivery of anticancer drugs. *Cancer Letters*, 558. doi:10.1016/j.canlet.2023.216093
- Rahmati, S., Shojaei, F., Shojaeian, A., Rezakhani, L. ve Dehkordi, M. B. (2020). An overview of current knowledge in biological functions and potential theragnostic applications of exosomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 226. doi:10.1016/j.chemphyslip.2019.104836
- Raju, D., Bathini, S., Badilescu, S., Ghosh, A. ve Packirisamy, M. (2022). Microfluidic Platforms for the Isolation and Detection of Exosomes: A Brief Review. *Micromachines*, 13(5). doi:10.3390/mi13050730
- Rashed, M. H., Bayraktar, E., Helal, G. K., Abd-Ellah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A. ve Rodriguez-Aguayo, C. (2017). Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3).. doi:10.3390/ijms18030538
- Rontogianni, S., Synadaki, E., Li, B., Liefwaard, M. C., Lips, E. H., Wesseling, J., ... Altelaar, M. (2019). Proteomic profiling of extracellular vesicles allows for human breast cancer subtyping. *Communications Biology*, 2(1). doi:10.1038/s42003-019-0570-8
- Roose, J. P., Diehn, M., Tomlinson, M. G., Lin, J., Alizadeh, A. A., Botstein, D., ... Weiss, A. (2003). T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biology*, 1(2). doi:10.1371/journal.pbio.0000053
- Samaan, T. M. A., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P. ve Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*, 9(12). doi:10.3390/biom9120789
- Seo, N., Shirakura, Y., Tahara, Y., Momose, F., Harada, N., Ikeda, H., ... Shiku, H. (2018). Activated CD8⁺ T cell extracellular vesicles prevent tumour progression by targeting of lesional mesenchymal cells. *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-02865-1

- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Patra, J. K., Singh, Y. D., Panda, M. K., Das, G., ... Calina, D. (2021). Paclitaxel: Application in Modern Oncology and Nanomedicine-Based Cancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2021/3687700
- Smolarz, B., Zadrożna Nowak, A. ve Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14(10). doi:10.3390/cancers14102569
- Sovunjoy, E., Halbutoğulları, Z. S., Gacar, G., Öztürk, A., Duruksu, G. ve Yazır, Y. (2023). Examining the effect of activated cytotoxic (CD8+) T-cell exosomes to the lung cancer. *Medical Oncology*, 40(12). doi:10.1007/s12032-023-02198-0
- Srivastava, A., Moxley, K., Ruskin, R., Dhanasekaran, D. N., Zhao, Y. D. ve Ramesh, R. (2018). A Non-invasive Liquid Biopsy Screening of Urine-Derived Exosomes for miRNAs as Biomarkers in Endometrial Cancer Patients. *AAPS Journal*, 20(5). doi:10.1208/s12248-018-0220-y
- Stevic, I., Müller, V., Weber, K., Fasching, P. A., Karn, T., Marmé, F., ... Schwarzenbach, H. (2018). Specific microRNA signatures in exosomes of triple-negative and HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy within the GeparSixto trial. *BMC Medicine*, 16(1). doi:10.1186/s12916-018-1163-y
- Subhan, M. A., Parveen, F., Shah, H., Yalamarty, S. S. K., Ataide, J. A. ve Torchilin, V. P. (2023). Recent Advances with Precision Medicine Treatment for Breast Cancer including Triple-Negative Sub-Type. *Cancers*, 15(8). doi:10.3390/cancers15082204
- Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X. ve Zhang, B. (2023). T cells in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). doi:10.1038/s41392-023-01471-y
- Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M. ve Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). doi:10.3390/ijms18061153
- Thomas, S. C., Kim, J. W., Pauletti, G. M., Hassett, D. J. ve Kotagiri, N. (2022). Exosomes: Biological Pharmaceutical Nanovectors for Theranostics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi:10.3389/fbioe.2021.808614

- Tian, J., Han, Z., Song, D., Peng, Y., Xiong, M., Chen, Z., ... Zhang, L. (2023). Engineered Exosome for Drug Delivery: Recent Development and Clinical Applications. *International Journal of Nanomedicine*, 18. doi:10.2147/IJN.S444582
- Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., ... Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383-2390. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.083
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., ve Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Torres Quintas, S., Canha-Borges, A., Oliveira, M. J., Sarmento, B. ve Castro, F. (2023). Special Issue: Nanotherapeutics in Women's Health Emerging Nanotechnologies for Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *Small*. doi:10.1002/smll.202300666
- Tran, T. A., Gillet, L., Roger, S., Besson, P., White, E. ve Le Guennec, J. Y. (2009). Non-anti-mitotic concentrations of taxol reduce breast cancer cell invasiveness. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 304-308. doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.073
- Umez, T., Ohyashiki, K., Kuroda, M. ve Ohyashiki, J. H. (2013). Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*, 32(22), 2747-2755. doi:10.1038/onc.2012.295
- Uscanga-Perales, G. I., Santuario-Facio, S. K. ve Ortiz-López, R. (2016). Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Medicina Universitaria*, 18(71), 105-114. doi:10.1016/j.rmu.2016.05.007
- Wang, S., ve Shi, Y. (2022). Exosomes Derived from Immune Cells: The New Role of Tumor Immune Microenvironment and Tumor Therapy. *International journal of nanomedicine*, 17, 6527–6550. doi:10.2147/IJN.S388604
- Want, M. Y., Bashir, Z. ve Najar, R. A. (2023). T Cell Based Immunotherapy for Cancer: Approaches and Strategies. *Vaccines*, 11(4). doi:10.3390/vaccines11040835

- World Health organization [WHO], (2024). Breast Cancer, World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> adresinden erişildi.
- Wu, Y., Wang, Y., Lu, Y., Luo, X., Huang, Y., Xie, T., ... Zhang, J. (2022). Microfluidic Technology for the Isolation and Analysis of Exosomes. *Micromachines*, 13(10). doi:10.3390/mi13101571
- Xi, X. M., Chen-Meng, Xia, S. J. ve Lu, R. (2021). Drug loading techniques for exosome-based drug delivery systems. *Pharmazie*, 76(2-3). doi:10.1691/ph.2021.0128
- Xin, H., Li, Y., Buller, B., Katakowski, M., Zhang, Y., Wang, X., ... Chopp, M. (2012). Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells*, 30(7), 1556-1564. doi:10.1002/stem.1129
- Yang, G., Waheed, S., Wang, C., Shekh, M., Li, Z. ve Wu, J. (2023). Exosomes and Their Bioengineering Strategies in the Cutaneous Wound Healing and Related Complications: Current Knowledge and Future Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 19(5), 1430–1454. doi:10.7150/ijbs.80430
- Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., ... Bai, S. (2015). Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio. *Pharmaceutical Research*, 32(6), 2003-2014. doi:10.1007/s11095-014-1593-y
- Ying, N., Liu, S., Zhang, M., Cheng, J., Luo, L., Jiang, J., ... Zeng, D. (2023). Nano delivery system for paclitaxel: Recent advances in cancer theranostics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 228. doi:10.1016/j.colsurfb.2023.113419
- Zagami, P. ve Carey, L. A. (2022). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *npj Breast Cancer*, 8(1). doi:10.1038/s41523-022-00468-0
- Zebrowska, A., Jelonek, K., Mondal, S., Gawin, M., Mrowiec, K., Widłak, P., ... Pietrowska, M. (2022). Proteomic and Metabolomic Profiles of T Cell-Derived Exosomes Isolated from Human Plasma. *Cells*, 11(12). doi:10.3390/cells11121965
- Zeng, H., Guo, S., Ren, X., Wu, Z., Liu, S. ve Yao, X. (2023). Current Strategies for Exosome Cargo Loading and Targeting Delivery. *Cells*, 12(10). doi:10.3390/cells12101416

- Zhang, L., Fan, C., Hao, W., Zhuang, Y., Liu, X., Zhao, Y., ... Dai, J. (2021). NSCs Migration Promoted and Drug Delivered Exosomes-Collagen Scaffold via a Bio-Specific Peptide for One-Step Spinal Cord Injury Repair. *Advanced Healthcare Materials*, 10(8). doi:10.1002/adhm.202001896
- Zhang, Y., Liu, Q., Zhang, X., Huang, H., Tang, S., Chai, Y., Xu, Z., Li, M., Chen, X., Liu, J., ve Yang, C. (2022). Recent advances in exosome-mediated nucleic acid delivery for cancer therapy. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 279. doi:10.1186/s12951-022-01472-z
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., ve Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell ve bioscience*, 9, 19. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2
- Zhao, S., Tang, Y., Wang, R., ve Najafi, M. (2022). Mechanisms of cancer cell death induction by paclitaxel: an updated review. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 27(9-10), 647–667. doi: 10.1007/s10495-022-01750-z
- Zhao, X., Wu, D., Ma, X., Wang, J., Hou, W. ve Zhang, W. (2020). Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128. doi:10.1016/j.biopha.2020.110237
- Zhou, Q., Wei, S., Wang, H., Li, Y., Fan, S., Cao, Y. ve Wang, C. (2023). T cell-derived exosomes in tumor immune modulation and immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. doi:10.3389/fimmu.2023.1130033