



T.C

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRELERİNDEN ELDE EDİLEN
EKSOZOMLARIN HÜCRE SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kevser İNCE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Gaziantep

2024



T.C

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRELERİNDEN ELDE EDİLEN
EKSOZOMLARIN HÜCRE SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kevser İNCE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Gaziantep

2024

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRELERİNDEN ELDE EDİLEN
EKSOZOMLARIN HÜCRE SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Kevser İNCE

Tez Savunma Tarihi: 07/05/2024

Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne; Bu çalışmanın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmza

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Doç. Dr. Sevgi GEZİCİ

Doç. Dr. İbrahim BOZGEYİK

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

07/05/2024

Kevser İNCE

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresince, tez konumun belirlenmesinde, çalışmamda değerli bilgi ve tecrübeleriyle tezimin her aşamasında benden desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU' ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle destek olan Anabilim Dalı hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım kıymetli hocalarım başta sayın Öğr. Gör. Dr. Demet KAHRAMAN hocam olmak üzere sayın Doç. Dr. Esra BOZGEYİK ve Doç. Dr. İbrahim BOZGEYİK hocalarıma ve sayın hocam Göğüs Cerrahi ABD Başkanı Prof. Dr. Ahmet Ferudun IŞIK' a teşekkür ederim.

Çalışmam da yer alan NK-92 hücre hattı temininde yardımcı olan İstanbul Üsküdar Üniversitesi sayın Prof. Dr. Sevim IŞIK' a teşekkür ederim.

Bu süreçte bilgi ve tecrübelerini her daim paylaşan ve manevi desteklerini hiç eksiltmeyen Pınar YUMRUTAŞ, Ebru SAĞLAM, Hülya GÜVEN, Semih GÜLER, Halil CAŞKA ve Elif GÜNEYSU' ya çok teşekkür ederim.

Birlikte çıkmış olduğumuz bu akademik yolculukta zor zamanlarımızda oldu, güldüğümüz ve eğlendiğimiz zamanlarımızda oldu. Bu zamanlarda hep yanımda olan can dostum Şahadet YEL' e sonsuz teşekkür ederim.

Atmış olduğum her adımda her daim yanımda olduklarını hissettiren sevgili annem Leyla İNCE ve sevgili babam Ertan İNCE' ye sonsuz teşekkür ederim. Yanımda olduğunu hissettiren bir tanecik kardeşim Ömer Emin İNCE' ye de teşekkür ederim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyon Başkanlığı tarafından TF.YLT.22.65 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1.Giriş ve Amaç	4
2. Genel Bilgiler.....	7
2.1. İmmün Sistem	7
2.1.1. Edinsel İmmün Sistem	8
2.1.2. Doğal İmmün Sistem	8
2.2. NK Hücreleri.....	9
2.3. NK Hücre Gelişimi	9
2.4. İnsan NK Hücre Alt kümeleri	10
2.5. NK Hücrelerinin İnhibisyon, Aktivasyon Reseptörleri ve Görevleri	11
2.6. NK Hücrelerinin Fonksiyonu.....	12
2.7. NK Hücre Sitotoksitesi	12
2.8. NK-92 Hücre Hattı.....	14
2.9. NK Hücre Sitotoksite Belirlenmesinde Kullanılan Metotlar	14
2.9.1. Krom Salınım Metodu (Chromium (⁵¹ Cr) Release Assay: CRA)	14
2.9.2. CD107a Ekspresyonuna Bağlı Sitotoksite Testi	15
2.9.3. K562 Lizizinden Kaynaklı Sitotoksite Testi	15
2.10. Ekstraselüler Veziküller.....	16
2.10.1. Apoptotik Cisimler	17
2.10.2 Mikroveziküler Cisimcikler	18
2.11. Eksozomlar	18
2.12. Eksozomların Biyogenezi ve Moleküler Kompozisyonu	19

2.13. Eksozomların Hücre İçine Alınması.....	20
2.14. Eksozomların Membran Bileşimi ve İçeriği	21
2.14.1. Eksozomların Lipit İçeriği	22
2.14.2. Eksozomların Protein İçeriği	23
2.14.3. Eksozomların Nükleik Asit İçeriği	25
2.15. Eksozomların Fonksiyonları	26
2.16. Eksozomlar ve Kanser	27
2.17. Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu	28
2.17.1. Diferansiyel Ultra Santrifüjleme	28
2.17.2. Polimer Bazlı Eksozom İzolasyonu	28
2.17.3. Ultrafiltrasyon	29
2.17.4. İmmünolojik Ayırma	30
2.17.5. Mikroakışkan Tabanlı İzolasyon Teknikleri	31
2.17.6. Jel Filtrasyon Kromatografisi	32
2.18. Akciğer Kanseri	34
2.18.1. Epidemiyoloji.....	34
2.18.2. Histolojik Sınıflandırma	35
3.GEREÇ ve YÖNTEM	36
3.1. Kullanılan Malzemeler	36
3.2. Kullanılan Cihazlar	36
3.3. Hücre Kültürü	37
3.3.1. NK-92 Hücre Büyütülmesi ve Çoğaltılması	37
3.3.2. NK-92 Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması	37
3.4. NK-92 Hücre Hattının Akış Sitometride Analizi	38
3.5. NK-92 Hattı Kültürü Besiyerinden Eksozomların İzolasyonu	38
3.6. Eksozomların Karakterizasyon ve Boyutlarının Tespiti	39
3.6.1 Eksozomların Nanodrop Spektrofotometre ile Tanımlanması	39
3.6.2. Zeta Potansiyel Ölçümleri ve Partikül Büyüklüğü	39
3.7. K562 Hücre Hattı Kültürü	39
3.8. Akciğer Hücre Hatlarının Kültürü	40
3.9. Hücre Sayımı	41
3.10. Hücrelere Eksozom Uygulanması	42
3.11. Sitotoksikite Testi.....	42

4.BULGULAR.....	44
4.1. NK-92 Hücre Hattının Akış Sitometri Analizi	44
4.2. Eksozomların Boyut ve Karakterizasyonlarının Belirlenmesi.....	44
4.2.1. Eksozomların Nanodrop Spektrofotometre ile Tanımlanması	44
4.2.2. Zeta Potansiyel Ölçümü ve Partikül Büyüklüğü.....	45
4.3. Hücre Canlılığı Analizleri.....	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	50
6. KAYNAKLAR	56
7. ÖZGEÇMİŞ	66



KISALTMALAR ve SİMGELER

°C:	Santigrat derece
%:	Yüzde
A549:	Akciğer kanseri hücre hattı
ADCC:	Antikora bağımlı hücresel sitotoksite
APC:	Antijen sunan hücre
ApoBD:	Apoptotik cisim
Beas-2B:	Sağlıklı akciğer hücre hattı
DC:	Dentritik hücre
DDP:	Sitagliptinin plazma inhibitörü
DNA:	Deoksiriboz nükleik asit
HTB-54:	Akciğer kanseri hücre hattı (Calu-1)
EV:	Extra celüler (hücre dışı) vezikül
ESCRT:	Endozomal sınıflandırma kompleksleri
FBS:	Fetal Bovine Serum, Fetal Sığır Serum
Fc:	Fragment crystallizable region
GM-CSF:	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GTPaz:	Guanozin trifosfataz
IFN-γ:	İnterferon gamma
Ig G:	İmmonoglobülin g
IL-2:	İnterlökin-2
ILV:	İntra luminal (lümen içi) vezikül
IS:	İmmünolojik Sinaps
ITAMs:	İmmünoreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi
K562:	Lösemik hücre soyu
KIR:	Killer-cell immunoglobulin-like receptor (Öldürücü hücre immünglobulin benzeri reseptör)
LNCRNA:	Uzun kodlanmayan RNA
LPC:	Fosfatidilkolin
MHC:	Büyük histo-uyumluluk kompleksi
ML:	Mililitre
mm ³ :	minimetre küp

μL :	Mikrolitre
miRNA :	mikroRNA
mRNA :	Mesajcı RNA
MV :	Mikrovezikül
MVB :	Multivesiküler cisimler
NK :	Natural Killer, Doğal Öldürücü
NKD:	Doğal öldürücü hücre hastalığı
NK-EXO:	Natural killer hücrelerden izole edilen eksozomlar
NKG2A:	Killer cell lectin like receptor-2A
NKG2D:	Killer cell lectin like receptor-2D
NKp30:	Natural cytotoxicity receptor30 (Doğal sitotoksikite reseptörü30)
NKp44:	Natural cytotoxicity receptor44 (Doğal sitotoksikite reseptörü44)
NKp46:	Natural cytotoxicity receptor46 (Doğal sitotoksikite reseptörü46)
Nm:	Nanometre
PKMH:	Periferik kan mononükleer hücreleri
PS:	Fosfatidilserin
RNA :	Ribonükleik asit
Rpm:	Rounds per minute
SF:	Fetal sığır serumsuz besiyer
SM:	Sfingomiyelin
TCR:	T cell receptor (T hücre reseptörü)
TEM:	Transmisyon elektron mikroskobu
TNF:	Tümör nekrozis faktör
TRAIL:	TNF aracılı apoptoz indükleyen ligand
α :	Alfa
γ :	Gama
Wst-1:	(2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)- 2H tetrazolyum

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Akış sitometrisinde, CD56 ^{bright} ve CD56 ^{dim} NK hücrelerin analizi	10
Şekil 2.2. NK hücre aktive edici ve inhibitör reseptörleri	12
Şekil 2.3. Ekstraselüler veziküller; eksozom, mikrovezikül ve apoptotik cisimler	17
Şekil 2.4. Eksozom biyogenez şeması	20
Şekil 2.5. Eksozomların hedef hücre içine alınımı	21
Şekil 2.6. Eksozom içeriği	22
Şekil 2.7. Diferansiyel ultra santrifüj ile eksozom izolasyon şeması	28
Şekil 2.8. Polimer bazlı eksozom izolasyonu Şeması	29
Şekil 2.9. Ultrafiltrasyon bazlı eksozom izolasyon şeması	30
Şekil 2.10. İmmünoafinite bazlı eksozom izolasyonunun şeması	31
Şekil 2.11. Jel Filtrasyon Kromatografisi bazlı eksozom izolasyonu şeması	32
Şekil 4. 1. NK-92 hücresinin akış sitometri analizleri	44
Şekil 4. 2. Eksozomların boyut büyüklükleri grafiği	45
Şekil 4. 3. K562 hücre hattında eksozomun 48 saatlik hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır	46
Şekil 4. 4. A549 hücre hattında eksozomun 48 saatlik hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır.	47
Şekil 4. 5. HTB54 hücre hattında eksozomun 48 saatlik hücre proliferasyonu üzerine etkileri Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır.	48
Şekil 4. 6. Beas2B hücre hattında eksozomun 48 saatlik hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır.	49

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1. NK-92 hücreleri mikroskop görüntüsü (x100)	37
Resim 3.2. Ultra santrifüj cihazı ve tüp içerisinde yer alan eksozom.....	39
Resim 3.3. K562 hücre hattının mikroskop görüntüleri (x100).....	40
Resim 3.4. A) A549, B) HTB54 ve C) Beas-2B akciğer hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (x100).....	40
Resim 3.5. Thoma lamına hücre sayımı için hazırlanması	41
Resim 3.6. A) A549- eksozom B) HTB54- eksozom C) Beas2B- eksozom WST-1 süspanse boyası sonrası görüntüsü	43

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Doğal ve Edinsel immün sistem	7
Tablo 2.2. Eksozom izolasyon tekniklerinin çalışma prensibi, avantaj ve dezavantajı..	33
Tablo 2.3. Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması	35
Tablo 3.1. Kullanılan malzemeler.....	36
Tablo 3.2. Kullanılan Cihazlar.....	36



ÖZET

DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRELERİNDEN ELDE EDİLEN EKSOZOMLARIN HÜCRE SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kevser İNCE

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Mayıs 2024, 65 sayfa

Bağışıklık sistemi, vücudu yabancı ve zararlı mikroorganizma ve maddelerden koruyarak hastalıklara karşı bir savunma mekanizması oluşturan karmaşık bir sistemdir. Bağışıklık sistemi kazanılmış ve doğal olarak iki ana gruba ayrılır. Doğal öldürücü (NK) doğal bağışıklık sistemin en önemli ve etkili hücrelerindendir. NK hücreleri, uyarıldıkları anda sitokin salgırlar ve oldukça hızlı cevap verebilme yeteneğine sahiptirler. NK hücreleri hem lenfoid organlarda hem de kemik iliği, akciğer ve bağırsak gibi lenfoid olmayan periferik dokularda bulunur. NK-92 hücre hattı iyi karakterize edilmiş standardize bir NK hücre hattıdır ve hücre bazlı immünoterapi de ideal bir kaynaktır. Eksozomlar, çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullara yanıt olarak hücreler tarafından salınan küçük veziküllerdir. Kanserde eksozomlar, antitümör aktivitesini uyarabilir. Böylece tümörü durdurabilir ya da yavaşlatabilir. NK hücresinden elde edilen eksozomlar tarafından, hedef hücelere iletilen proteinler ve nükleik asitler, biyolojik tepkilerini etkili bir şekilde değiştirebilir. Eksozomların bu özelliğiyle NK hücreleri, kanser hücrelerine karşı göstermiş olduğu sitotoksosite yeteneğinin dahada etkili hale gelmesini sağlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda, kanserli ve sağlıklı hücre gruplarına eksozom vererek hücreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda NK-92 hücre hattı kullanıldı ve uygun koşullarda kültür edildi. Kültür edilen hücrelerden eksozomlar izole edildi ve karakterize edilerek doğrulandı. Akciğer hücre hatlarından; A549, HTB54 kanser ve sağlıklı Beas-2B hücre hatları kültürü yapıldı. İzole edilen NK eksozomları farklı dozlarda, akciğer hücrelerine uygulandı ve WST-1 yöntemi ile hücre canlılığı analiz edildi. Elde edilen verilere göre, K562 kontrol hücre hattı ile yapılan deneylerde NK eksozomlarının doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Buna ek olarak, K562 hücre hattı ile belirlenen konsantrasyonlarda NK eksozomları; HTB-54, Beas2B hücre hatlarında %30 oranlarında hücre canlılıklarının azalttığı, ancak A549 hücre hattında ise hücre canlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, verilerimiz NK eksozomlarının akciğer kanserine karşı yenilikçi bir terapötik yaklaşım olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: A549, Beas-2B, Doğal öldürücü hücreler (NK), Eksozom, HTB54

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF EXOSOMES FROM NATURAL KILLER (NK) CELLS ON CELL CYTOTOXICITY

Kevser İNCE

Master Thesis, Department of Medical Biology

Thesis Advisor: Assoc. Dr. Serdar ÖZTUZCU

May 2024, 65 pages

The immune system is a complex system that forms a defense mechanism against disease by protecting the body from foreign and harmful microorganisms and substances. The immune system is divided into two main groups: acquired and natural. Natural killer (NK) cells are among the most important and effective cells of the innate immune system. NK cells release cytokines upon stimulation and have the ability to respond very rapidly. NK cells are found in both lymphoid organs and non-lymphoid peripheral tissues such as bone marrow, lung and intestine. The NK-92 cell line is a well-characterized, standardized NK cell line and an ideal source for cell-based immunotherapy. Exosomes are small vesicles released by cells in response to various physiological and pathological conditions. In cancer, exosomes can stimulate antitumor activity. This can stop or slow down the tumor. Proteins and nucleic acids delivered to target cells by NK cell-derived exosomes can effectively alter their biological response. This feature of exosomes makes NKs an even more important factor in their cytotoxicity against cancer cells. For this purpose, exosomes were administered to cancerous and healthy cell groups and their effects on cells were investigated. NK-92 cell line was used in our study and cultured under appropriate conditions. Exosomes were isolated from cultured cells and characterized and validated. Lung cell lines; A549, HTB54 cancer and healthy Beas-2B cell lines were cultured. Isolated NK exosomes were applied to lung cells at different dosages and cell viability was analyzed by WST-1 method. According to the data obtained, NK exosomes decreased cell viability in a dose-dependent manner in experiments with K562 control cell line. In addition, NK exosomes at concentrations determined with K562 cell line decreased cell viability by 30% in HTB-54, Beas2B cell lines, but increased cell viability in A549 cell line. In conclusion, our data showed that NK exosomes could be an innovative therapeutic approach against lung cancer.

Key Words: A549, Beas-2B, Exosome, HTB54, Natural killer cells (NK)

1.Giriş ve Amaç

Doğal öldürücü olarak tanımlanan hücreler, virüslerin neden olabileceği hastalıklara ve tümör hücrelerine karşı konak hücreyi saldırılara karşı koymasında rol oynayan hücrelerdir. NK (Natural Killer, Doğal Öldürücü) hücreleri, mikroorganizmalarla önceden karşılaşma ihtiyacı duymadan cevap oluşturabilme yeteneğe sahip olduğundan doğal immün sistem hücreleri arasında yer almaktadır (1). İlk zamanlarda NK'lar, doğuştan gelen lenfositler gibi düşünülmüştür. Ancak ilerleyen araştırmalar sonucunda NK hücrelerinin mikroorganizmalarla ilk karşılaşmasından sonra diğer her karşılaşmasında yabancı zararlı hücreleri tanıdığı ve işlevsel olarak tepki verdiği gözlemlenmiştir. Bu da NK hücrelerinin de hafızası olduğunu göstermektedir. Ayrıca, NK hücrelerinin aktivitelerini düzenleyen birçok hücre yüzeyi aktive edici ve inhibe edici reseptörler içermektedir (2).

İnsan NK hücreleri akciğerler, rahim, lenf düğümü ve deri gibi bazı dokulardan özellikle de yaygın olarak tercih edilen periferik kandan izole edilebilir. NK hücreleri, $CD3^- CD16^+ CD56^+$ olarak tanımlanmaktadır. Çalışmaların çoğu periferik kandaki NK hücre alt grupları ile yapılmıştır ve bu alt gruplar $CD56^{bright}$ ve $CD56^{dim}$ alt kümeleridir (3). $CD56^{dim}$ doğal sitotoksitede görevlidir. $CD56^{bright}$ alt kümesi de sitokin üretimi yapabilme yeteneğine sahiptir. Aktive edici koşullar altında, her iki alt grup da birbirlerinin yerine geçerek atfedilen işlevleri hızla uyarılabilir (4). Sitotoksitede yeteneklerinin olduğu bilinmesinin hemen sonrasında ifade ettikleri $CD16$ 'ya göre alt grupları belirlenmiştir. Böylece hücreler $CD56$ ve $CD16$ ekspresyonları ile belirlenen farklı tip alt grupları içerdiği bilinmektedir (5).

Eksozomlar; hücreler arası iletişimde, sinyal iletiminde, immünolojik yanıtın düzenlenmesinde ve genetik materyal transferinde etkin rol almaktadır. Eksozomlar ortalama 30-100 nm boyutlara sahiptir. Eksozomlar diğer EV'lerden, kendilerine özgü biyogenez yollarının olması, lipid kompozisyonları ve hücreler arası taşıdıkları kargo içeriklerinin farklı olmasından kaynaklı olarak önemli farklılıklar içerir (6). Eksozom, çift katmanlı bir lipid zardan meydana gelir ve hücresel organelleri yoktur. Eksozomların içeriğinde salındıkları hücrelerin proteinleri, DNA ve RNA'ları da bulunur. Ayrıca kendine özgü $CD9$, $CD63$, $CD81$ ve $CD82$ proteinleri ile karakterize edilir (7).

Eksozomlar; kan, tükürük, plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı, amniyotik sıvı ve anne sütü vb. vücut sıvılarından elde edilebilir. Ökaryotik hücrelerde bulunan eksozomlar, yaşam süreçleri boyunca periyodik bir şekilde küçük miktarlarda hücre içi sıvıyı içerisine alarak endozom olarak bilinen küçük yapıları oluştururlar (8). Erken endozom olgunlaşarak geç endozoma dönüşümünü gerçekleştirir ve endozom lümeni içinde intraluminal veziküllerin (ILV) oluşumu ile karakterize edilir. İçeriye doğru katlanarak tomurcuk oluştururken hücrenin içeriğinde bulunan nükleik asitleri ve proteinleri de içerisine alarak multiveziküler cisimcikleri (MVB) oluştururlar ve hücrenin membranı ile kaynaşarak hücrenin dışına salınırlar (9).

Eksozomlar hücre dışına salındıktan sonra hedef hücreler tarafından içeri alınabilmeleri için dört farklı yol izlerler. Ligand-reseptör ilişkisi; eksozomun üzerinde bulunan ligandlar ile hedef hücre yüzeyindeki reseptörler aracılığıyla hedef hücreye alınmasıdır. Füzyon; eksozom membranı ile hedef hücrenin membranı doğrudan kaynaşarak eksozom içeriğinin hücrenin sitoplazmasına alınmasıdır (10). Fagositöz: eksozom hedef hücre zarında meydana gelen yalancı ayaklar ile çevrelenip hücre içerisine alınmasıdır. Endositöz: hücre zarından geçemeyecek kadar büyük eksozomlarda, hedef hücrenin membranı içeriye doğru kıvrılarak bir cep oluşturmasıyla eksozomu hücre içerisine alınmasıdır (11).

Eksozomlar, DNA, RNA ve uzun kodlanmayan RNA (lnc RNA) gibi nükleik asitler, tetraspanin, antijen sunan moleküller ve adezyon molekülleri gibi proteinleri ve çift katmanlı lipid tabakasında ise kolesterol, seramid ve sfingomiyelin gibi lipid molekülleri içermektedir. Eksozom içeriği köken aldığı hücreye göre değişiklik göstermektedir (12). Kanserde, eksozomlar büyük ölçüde tümör progresyonunun destekleyicileri olarak tanımlanmıştır; eksozomların ayrıca antitümör fonksiyonlara sahip olduğu ve hastalığın ilerlemesini sınırlamak için hareket ettiği de düşünülmektedir. Eksozomlar ve özellikle içerikleri, kanseri saptamak ve tümör ilerlemesi ve metastazının potansiyel düzenleyicileri hakkında bilgi sağlamak için potansiyel bir bilgi kaynağı olarak ortaya çıkarılmıştır (13).

Bu çalışmada, NK-92 hücrelerini 24-72 saat aralığında serumsuz besiyer ile inkübe edilerek ultra santrifüjleme yöntemi ile eksozomları izole edilmiştir. Eksozomların, akış sitometri, nanodrop spektrofotometre ve zeta potansiyel ölçümleriyle boyut ve karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Analizleri yapılan eksozomları, K562 kronik

miyeloid lösemi hücre hattı, kanserli HTB-54, A-549 ve sağlıklı Beas-2B akciğer hücre hatlarına verildikten sonra 48 saat inkübasyona bırakıldı ve WST-1 yöntemi ile sitotoksosite testi uygulandı. Böylece NK hücresinden elde edilen eksozomlar tarafından, hedef hücrelere iletilen proteinler ve nükleik asitler, biyolojik tepkilerini etkili bir şekilde değiştirebilme yeteneğinin olduğu bilinmektedir. Eksozomların bu özelliğiyle birlikte NK hücrelerinin, kanserli hücre hatlarına karşı göstermiş olduğu sitotoksosite yeteneğini arttırmasını hedefledik. Yaptığımız çalışmanın, akciğer kanserine yönelik yapılan tedaviler arasında yan etkisinin daha az görülebileceğini ve tedaviye yönelik etkin rol oynayabileceğini ümit etmekteyiz. Ayrıca yaptığımız çalışmanın moleküler tabanlı akciğer kanser çalışmalarında referans oluşturabileceğini düşünmekteyiz.



2. Genel Bilgiler

2.1. İmmün Sistem

İmmünite: patojen olarak tanımlanan mikroorganizmalara yönelik göstermiş olduğu bir direnç olarak tanımlanmaktadır. İmmün sistem ise; mikroorganizmalara karşı savunma yapan molekül, hücre ve dokuların tamamına denilmektedir. Bağışıklık hücreleri yabancı olarak algıladığı maddelerin girişine karşı toplu ve koordineli olarak verdikleri tepkilere bağışıklık tepkisi denilmektedir (14). İmmün sistemin en önemli görevi, konak hücreye zarar verme eğilimi yüksek olan yabancı mikroorganizmalara karşı fiziksel veya kimyasal saldırılara tepkisel yaklaşarak konağı koruma altına alarak ve organizmanın normal olarak yaşamını sürdürebilmesini desteklemektedir. İmmün sistem organizma da bazı zamanlarda yabancı organizmayı tanımlayıp immün yanıt oluştururken, bazı zamanlarda ise kendi hücreleri olarak tanımlayıp yanıt vermez ve cevapsız kalıp koruduğu bilinmektedir. İmmün sistem iki gruba ayrılır: doğal immün sistem ve edinsel immün sitem (Tablo 1) (15).

Tablo 1.1. Doğal immünite ve Edinsel immünite

İMMÜN SİSTEM	
Doğal İmmün Hücreleri	Edinsel İmmün Hücreleri
⇒ Nötrofil	⇒ Hücresel
⇒ Bazofil	T lenfosit
⇒ Eozinofil	* Sitotoksit T hücresi
⇒ Mast hücre	* Yardımcı T hücresi
⇒ Dendritik hücre	* Regülatör T hücresi
⇒ NK hücre	⇒ Humoral
⇒ Makrofaj	B hücresi

2.1.1. Edinsel İmmün Sistem

Mikroorganizmaların saldırısına tepki olarak verilen immün cevap, doğal immün sistem ve edinsel immün sistem olarak sıralı bir şekilde tepki vermektedir. Doğal immün sistemin verdiği yanıt edinsel sistemin verdiği yanıtla göre daha hızlı ve kısa sürelidir. Edinsel immün sistem özgül ve uzun süreli bellek olarak oldukça önemli görevleri bulunmaktadır. Özgüllük, her antijene özgün oluşturulan ve bunun sonucunda immün yanıtın da birbirinden farklı olmasına dayalı olarak tanımlanmaktadır. Oluşturulan bu yanıtın kaynağında ise lenfositlerin özgün olması yer almaktadır (16). Bellek, antijen ile ilk karşılaştıktan sonraki her karşılaşmasında artar ve daha etkili yanıtı oluşturmaktadır. İmmün cevap; lenfositlere ait olan antijen reseptörü ile ilişkili antijeni tanınmasıyla beraber başlatılır. İmmün sistem hücreleri humoral ve hücreli olmak üzere iki ana grup altında yer alır. Humoral yani B lenfositleri tarafından üretimi gerçekleştirilen antikorlarla birlikte hücre dışında bulunan mikroorganizmalara tepkisel olarak oluşturulan yanıtıdır. Hücreli immün sistem hücresi ise, T lenfositleri kapsar. Onlarda üç alt grupta incelenir. Yardımcı ($CD4^+$) T lenfositleri, sitotoksik ($CD8^+$) T lenfositleri ve regülatör T lenfositleri olarak tanımlanır (17).

2.1.2. Doğal İmmün Sistem

Ökaryotik canlılarda, mikroorganizmaların sebep oluşturduğu enfeksiyonlara tepki olarak kendini koruma altına alır ve bu nedenle de kendi içinde doğan bir savunma mekanizmasını oluşturur (18). Oluşturduğu savunma mekanizması, mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonu tanır ve onları işlevsiz hale getirmek adına mikroorganizmanın kendisinde var olan yanıtın oluşturulması doğal immün sistem olarak adlandırılmaktadır. Doğal immün sistem enfeksiyonlara tepki olarak savunma yapan öncül hücreleri oluşturur ve mikroorganizmaların ilerlemesini durdurarak konak dokuya alımının önüne geçer ve konağa alınan mikroorganizmaları ise ortadan kaldırır (19). Ek olarak, edinsel immün sisteme göre doğal immün sistem de hafıza yoktur ve mikroorganizmayla karşılaştığı anda hızlı bir şekilde yanıt oluşturur ve edinsel immün yanıtla destek verir. Doğal immün sistemde hafıza olmadığı için mikroorganizma ile her karşılaştığında her zaman ilk karşılaştığı tepkiyi verir. Doğal immün sistem, enfeksiyon oluşturmaz fakat kendisine de ait olmadığını düşündüğü ajanlara tepki olarak herhangi bir karşılık oluşturmazlar. Nötrofiller, makrofajlar,

bazofiller, eozinofiller, mast hücreleri, dendritik hücreler ve NK doğal immün sistem elemanlarıdır (20).

2.2. NK Hücreleri

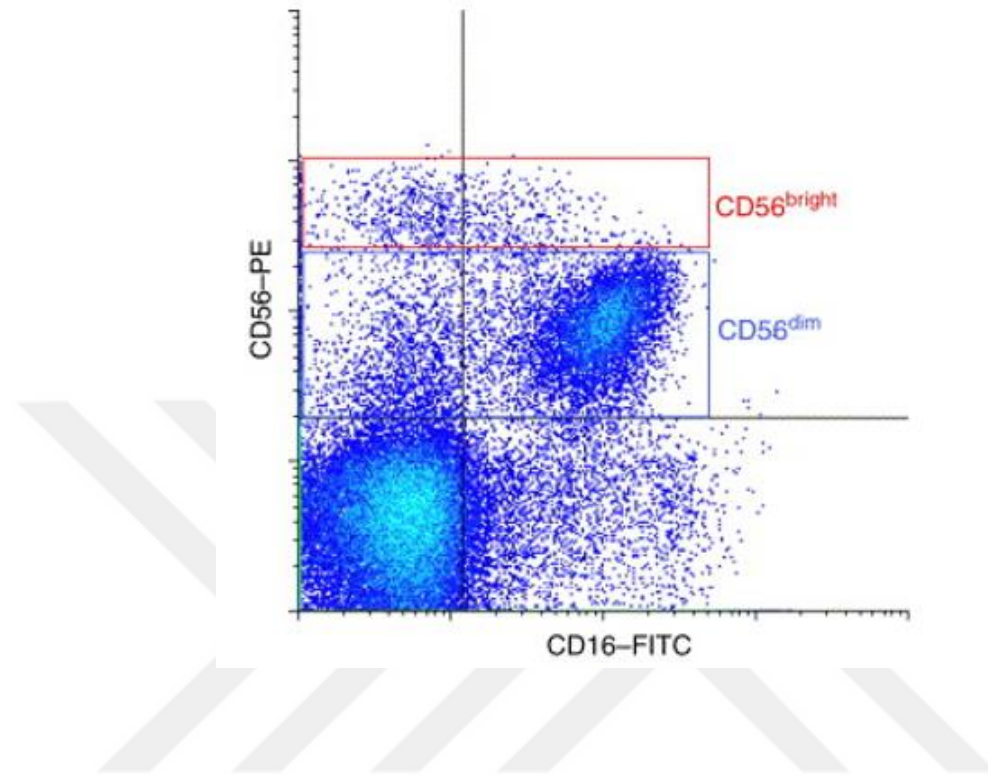
Doğal öldürücü hücreler, virüslerin neden olabileceği hastalıklara ve tümör hücrelerine tepkisel olarak, konak hücreyi saldırılara karşı koymasında rol oynayan hücrelerdir. NK hücreleri, mikroorganizmalarla önceden karşılaşma ihtiyacı duymadan cevap oluşturabileceği için doğal immün hücreleri arasında yer almaktadır (21). İlk zamanlarda NK'lar, doğuştan gelen lenfositler gibi düşünülmüştür. Ancak ilerleyen araştırmalar sonucunda NK hücrelerinin mikroorganizmalarla ilk karşılaşmasından sonra diğer her karşılaşmasında yabancı zararlı hücreleri tanıdığı ve işlevsel olarak tepki verdiği gözlemlenmiştir (22). Bu da NK hücrelerinin de hafızası olduğunu göstermektedir. Ayrıca, NK hücrelerinin aktivitelerini düzenleyen birçok hücre yüzeyi aktive edici ve inhibe edici reseptörler içermektedir (23).

2.3. NK Hücre Gelişimi

Doğal öldürücü (NK) hücreleri; timustan bağımsız olarak gelişen, kemik iliğinden üretilen büyük granüle sahip lenfositleri oluşturmaktadır ve CD3⁻ CD56⁺ 16⁺ özellikleri gösteren fenotipe sahiptirler (2). NK hücreleri periferik kan, dalak ve amniyotik sıvılarda yoğun bir şekilde bulunurlar. NK hücreleri, enfeksiyona maruz kalmış hücreler ile ilk karşılaşmada herhangi bir uyarı olmadan tanıma ve ortadan kaldırma yeteneği göstermeleri, MHC sınıflarının olmaması T ve B hücrelerinden ayrılmasını sağlamaktadır (24).

NK hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD2 molekülü ve Ig G'nin Fc parçasına düşük afinite sergileyen FcRIII (CD16) NK hücrelerinin tanınması için oldukça gereklidir. NK hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir diğer molekül ise nöral adezyon molekülü-1 (CD56) 'dür (25). NK hücreleri CD56 yüzey moleküllerinin sahip olduğu işlevlerinin yoğunluğa göre "CD56^{bright} CD16^{dim} ve CD56^{dim} CD16^{bright}" iki ana grubu oluşturmaktadır. CD56^{dim} CD16^{bright} periferik kan NK hücrelerinin yaklaşık olarak %90'ını oluşturur. Yüksek miktarlarda Fc-γ reseptör CD16 ve perforin eksprese etmektedirler (26). NK hücreleri CD56^{dim} CD16^{bright} oldukça düşük miktarlarda sitokin üretirler ve hedef hücreleri ortadan kaldırır. NK hücreleri olan CD56^{bright} CD16^{dim}, ikincil lenfoid organlar üzerinde yerleşik olarak bulunurlar ve TNF, GM-CSF ve IFN-γ, bulunduran

çok sayıda sitokin üretmektedir. NK hücreleri $CD56^{bright}$ $CD16^{dim}$ zaman alan aktivasyon sonucunda sitotoksikite yeteneği göstermektedir (Şekil 2.1) (27).



Şekil 1.1. Akış sitometrisinde, $CD56^{bright}$ ve $CD56^{dim}$ NK hücrelerin analizi. $CD56^{bright}$ NK hücreleri, insan NK hücrelerinin tamamının yaklaşık olarak %10'unu oluşturur ve $CD56^{dim}$ ise insan NK hücrelerinin tamamının yaklaşık olarak %90'ını oluşturur. Yoğun olarak $CD16^{bright}$ ifadesine sahiptir (27).

2.4. İnsan NK Hücre Altkümeleri

İnsan NK hücreleri akciğerler, rahim, lenf düğümü ve deri gibi bazı dokulardan özellikle de yaygın olarak tercih edilen periferik kandan izole edilebilir. NK hücreleri, $CD3^{-} CD16^{+} CD56^{+}$ olarak tanımlanmaktadır (28). Çalışmaların çoğu periferik kandaki NK hücre alt grupları ile yapılmıştır ve bu alt gruplar $CD56^{bright}$ ve $CD56^{dim}$ alt kümeleridir. $CD56^{dim}$ alt kümesi daha baskındır ve bu alt gruplar sağlıklı bireylerden alınan periferik kan NK hücrelerinin yaklaşık olarak %90'ını oluşturur (29).

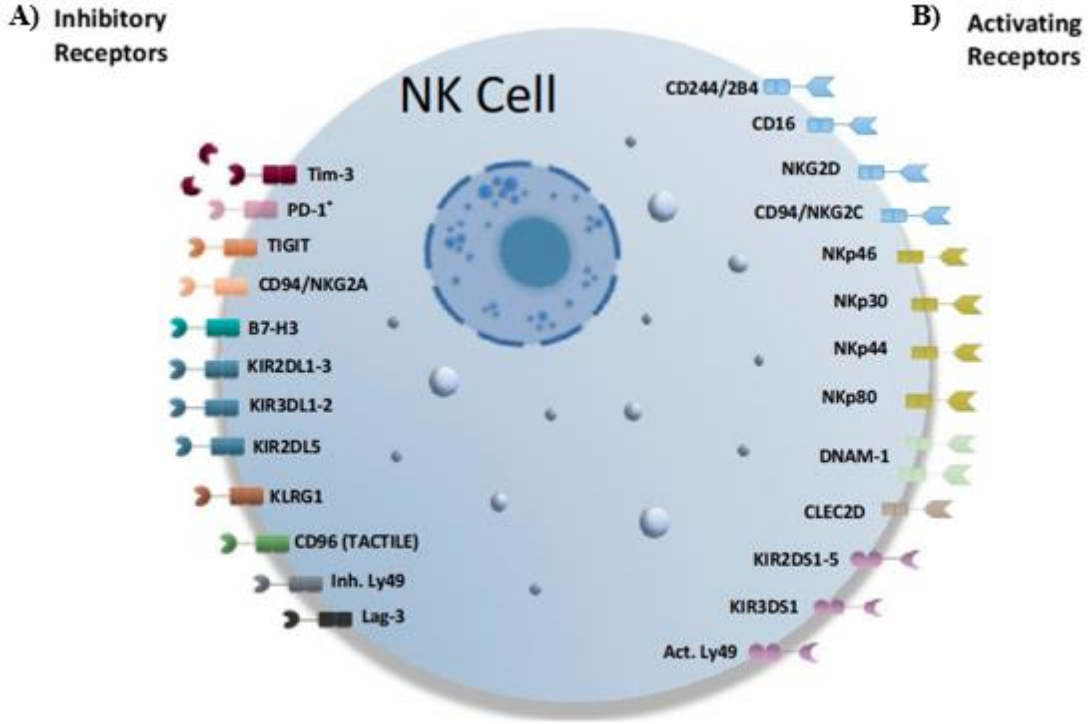
$CD56^{dim}$ NK hücreleri, başlangıçta NK hücrelerinin sıklıkla görülen lizis mekanizması olan litik granül bileşenleri ve belirli aktive edici reseptörleri eksprese edebildikleri için çoğunlukla en sitotoksik alt grup olarak bilinmektedir. Ayrıca $CD56^{dim}$ doğal sitotoksikite görevlidir. Aktive edici koşullar altında, her iki alt grup da birbirlerinin yerine geçerek atfedilen işlevleri hızla uyarılabilir (30).

Sitotoksosite yeteneklerin olduğu bilinmesinin hemen sonrasında eksprese ettikleri CD16'ya göre de alt grupları belirlenmiştir. Dolayısıyla hücreler CD56 ve CD16 ekspresyonları ile belirlenen farklı tip alt grupları içerdiği bilinmektedir (31).

2.5. NK Hücrelerinin İnhibisyon, Aktivasyon Reseptörleri ve Görevleri

NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D ve KIR (immünoglobulin benzeri reseptörler) grubunu oluşturan reseptörler NK hücre aktivasyon reseptörleridir ve sitotoksositeyi uyarma yeteneğine sahiptir. Ayrıca sitokin üretimini sağlamaktadır. Resept rlerden birkaçı transmembran sinyal molekülleriyle birlikte geri dönüşümlü olarak bulunur ve protein tirozin kinaz bağlı sinyal yolağını aktif hale getirir (32). Bu moleküller sitoplazmik kısımlarında tirozin ve lizince yoğun serilerden meydana gelen imm noresept r tirozin bağımlı aktivasyon motifleri olarak adlandırılan ITAMs bulundurulur. Bu motifler aktivasyon ve inhibisyon için destek g revindedirler. NK hücrelerinin aktivasyonu ITAMs motifleriyle etkileşim içerisinde olamayan farklı türlerdeki hücre yüzey reseptörleri de bulunmaktadır. Bu grubu integrin ve sitokin reseptörleri haricinde DAP10 transmembran adaptör molekülüyle etkileşimi olan NKG2D'yi bulundurmaktadır (33).

NK hücreleri yüzeylerinde aktivasyon reseptörleri haricinde inhibitör reseptörleri de eksprese etmektedir. İnhibisyon reseptörleri ise, CD96, Ly49, TIGIT, CD94/NKG2A ve NKRP1A'yı bulundurulur. Genelde bu reseptörler kendisine ait olanı tanır ve negatif yönde sinyaller oluşturur. Bu şekilde aktivasyonunu engellemektedirler. İnhibitör reseptörler KIR grubunu oluşturan inhibitör KIR olarak adlandırılmışlardır (34). İnhibitör KIR reseptörlerin sitoplazmik u  kısımlarında imm noresept r tirozin bağlı inhibitör motiflerinin (ITIM) bulundurulmasıyla ayırt edici özellik taşmaktadırlar (şekil 2.2.). Ayrıca, bu reseptörlerin ligandları MHC sınıf I molekülleridir. Birbirleriyle etkileşiminde bulunmalarının sonrasında sitoplazma içerisinde ITIM'lar tirozin kalıntılarında fosforillenir ve böylece NK hücre aktivasyonunun inhibisyonu gerçekleşir (35).



Şekil 2.2. NK hücre aktive edici ve inhibitör reseptörleri **A**, genelde ekspresesi sağlanan inhibitörler ve kontrol noktası proteinler verilmiştir. **B**, genelde ekspresesi sağlanan NK hücre aktive edici, apoptozu indükleyen ölüm ve yardımcı uyarıcı reseptörler verilmiştir (36).

2.6. NK Hücrelerinin Fonksiyonu

NK hücreleri fonksiyonel olarak iki kısma ayrılır. Bunlardan ilki hücrel sitotoksisite yeteneğine sahip olmasıdır. NK hücreleri, uyarıcı bir faktör olmadan hedefteki hücreyi tanıyıp ortadan kaldırarak bu özelliği göstermektedir (31). İkinci önemli etkisi ise, antikor vasıtasıyla (IgG) hedef hücreyi yok etmek için humoral immün sistem hücreleriyle birlikte hareket halinde olmasıdır. Bu da NK hücrelerinin antikor bağımlı hücrel sitotoksisite (ADCC) yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir (37).

2.7. NK Hücre Sitotoksisitesi

NK hücresi sitotoksisitesini düzenlemek için görev yapan moleküler mekanizmalar üç kısma ayrılır; Hedef hücreyi tanıma, hedef hücre ile teması ve immünolojik sinaps (IS) oluşturabilme yeteneği ve son olarak NK hücresi tarafından hedef hücre ölümü (38).

Doğrudan ya da dolaylı hedef tanıma olarak iki farklı şekilde NK hücreleri sitotoksik etki gösterir. NK hücre yüzeyinde bulunan reseptörler tarafından genel bir sinyal gönderilir ve bu sinyallere karşılık olarak oluşan sinyallerle aktive veya inhibe edilmesi

doğrudan tanıma mekanizması olarak ifade edilir. NK hücrelerinde sitotoksik granüllerin hücre içinden hücre dışına atılması ya da ölüm reseptörü ile sitotoksosite tarafından hedefi ortadan kaldıracak mekanizmaları aktif hale getirmesine doğru hedefi tanıma denir (39). NK hücrelerinden kaynaklanan Fc γ RIIIa reseptörünü yani CD16'yı eksprese etme özelliğini aktive edebilir ve antikör ile kaplanan hedef hücre tespit edilmesini sağlayan bu mekanizmaya ise antikora bağımlı hücrel sitotoksosite (ADCC) olarak bilinen dolaylı tanıma denilmektedir. Ölüm reseptörü ile sitotoksitede NK hücrelerinden kaynaklanarak oluşturulan ölüm ligandları ve hedef hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri kendi aralarında bağ oluşturur, bu mekanizmadan kaynaklı olarak tanınan moleküllerin ölümünü sağlayacak kaspaz kaskadının aktif hale gelmesi gerçekleşmiş olur. NK hücreleri ise interferon gama (IFN- γ) üretimini gerçekleştirerek hücre aktivitesini de dahil ederek bağışıklık sisteminin oluşturduğu yanıtları pozitif bir döngü haline gelmesini sağlayarak düzene koymaktadır (40).

NK hücreleri, çoğunlukla litik granüller olarak tanımlanan en başta oluşumu sağlanmış lizozomal ilişkili organellerin içeriğinde bulunan molekülleri dışarıya salarak hedef hücrelerin ölümünü sağlar. Litik granüllerin hücre içinden hücre dışına atılması, temas sağlanan bölgesinde bir hücrel sinaps (IS) oluşturmak adına bir NK hücresinin hedef olarak belirlediği hücre ile konjuge edilmesiyle başlatılan sıkı olarak düzenlenen bir işlemdir (41). Bu granüller, mikrotübül düzenleme merkezine (MTOC) yönelim sağlayan mikrotübüller üzerinde taşınırlar ve böylece IS'nin dışında salınmalarının önüne geçilmesini sağlar. NK hücresi ile hedef olarak belirlediği hücre arasında yer alan litik IS'deki sinyallerin geçici ve uzamsal etkileşimi sağlayarak birbirleri arasında iletişimi, aktin hücre iskeletinin reorganizasyonu ve sonrasında hedef hücreye odaklanmış bir şekilde salınım sağlamak üzere MTOC ile litik granüllerin IS'ye kutuplaşması için ortam sağlar. Oluşan bu mekanizma sonucunda NK hücresi ölümü gerçekleştirilen hedeften uzaklaşır, böylece NK hücresi seri olarak öldürme mekanizmalarına aracılık etmektedir (42).

NK hücreleri, CD8⁺ T hücrelerinkine (CTL) benzer bir şekilde doğrudan enfekte hücreyi öldürme yeteneğine sahiptir. Bu hücreler antijen özellikli olup virüs ya da tümör hücresine ait olan antijenler, antijen sunan hücrelerin (APC) majör histo uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf I molekülleriyle birlikte CTL'lere sunulmasıyla sitotoksik etki oluşturmaktadır (43). Enfekte olan hücrelerle birlikte tümörlerinde, MHC sınıf I ekspresyonları inhibe ettiğinde bu hücreler CTL'nin oluşturduğu sitotoksik etkisinden

uzaklaşmakta ve böylece NK hücrelerinin yönelimini sağlamaktadırlar. Bundan dolayı da NK hücreleri ile MHC sınıf I molekülleri kayıp hücreleri tanır ve lizozomal enzimler vasıtasıyla sitotoksisiteyi oluştururlar. Böylece MHC molekülleri var olan hücrelerde bu reseptörler NK hücrelerinde bulunan inhibe edici reseptörleri ile tanımlanır ve oluşturmuş olduğu aktivasyonu baskılanır (44).

2.8. NK-92 Hücre Hattı

NK-92 hücre hattı, 1992 yılında Klingemann ve arkadaşları malign Hodgkin dışı lenfomalı 50 yaşındaki bir erkekten izole ederek oluşturmuşlardır. NK-92 hücreleri CD3, CD4, CD8 ve CD16 yokluğu ile ifade edilir ve CD2 ile CD56'yı eksprese eder. NK-92 hücrelerinin büyüyüp gelişmesi, rekombinant IL-2'nin ortamda olmasına bağlıdır; IL-2' nin ortamda olmaması durumunda hücreler 72 saat içinde öldüğü belirlenmiştir. NK-92 hücreleri kümeler oluşturup birbirlerine tutunarak büyüme eğilimini göstermektedir ve bu kümeler dağıldığında ise kolayca öldükleri görülmüştür (45).

NK-92 hücreleri de NK hücreleri gibi önceden karşılaşmaya gerek duymadan ilk karşılaşmada tümör hücrelerini öldürebilme yeteneklerine sahiptirler. NK-92 hücrelerinde CD16 yoktur ancak bu hücreler farklı tür kanser hücrelerine karşı yüksek derecede sitotoksik aktivite göstermektedir. NK-92 hücreleri iki alt grubu NK-92MI ve NK-92CI'yi oluşturur. NK-92 hücrelerine, alt grupları biyolojik özellik açısından benzerlik gösterir ancak IL-2'ye bağlı gelişimsel özellikler göstermezler (46).

2.9. NK Hücre Sitotoksisite Belirlenmesinde Kullanılan Metotlar

NK hücrelerinin göstermiş olduğu en önemli yetenekleri arasında yer alan hücresel sitotoksisite temelde iki farklı şekilde incelenmektedir. İlki perforin ve granzimler vasıtasıyla oluşturulan sitotoksisitedir. Diğerisi ise, Fas ve TRAIL vb. moleküllerle birlikte hedef hücrenin zar yapısında bulundurduğu Fas ve TNF benzeri ölüm reseptörleri ile etkileşime girer ve onları uyararak hedef hücre içerisinde bulunan apoptotik döngünün aktif hale gelmesi şeklinde gerçekleşmektedir (34). Totalde bilinen üç farklı sitotoksisite testi vardır. Bunlar;

2.9.1. Krom Salınım Metodu (Chromium (⁵¹Cr) Release Assay: CRA)

Brunner ve arkadaşları tarafından ilk kez 1968'de tanımlanmıştır (47). Metot, lizis sonrasında hedef deki hücreye yüklenen radyoaktif ⁵¹Cr-Na₂ ⁵¹CrO₄'un salınımıyla gerçekleşir ve in vitro hücre-aracılı sitotoksisite incelenmelerinde de oldukça yaygın

kullanılır. Metot oldukça basit ve birden fazla kez tekrarlandığının da bile aynı sonuçları vererek güvenilirliği yüksektir (48). Günümüze bu yöntem NK hücre sitotoksitesinin ölçülmesinde oldukça tercih edilen bir yöntemdir. Fakat en büyük dezavantajı radyoaktif bir yöntem olmasından kaynaklı olarak araştırmacıları farklı yöntemlere yönelmesini sağlamıştır (49). Bu yöntemde genel olarak kronik miyeloid lösemi hücre ailesine ait K562 hücreleri kullanılmaktadır. Yöntem; çalışılacak olan hücreler radyoaktif ^{51}Cr ile inkübeye bırakılır (50). Sonrasında, bu hücre birleşimine efektör hücreler eklenerek 3-4 saatliğine tekrar inkübe edilir ve ardından ^{51}Cr sitotoksiste ölçümü yapılmaktadır. Çalışılan hücreler tarafından salınan ^{51}Cr oranı ile NK hücrelerden kaynaklı öldürülen çalışmadaki hücreler ile doğru orantıya sahiptir ve bu ölçüme göre NK hücrelerinin oluşturdukları sitotoksitesi incelenir (51).

2.9.2. CD107a Ekspresyonuna Bağlı Sitotoksiste Testi

Bu yöntem ise akım sitometrisi ile NK hücre sitotoksitesi belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. NK hücrelerin sitoplazma içerisinde bulunan perforin ve granzim vb. litik granüller, hedef hücreyle birlikte bir araya geldiğinde ve ihtiyacı olan reseptör etkileşimleri ardından litik granüllerin hedef hücreye sitotoksik moleküllerini ortama salmasıyla oluşur (52). Sitotoksik moleküllerin ortama salınmasıyla sekretuar lizozomlar da ortam içerisine salınır ve böylece CD107a hücre membranına doğru taşınır. Yöntem; CD107a (LAMP-1, lizozom bağlı membran proteini-1) antikoru ve NK hücrelerinin yüzeyindeki işaretleyici antijenlerin etkileşime girmesi ve floresan bir ışığa ile okunmasına dayanmaktadır (53).

2.9.3. K562 Lizizinden Kaynaklı Sitotoksiste Testi

NK hücre sitotoksiste testi için bir diğer yöntem ise, CFSE (carboxyfluoresan diacetate succinimidly ester) ile işaretlenmiş K562'nin lizizi sonucunda oluşturulan metottur. K562 hücrelerinin diğer hücrelerden ayıran özelliği kendisinin üretilmesi için uygun kültür ortamında üremesi ve hayatta kalma sürelerinin diğer hücelere oranla uzun olmasıdır. NK hücrelerinin sitotoksiste incelemeleri haricinde de apoptoz ile ilgili birçok farklı çalışmalar için kullanımı mümkündür (54). Yöntem, pıhtılaşmamış olan kan örneğinden PKMH'lerin (Periferik kan mononükleer hücreleri) izolasyonu yapılmaktadır. Elde edilen periferik kan mononükleer hücreleri sitotoksiste değerlendirme testi için herhangi bir faktör eklemeyen kullanılabilir veya çeşitli metotlar doğrultusunda izolasyonu gerçekleştirilen NK hücrelerine de bu yöntem uygulanabilir. Sonrasında NK hücre saf halde elde edilip edilmediğinin belirlenmesi

adına CD3, CD16 ve CD56 işaretleyicilerine bakılarak tespiti sağlanır. Sonraki basamakta, hedef hücre olarak tanımlanan K562 hücreleri, hücre membranına bağlanır ve yeşil floresans da ışına oluşturan CFSE tarafından işaretlenir (55). İşaretlenen K562 hücreler ile izole edilmiş NK hücreler ya da PKMH'ler belirlenen farklı oranlarda (1:1, 3:1, 10:1,15:1) 3-4 saat 37°C'de inkübeye bırakılır. Son olarak, ortamdaki ölü hücrelerin belirlenebilmesi için propidyum iyodür (PI) floresanda kırmızı renkte ışına veren bir boya ile boyama işleminden geçirerek Akım sitometri analizi yapılır. Canlı olarak tespiti sağlanan K562 hücreleri yalnızca yeşil floresans ışına yaparken, ölü olarak tespiti sağlanan K562 hücreleri ise yeşil aynı zamanda da kırmızı floresans ışına vermektedir (56).

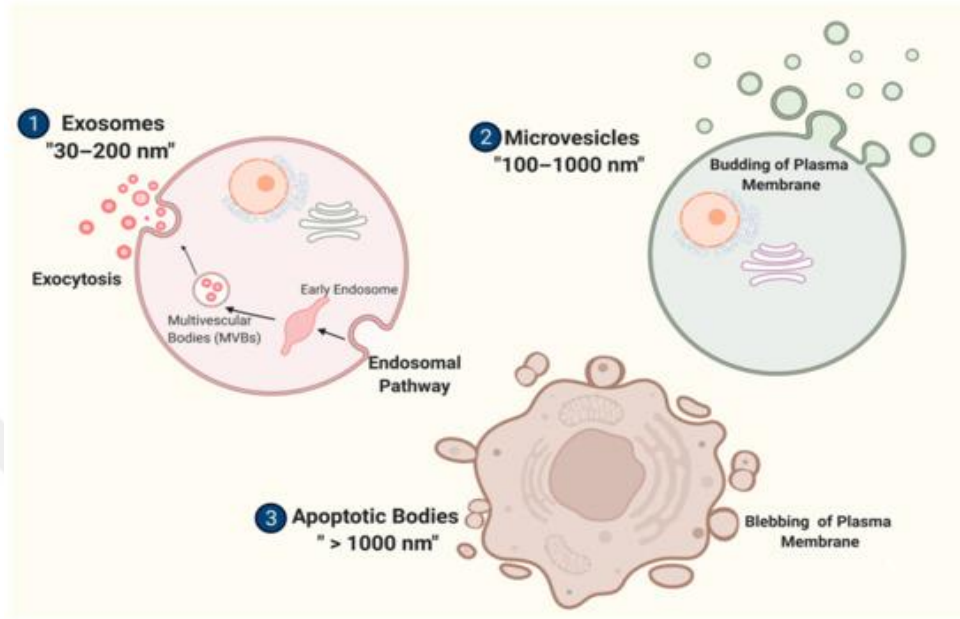
2.10. Ekstraselüler Veziküller

Hücre dışı veziküller (EV'ler), hücreler tarafından hücre dışı boşluğa salgılanan veziküllerdir ve tüm dokulardan, birçok hücre tipinden ve vücut sıvılarından salgılanabilen, lipit çift katmanlı zarla çevrilidirler. EV'ler; apoptotik cisimler, eksozomlar ve mikroveziküller (MV'ler) olmak üzere üç alt tipe ayrılır (Şekil 2.3.). Bu ayırım salınım yollarına, boyutlarına, biyogenezlerine, içeriğine ve işlevlerine göre farklılaşan hücre dışı veziküller olarak sağlanır. EV'lerin içeriği, lipitler, nükleik asitler, proteinler, plazma zarı ve sitozollerden oluşur. Farklı EV'ler, MV'ler, eksozomlar ve apoptotik cisimler arasında belirleyici bir protein ayırımı söz konusu değildir. Bu ayırım birbirinden farklı oluşum yollarından elde ettikleri proteinler sayesinde gerçekleşebilir (57).

EV'ler, temasa bağımlı hücreler veya temastan bağımsız hücrelerle salgı yoluyla iletişime geçerler. Her bir EV, alıcı hücreler tarafından hedef gösterilmeye izin veren yüzey molekülleri taşır. Bir hücre diğer bir hedef hücreyle etkileşime girdikten sonra EV'ler, reseptör ligand etkileşimi ile hücre içerisine alınarak sinyal iletimini indükleyebilir ya da farklı bir yol olarak endositoz ve/veya fagositoz ile özümseyebilir. EV'lerin başka bir özelliği ise içlerinde taşıdıkları molekülleri sitozolüne iletmek üzere hedef hücrenin zarı ile kaynaşarak alıcı hücrenin fizyolojik görünümünü değiştirebilir (58).

EV'ler kanser, kardiyovasküler hastalık, nörolojik ve immünolojik bozukluklar gibi birçok hastalık durumuyla ilişkilendirilmiştir. EV'ler; miRNA, proteinler, lipidler,

nükleik asitler, zengin potansiyel biyobelirteç kaynakları olup terapötik hedeflere sahiptirler ve EV'ler ilaç dağıtım araçları olarak da etkin rol oynamaktadırlar. (59)



Şekil 2.3. Ekstraselüler veziküller; eksozom, mikrovezikül ve apoptotik cisimler (60)

2.10.1. Apoptotik Cisimler

Çok hücreli organizmalar yaşamın devamı için bölünmeye ihtiyaç duyarlar ve bölünen hücre sayısının olması gerekenden daha fazla olması sonucunda hücre ölümleri gerçekleşir. Böylece hücre sayısı hücre ölümleri ile dengeli hale gelir. Bir organizma da yeteri kadar hücre olup organizmanın artık hücreye ihtiyacı kalmadıysa, hücre içi habercileri harekete geçirerek istenmeyen hücreyi intihara sürükler. İntihar sürecine ise Yunancada yaprak dökümü olarak adlandırılan apoptoz ya da başka bir değişle programlı hücre ölümü denilmektedir (61).

Apoptotik cisimler (ApoBD'ler), 1000-5000 nm çap aralığında bir boyuta sahip olup hücresel apoptozun geç evresi sırasında plazma zarından tomurcuklanarak salınan en büyük EV'lerdir. Apoptotik cisimler, taşıdıkları kargo içeriklerine, boyutlarına ve nükleik asitlerine göre diğer EV'lerden ayırt edici özellik gösterir (62).

ApoBD'ler T hücreleri, monositler, endotel hücreleri ve epitel hücreleri gibi birçok hücre türünden üretimi gerçekleştirilebilir. ApoBD'lerin oluşumu ile apoptotik

hücrelerin fagositler aracılığıyla temizlenmesinde önemli bir görev üstlendiği bilinmektedir. Ayrıca ApoBD'lerin hücreler arasındaki iletişime katkıda bulunabilmek için DNA'yı, mikroRNA'ları, proteinleri ve lipitleri taşıdığı da bilinmektedir (63).

2.10.2 Mikroveziküler Cisimcikler

Mikroveziküler cisimcikler 50-1000 nm boyutlarına sahip hücrenin plazma membranından tomurcuklanmasıyla ortama salınır. Mikroveziküler cisimcikler, EV'lerden taşıdıkları kargo içeriğine bağlı olarak birbirinden ayrılır. İçeriğinde mRNA, miRNA ve proteinleri bulundurur. Görevleri ise diğer EV'lerdeki gibi hücre içi iletimi ve hücreler arası haberleşmeyi sağlamaktadır (64). Ayrıca kanserde anti tümöral etki, metastaz ve anjiyogenez gibi birçok önemli etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Oluşturulduğu hücrenin antijenik özelliklerini taşır (65). Yanlış katlanan proteinlerin, metabolik artıkların ve sitotoksik ajanların ortamdan kaldırılmasında etkin rol oynamaktadır (66).

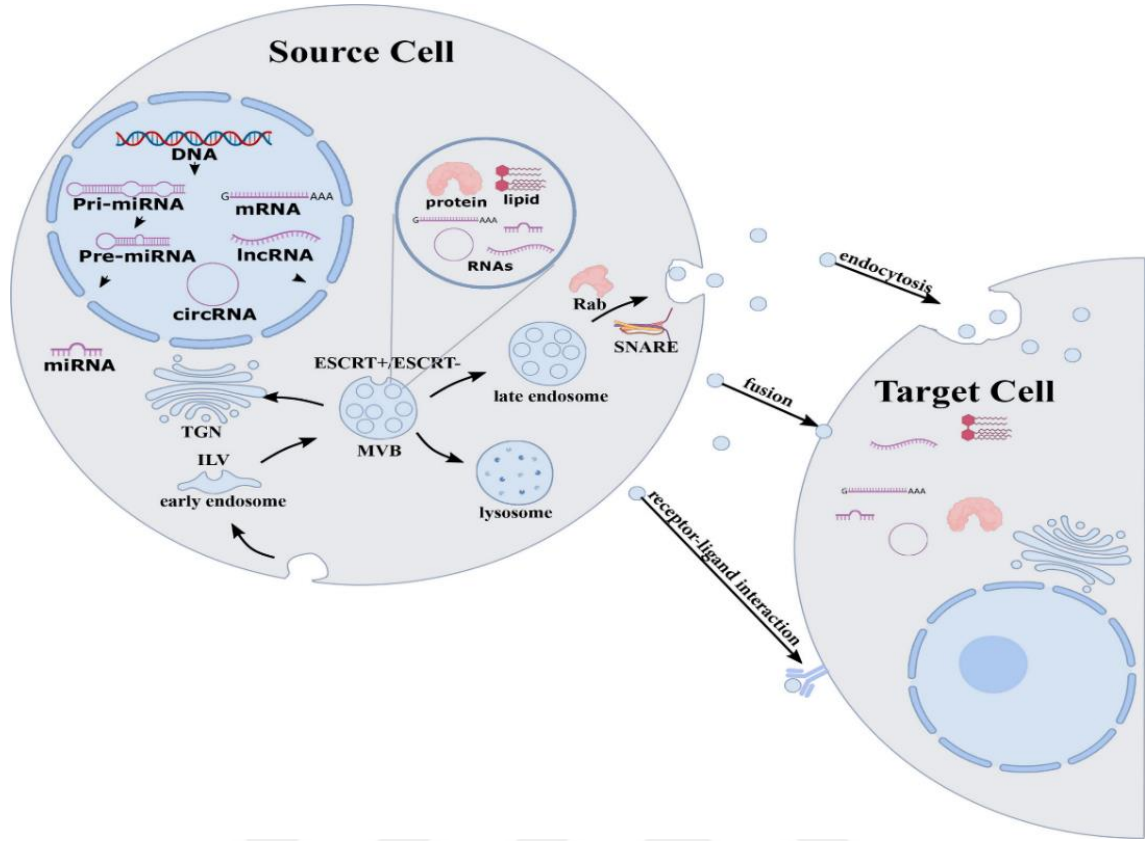
2.11. Eksozomlar

1970' de Rose Johnstone ve arkadaşları tarafından yapılan ilk çalışmalarda eksozomlar hücre içerisinde istenmeyen molekülleri, hücre dışına atılımında görevli hücre artıkları olarak görev yaptığını ileri sürmüşlerdir (67). Bilinenin aksine son 20 yılda yapılan çalışmalarda eksozomların birçok fizyolojik görev üstlendikleri gözlemlenmiştir. Eksozomlar; hücreler arası iletişimde, sinyal iletiminde, immünolojik yanıtın düzenlenmesinde ve genetik materyal transferinde etkin rol almaktadır (68). Eksozomlar ortalama 30-100 nm boyutlara sahiptir. Eksozomlar diğer EV'lerden, kendilerine özgü biyogenez yollarının olması, lipid kompozisyonları ve hücreler arası taşıdıkları kargo içeriklerinin farklı olmasından kaynaklı olarak önemli farklılıklar içerir. Eksozom, çift katmanlı bir lipid zarından meydana gelir ve hücresel organelleri yoktur. Eksozomların içeriğinde salındıkları hücrelerin proteinleri, DNA ve RNA'ları da bulunur. Ayrıca kendine özgü CD9, CD63, CD81 ve CD82 proteinleri ile karakterize edilir (69). Eksozomların Hücreler arası iletişim, çok hücreli canlılarda hücresel fonksiyonları ve doku homeostazının devamı için gereklidir. Bu hücreler arası iletişim temasa bağımlı veya temasa bağımsız olarak iki farklı şekilde gerçekleşir. Hücreler endozomlardan, plazma zarından kaynaklı olarak üretilen eksozomlardan ve mikro-parçacıklar (MV'ler) gibi birçok farklı vezikül türlerini serbest bırakır. Eksozomların salınması, farklı hücreler tarafından multiveziküler cisimler (MVB'ler) olarak plazma zarı ile füzyonu sonucu gerçekleştirir (70). Eksozomlar; kan, tükürük, plazma, idrar, beyin

omurilik sıvısı, amniyotik sıvı ve anne sütü vb. vücut sıvılarından elde edilebilir. EV'leri izole etmek için birçok yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerle eksozom saf ve yüksek miktarlarda izolasyonu gerçekleştirebilmek için ve bu yöntemleri standart hale getirebilmek için birçok çalışma yapılmıştır (71). Eksozomlar, izolasyondan sonra da protein boyama ya da immüno blotma gibi farklı yöntemlerle analizi yapılması mümkündür. Eksozomlar sadece hücrelerin içeriğinde bulunan molekülleri taşımazlar, biyobelirteç ve ilaç taşımada görev alırlar (72).

2.12. Eksozomların Biyogenezi ve Moleküler Kompozisyonu

Eksozomlar; amniyotik, idrar, plazma, beyin omurilik sıvısı, tükürük ve anne sütü gibi daha birçok vücut sıvısında bulunurlar. Ayrıca eksozomlar, mast hücreleri, dendritik hücreler, mezenkimal kök hücreleri, tümör hücreleri, NK hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri ve daha birçok farklı hücreler tarafından salgılanabilir (73). Eksozomlar çeşitli yüzey molekülü bulundurlar ve böylece çeşitli hücre reseptörünü aktif hale getirebilir. Bu da eksozomların hücreler arasındaki (protein, lipit vb.) madde alışverişi yapabilme yeteneğini arttırmasını sağlar (74). Ökaryotik hücrelerde bulunan eksozomlar, yaşam süreçleri boyunca periyodik bir şekilde küçük miktarlarda hücre içi sıvıyı içerisine alarak endozom olarak bilinen küçük yapıları oluştururlar. Erken endozom olgunlaşarak geç endozoma dönüşümünü gerçekleştirir ve endozom lümeni içinde intraluminal veziküllerin (ILV) oluşumu ile karakterize edilir. Genelde 30-100 nm çaplara sahip ILV'ler, endozomal zarın iç kısmına doğru tomurcuklanmasıyla sitozolde bulunan bazı molekülleri birbirlerinden bağımsız olarak içine alır. Böylece transmembran ve periferik proteinleri yapısına katar (75). Ayrıca eksozomlar, hücrenin DNA'sı, mRNA'ları ve mikroRNA'ları gibi birçok molekül kombinasyonlarını da içerisinde bulundurur (76). İçerisinde birçok ILV'ler bulunduran ve bir zarla çevrili bu yapıya Multiveziküler cisimcikler (MVB) adı verilmektedir. MVB'ler genelde hidrolaz içeren hücrenin kendi içerisinde bulunan lizozom ile birleşerek apoptoza uğrayabilirler. Aksi takdirde hücrenin kendi zarıyla kaynaşarak hücre dışı boşluğa eksozomlar olarak salınıp diğer hücreler tarafından etkileşimi sağlanabilir (77). Membran proteinleri için lizozomal MVB sınıflandırma yolu, önemli miktarlarda sitoplazmik alanlarının çoğunluğunda bulunmasına ve sonrasında taşıma (ESCRT) makinesi için gerekli olan endozomal sıralama kompleksi tarafından tanınmasına dayanır (Şekil 2.4.). Ancak ESCRT'den bağımsız olarak gelişen MVB oluşumu da tanımlanmıştır (78).

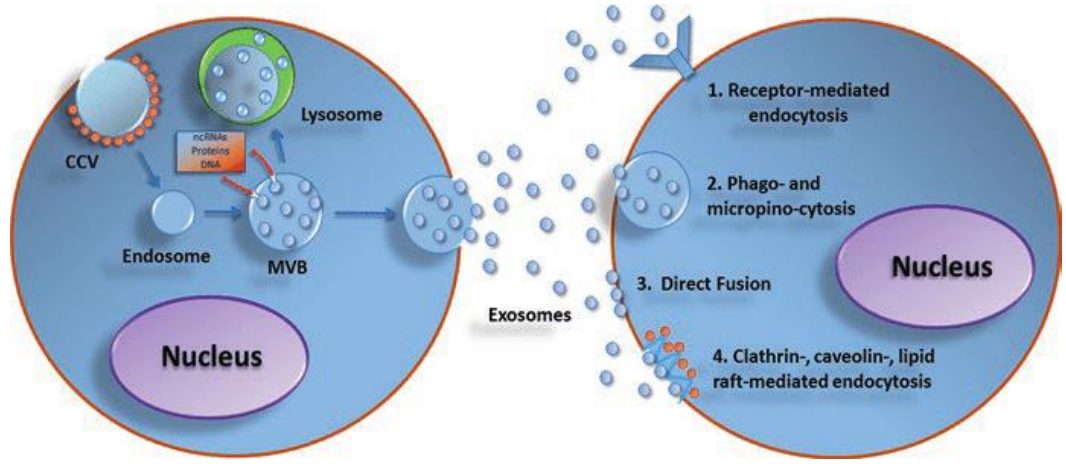


Şekil 2.4. Eksozomların biyogenezinin şematik olarak gösterimi (78)

2.13. Eksozomların Hücre İçine Alınması

Eksozomlar oluşuktan sonra hedef hücreler tarafından dört farklı yol ile taşıdıkları kargo içeriğini aktarabilir (Şekil 2.5.). Bunlar;

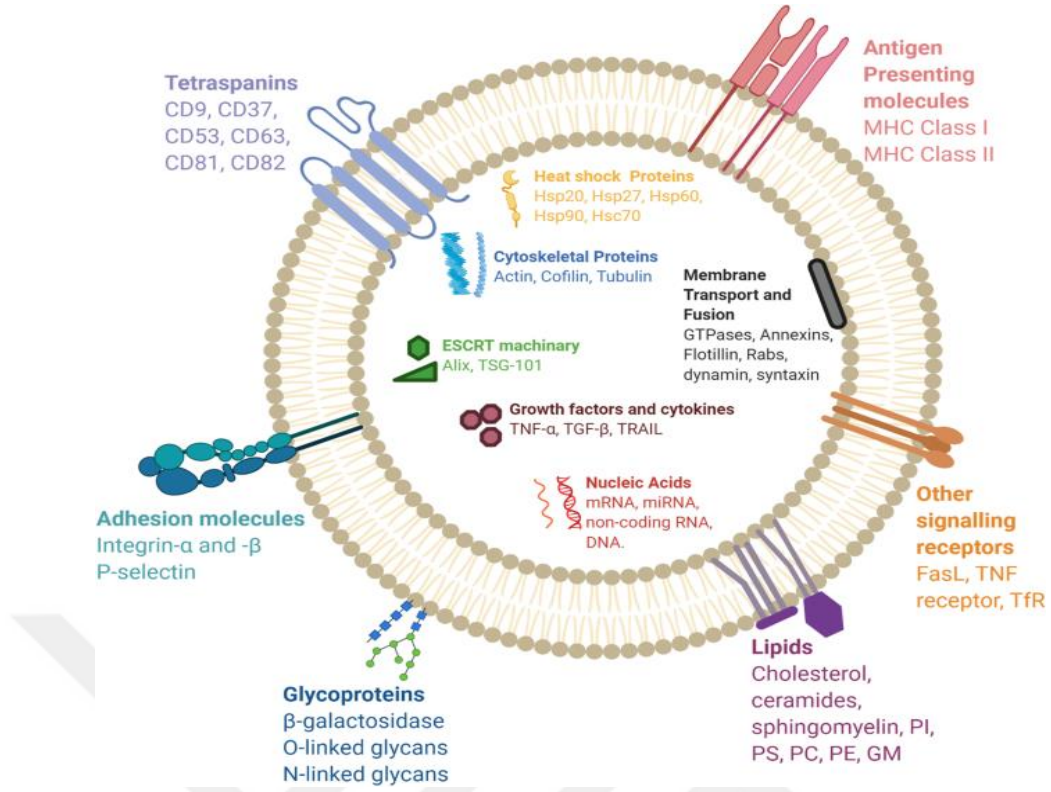
1. Ligand- reseptör ilişkisi: eksozom yüzeyinde bulunan ligandlar hedef hücre yüzeyinde bulunan ve eksozom ligandlarını tanıyan reseptörler ile birleşip içeriğindeki kargosunu aktarmasıdır.
2. Füzyon: eksozom membranı ile hedef hücrenin membranı doğrudan kaynaşarak eksozom içeriğinin hücrenin sitoplazmasına alınmasıdır (79).
3. Fagositoz: eksozom hedef hücre zarında meydana gelen yalancı ayaklar ile çevrelenip hücre içerisine alınmasıdır.
4. Endositoz: hücre zarından geçemeyecek kadar büyük eksozomlarda, hedef hücrenin membranı içeriye doğru kıvrılmasıyla bir cep oluşturur ve böylece eksozomu hücre içerisine alınmasını sağlamaktadır (80).



Şekil 2.5. Eksozomların hedef hücre içine alınmasının şematik olarak gösterilmesi (81)

2.14. Eksozomların Membran Bileşimi ve İçeriği

Eksozomlar, DNA, RNA ve uzun kodlanmayan RNA (lnc RNA) gibi nükleik asitler, tetraspanin, antijen sunan moleküller ve adezyon molekülleri gibi proteinleri ve çift katmanlı lipid tabakasında ise kolesterol, seramid ve sfingomiyelin gibi lipid molekülleri içermektedir. (Şekil 2.6.) Eksozom içeriğine ait ExoCarta (www.exocarta.org) 2021 verilerinin sunulduğu veri tabanına göre eksozomlarla ilişkilendirilen şu ana kadar yaklaşık olarak 3408 mRNA, 1116 lipid, 2838 miRNA, 9769 protein belirlenmiştir. Eksozomların içerisinde bulundurdıkları moleküller köken aldıkları hücrenin içeriğine göre farklılıklar göstermektedir (82).



Şekil 2.6.Eksozom içeriği. Eksozomlar; tetraspaninler, antijen sunan moleküller, adezyon molekülleri, ısı şok proteinleri ve füzyon proteini gibi daha birçok proteinleri, sfingomiyelin, seramid, kolesterol gibi birçok lipidleri ve DNA, RNA, miRNA, uzun kodlanmayan RNA’lar gibi daha birçok nükleotidi içerir (83).

2.14.1. Eksozomların Lipit İçeriği

Dolaşımında yer alan eksozomlar çift katlı lipid tabakasına sahiptir ve lipid tabakasının içeriğinde, seramid, sfingomiyelin (SM), fosfatidilkolin (LPC), fosfatidil-etanolamin, fosfatidilserin (PS), gangliosid GM3 ve fosfatidilinositol vb. plazma zar lipidlerini bulundurur (84). Bu lipidler, çeşitli hücre türlerinden elde edilen eksozomlarda farklı oranlarda bulunmaktadır. Örneğin Retikülositlerden elde edilen eksozomlardaki lipidlerin tamamından sadece yarısını fosfatidilkolin kapsamaktadır (85). Mast hücrelerinden ve dendritik hücrelerden elde edilmiş eksozomlardaki lipid içeriğinde ise tamamına bakıldığında bu oran üçte birinden daha az olduğu belirlenmiştir (86).

Eksozomda intralüminal veziküllerin biyogenezi için oldukça önemli görülen seramid beraberinde de yüksek konsantrasyona sahip kolesterol ve sfingomiyelin gibi membran lipid bileşenleri ile karakterize edilir (87). Ayrıca eksozomlarda diğer hücre membranlarında görülmemiş ve kolesterolün birikmesini sağlayan lizofosfatidik asidi

olarak bilinen ve oldukça nadir karşılaşılan bir tür fosfolipit içeriğini membranlarında bulundurdıkları yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir ve lizofosfatidik asidin, yeni üretilmiş eksozomların kendisi olmadan da bu zardaki vezikülün tomurcuklanmasına fayda oluşturabileceği varsayımlar arasındadır (88).

Eksozomların membranında bulunan sfingomiyelin ve kolesterolün hidrojen bağı yaptığı varsayımlar arasındadır ve böylece sfingomiyelin ile kolesterol eksozom membranındaki çift katmanlı tabakanın sıkı bir şekilde paketlenmesi ve su geçirgenliğinin azalmasına neden olur (89). Eksozomların olduğundan daha sert bir tabakaya sahip olmasına yol açar. Bu olay eksozomların artan membran sertliği, kolay bir şekilde çözünür olmamaları ve biyolojik sıvılar içerisinde kararlılıklarını arttırarak pozitif bir etkiye sahip olmalarını sağlar. Bu da deterjan türleri ile muamelelerinde daha dirençli olmaları için zemin hazırlar (90).

Fosfatidilserin ise farklı biyolojik süreçlerde yer aldığı ve bir sinyal verici molekül olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Fosfatidilserin çeşitli türlerde fosfolipit transport enzimleri ile eksozomların plazma zarında ifade edilir. Ayrıca eksozomun plazma zarına sinyal göndermesi ve füzyon ile dışa salımı için izin verir (91). ILV' lerde ve MVB membranında yer alan seramid, esansiyel lipidlerden bir tanesidir. Eksozomda bulunan membranın iç kesimi seramid tarafından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir (92).

2.14.2. Eksozomların Protein İçeriği

Eksozomlarda; Hsp60, Hsp70 ve Hsp90 ısı şok proteinleri, GTPaz, Rab, anneksin ve flotillin membran transport ve füzyon proteinleri, MHC I, MHC II immün sistem proteinleri, Alix ve TSG101 MVB'lerle ilgili proteinler, CD9, CD63, CD81, CD82 Tetraspaninler (hücre göçü, hücre-hücre adezyonu), İntegrinler (hücre adezyonu ile ilgili), aktin ve miyozinler (hücre iskeletinin oluşumu) gibi birçok protein bulunur. Eksozom hücre yüzeylerinde bulunan proteinlerle hedef hücrenin plazma zarında yer alan reseptörler birleşerek taşıdıkları kargoyu hücre içerisine aktarılmasını sağlar (93).

Tetraspaninler, eksozomlarda oldukça sık karşılaşılan bir tür transmembran protein grubu üyesidir. Özellikle de CD9, CD63, CD81, CD82 proteinleri eksozom markerleri olarak belirlenmektedir. Bu tetraspanin proteinleri hücrede, füzyonda, sinyal iletiminde ve hücre-hücre adezyonunun da rol alır (38). Oldukça önemli görevleri olmasına rağmen eksozomlar da birçok görevi hala araştırılmaktadır. Tetraspaninler, EV'lerde de

oldukça yaygın olarak bulunur ve EV'ler üzerinde işlevsel etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (94).

Tetraspaninlerin EV'lerin üretiminde sitozolik etkiye sahip proteinlerle etkileşim içerisinde olup ve luminal kargo yüklemeye katılmasının olası bir süreç olduğunu düşünülmektedir (95). CD9'un eksozomların alıcı hücrelerle füzyonunda görev alması, diğer tetraspaninlerin de eksozomlarda ve hücre membranlarında benzer işlevlerde görev alabileceğini göstermektedir (96). Tetraspaninlerin ligand-reseptör arasındaki ilişki oldukça sınırlayıcı olduğu için ve küçük boyutlara sahip olmalarından kaynaklı olarak bazı immünolojik ve biyokimyasal analizler bakımından zorluklar yaşanması sebebiyle oldukça az sayıda çalışılmıştır. Ek olarak, füzyon, hücre-hücre adezyonu ve hücreler arası sinyalleşme araçları olarak fonksiyonlarıyla yeni bir ilaç keşfi bakımından faaliyetleri bulunmaktadır (97).

İntegrinler; kanser ve bağışıklık hücrelerinden köken alarak türetilen eksozomlar da oldukça yoğun olarak tanımlanan proteinlerdendir (98). Adezyon molekülü görevi görerek hücre dışı matrikse hücrenin tutunmasını sağlar. İntegrinler, eksozomlarda veziküllerin gideceği hedef hücrelere yönlendirilmesinde görev alırlar (99).

Laktadherinler, EGF faktörü VIII olarak da bilinirler ve ayrıca adezyon molekülü görevi görürler. Laktadherinler, genelde immün hücrelerinden ve fibroblastlardan elde edilen eksozomlarda bulunur (100).

Eksozomlarda, CD55 ve CD59 proteinleri de tetraspaninler ve integrinler gibi ilaç taşımada oldukça önemli potansiyele sahiptir. B hücreleri, dendritik hücreler ve bronşiyal epitel hücreleri gibi daha birçok hücreden köken alınan eksozomlarda bulunmuşlardır. CD55 ve CD59 proteinleri eksozomları kompleman sisteminden kaynaklı lizizden korumaktadır (101).

GTPaz, Rab, anneksin ve flotillin gibi proteinler eksozomlarda membran transport ve füzyon proteinleri işlevine sahiptirler (102).

Antijen sunan hücrelerden (APC'ler) salgılanan EV'lerin biyolojisi farklı tümör tiplerinde güçlü immün sistemi uyarıcı işlevselliği gösterdiği bilinmektedir. B hücrelere ve dendritik hücrelere (DC) benzer antijen sunan hücrelerden salgılanan eksozomlar, MHC sınıf I ve II kompleksleriyle birlikte uyarıcı etkiye sahip moleküller tarafından zenginleştirilmiştir ve in vitro T hücresi gelişmesini uyarmayı sağlayan peptit içeren

MHC'yi transportunu yapan eksozomları saldıkları gözlemlenmiştir. APC'lerden salınan eksozomların artmasını in vitro uyaran ve in vivo indüklenme özelliğine sahip olabileceği görülmüştür (80).

Taşıma için ihtiyaç duyulan ESCRT, MVB ve ILV biyogeneğinde etkin bir rol oynar. ESCRT'ler, maya hücrelerinden memeli hücrelerine kadar korunan ilişkili proteinlerle (VPS4, VTA1, ALIX) ESCRT'nin dört kompleksi (ESCRT-0, -I, -II ve -III) bir araya gelmesiyle yaklaşık olarak yirmi proteinden oluşmaktadır. Tsg101, taşıma ESCRTI için ihtiyaç duyulan ESCRT bileşenleri arasında yer alır (103). ALIX, ayrıca endozomal sıralama kompleksinin II ve III' ü bağladığı bilinmektedir. ESCRT makinesinin ayrılması ve geri dönüşümünün gerçekleştirilmesi, AAA-ATPaz Vps4 ile etkileşimi gerektirir ve böylece Vps4'ün etkisiyle endozomal zarı ayrılır (104).

Isı şok proteinleri (Hsps), eksozomların biyogeneğinde görev almaktadır. Eksozomlarda en yaygın bilinen üyeleri 60,70 ve 90 Hsp'lerdir. Hsps ailesinin diğer üyelerinden olan Hsp20'nin, doğrudan TSG101 ile etkileşim halinde olarak eksozomların biyogeneğinde rol oynadıkları belirlenmiştir (105).

2.14.3. Eksozomların Nükleik Asit İçeriği

Eksozomlar, DNA, mRNA, miRNA ve diğer kodlamayan RNA'lar da dahil olmak üzere farklı türde nükleik asitler taşırlar (106). İşlevsel özelliklere sahip RNA'nın, eksozomlar aracılığıyla hücreler arası taşınmada görev aldığı in vitro aynı zamanda in vivo olarak da ispatı sağlanmış olup, gen ifadesi ve protein translasyonunun düzenlenmesi gibi birçok önemli fonksiyonel görevi olduğu düşünülmektedir (107). mRNA'nın organizmadaki fonksiyonu ise amino asit dizisi ile protein hakkında bilgi vermesidir. mRNA'ların eksozomların aracılığıyla transferi ile hücreler arasında fenotopik özelliklerinin değişimini sağlayabileceği belirtilmiştir (108). miRNA'lar, nükleotid uzunluğuna sahip kısa kodlamayan RNA'ları içermektedir. miRNA'ları hücre ekstraselüler kısımlara taşınmasını eksozom gerçekleştirir (109). miRNA gibi kısa kodlanmayan RNA'ları ve uzun kodlanmayan RNA'ları da eksozom içerisine alır ve alıcı hücreye aktarılmasına aracılık sağlar (110). Eksozomda yer alan nükleik asitleri, lipid çift katmanının korunması sebebiyle yüksek stabilite özelliği gösterir. Bu stabilite ise hastalığa özgü biyobelirteçler olarak görev yaparken önemli ölçüde avantaj sağlamaktadır (111).

2.15. Eksozomların Fonksiyonları

1970 yılında Rose Johnstone ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda eksozomlar, hücre içerisinden hücre dışına atılması gereken molekülleri uzaklaştıran elemanlar olarak görev yaptığını düşünmekteydi (67). Ancak yapılan son 20 yıl içerisindeki çalışmalar ise eksozomların; hücreler arası iletişimde, immünolojik yanıtın düzenlenmesinde, sinyal iletimi ve hücrenin genetik materyalinin taşınmasında önemli ölçülerde görev üstlendikleri belirlenmiştir (68). İçeriğinde bulundurdıkları proteinler, nükleik asitler ve lipitleri ile eksozomlar yapılan son birkaç yıldaki çalışmalara göre oldukça önemli fonksiyonel etkisi olabileceği araştırılmaktadır. Ayrıca eksozomlar; amniyotik, idrar, plazma, beyin omurilik sıvısı, tükürük ve anne sütü gibi daha birçok vücut sıvısında bulunurlar ve mast hücreleri, dendritik hücreler, mezenkimal kök hücreleri, tümör hücreleri, NK hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri ve daha birçok farklı hücreler tarafından salgılanabilir (73). Yapılan bir çalışmada anne sütünden elde edilen eksozomların içeriğinde bulundurduğu farklı türlerdeki mikroRNA düzeylerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, bağışıklık düzenleyici olarak görev alan miRNA'lar, (miR-181a ve miR-155'ler gibi) bebeğin anneyi ilk 6 ay boyunca emmesinde yüksek oranlarda bulunmuştur, fakat daha sonraki aylarda ise önemli ölçüde azalmıştır. Anne sütündeki eksozomların içeriğindeki miRNA'ların bebeğin bağışıklık sisteminin büyük ölçüde gelişimini düzenleyebileceği ön görülmüştür (112). Başka bir çalışmada, eksozomların sadece protein ve lipit transferini yapmak ya da hücreler arası sinyalleri harekete geçirmek için alıcı hücrelere spesifik olarak hedeflenmediğini, aynı zamanda özelleşmiş nükleik asit transferi sağladığını göstermiştir (113). Eksozomların en önemli işlevi, vücut içerisinde birbirinde farklı ve uzak bölgeler arasında olduğu düşünülen hücre-hücre etkileşimini ortaya koyar (114). Eksozomlar hakkında yapılan farklı türlerdeki araştırmalarda ise, prionlar ve virüsler vb. patojenlerin bir hücreden farklı bir hücre yayılmasında da rol aldığı görülmektedir (115). Farklı türe sahip patojenler eksozom yolunu bozabilir. Pegtel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (116), Epstein Barr virüsü (EBV) ile enfekte olmuş hücrelerden kaynaklı salgılanan miRNA'ların eksozomlar tarafından aktarılır. Buda enfekte olmamış alıcı hücreler üzerinde etki ettiğini bildirmişlerdir. Örneğin, HIV aracılığıyla enfekte oldukları zaman dendritik hücreler, monositler, makrofajlar ve lenfositler eksozomları aynı zamanda da HIV virionları üretebilir (117) ve çoğu durum içerisinde hücrenin ne salgıladığını ayırt etmek oldukça zordur. Hücreler arası iletişim de görev alan eksozomların bir avantajı ise, mesajın belirli olması ve birden fazla konuma yönelik hedeflenebilmesidir. Fazlaca

miRNA'nın eksozomlar ile hedef hücreye iletilmesi, hedeflenen hücrelerin sahip olduğu tüm gen ekspresyonunda hızlı bir şekilde değişikliklere izin verir. Bu, hücreler arası iletişim, büyüme, bölünme, yaşamını devam ettirebilme, farklılaşma, apoptoz vb. ile ilgili mesajları içermektedir (118).

2.16. Eksozomlar ve Kanser

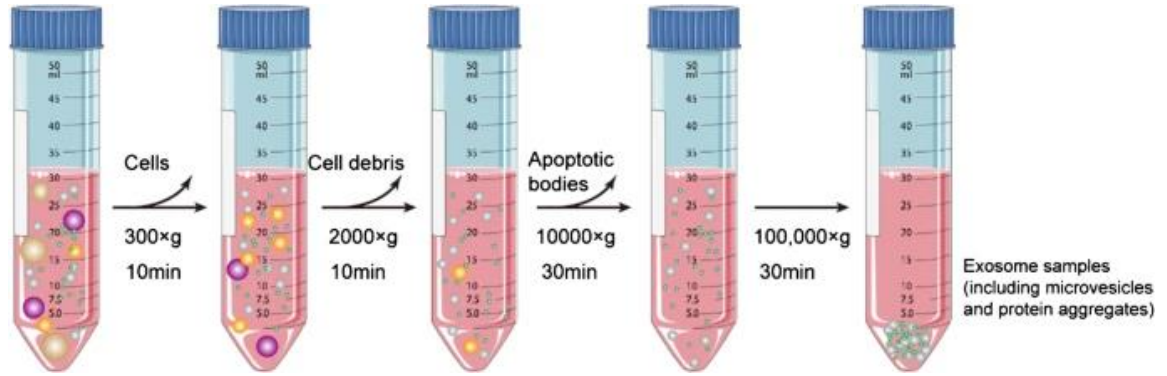
Eksozomların kanser üzerindeki etkisi yıllar içinde daha geniş araştırmalara konu olmuştur. Yapılan birçok araştırmada, kanser eksozomlarında yer alan onkojenik sinyal moleküllerinin tamamında olmasa da kanserin ilerlemesinden sorumlu tutulduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu tür kanser hücreleri tedavi direncine destek sağlayan eksozomları salmaktadır. Böylece kanser hücresinin yaşam süresiyle ve hedef hücrelerde gen ifadesinin düzenlenmesiyle DNA onarımını yükseltir (119). Kanserde, eksozom salımı yüksektir. Kanser hücreleri diğer sağlıklı hücelere oranla oldukça fazla eksozom üretebilme yeteneği gösterir (120). Eksozomların tümörle temas kurdukları yakın ya da uzak da ki vücut kısımlarına yatay bilgi alışverişi, tümör gelişimini ve metastazını kolay hale gelmesini sağlar. Bu olay, lümen içerisine paketlenmiş olan miRNA vb. kısa kodlanmayan RNA'ların yer değiştirmesi yoluyla gerçekleşir (121). Birçok çalışma, dolaşım halinde olan eksozom-miRNA'ları kanser içerisinde terapötik izlemeye tanı ve hastalığın evresini belirlemede biyobelirteç olarak göstermektedir (119). Yüksek oranlarda prostaglandin PGE2 ile TGF- β bulunduran eksozomlar, immün hücrelerinin tümör hücrelerinden uzaklaşmasını ve tümör hücrelerinin gelişimine katkı sağlar (122).

Eksozomlar, tümör hücrelerine hedeflenen bağışıklık sistemini düzenlemede görev almaktadırlar. Birçok araştırmacı, bağışıklık hücreleri ve eksozom arasındaki etkileşimi araştırmıştır (123). Eksozomlar, NK hücrelerin çoğalmasını en aza indirerek, sitotoksik T hücrelerinde apoptozu indükleyerek ve bağışıklık sisteminin sitotoksik özelliğini ortadan kaldırma eğilimi göstermektedir (124) Ayrıca, tümör kaynaklı eksozomlar tarafından İnterlökin 2 yardımıyla engellemeye karşılık olarak NK hücrelerinin aktive edilemediği ve tümör kaynaklı eksozomların, adenozin indüksiyonu ile T hücrelerini baskıladığı da gösterilmiştir (125).

2.17. Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu

2.17.1. Diferansiyel Ultra Santrifüjleme

Diferansiyel santrifüjleme ilk kez Johnstone ve arkadaşları tarafından retikülosit doku kültürü ortamından eksozomları saflaştırılmak için geliştirilmiş bir yöntemdir. Hücre kültürü ortamından ya da kan, idrar ve amniyotik sıvısı gibi vücut sıvılarından eksozom izolasyonu için maksimum saflığın en çok elde edildiği yöntemlerden biridir (126). Prensibi merkezkaç kuvvetinin düşük hızdan yüksek hıza bağlı olarak oluşturduğu etkiye dayalıdır. Merkezkaç kuvvetinin hızı eksozom haricinde proteinler gibi küçük moleküllerinde pellet kısmında bulunabilmesi ya da merkezkaç kuvvetinin hızından kaynaklı olarak eksozomların yapısının tahrip olabilmesine olanak sağlar. Ekipmanı maliyetli ve saf eksozom elde etme oldukça zaman alıcıdır. Ayrıca kolay kullanımı ve fazlaca eksozom izolasyonu için bazı avantajlara da sahiptir (127). Diferansiyel ultra santrifüjleme, $300 \times g$ - $100.000 \times g$ aralığında yüksek hızda ve çok sayıda santrifüjleme döngüsü içerir. Santrifüj derecesi 4°C de çalıştırılır. Hücreler, hücre kalıntıları ve apoptotik cisimler, birbirinden farklı zaman aralıklarında ve farklı merkezkaç kuvvetleriyle ortamdan uzaklaştırılır. Son santrifüjleme işleminden sonra ($100.000 \times g$), süpernatant atılır ve pellette eksozomlar toplanır (Şekil 2.7.) (128).

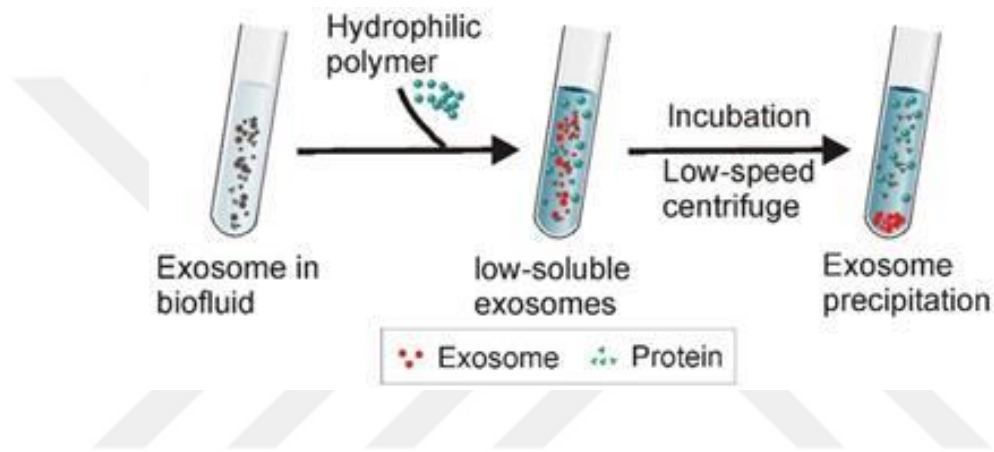


Şekil 2.7. Diferansiyel ultra santrifüj ile eksozom izolasyon şeması (129) tekrarlı santrifüjleme ve santrifüj hızına bağlı olarak izolasyon

2.17.2. Polimer Bazlı Eksozom İzolasyonu

Polietilen glikol (124) gibi su geçirgenliği olmayan polimerler, hidrofobik protein ve lipid molekülünü çöktürmede avantaj sağlayabilir. Düşük hızlı santrifüjleme veya

filtrasyonla birlikte kullanımında eksozom izolasyonu için eksozomal çözünürlüğü düşürebilir. Bu polimerleri kullanarak, oldukça kolay bir kullanım ve potansiyel olarak ise biyolojik aktiviteye etki etmeden nötr pH koşulları içerisinde bulundurarak saf eksozom eldesi için birçok avantaja sahiptir (130). Ticari olarak temin edilebilen polimer bazlı kitler kullanılır ve ultra santrifüjlemeyle birlikte uygulandığında yüksek oranlarda eksozom verimi sağlar. (Şekil 2.8.) Eksozom haricinde ortamda bulunan polimer moleküller veya proteinlerden kaynaklı kontaminasyon, polimer bazlı eksozom izolasyonunda görülebilecek sonuçlar arasındadır (131).

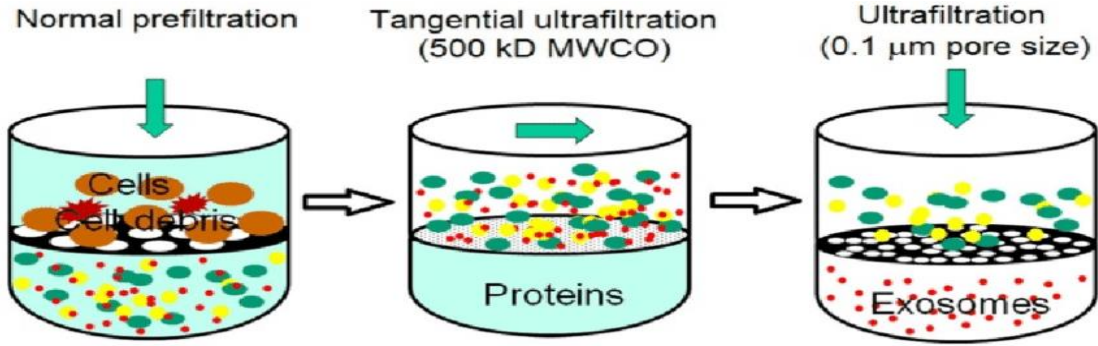


Şekil 2.8. Polimer bazlı eksozom izolasyonu Şeması. Polimer kullanarak ultra santrifüjleme ile izolasyonu (132)

2.17.3. Ultrafiltrasyon

Bu teknik boyut analizine dayalı bir yöntemdir. Akışkan olan moleküllerin belirli büyüklükte gözeneklere sahip bir filtreden geçebilme prosedürünü içerir. Eksozom izolasyonu için 0.8, 0.45, 0.22 ve 0.1 μm çaplarında gözeneğe sahip filtrelerle tekrarlı filtreleme aşamaları bulundurur ve böylece filtrenin gözenek boyutundan daha büyük parçacıkların filtrelenmiş sıvıdan aşamalı olarak uzaklaştırılmasıyla mümkün kılınır. Genelde tercih edilen ticari filtrelerin gözenek boyutu 0,1 μm olup ve düşük afiniteye içeren hidrofilik polimerlerden oluşturulur. (Şekil 2.9.) Bu yöntemle, protein kontaminasyon ve bazı küçük çaplı molekülü ayırt etmek mümkün olmayabilir ya da filtreden daha küçük yapılardaki eksozomların geçişine izin verilebilir (133). Ayrıca, özel ekipman gereksiniminin olmaması ve prosedürün basitliği, kısa süre içerisinde çok sayıda eksozomu yüksek oranlarda saflaştırma hızı ve ek reaktiflerin gerekli olmaması

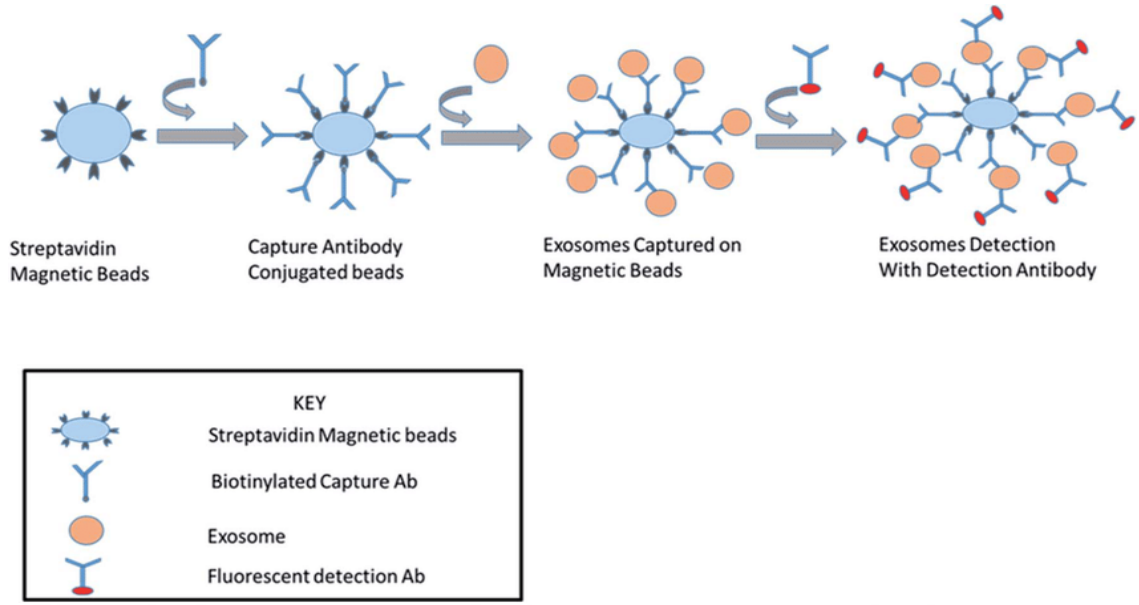
avantajları arasında yer alır. Filtreleme esnasında bazı moleküllerden kaynaklı olarak filtrenin tıkanması, saflaştırma oranında azalma olmasından kaynaklı olarak eksozom kaybına neden olabilir (134).



Şekil 2.9. Ultrafiltrasyon bazlı eksozom izolasyon şeması. Boyut analizine dayalı olarak küçük moleküllerin tutulması ve büyük boyutlu moleküllerin doğrudan geçmesi (135)

2.17.4. İmmünolojik Ayırma

İmmünolojik ayırma için birçok farklı yöntemler geliştirilmiştir. İmmüno-çip eksozomların hücre membranı üzerinde bulunan reseptörlerin kullanıldığı ayırma prensibine dayanır. Elde edilen eksozomlar DNA veya RNA izolasyonu için başka bir yöntem ya da cihaza gerek duymadan tercih edilebilir (136). Ayrıca immünolojik analizlerde eksozomun içerisinde bulunan proteinler özel bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Eksozom izolasyonu; antikor ile kaplanmış manyetik boncukların, eksozomları antijen sunan hücreler tarafından ayrılmanın sağlanması için önemli bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Koşulları sağlayacak eksozom membran markörü seçmek, yapılan izolasyonun başarılı bir sonuç vermesi için öncelikli ve önemli bir adımdır (137). Eksozomların zarlarındaki CD81, CD9 ve CD63 gibi önemli tetraspanin ailesi belirteçleri etkili bir immün yakalama sunmaktadır (138). Eksozom izolasyonunda kullanılan bilinen yöntemlerin aksine, antikor ile kaplanmış manyetik boncuklar vücut sıvılarından elde edilen eksozom izolasyonu için doğrudan kullanılabilir ve böylece diğer yöntemlerde kullanılan santrifüjleme adımlarını azaltarak zamandan tasarruf sağlanabilir (Şekil 2.10.). Ancak büyük miktarlardaki eksozom izolasyonu için uygun değildir. Manyetik boncuk ile kaplanmış eksozomları; flow sitometrisi, Western blotlama veya elektron mikroskopuyla analizi mümkündür (139).



Şekil 2.10. İmmünoafinite bazlı eksozom izolasyonunun şeması. Antikor ile kaplanmış olan manyetik boncukların, eksozomları antijen sunan hücreler ile tutunup yakalanması (140)

2.17.5. Mikroakışkan Tabanlı İzolasyon Teknikleri

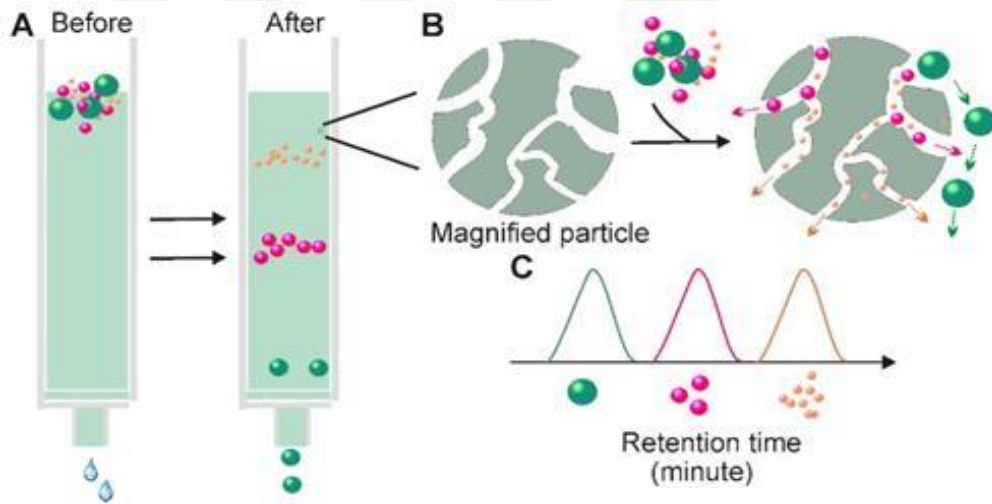
Mikroakışkanlar, mikro boyutlu kanallara sahiptir ve bu kanalları kullanarak mikrolitreden mililitreye kadar değişkenlik gösterebilen düşük miktarlarda sıvıları yönlendirmek için kullanılan bir metottur. Mikroakışkanlar, hücre kültürü ortamında bulunan eksozomların immüno-yakalanmasının da, miktarının belirlenmesinin de ve karakterizasyonunun da kolaylık sağlar (141). Liang ve arkadaşları tarafından bir çift filtrasyona sahip mikroakışkan cihaz geliştirilerek moleküllerin boyut farklılıklarından yararlanıp mesane kanseri olan hastalardan alınan idrar örneği ile hem EV'lerin izolasyonunu gerçekleştirmişler hem de ölçülmesini sağlamışlardır. EV'leri ölçebilmek için mikro plakalar ve mikroçipler geliştirilerek yöntemin, ultra santrifüjleme işlemine göre daha iyi sonuçlar elde edebileceğini gözlemlemişlerdir. Böylece ultra santrifüje göre daha az maliyetli ve daha hızlı sonuç alımı mümkün olmuştur (142).

Mikroakışkan tabanlı eksozom izolasyonu olmasına rağmen boyut analizine dayalı bir prensip içerdiği için eksozom dışında protein gibi küçük boyutlu moleküller de gözeneklerden rahatlıkla geçebileceklerdir ve böylece saf bir eksozom eldesi olmayacağından oldukça önemli bir dezavantaj sağlamaktadır (143).

2.17.6 Jel Filtrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi, farklı boyutlara sahip molekülleri birbirinden ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik ayrıca boyut dışlama veya jel dışlama olarak da bilinmektedir. Moleküller farklı boyutlara sahip gözenekli bir matris içeren hareketli ve sabit faz arasındadır. Bu iki faz arasında kalan moleküller kolon içerisinde aşağıya akış prensibi ile birbirlerinden ayrılır. (Şekil 2.11.) Nispeten küçük çaplı moleküller jel boncuklar içerisinde yer alan gözenekler ile tutulur ve daha büyük boyutlara sahip moleküller ise bu gözeneklere takılmayıp doğrudan kolondan ayrılır. Bu şekilde, eksozom diğer farklı boyutlardaki moleküllerden ayrılabilir (144).

Jel filtrasyonda kullanılan matriks agaroz (Sephacrose), dekstran (Sephadex) gibi doğal ya da poliakrilamid (Sephacryl, BioGel) gibi sentetik polimerler yaygın olarak tercih edilir (145).



Şekil 2.11. Jel Filtrasyon Kromatografisi bazlı eksozom izolasyonu şeması. (A) gözenekli filtreden moleküllerin boyutlarına göre ayrımı (B) küçük boyutlu moleküllerin gözeneklere girip daha büyük boyutta moleküllerin gözeneklere girmeden doğrudan geçmesi (C) boyuta göre ayrımı (146)

Tablo 2.2. Eksozom izolasyon tekniklerinin çalışma prensibi, avantaj ve dezavantajı

İzolasyon Yöntemi	Çalışma prensibi	Avantajları	Dezavantajları
Diferansiyel Ultra santrifüjleme	Yöntem, tekrarlı ve belirli düzeylerde hıza bağlı santrifüjleme işlemine dayalıdır.	Eksozomları biyolojik sıvı ve ortamlardan ayırt etmek için oldukça yaygın olarak kullanılır.	Bu yöntemde; plazma ve serum gibi biyolojik sıvılar kullanıldığında elde edilen eksozom beklentiden daha düşük oranlardadır.
Polimer Bazlı Eksozom İzolasyonu	Yöntem, biyolojik sıvı ve polimer içeren bir çözelti ile çökmesini sağlayıp düşük hıza sahip santrifüjlemeyle birlikte izolasyon işlemine dayalıdır.	Eksozomların izolasyonu sırasında nötr pH'ın kullanılması avantaj sağlar.	Bu yöntemde; elde edilmesi istenilen ürün saf eksozom iken, eksozom dışında farklı moleküllerle birlikte ayırım söz konusudur.
Ultrafiltrasyon	Yöntem, filtreme işlemi ile küçük moleküllerin filtrede kalması ve daha büyük moleküllerin ise filtreden doğrudan geçme prensibine dayalıdır.	Eksozomların, filtrasyon ile diğer moleküllerden kolayca ayrılmasını sağlar.	Bu yöntemde, eksozomlar filtredeki membrana yapışabilir ve böylece daha az eksozom eldesini mümkün kılar. Diğer bir dezavantajı ise filtreme esnasında ekstradan bir güç uygulandığında eksozomların deforme olma eğilimini artırır.
İmmünolojik Ayırma	Yöntem, Spesifik antikorlara bağlanan manyetik boncuklar ile eksozomları elde etme yöntemidir.	Eksozomların veya eksozomların alt tiplerini ve eksozomal proteinlerin belirlenmesinde oldukça önem sağlar.	Bu yöntemde, yüksek miktara sahip eksozom eldesi mümkün olmaya bilir. Ayrıca izole edilen kesecikler işlevsel özelliklerini kaybedebilirler.
Mikroakışkan Tabanlı Eksozom İzolasyonu	Yöntem, Mikro boyutlu kanallara sahiptir ve bu kanalları kullanarak düşük miktarlarda sıvıları yönlendirmek için kullanılan bir metottur.	Eksozomların izolasyonu, ultra santrifüje göre daha az maliyetli ve daha hızlı sonuç elde etmek mümkündür.	Bu yöntemde, mikroakışkan bir cihazda olmasına rağmen ayırmada boyut farklılıklarından yararlanıldığı için saf eksozom eldesi düşüktür.
Jel Filtrasyon Kromatografisi	Yöntem, Farklı boyutlara sahip molekülleri birbirinden ayırmak için kullanılan bir yöntemdir.	Eksozomların boyutlara göre ayrımını mümkün kılar.	Bu yöntemin maliyeti yüksektir.

2.18. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünya genelinde kanser sonrası ölümler içerisinde en yaygın rastlanan türüdür ve bronş epitelinden köken almaktadır. 60 yaş ve üzeri kadınlarda ve erkeklerde akciğer kanseri sıklıkla görülmektedir. Akciğer kanserinin gelişimi sigara kullanımı ile yakından ilişkilidir. Ancak akciğer kanseri sigara kullanımı dışında da genetik ve hava kirliliği gibi birçok etkene bağlı olarak gelişim sağlayabilir (147).

2.18.1. Epidemiyoloji

2020 yılında yapılan Dünya Sağlık Örgütü'nün kanser üzerine yapmış olduğu çalışma verileri incelendiğinde Dünya genelinde akciğer kanseri hastalarının oranı oldukça artmış olup bu nedenle ölümlerde oldukça yüksektir ve sigara içen toplumlarda paralel bir şekilde yükseliş olup akciğer kanseri de oldukça yaygın olarak görülmektedir (148). 2018 yılında yapılan araştırmalara göre Global kanser istatistikleri yılda 18.1 milyon güncel olarak tanımlanan kanser vakalarının 2.09 milyonluk kısmını akciğer kanserinin oluşturabileceğini ve kanser tanısı sonrası ölümlerin de hemen hemen 1.76 milyonunu kapsayan kısmının ise akciğere kanseri sonrası ölümün oluşturabileceğini tahmin edilmektedir. Bu veriler doğrultusunda kanser türlerinden kadınlarda aynı zamanda da erkeklerde yoğun olarak karşılaşılan kanser çeşidi akciğer kanseridir. Ancak erkekler de kadınlara oranla daha sık karşılaşılan kanser kaynaklı ölümlerin öncülleri arasında yer alır. Dünya üzerinde sigara içimine bağlı olarak akciğer kanseri ölümlerin %80'i nüfusla eş değer bir şekilde yoğun olarak görüldüğü ülkeler Çin, Endonezya, Kuzey ve Doğu Afrika ülkeleridir (149). Türkiye bakıldığında yapılan kanser araştırmalarında Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) akciğer kanseri istatistiklerine göre erkeklerde yaşa bağlı olarak standartlaştırılmış artışları 2012 -2016 yılları arasında sırasıyla %60,4, %59,3, %52,5, %52,5 ve %57,7 oranlarında yer almaktadır ve kadınlarda ise standartlaştırılmış artışları; 2012-2016 yılları arasında sırasıyla %9,3, %10,0, %8,7, %9,0 ve %9,8 oranlarında yer almaktadır. Ülkemizde yaşla birlikte bu oran kadınlarda en fazla 75-79 yaş aralığında tespiti sağlanmışken, erkeklerde ise 85-89 yaş aralığında olarak bildirilmektedir. Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırıldığında en sık rastlanan türü adenokarsinomdur ve küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) ile küçük hücreli akciğer kanseri (101) de beraberinde gelmektedir (150).

2.18.2. Histolojik Sınıflandırma

Akciğer kanseri Dünya Sağlık Örgütü araştırmalarına göre histolojik ayrımı, gelişimsel hızına, metastazın zamanlamasına, kemoterapi ve radyoterapiye karşı verdiği cevaba bağlı olarak ayrılır (151). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri şeklinde ikiye ayrılır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri ise üçe ayrılır; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur (Tablo 2.3.). Akciğer kanserinin bütününden yaklaşık olarak % 83'ü küçük hücreli olmayan ve yaklaşık olarak %16'sını ise küçük hücreli akciğer kanseri oluşturmaktadır (152).

Tablo 2.3. Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması

Akciğer Kanseri Hücreleri	
Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
Adenokarsinom; akciğer kanser hastalarında en yaygın olarak görülen türü ve çoğunlukla sigara kullanmayan kadın hastalarda görülür. Çoğunlukla periferik yerleşimlidir.	Sigara kullananlarda görülmektedir. Çoğunlukla santral yerleşimlidir. Aralarında en kötü prognozlu türdür.
Skuamöz Hücreli; en sık görülen ikinci akciğer kanseri ve genellikle de sigara kullanan hastalarda görülür. Çoğunlukla santral yerleşimlidir.	
Büyük Hücreli; akciğer kanseri hastalarda nadiren görülen türüdür. Çoğunlukla periferik yerleşimlidir.	

HTB-54, Calu-1 olarak da tanımlanmaktadır. Epitelyal morfolojiye sahip bir hücre dizisidir (128). İnsan akciğer karsinom hücre hattıdır. Beas-2B, kanserli olmayan insan otopsilerinden alınan normal bronş epitel hücre dizisidir. A549, akciğer adenokarsinom hücre hattıdır. Epitelyal morfolojiye sahip bir hücre dizisidir (153).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Tablo 3.1. Kullanılan malzemeler

Kullanılan Malzeme	Marka
MyeloCult™ H5100 medium	Stemcell, Cat.No. 05150
RPMI- 1640 medium	Hyclone,USA, Cat. No.SH30027.01
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Cat. No. 67685
Fetal Bovin Serum (FBS)	Sigma-Aldrich,USA, Cat. No. F9665
Trypsin-EDTA Solüsyonu (1X)	Hyclonde, USA,Cat.No. SH30042.01
Penicilin-Streptomycin	Gibco, Cat.No. 15070063
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Hyclonde, USA,Cat.No. SH30588.01
WST-i	Roche,Cat. No. 50015944001 Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar

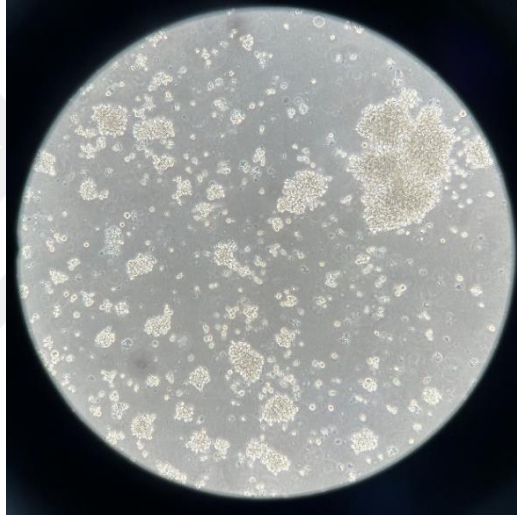
Cihaz	Marka
Sınıf II biyogüvenlik kabini	Nu-Aire,USA
CO2'li 37 °C inkübatör	Nu-Aire,USA
Işık mikroskobu	Nikon,Eclipse E200, Japonya
Faz-kontrast ışık mikroskobu	Nikon, TS100, Japonya
Santrifüj (soğutuculu)	Hettich, Almanya
Ultrasantrifüj	Beckman Coulter,USA
Thermoshaker(incubator shaker)	Gerhardt,
NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre	Thermo Scientific
-80 Buz dolabı (Derin dondurucu)	Hettich, Almanya
-20 Buz dolabı (Derin dondurucu)	Arçelik, Türkiye
+4 (Buzdolabı)	Arçelik, Türkiye
Absorbans mikropilaka okuyucusu (Thermo Fisher Scientific Oy Ratastie 2)	Thermo Scientific,Firlandiya

3.3. Hücre Kültürü

Yapmış olduğumuz çalışmada, NK-92 insan lösemi hücre hattı kullanıldı. NK-92 hücreleri İstanbul Üsküdar Üniversitesi laboratuvarlarında -196 °C sıvı azot içerisinde muhafaza edilen, Prof. Dr. Sevim IŞIK' a ait hücre stoklarından elde edilmiştir.

3.3.1. NK-92 Hücre Büyütülmesi ve Çoğaltılması

Çalışmada insan NK-92 hücre hattı, %10,5 horse serum, %5 FBS, %1 pen/strep ve 100 UI/ml IL-2 (Proleukin) (Chiron Corporation) ile takviye edilmiş MyeloCult medyum ile kültür ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂'de kültür yapılmıştır (Resim 3.1.).



Resim 3.1. NK-92 hücreleri mikroskop görüntüsü (x100)

3.3.2. NK-92 Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

Hücreler büyütülüp, çoğaltıldığında pasajlama işlemi uygulandı. NK hücreleri süspanse hücrelerdir. Bu nedenle, flaskın içerisindeki hücrelerin tamamını alabilmek için birkaç kez homojenize edildi ve falkona toplandı. Sonrasında 1750 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı, tüpün alt tabakasında kalan pellet ise 1 ml besiyer ile süspanse edildi ve hücre yoğunluğuna göre besiyer eklenerek inkübasyona bırakıldı. Çalışma süresince hücrelerin ara ara çöktürülüp sayım yapıldı. Hücreler yeterli sayıya ulaşana kadar pasaj yapıldı ve 24-72 saat serumsuz besiyer ortamında inkübeye bırakıldı. İnkübe süresi tamamlanınca besiyerleri, eksozom için çöktürülüp toplandı geriye kalan

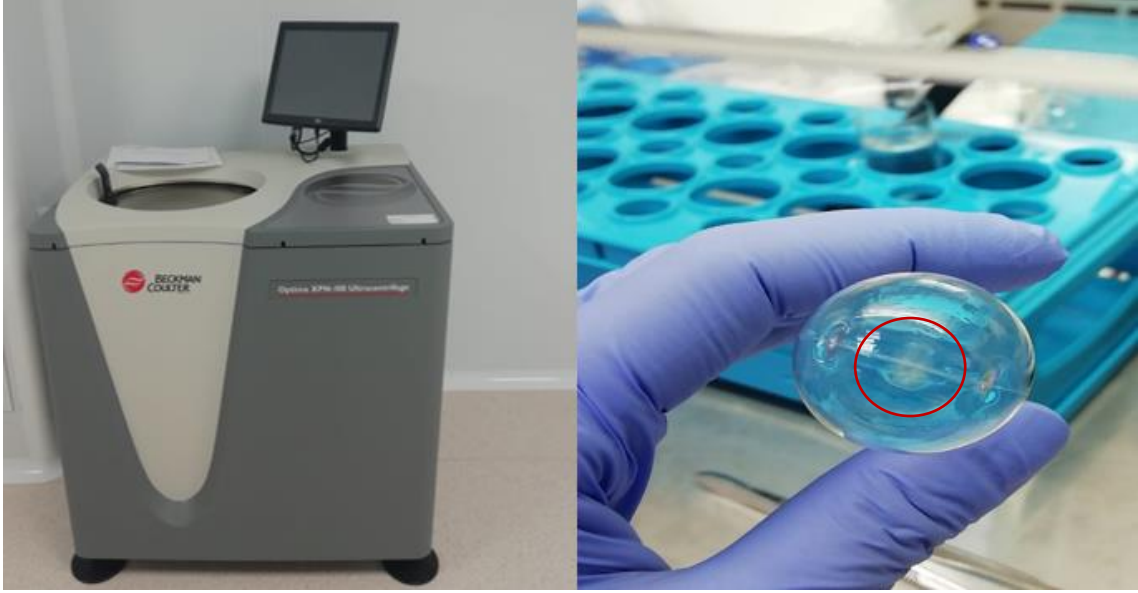
pellet kısmındaki NK hücrelerini ise stoğa almak için %10 DMSO ve %90 FBS içeren çözelti ile süspanse ederek kriyotüp içerisinde 2 saat -20°C, 1 gece -80°C ve uzun süreli olarak -156°C’ de saklayabilmek için donduruldu.

3.4. NK-92 Hücre Hattının Akış Sitometride Analizi

1. Her bir akış sitometrisi tüplerine 50 µl hücre konuldu.
2. Bir tüpte sadece hücre, diğer tüplere ise mix (CD56, CD16 ve CD3) ve CD107 a antikorları eklendi.
3. Antikorlar eklendikten sonra 30 dk karanlık ortamda antikorların çalışması için bekletildi.
4. 1850 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant kısmı atıldı, pellet üzerine 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklendi.
6. 1850 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant kısmı atıldı, pellet üzerine 300 µl hücre yıkama solüsyonu eklendi ve akış sitometride ölçüm yapıldı.

3.5. NK-92 Hattı Kültürü Besiyerinden Eksozomların İzolasyonu

NK-92 hücreleri, hücre hattına bağlı olarak 12-72 saat serumsuz ortamda inkübe edildikten sonra besiyeri 300×g'de 10 dakika, 2000×g'de 30 dakika seri santrifüjleme yapılmasının ardından pellet uzaklaştırıldı ve hücrenin süpernatantı fitreden geçirilerek hücre kalıntıları, daha büyük veziküllerden ayırma işlemi yapıldı. Eksozom dışındaki diğer moleküllerden tamamen ayırabilmek için 10.000×g'de 70 dakika santrifüjleme yaparak süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Pelleti PBS ile homojenize edildi ve tekrar 10.000×g'de 70 dakika santrifüjleme işlemi yaparak yıkama yapıldı. Sonrasında süpernatantı ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet kısmında eksozom yer almaktadır. Eksozom varlığına göre PBS ile sulandırarak tüp içerisindeki eksozom toplandı (Resim 3.2.) ve uzun süreli kullanım için -80°C de muhafaza edildi.



Resim 3.2. Ultra santrifüj cihazı ve izole edilen eksozomların tüp içerisinde görünümü

3.6. Eksozomların Karakterizasyon ve Boyutlarının Tespiti

3.6.1 Eksozomların Nanodrop Spektrofotometre ile Tanımlanması

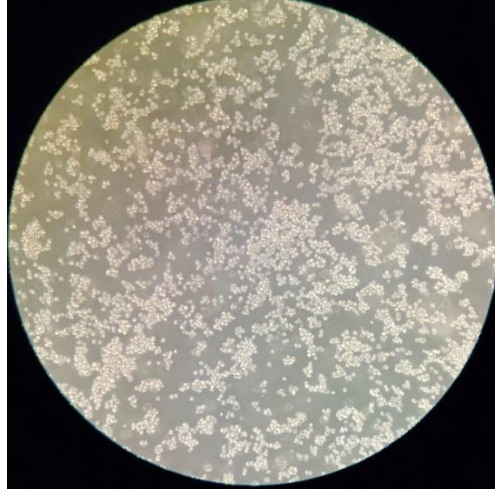
İzole edilen eksozomdan 100 μ l alınır ve bir kuyucuğa 50 μ l PBS diğer kuyucuğa ise 50 μ l eksozom eklenerek nanodrop cihazında eksozomun protein analizi yapıldı.

3.6.2. Zeta Potansiyel Ölçümleri ve Partikül Büyüklüğü

Eksozomların partikül boyutlarını ve zeta potansiyellerinin belirlenmesinde Malvern NanoZS aparatı kullanıldı. PBS ile seyreltilen eksozomlar ölçüm için hazırlandı ve küvetlerine yerleştirildi. Ölçüm küvetlerinde cihazdaki gerekli görülen düzeltmeler sonrasında partikül büyüklükleri yapıldı ve PS gibi hidrodinamik çap (hydrodynamic diameter) uygulandı. Ölçümlerin doğruluğu için birden çok kez tekrarlanarak sonuçlar alınmıştır.

3.7. K562 Hücre Hattı Kültürü

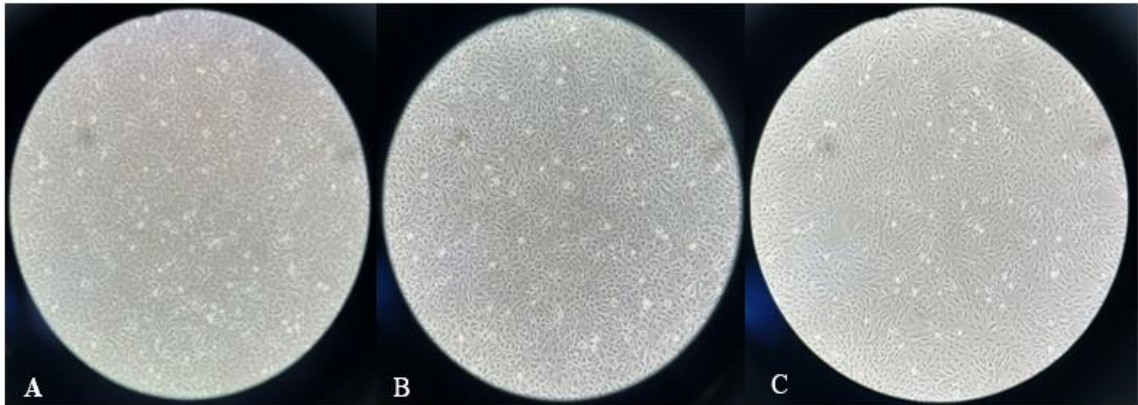
Çalışmada, K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattı (ATCC) American Type Culture Collection kullanıldı. %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin- streptomisin solüsyonu (100 U/ml penisilin, 100 lg/ml streptomisin), içeren RPMI kültür ortamında 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli atmosferde inkübe edilerek kültür edildi (Resim 3.3.).



Resim 3.3. K562 hücre hattının mikroskop görüntüleri (x100)

3.8. Akciğer Hücre Hatlarının Kültürü

Çalışmada, A549 kanser hücre hattı, HTB54 kanser ve Beas-2B sağlıklı hücre hattı (ATCC) American Type Culture Collection kullanıldı. A549, HTB54 ve Beas-2B hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin- streptomisin solüsyonu (100U/ml penisilin, 100 lg/ml streptomisin), içeren RPMI kültür ortamında 37°C’de %5 CO₂ içeren nemli atmosferde inkübe edilerek kültür edildi (Resim 3.3.).



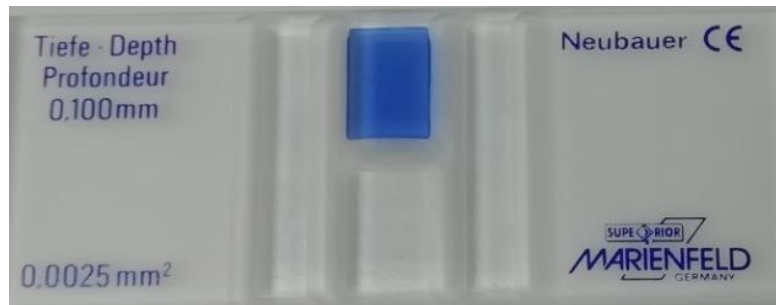
Resim 3.4. A) A549, B) HTB54 ve C) Beas-2B akciğer hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (x100)

3.9. Hücre Sayımı

Kültürü yapılan hücrelerin bir sonraki uygulamaya geçmeden önce plaklara ekimi için her bir kuyucuğa belirlenen oranlarda hücreler ekildi. Bu oranları belirleye bilmek için ise hücreyi pasajladıktan hemen sonrasında hücreyi tekrar ekmeden hemen önce Tripan Mavisini içeren boya ile Thoma Lamında (Iso Lab) hücre miktar sayımı yapıldı. Thoma lamı metodu; mikroskopta 0,1 mm³ hacmi olan tabla ile sayım yapıp ve sonrasında toplam hücre sayısını hesaplayabilmek için formül kullanarak numunenin 1 ml'sinde bulunan hücre sayısını belirleme esasına dayanmaktadır.

Sayım için; santrifüj sonrası süpernatant atılıp, peletteki hücrenin üzerine 1 ml besiyer verildi ve homojenize edildi. Hücre süspansiyonundan 10 µl ve 10 µl Tripan Mavisinden alınarak homojenize edildi. Elde edilen karışımdan 10 µl alınarak Thoma Lamına yükleme yapıldı. Sonrasında ise ışık mikroskobunda sayım gerçekleştirildi. Tripan mavisini ile boyanan hücreler ölü, boyanma gözlemlenmeyen hücreler ise canlı hücreler olarak belirlendi. Sadece boyayı içine almayan hücreler canlı olarak belirlenerek sayımı yapıldı. Thoma Lamındaki 16 karede sayıldı ve hesaplama yapıldı. Yapılan hesaplama sonrasında ekim yapılacak her bir kuyucuğa hücre miktarı belirlendi (Resim 3.4.). 1 ml de ki hücre konsantrasyonunu belirlemek için;

Sayılan Hücre Sayısı × Dilüsyon Katsayısı × 10.000 = 1 ml de Hücre Konsantrasyonu formülü kullanılmıştır.



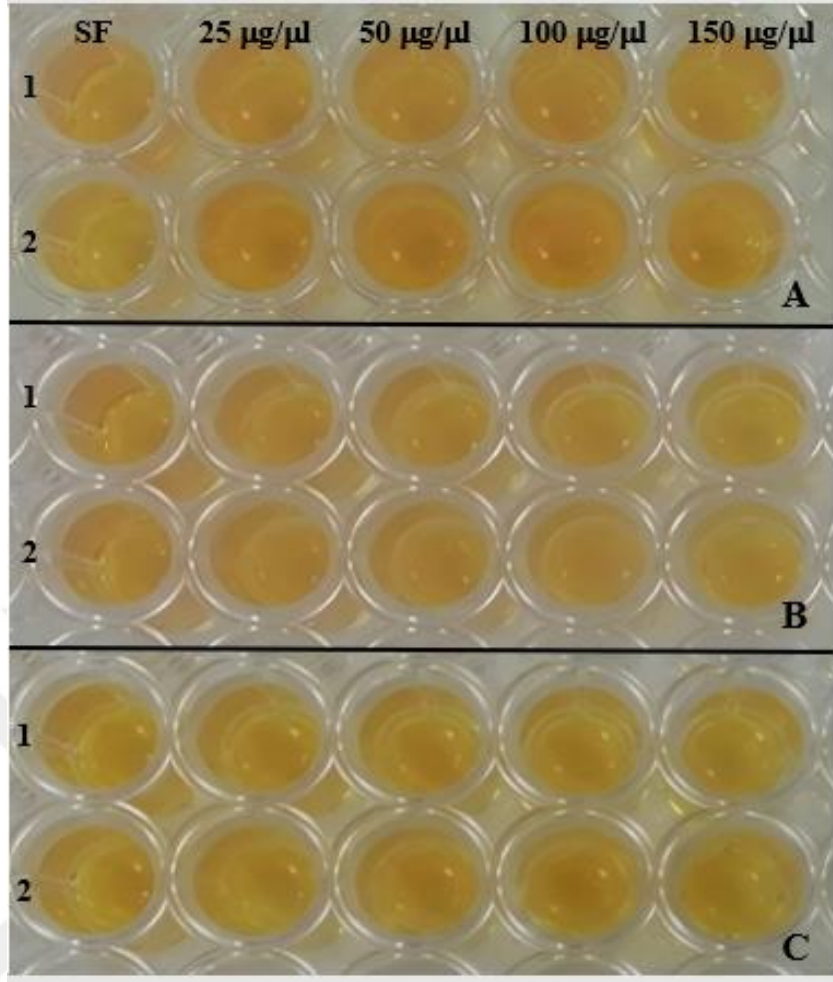
Resim 3.5. Thoma lamına 1/1 oranında tripan mavisini ve süspansiyon hücre verilerek hücre sayımı için hazırlanması

3.10. Hücrelere Eksozom Uygulanması

K562 hücre hattı 96'lı kuyucuklara 1*100/ml her bir konsantrasyonda iki adet tekrar olacak şekilde ekildi ve hücreler kümelenmeye başlayana kadar inkübe edildi. Kültürü edilen K562 hücre hattı, biri kontrol grubu (SF) ve diğer gruplarda ise 4 farklı konsantrasyon (1*25, 2*50, 3*100 ve 4*150) olacak şekilde hücreler üzerine eksozom verildi. 48 saat 37°C ve 5% CO₂ koşullarında inkübe edildi. A549, HTB54 ve Beas2B hücre hatları ise ekim yapıldığı flasklar içerisinde %90 konfluens olunca, hücreler ayrı ayrı 1*100/ml olacak şekilde 96'lı hücre kuyucuklarına her bir konsantrasyondan iki adet tekrar olacak şekilde ekildi ve %70 konfluens olana kadar inkübe edildi. Sonrasında kültürü edilen kanser ve sağlıklı hücreleri biri kontrol grubu (SF) ve diğer gruplarda ise 4 farklı konsantrasyonlar da (1*25, 2*50, 3*100 ve 4*150) hücreler üzerine eksozom verildi ve 48 saat olacak şekilde 37°C ve 5% CO₂ koşullarında inkübe edildi.

3.11. Sitotoksosite Testi

Suda çözüne bilen tetrazolyum tuzları yani Wst'ler de MTT de olduğu gibi tetrazolyum tuzları ailesinin bir üyesidir. Günümüzde diğerlerinde daha sıklıkla kullanılabilecek olan ise (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum yapısına sahip Wst-1'dir. Hücrelerin canlılığı ise WST-1 yöntemi ile değerlendirilecektir. K562 hücre hattı haricindeki diğer hücre hatlarına 96'lı kuyucuktaki kültür vasatının medyumunu ortamdan uzaklaştırmadan 1 µg/ml içeren süspanse çözeltiyi çözdürüp homojen bir şekilde dağıtılarak hücrelerin üzerine 10'ar µl eklendi. Boyanın hücre içine alınabilmesi için 37°C'de ve %5 CO₂'de 90-120 dk süre ile inkübe edildi. Sonrasında ise çalkalayıcıda 1 dk boyunca çalkalayıp homojen olarak dağılması sağlanır. (Resim 3.5.) Renkteki değişim kolorimetrik bir okuyucu olan spektrofotometre ile 460 nm'de okutuldu. K562 hücre hattına ise elde edilen eksozom verilip 48 saatlik inkübasyon sonrasında mikroskop altında thoma lamı ile hücre sayımı yapılarak sitotoksitesite belirlendi.

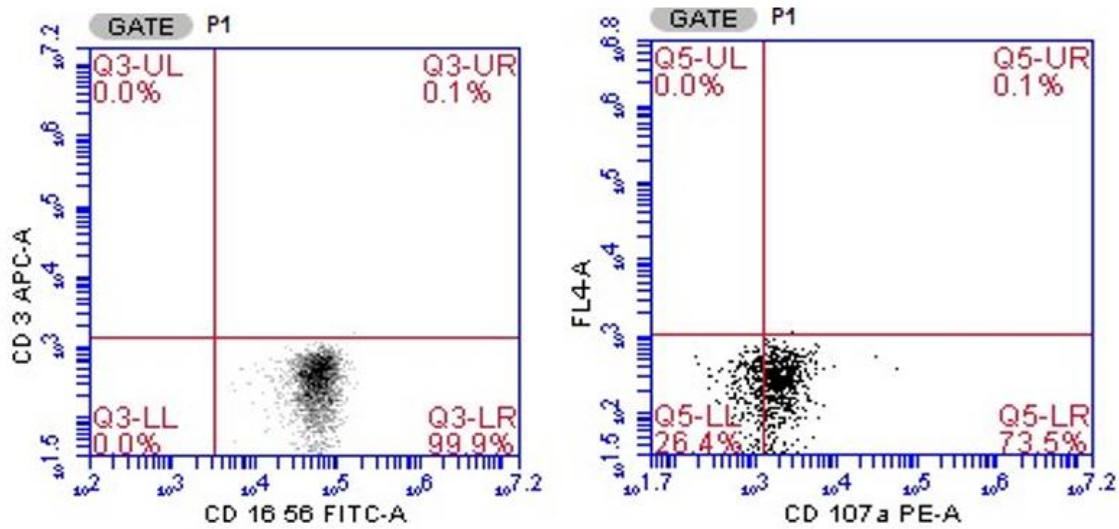


Resim 3.6. A) A549- eksozom B) HTB54- eksozom C) Beas2B- eksozom WST-1 süspanse boyası eklenip inkübasyona bırakıldıktan sonraki görüntüsü

4.BULGULAR

4.1. NK-92 Hücre Hattının Akış Sitometri Analizi

Akış sitometri; hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriğini ele alarak sitoplazmik granülsitesi bakımından analiz edilmesidir. Bu amaç doğrultusunda hedeflenen yapı veya hücreyi flüoresan özelliği taşıyan bir madde ile işaretli bir antikor ya da özel bir boya kullanılarak önce işaretleyip sonrasında akış sitometride değerlendirmeleri yapılmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 1. NK-92 hücresinin akış sitometri analizleri

4.2. Eksozomların Boyut ve Karakterizasyonlarının Belirlenmesi

4.2.1. Eksozomların Nanodrop Spektrofotometre ile Tanımlanması

Düşük miktarlarda elde edilen nükleik asit ve proteinlerin miktarları nanodrop spektrofotometre ölçümü yapılarak, hücreye verilecek olan eksozom konsantrasyonları hesaplamalarla belirlendi. Nanodrop da 0,93 mg/ml olarak ölçüm yapılmıştır.

4.2.2. Zeta Potansiyel Ölçümü ve Partikül Büyüklüğü

Serumsuz kültür ortamından elde edilen NK-92'nin eksozomları boyut ve zeta potansiyel ölçümüyle karakterize edildi. Eksozomların (Exo) boyutu 122.0 nm ölçüldü (Şekil 4.2.).

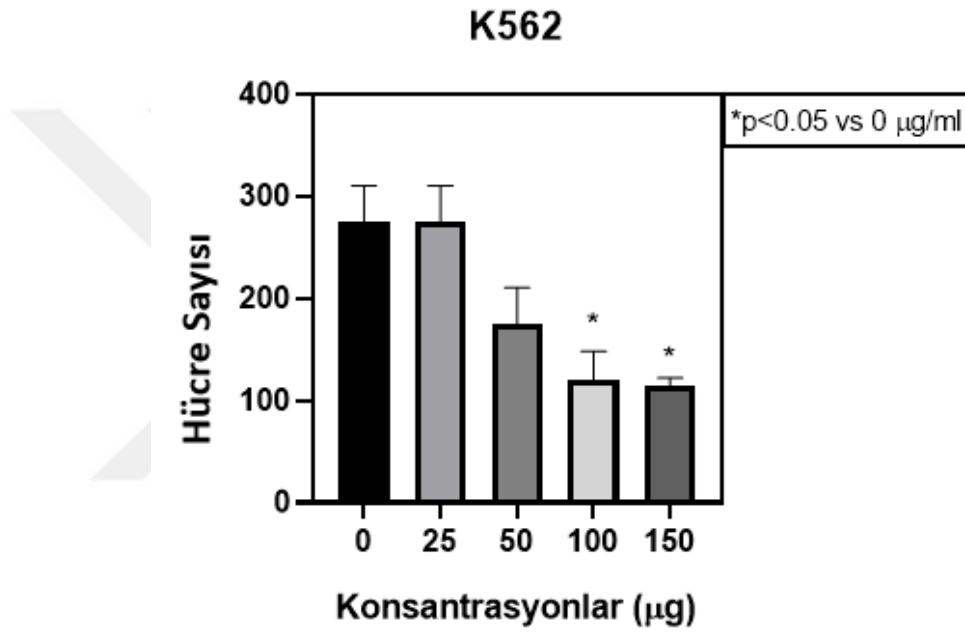


Şekil 4. 2. Eksozomların boyut büyüklükleri grafiği

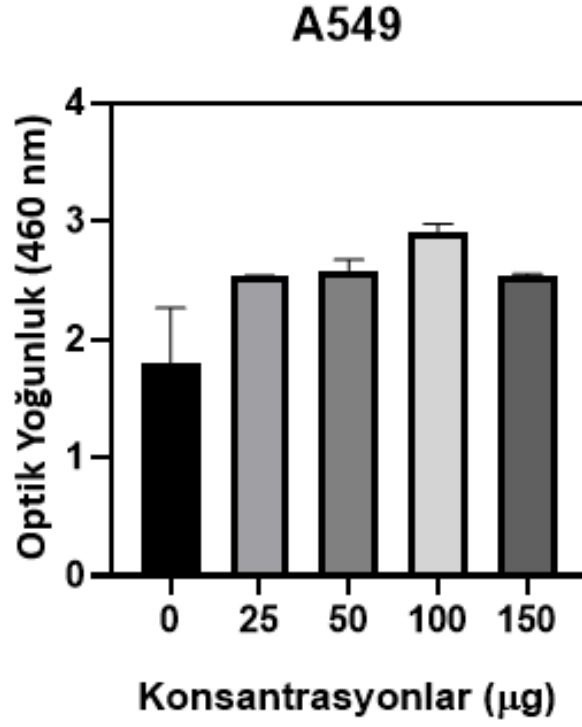
4.3. Hücre Canlılığı Analizleri

Doğal immün hücresi olan NK-92 hücre hattından elde edilen eksozomların A549, HTB54 akciğer kanseri hücre hatları ve Beas2B akciğer sağlıklı hücre hattı üzerindeki doza bağlı olarak hücre proliferasyonuna olan etkileri değerlendirebilmek için WST-1 deneyi yapılmış ve Spektrofotometre ölçüm cihazında absorbans değerleri bulunmuştur. A549, HTB54 akciğer kanseri hücre hatları ve Beas2B akciğer sağlıklı hücre hattı üzerindeki doza bağlı olarak hücre proliferasyonuna olan etkileri değerlendirebilmek için öncelikle K562 lösemi hücresine farklı konsantrasyonlarda eksozom verildi ve hücre canlılığına bakıldı. K562 hücresine verilen eksozom konsantrasyonları literatüre bakılarak belirlenmiş ve (SF, 1*25, 2*50, 3*100 ve 4*150) uygulanan dozlar sonucunda 100 µg/µl ve 150 µg/µl de hücre canlılığının %50 oranında azaldığı belirlenmiştir. Böylece farklı konsantrasyonlarda ki eksozom, K562 hücre hattı üzerinde proliferasyonu baskılayıcı konsantrasyonu 100 µg/µl ve 150 µg/µl olarak belirlendi. Hücre proliferasyondaki yükselişi 48. saat sonrasında % lik üzerinden hücre canlılığı oranı ile verilmiştir. Buna bağlı olarak; 100 µg/µl ve 150 µg/µl yoğunluktaki dozlarda,

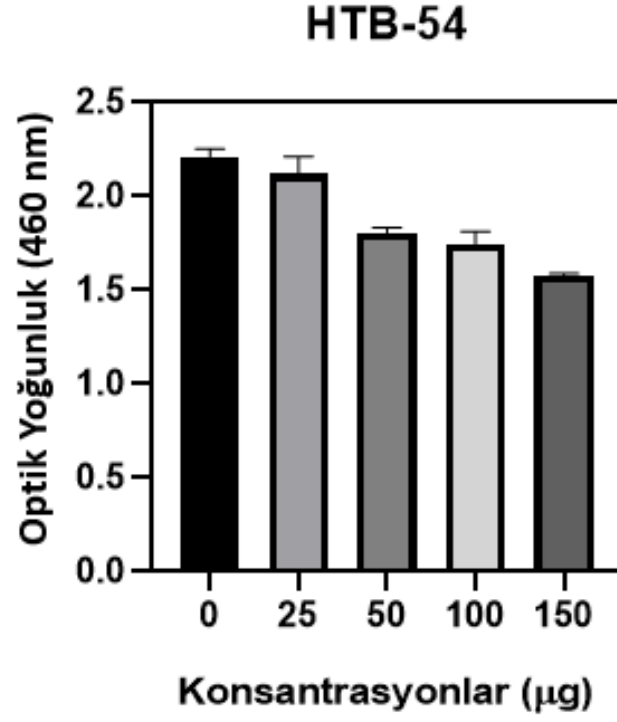
48. saat sonrasında A549 kanserli hücre hattında anlamlı bir ölüm gözlenmez iken, HTB54 kanser hücre hattında ve Beas2B sağlıklı hücre hattında ~%30 oranlarına sahip ölü hücre görülmektedir. Doz miktarı artışına göre her üç hücre grubunda da ölüm oranlarında farklılıklar gözlemlenmektedir. Belirlenen konsantrasyonlar sonrasında diğer hücre hatlarına eksozom verildikten sonra WST-1 deneyi yapılmıştır. Bu deneyden sonra absorbans ölçümlerden elde edilen hücre proliferasyon grafiği Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’de verilmiştir.



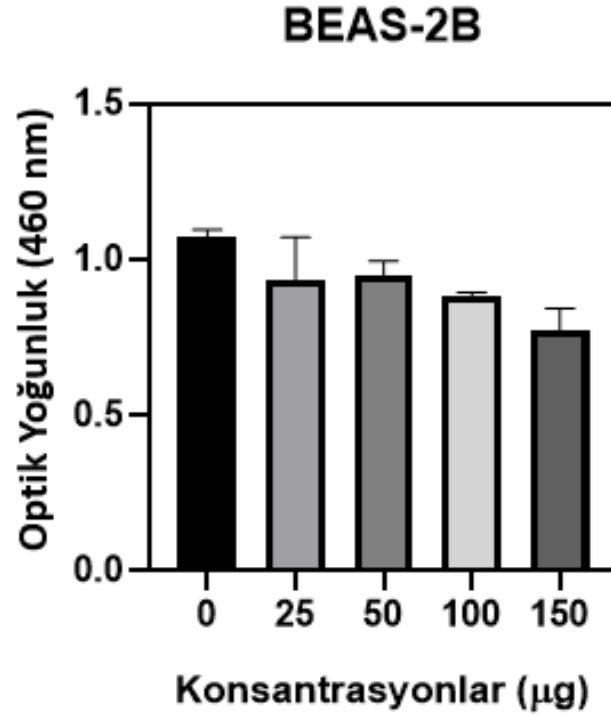
Şekil 4. 3. K562 hücre hattında eksozomun 48 saatlik hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü varyans analiz (One-wayanalysis of variance, ANOVA) ve Kruskal-Wallis testi uygulandı, anlamlılık görüldüğünde gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi uygulanarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerde ‘prism 8’ istatistik programı kullanıldı (GraphPad Software, Inc, ABD).



Şekil 4. 4. A549 hücre hattında eksozomun 48 saatlik hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü varyans analiz (One-wayanalysis of variance, ANOVA) ve Kruskal-Wallis testi uygulandı, anlamlılık görüldüğünde gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi uygulanarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerde 'prism 8' istatistik programı kullanıldı (GraphPad Software, Inc, ABD).



Şekil 4. 5. HTB54 hücre hattında eksozomun 48 saatlik hücre proliferasyonu üzerine etkileri Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü varyans analiz (One-wayanalysis of variance, ANOVA) ve Kruskal-Wallis testi uygulandı, anlamlılık görüldüğünde gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi uygulanarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerde ‘prism 8’ istatistik programı kullanıldı (GraphPad Software, Inc, ABD).



Şekil 4. 6. Beas2B hücre hattında eksozomun 48 saatlik hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü varyans analiz (One-wayanalysis of variance, ANOVA) ve Kruskal-Wallis testi uygulandı, anlamlılık görüldüğünde gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi uygulanarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerde ‘prism 8’ istatistik programı kullanıldı (GraphPad Software, Inc, ABD).

Yapılan çalışmalar sonucunda, veriler normal dağılıma sahip olma düzeylerine bakıldı. Elde edilen bulgular doğrultusunda tek yönlü varyans analiz (One-wayanalysis of variance, ANOVA) ve Kruskal-Wallis testi uygulandıktan sonra anlamlılık görülen gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi uygulanarak belirlenmiştir. Her test grubu ve uygun olarak kabul edilen kontrol grupları arasında karşılaştırılma yapıldı. Yapılan karşılaştırmalar sonrasında, 0.05’ten daha küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edildi ve işaretlemeye belirtildi. İstatistiksel analizlerde ‘prism 8’ istatistik programı kullanıldı (GraphPad Software, Inc, ABD).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

NK hücreleri, virüs ve tümör hücrelerine tepkisel olarak konak hücreyi saldırılara karşı koymasında rol oynayan hücrelerdir. NK hücreleri, mikroorganizmalarla önceden karşılaşma ihtiyacı olmadan yanıt oluşturabileceğinden doğal immün sistem hücreleri arasında yer almaktadır. Buda, NK hücrelerinin hafızası olduğunun bir göstergesidir. Daha da önemlisi, NK hücrelerinin aktivitelerini düzenleyen birçok hücre yüzeyi aktive edici ve inhibe edici reseptörler içermesidir (20). NK hücreleri, $CD3^{-} CD16^{+} CD56^{+}$ olarak tanımlanmaktadır. Çalışmalarda genellikle periferik kandan izole edilen NK hücre alt grupları tercih edilmiştir ve bu alt gruplar $CD56^{bright}$ ve $CD56^{dim}$ varlığı veya yokluğuna göre oluşturulmuştur. $CD56^{dim}$ doğal sitotoksistide görev alırken $CD56^{bright}$ ise sitokin üretebilme görevini almaktadır (21). İnsan NK hücreleri akciğerler, rahim, lenf düğümü gibi bir çok dokulardan ve özellikle yaygın olarak tercih edilen periferik kandan izole edilebilir ve farklı birçok tümörlerin tedavisinde kullanılan NK hücreleri klinik çalışmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir (23).

NK-92 hücre hattı, 1992 yılında Klingemann ve arkadaşları malign Hodgkin dışı lenfomalı 50 yaşındaki bir erkekten izole ederek oluşturmuşlardır. Ayrıca NK-92 hücreleri CD3, CD16 yokluğu, CD2 ve CD56 ile karakterize edilmektedir. NK-92 hücrelerinin büyümesi, gelişmesi ve çoğalabilmesi rekombinant IL-2'nin ortamda olmasına bağlıdır (27). NK-92 hücrelerin de NK hücrelerinde olduğu gibi CD16 yoktur ancak bu hücreler farklı birçok kanser türüne karşı yüksek oranlarda sitotoksistite yeteneği göstermektedir.

Eksozomlar; hücreler arası iletişimde, sinyal iletiminde, immünolojik yanıtın düzenlenmesinde ve genetik materyal transferinde etkin rol alan 30-100 nm boyutlara sahip hücre dışı keseciklerdir. Eksozom, çift katmanlı lipid membrandan oluşur ve hücrel organelleri bulunmaz, içeriğinde salındıkları hücrelerin proteinleri, DNA ve RNA'ları da bulunur. Ayrıca kendine özgü CD9, CD63, CD81 ve CD82 proteinleri ile karakterize edilir (44). Eksozomlar; kan, tükürük, plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı, amniyotik sıvı ve anne sütü vb. vücut sıvılarından elde edilebilir. Bunlar dışında eksozomlar, mast hücreleri, dendritik hücreler, mezenkimal kök hücreleri, tümör hücreleri, NK hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri ve daha birçok farklı hücreler

tarafından salgılanabilir. Ayrıca eksozomlar sadece hücrelerin içeriğinde bulunan molekülleri taşımazlar, biyobelirteç ve ilaç taşımada da görev alırlar (67).

Yapılan bir çalışmada, Natural killer hücrelerden izole edilen eksozomların tipik bir NK hücre belirteçlerine ve içeriğine sahip olduğu belirtilmiş ve SKOV3, OV90 ve COC1/DDP yumurtalık kanseri hücrelerini doza bağlı olarak öldürebilme yeteneğinin olduğunu araştırmışlardır. Ancak, aynı konsantrasyona sahip NK hücresinden elde edilen eksozomun sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkisi görülmemiştir, bu durum kanser tedavisi olarak NK hücresinden elde edilen eksozomun güvenilirliğini göstermektedir (154). Byeong-Cheol Ahn ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, melanom ksenograft yerleştirilen hayvan modellerini üzerinde araştırma yapmış ve NK-92 hücresinden elde edilen eksozomları intratümöral enjeksiyon yöntemi ile uygulamışlardır. Sonrasında floresans yöntemlerle görüntüleme yaparak Eksozomların işlevselliğinin tespitini sağlamışlardır. Çalışmanın sonuçlarında ise, NK-92 eksozomunun, tümörün gelişmesini engelleyebileceğini göstermişlerdir. Çalışmada, NK hücrelerinden elde edilen eksozomların, melanom hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin görüldüğü belirlenmiştir (155).

Bu tez çalışmasında, NK-92 hücre hattından elde edilen eksozomlar tarafından, hedef hücrelere iletilen proteinler ve nükleik asitler, biyolojik tepkilerini etkili bir şekilde değiştirebilme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Eksozomların bu özelliğiyle NK hücreleri, kanserli hücre hatlarına karşı göstermiş olduğu sitotoksikite yeteneğinin dahada önemli bir etken olmasını sağlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda, kanserli ve sağlıklı hücre gruplarına eksozom vererek hücreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Ho Yong Kim ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, NK hücresinden elde edilen eksozomun primer karaciğer kanseri olan hepatoselüler karsinomun hem in vitro hem de in vivo anti-tümör aktivitesini arttırmada önemli rol üstlendiğini incelemişlerdir. NK hücresinden elde edilen eksozomun, TEM de görüntüleme yaparak tespiti sağlanmıştır. NK hücrelerinden elde edilen eksozomlar, HepG2 insan karaciğer hücre hattı ve Huh7 karaciğer tümör hepatosit türevli karsinom hücre hattı hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında Hep3B karaciğer hücre hattı hücrelerinde maksimum hücre canlılığını, sitotoksikiteyi ve apoptozu 10 saat içerisinde indüklediğini tespit etmişlerdir. NK hücrelerinden elde edilen eksozomlar, normal karaciğer THLE-2 hücrelerinde sitotoksikite ve apoptoz göstermediğini belirtmişlerdir. Böylece yapmış oldukları

çalışmanın NK hücrelerinden elde edilen eksozomların primer karaciğer kanseri olan hepatoselüler karsinomun hücre hatlarında immünoterapötik olarak önemli bir yere sahip olabileceğini bildirmişlerdir (156).

Galit Granot ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise NK hücrelerinden türetilen eksozomun lösemi hücre hatlarına ile hasta örneklerine karşı zaman kavramı ve doza bağlı bir şekilde değişiklik gösterdiğini ve bu değişikliklerin güçlü sitotoksik aktivite göstermiş olduğunu araştırmışlardır. HL-60 insan lösemi hücre hattı verilerini incelerken, 4 saat boyunca NK türevli eksozoma maruz kalan hücrelerde artan apoptotik yanıt görmüşler, fakat bu hücreler daha uzun sürelerde NK türevli eksozoma maruz bırakıldığında ise apoptoz düzenlerinde azalma gözlemlemişlerdir (157).

Yapılan başka bir çalışmada, tümör ve stromal hücrelerin, EMT (epitelyal mezenkimal geçiş) ile ilişkili yolların düzenlenmesinde eksozom aracılı protein ve miRNA taşıması ile kanser hücrelerinin istilasını düzenleyebileceğini düşünülmektedir. Bu çalışmada, A549 akciğer kanseri hücre hattında eksozomal miRNA ve protein miktarlarının TGF- β vasıtasıyla epitelyalden mezenkimal duruma transferini incelemişlerdir. Salınan eksozom proteini ve miRNA düzeylerinin, bu bileşenlerin türetildiği hücrelerin özelliğini ve fenotipini gösterdiğini gözlemlemişlerdir (158).

Bu tez çalışmasında; eksozomların kanser hücrelerinde etkin rol oynadığı, salındığı hücrelerin özelliğini taşıdığı, sadece hedef hücreyi yönelik etkin rol üstlendiği bilinmektedir. Ayrıca kemoterapi ilaçları gibi zararlı bir etkiye sahip değildir. Bu nedenle NK hücrelerinden salınarak elde edilen eksozom kanserli hücreleri inhibe etmesi hedeflenmiştir (147).

Çiang Fu ve arkadaşlarının yapış oldukları çalışmada, NK-92 veya NK92-hIL-15 hücrelerinden elde edilen eksozomlar, normoksik veya hipoksik koşulların bulundurulduğu kültür ortamından izole etmişlerdir. NK-92 ve hipoksik NK92'den elde edilen eksozomlar, TEM, nanopartikül ölçümü ve western blot ile karakterize edildi. Sonrasında ise sitotoksisiteyi belirleyebilmek için, akış sitometrisi ve western blot yöntemlerini kullanmışlardır. Yapmış oldukları çalışma sonucunda, 48 saatlik hipoksik koşullar sonrasında NK-92 hücresinden elde edilen eksozomlar, önemli ölçüde artan sitotoksisite etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Hipoksi koşullar altındaki NK-92 hücrelerinden elde edilen eksozomlar ve NK92-hIL-15 hücrelerinden elde edilen eksozomlar, normoksi koşullar altında NK-92 hücrelerinden elde edilen eksozomlar

muadilleriyle karşılaştırmışlardır ve NK hücrelerinin fonksiyonel proteinlerinden özellikle FasL, perforin ve granzim B ekspresyonlarının arttığını göstermişlerdir (159).

2020 yılında yapılan Dünya Sağlık Örgütü'nün kanser üzerine yapmış olduğu çalışma verileri incelendiğinde Dünya genelinde akciğer kanseri hastalarının oranı oldukça artmış olup bu nedenle ölümlerde oldukça yüksektir ve sigara içen toplumlarda paralel bir şekilde yükseliş olup akciğer kanseri de oldukça yaygın olarak görülmektedir. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immüno terapi gibi birçok tedavi yöntemi vardır. Bu tür tedavi yöntemlerinin oldukça zararlı etkileri de bulunmaktadır. Bu zararlı etkileri en aza indirilmesi için yapılan bir çok araştırma mevcuttur (160). Yapılan çalışmalarda, eksozomların akciğer kanser hücrelerinde tümör gelişimini tetiklediği ve tümör mikro çevresine aracılık edebileceğini analiz edilmiştir. Örneğin; melanom kaynaklı eksozomların akciğer endotelial geçirgenliğini arttırabileceğini ve farelerde ise akciğer metastazlarını arttırabileceğini göstermişlerdir (160). Xiao ve arkadaşları DDP (sitagliptinin plazma inhibitörü) maruziyeti esnasında A549 akciğer kanseri hücrelerinin DDP'ye karşı direncin etkileyebildiğini ön görmüşlerdir. Ayrıntılı mekanizmaları henüz belirlenememiş olsa da eksozom oluşumu ve salımının inhibisyonunun, akciğer kanserinin ileride tedavisi için yeni ve ilgi çekici bir strateji sunabileceğini savunmuşlardır (161).

Bu çalışmada, NK-92 hücreleri kültüre edilmiştir ve NK-92'lerin çoğaltma işlemine eksozom izolasyonu için gerekli seviyede besiyer elde edene kadar devam edilmiştir. NK-92 hücreleri, eksozomu alınmadan önce akış spektrofotometrik analizi ile tespiti sağlanmıştır. NK-92'den eksozomlar, seri santrifüjleme ve sonrasında ise ultra santrifüjleme yapılarak izole edilmiş ve salınan eksozomların zeta potansiyel ve nanodrop spektrofotometre ile ölçümü yapılarak boyut ve karakterizasyon analizi yapılmıştır. Ölçüm sonrasında eksozom diğer hücre hatlarına verilmeden önce K562 hücrelerine verilip sonrasında da diğer hücrelere uygun olan konsantrasyonlar belirlenerek eksozoma maruz bırakılmıştır.

K562, insan kronik miyeloid lösemi bir hücre hattıdır. NK ve K562 hücreleri miyeloid hücrelerden köken almaktadır. K562 hücre hatları hassas bir hedef hücre olarak kullanılır ve in vitro NK hücre fonksiyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (68). Ayrıca yapılan bir çalışmada K562 hücresinden elde edilen eksozomal miR-711'in BM-MSC'lere (kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücre)

transfer olduğunu ve CD44 ekspresyonunu düşürerek BM-MSC yapışma özelliğini baskıladığını gösterilmiştir. Buda, CML (kronik miyeloid lösemi) hücrelerinin BM (kemik iliği) mikro ortamını etki altında bırakıp farklılaştırabildiğini, böylece kendi gelişimleri için uygun ortamı oluşturabildiği göstermiştir. Fakat bu araştırma doğrultusunda eksozomun içeriği ile ilgili cevaplanması gereken daha karmaşık yapıların olduğu düşünülmektedir. Araştırmada, K562'den türetilmiş eksozomlarda yüksek düzeyde eksprese edilen miRNA'lardan sadece birini hedef olarak almışlardır (162).

Qi LI ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada; NK hücrelerinin tümör hücrelerinden elde edilen eksozomları hücre içine nasıl aldığı ve NK hücrelerinde diğer hücrelerden türetilen eksozomları hücre içine alım yapıp yapmadıklarını araştırmışlardır. Yapmış oldukları çalışmada floresan etiketli boya kullanarak, NK hücrelerinin diğer hücrelerden elde edilen eksozomlar aracılığıyla alım verimliliği analizi yapmışlardır. Elde etikleri sonuçlara göre, NK hücrelerinin kendisinden türetilen eksozomları kolayca alabildiği ve K562 ile Jurkat hücrelerinin eksozomları üzerindeki alım oranı, HepG2, HeLa ve MCF7 gibi hücrelerden elde edilen eksozomları alım oranlarından önemli ölçüde fark gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışma doğrultusunda, benzer yapılara ve benzer köken aldıkları hücrelere göre salgıladıkları eksozomların hedefteki hücrelerde de bu benzer özelliklerden kaynaklı olarak anlamlı farklılıklar oluşturabileceğini ön görmüşlerdir (163).

Bu çalışmada, NK-92 hücrelerinden türetilmiş eksozom, NK hücre belirteçlerine ve içeriğine sahiptir ve K562 lösemi hücrelerine NK-92 hücrelerinden elde edilen eksozomların verilmesiyle birlikte doza bağlı bir şekilde öldürebilme yeteneğinin olduğu canlı hücrelerin sayımı ile belirlenmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda 100 µg/µl ve 150 µg/µl deki konsantrasyonların etkin öldürme dozları olarak belirlenmiş ve bu verilerden yola çıkarak aynı konsantrasyonlara sahip NK-92 hücrelerinden türetilmiş eksozomları A549 ve HTB-54 akciğer kanseri hücre hatlarına ve Beas-2B akciğer sağıklım hücre hattına verilmiştir. 48 saat süren inkübasyon süresi sonrasında WST-1 yöntemi ile sitotoksosite testi yapılmıştır. Sonrasında her dört grup hücre hattında hücrelerin canlılık oranları tek yönlü varyans analiz (One-wayanalysis of variance, ANOVA) ve Kruskal-Wallis testi uygulanarak belirlenmiştir. Anlamlılık görüldüğünde gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi uygulanarak belirlenmiş ve her test grubu ve uygun olarak kabul edilen kontrol grupları arasında karşılaştırılma yapılmıştır.

0.05'ten daha küçük P değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir ve istatistiksel analizlerde 'prism 8' istatistik programı kullanılmıştır (GraphPad Software, Inc, ABD). A549 hücre hattında 25 µg/µl, 50 µg/µl ve 150 µg/µl konsantrasyonlarında 100 µg/µl konsantrasyonuna göre artış gözlemlenirken, SF yani FBS içermeyen besiyer deki kontrol grubunda ise eksozomdan kaynaklı olamayan hücrelerin ölümü görülmüştür. HTB-54 hücre hattında 50 µg/µl, 100 µg/µl ve 150 µg/µl konsantrasyonlarında ise ~%30 oranlarına sahip hücre kaybı görülmüştür. Beas2B kontrol hücre hattına belirlenen konsantrasyonlardaki eksozoma maruz bırakılmasından 48 saat sonrasında ise 25 µg/µl, 50 µg/µl ve 100 µg/µl ve 150 µg/µl konsantrasyonlarında yapılan analizler sonucunda ~%30 oranlarında sitotoksosite gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol grubundaki azalma ve A549 hücresindeki artmaya göre tedaviye yönelik olarak anlamlı bir sonuç elde edilemediği ve hücre hatlarında farklı konsantrasyonlarda NK kaynaklı eksozomun etkin rol oynadığını göstermektedir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde eksozomların farklı hücresel tedavilerde etkin rol oynadığı ve bunun dışında daha birçok işlevselliği olduğu güncel araştırmalarda görülmektedir. Eksozomun hedef hücre dışındaki diğer hücrelere zarar vermemesinden kaynaklı olarak da yeni tedaviler için öncül bir tedavi yöntemi olabileceğini umut etmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Jr., Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol.* 1986;137(9):2735-2739.
2. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;112(3):461-469.
3. Cederbrant K, Marcusson-Stahl M, Condevaux F, Descotes J. NK-cell activity in immunotoxicity drug evaluation. *Toxicology.* 2003;185(3):241-250.
4. Cosan F, Aktas Cetin E, Akdeniz N, Emrence Z, Cefle A, Deniz G. Natural Killer Cell Subsets and Their Functional Activity in Behcet's Disease. *Immunol Invest.* 2017;46(4):419-432.
5. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol.* 2016;196(7):2923-2931.
6. Wang N, Xie L. Diagnostic and therapeutic applications of tumor-associated exosomes. *Precision Radiation Oncology.* 2017;1(1):34-39.
7. Shen JY, Zhu XQ, Fei J, Shi PY, Yu SQ, Zhou JW. Advances of exosome in the development of ovarian cancer and its diagnostic and therapeutic prospect. *Oncotargets and Therapy.* 2018;11:2831-2841.
8. Vakhshiteh F, Atyabi F, Ostad SN. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine.* 2019;14:2847-2859.
9. Mangino G, Vincenza Chiantore M, Iuliano M, Capriotti L, Accardi L, Di Bonito P, Fiorucci G, Romeo G. Role of Extracellular Vesicles in Human Papillomavirus-Induced Tumorigenesis. *IntechOpen,* 2019.
10. Antimisiaris SG, Mourtas S, Marazioti A. Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2018;10(4).
11. Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacology & Therapeutics.* 2017;174:63-78.
12. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology.* 2013;200(4):373-383.
13. Guo W, Gao YB, Li N, Shao F, Wang CN, Wang P, Yang ZL, Li RD, He J. Exosomes: New players in cancer. *Oncology Reports.* 2017;38(2):665-675.
14. Zhang MC, Lam KP, Xu SL. Natural Killer Cell Engagers (NKCEs): a new frontier in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology.* 2023;14.
15. Marshall GD. The Adverse Effects of Psychological Stress on Immunoregulatory Balance: Applications to Human Inflammatory Diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America.* 2011;31(1):133-+.
16. Essential Clinical Immunology. *Essential Clinical Immunology.* 2009:1-362.
17. Manolakou T, Verginis P, Boumpas DT. DNA Damage Response in the Adaptive Arm of the Immune System: Implications for Autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(11):5842.
18. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology.* 2018;14(S2).
19. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001;357(9270):1777-1789.

20. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:189-220.
21. Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Experimental Hematology*. 2001;29(10):1157-1168.
22. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(2):112-123.
23. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*. 2008;9(5):503-510.
24. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunological Reviews*. 2006;214:56-72.
25. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: An update and future directions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;132(3):536-544.
26. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*. 2001;22(11):633-640.
27. Stokic-Trtica V, Diefenbach A, Klose CSN. NK Cell Development in Times of Innate Lymphoid Cell Diversity. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
28. Nielsen N, Ødum N, Ursø B, Lanier LL, Spee P. Cytotoxicity of CD56bright NK Cells towards Autologous Activated CD4+ T Cells Is Mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and Dampened via CD94/NKG2A. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31959.
29. Angelo LS, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, Rosen JB, Makedonas G, Forbes LR, Mace EM, Orange JS. Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. *Immunologic Research*. 2015;62(3):341-356.
30. Cosan F, Cetin EA, Akdeniz N, Emrence Z, Cefle A, Deniz G. Natural Killer Cell Subsets and Their Functional Activity in Behcet's Disease. *Immunological Investigations*. 2017;46(4):419-432.
31. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunology Letters*. 2005;100(1):7-13.
32. Beldi-Ferchiou A, Caillat-Zucman S. Control of NK Cell Activation by Immune Checkpoint Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(10).
33. Bakker ABH, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. NK cell activation: Distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Human Immunology*. 2000;61(1):18-27.
34. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SLH, Degli-Espostic MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*. 2005;42(4):501-510.
35. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
36. Quamine AE, Olsen MR, Cho MM, Capitini CM. Approaches to Enhance Natural Killer Cell-Based Immunotherapy for Pediatric Solid Tumors. *Cancers*. 2021;13(11):2796.
37. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225-274.
38. Kumar S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*. 2018;154(3):383-393.
39. Grudzien M, Rapak A. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. *Journal of Immunology Research*. 2018;2018.

40. Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*. 2009;128(1):7-15.
41. Gwalani LA, Orange JS. Single Degranulations in NK Cells Can Mediate Target Cell Killing. *Journal of Immunology*. 2018;200(9):3231-3243.
42. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008;27(45):5932-5943.
43. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Human NK cells and their receptors. *Microbes and Infection*. 2002;4(15):1539-1544.
44. Boissel L, Betancur-Boissel M, Lu WQ, Krause DS, Van Etten RA, Wels WS, Klingemann H. Retargeting NK-92 cells by means of CD19-and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Oncoimmunology*. 2013;2(10).
45. Chrobok M, Dahlberg CIM, Sayitoglu EC, Beljanski V, Nahi H, Gilljam M, Stellan B, Sutlu T, Duru AD, Alici E. Functional Assessment for Clinical Use of Serum-Free Adapted NK-92 Cells. *Cancers*. 2019;11(1).
46. Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*. 2016;164(6):1226-1232.
47. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*. 1968;14(2):181-196.
48. Vainio T, Koskimies O, Perlmann P, Perlmann H, Klein G. In Vitro Cytotoxic Effect of Lymphoid Cells from Mice Immunized with Allogeneic Tissue. *Nature*. 1964;204:453-455.
49. Somanchi SS, McCulley KJ, Somanchi A, Chan LL, Lee DA. A Novel Method for Assessment of Natural Killer Cell Cytotoxicity Using Image Cytometry. *PLoS One*. 2015;10(10):e0141074.
50. Whiteside TL, Bryant J, Day R, Herberman RB. Natural killer cytotoxicity in the diagnosis of immune dysfunction: criteria for a reproducible assay. *J Clin Lab Anal*. 1990;4(2):102-114.
51. Motzer SA, Tsuji J, Hertig V, Johnston SK, Scanlan J. Natural killer cell cytotoxicity: a methods analysis of 51chromium release versus flow cytometry. *Biol Res Nurs*. 2003;5(2):142-152.
52. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):15-22.
53. Shabrish S, Gupta M, Madkaikar M. A Modified NK Cell Degranulation Assay Applicable for Routine Evaluation of NK Cell Function. *J Immunol Res*. 2016;2016:3769590.
54. Fukuda M. K562 human leukaemic cells express fetal type (i) antigen on different glycoproteins from circulating erythrocytes. *Nature*. 1980;285(5764):405-407.
55. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 2009;254(2):149-154.
56. Dons'koi BV, Chernyshov VP, Osypchuk DV. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J Immunol Methods*. 2011;372(1-2):187-195.
57. Marar C, Starich B, Wirtz D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nature Immunology*. 2021;22(5):560-570.

58. Jeppesen DK, Zhang Q, Franklin JL, Coffey RJ. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends in Cell Biology*. 2023;33(8):667-681.
59. Babaker MA, Aljoud FA, Alkhilaiwi F, Algarni A, Ahmed A, Khan MI, Saadeldin IM, Alzahrani FA. The Therapeutic Potential of Milk Extracellular Vesicles on Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(12).
60. Jadli AS, Ballasy N, Edalat P, Patel VB. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2020;467(1-2):77-94.
61. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology-Basel*. 2020;9(1).
62. Jiang L, Paone S, Caruso S, Atkin-Smith GK, Phan TK, Hulett MD, Poon IKH. Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Scientific Reports*. 2017;7.
63. Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Taraboletti G, Carta G, Franceschini N, Pavan A, Dolo V. Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia*. 2008;10(5):481-488.
64. Clancy JW, Schmidtman M, D'Souza-Schorey C. The ins and outs of microvesicles. *Faseb Bioadvances*. 2021;3(6):399-406.
65. Alenquer M, Amorim MJ. Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses-Basel*. 2015;7(9):5066-5083.
66. Tai YL, Chen KC, Hsieh JT, Shen TL. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Science*. 2018;109(8):2364-2374.
67. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*. 2019;8(4).
68. Soung YH, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers*. 2017;9(1).
69. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2013;32(3-4):623-642.
70. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen X-M, Xu Y-M, Huang L-F, Wang X-Z. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*. 2015;2015:1-8.
71. Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PST. Quantification of Exosomes. *Journal of Cellular Physiology*. 2017;232(7):1587-1590.
72. Zhang Y, Liu YF, Liu HY, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*. 2019;9.
73. Jones LB, Bell CR, Bibb KE, Gu LL, Coats MT, Matthews QL. Pathogens and Their Effect on Exosome Biogenesis and Composition. *Biomedicines*. 2018;6(3).
74. Beach A, Zhang HG, Ratajczak MZ, Kakar SS. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*. 2014;7.
75. Xu J, Camfield R, Gorski SM. The interplay between exosomes and autophagy - partners in crime. *Journal of Cell Science*. 2018;131(15).
76. Tschuschke M, Kocherova I, Bryja A, Mozdziak P, Volponi AA, Janowicz K, Sibiak R, Piotrowska-Kempisty H, Izycki D, Bukowska D, Antosik P, Shibli JA, Dyszkiewicz-Konwinska M, Kempisty B. Inclusion Biogenesis, Methods of

- Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(2).
77. Yue BL, Yang HY, Wang J, Ru WX, Wu JY, Huang YZ, Lan XY, Lei CZ, Chen H. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Proliferation*. 2020;53(7).
 78. Han QF, Li WJ, Hu KS, Gao J, Zhai WL, Yang JH, Zhang SJ. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular Cancer*. 2022;21(1).
 79. Anfossi S, Fu X, Nagvekar R, Calin GA. MicroRNAs, Regulatory Messengers Inside and Outside Cancer Cells. *Exosomes, Stem Cells and Microrna: Aging, Cancer and Age Related Disorders*. 2018;1056:87-108.
 80. Schageman J, Zeringer E, Li M, Barta T, Lea K, Gu J, Magdaleno S, Setterquist R, Vlassov AV. The Complete Exosome Workflow Solution: From Isolation to Characterization of RNA Cargo. *Biomed Research International*. 2013;2013.
 81. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of Molecular Medicine*. 2013;91(4):431-437.
 82. Mignot G, Roux S, Thery C, Ségura E, Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2006;10(2):376-388.
 83. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*. 2021;19(1).
 84. Otero-Ortega L, Laso-García F, Gómez-de Frutos M, Fuentes B, Diekhorst L, Díez-Tejedor E, Gutiérrez-Fernández M. Role of Exosomes as a Treatment and Potential Biomarker for Stroke. *Translational Stroke Research*. 2019;10(3):241-249.
 85. Kim D, Kothandan VK, Kim HW, Kim KS, Kim JY, Cho HJ, Lee YK, Lee DE, Hwang SR. Noninvasive Assessment of Exosome Pharmacokinetics In Vivo: A Review. *Pharmaceutics*. 2019;11(12).
 86. Ung TH, Madsen HJ, Hellwinkel JE, Lencioni AM, Graner MW. Exosome proteomics reveals transcriptional regulator proteins with potential to mediate downstream pathways. *Cancer Science*. 2014;105(11):1384-1392.
 87. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2015;40:41-51.
 88. Zheng XW, Chen F, Zhang JN, Zhang Q, Lin JX. Exosome Analysis: A Promising Biomarker System with Special Attention to Saliva. *Journal of Membrane Biology*. 2014;247(11):1129-1136.
 89. Soekmadji C, Russell P, Nelson C. Exosomes in Prostate Cancer: Putting Together the Pieces of a Puzzle. *Cancers*. 2013;5(4):1522-1544.
 90. Jafari D, Malih S, Eslami SS, Jafari R, Darzi L, Tarighi P, Samadikuchaksaraei A. The relationship between molecular content of mesenchymal stem cells derived exosomes and their potentials: Opening the way for exosomes based therapeutics. *Biochimie*. 2019;165:76-89.
 91. Elkommos-Zakhary M, Rajesh N, Beljanski V. Exosome RNA Sequencing as a Tool in the Search for Cancer Biomarkers. *Non-Coding Rna*. 2022;8(6).
 92. Roma-Rodrigues C, Fernandes AR, Baptista PV. Exosome in Tumour Microenvironment: Overview of the Crosstalk between Normal and Cancer Cells. *Biomed Research International*. 2014;2014.

93. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*. 2005;17(7):879-887.
94. Sarko DK, McKinney CE. Exosomes: Origins and Therapeutic Potential for Neurodegenerative Disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11.
95. Mathieu M, Névo N, Jouve M, Valenzuela JI, Maurin M, Verweij FJ, Palmulli R, Lankar D, Dingli F, Loew D, Rubinstein E, Boncompain G, Perez F, Théry C. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature Communications*. 2021;12(1).
96. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology*. 2018;28(8):R435-R444.
97. Nazarenko I. Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation (vol 70, pg 1668, 2010). *Cancer Research*. 2010;70(16).
98. Kooijmans SAA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:1525-1541.
99. van Dommelen SM, Vader P, Lakhal S, Kooijmans SAA, van Solinge WW, Wood MJA, Schiffelers RM. Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):635-644.
100. Ha D, Yang NN, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016;6(4):287-296.
101. Jabbari N, Karimipour M, Khaksar M, Akbariazar E, Heidarzadeh M, Mojarad B, Aftab H, Rahbarghazi R, Rezaie J. Tumor-derived extracellular vesicles: insights into bystander effects of exosomes after irradiation. *Lasers in Medical Science*. 2020;35(3):531-545.
102. Suharta S, Barlian A, Hidajah AC, Notobroto HB, Ana ID, Indariani S, Wungu TDK, Wijaya CH. Plant-derived exosome-like nanoparticles: A concise review on its extraction methods, content, bioactivities, and potential as functional food ingredient. *Journal of Food Science*. 2021;86(7):2838-2850.
103. Chaput N, Taïeb J, Scharzt NEC, André F, Angevin E, Zitvogel L. Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2004;53(3):234-239.
104. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C, Raposo G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*. 2013;126(24):5553-5565.
105. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology*. 2014;28:3-13.
106. Regimbeau M, Abrey J, Vautrot V, Causse S, Gobbo J, Garrido C. Heat shock proteins and exosomes in cancer theranostics. *Seminars in Cancer Biology*. 2022;86:46-57.
107. Sato-Kuwabara Y, Melo SA, Soares FA, Calin GA. The fusion of two worlds: Non-coding RNAs and extracellular vesicles - diagnostic and therapeutic implications. *International Journal of Oncology*. 2015;46(1):17-27.
108. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang ZL, Milosevic J, Tkacheva OA,

- Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119(3):756-766.
109. Alvarez-Erviti L, Seow YQ, Yin HF, Betts C, Lakhal S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*. 2011;29(4):341-U179.
 110. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*. 2013;4.
 111. Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang WJ, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*. 2014;24(6):766-769.
 112. Vlasov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):940-948.
 113. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev*. 1998;12(23):3663-3674.
 114. Lin Y, Anderson JD, Rahnema LMA, Gu SV, Knowlton AA. Exosomes in disease and regeneration: biological functions, diagnostics, and beneficial effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020;319(6):H1162-H1180.
 115. Sachse M, Urbe S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell*. 2002;13(4):1313-1328.
 116. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. 2001;106(2):145-155.
 117. Bishop N, Woodman P. TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J Biol Chem*. 2001;276(15):11735-11742.
 118. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. 2002;3(5):321-330.
 119. Dilsiz N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. *Future Sci OA*. 2020;6(4):FSO465.
 120. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.
 121. Koh YQ, Tan CJ, Toh YL, Sze SK, Ho HK, Limoli CL, Chan A. Role of Exosomes in Cancer-Related Cognitive Impairment. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8).
 122. Kibria G, Ramos EK, Wan Y, Gius DR, Liu H. Exosomes as a Drug Delivery System in Cancer Therapy: Potential and Challenges. *Mol Pharm*. 2018;15(9):3625-3633.
 123. Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, Chen L, Yan X, Du Y, Yu L. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res*. 2015;25(1):24-38.
 124. Zomer A, Maynard C, Verweij FJ, Kamermans A, Schafer R, Beerling E, Schiffelers RM, de Wit E, Berenguer J, Ellenbroek SIJ, Wurdinger T, Pegtel

- DM, van Rheenen J. In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell*. 2015;161(5):1046-1057.
125. Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2019;1871(2):455-468.
 126. Gusachenko ON, Zenkova MA, Vlassov VV. Nucleic acids in exosomes: Disease markers and intercellular communication molecules. *Biochemistry (Moscow)*. 2013;78(1):1-7.
 127. Zhang MD, Jin K, Gao L, Zhang ZK, Li F, Zhou FF, Zhang L. Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods*. 2018;2(9).
 128. Shirejini SZ, Inci F. The Yin and Yang of exosome isolation methods: conventional practice, microfluidics, and commercial kits. *Biotechnology Advances*. 2022;54.
 129. Liu WZ, Ma ZJ, Kang XW. Current status and outlook of advances in exosome isolation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(24):7123-7141.
 130. Wang J, Ma P, Kim DH, Liu BF, Demirci U. Towards microfluidic-based exosome isolation and detection for tumor therapy. *Nano Today*. 2021;37.
 131. Mahgoub EO, Razmara E, Bitaraf A, Norouzi FS, Montazeri M, Behzadi-Andouhjerdi R, Falahati M, Cheng K, Haik Y, Hasan A, Babashah S. Advances of exosome isolation techniques in lung cancer. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(9):7229-7251.
 132. Xu K, Jin YL, Li YM, Huang YY, Zhao R. Recent Progress of Exosome Isolation and Peptide Recognition-Guided Strategies for Exosome Research. *Frontiers in Chemistry*. 2022;10.
 133. Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biochemistry Moscow Supplement Series a-Membrane and Cell Biology*. 2022;16(2):115-126.
 134. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao ZQ. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789-804.
 135. Boriachek K, Islam MN, Möller A, Salomon C, Nguyen NT, Hossain MSA, Yamauchi Y, Shiddiky MJA. Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small*. 2018;14(6).
 136. Havers M, Broman A, Lenshof A, Laurell T. Advancement and obstacles in microfluidics-based isolation of extracellular vesicles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2023;415(7):1265-1285.
 137. Liang WF, Liu J, Yang XL, Zhang Q, Yang WG, Zhang HM, Liu LQ. Microfluidic-based cancer cell separation using active and passive mechanisms. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2020;24(4).
 138. Contreras-Naranjo JC, Wu HJ, Ugaz VM. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab on a Chip*. 2017;17(21):3558-3577.
 139. Bu HC, He DG, He XX, Wang KM. Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy. *Chembiochem*. 2019;20(4):451-461.
 140. Kwizera EA, O'Connor R, Vinduska V, Williams M, Butch ER, Snyder SE, Chen X, Huang X. Molecular Detection and Analysis of Exosomes Using Surface-Enhanced Raman Scattering Gold Nanorods and a Miniaturized Device. *Theranostics*. 2018;8(10):2722-2738.

141. Bano R, Ahmad F, Mohsin M. A perspective on the isolation and characterization of extracellular vesicles from different biofluids. *Rsc Advances*. 2021;11(32):19598-19615.
142. Zhao L, Wang H, Fu J, Wu X, Liang XY, Liu XY, Wu X, Cao LL, Xu ZY, Dong M. Microfluidic-based exosome isolation and highly sensitive aptamer exosome membrane protein detection for lung cancer diagnosis. *Biosensors & Bioelectronics*. 2022;214.
143. Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Kondoh A, Fisher RJ. Refolding Proteins by Gel-Filtration Chromatography. *Febs Letters*. 1994;345(2-3):125-130.
144. Islas-Valdez S, López-Rayó S, Hristov-Emilov H, Hernández-Apaolaza L, Lucena JJ. Assessing metal-lignosulfonates as fertilizers using gel filtration chromatography and high-performance size exclusion chromatography. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;142:163-171.
145. Yang DB, Zhang WH, Zhang HY, Zhang FQ, Chen LM, Ma LX, Larcher LM, Chen SX, Liu N, Zhao QX, Tran PHL, Chen CY, Veedu RN, Wang T. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 2020;10(8):3684-3707.
146. Wistuba II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*. 2006;1(1):331-348.
147. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2019;94(8):1623-1640.
148. Rodak O, Peris-Díaz MD, Olbromski M, Podhorska-Okolów M, Dziegiel P. Current Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Histological Classification, Targeted Therapies, and Immunotherapy. *Cancers*. 2021;13(18).
149. Keser Şahin HH, Aslan O, Şahin M. Evaluation of cancer-related deaths in Turkey between 2009-2018: An epidemiological study. *Journal of Surgery and Medicine*. 2020;4(8):674-677.
150. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JHM, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011;6(2):244-285.
151. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, Goldstraw P, Comm IS, Biostatistics CR, Insti OCP. The IASLC lung cancer staging project: Validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *Journal of Thoracic Oncology*. 2007;2(8):694-705.
152. Ali W, Álvarez-Pérez M, Marc MA, Salardón-Jiménez N, Handzlik J, Domínguez-Álvarez E. The Anticancer and Chemopreventive Activity of Selenocyanate-Containing Compounds. *Current Pharmacology Reports*. 2018;4(6):468-481.

153. Biola-Clier M, Beal D, Caillat S, Libert S, Armand L, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M. Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis*. 2017;32(1):161-172.
154. Di Pace AL, Tumino N, Besi F, Alicata C, Conti LA, Munari E, Maggi E, Vacca P, Moretta L. Characterization of Human NK Cell-Derived Exosomes: Role of DNAM1 Receptor In Exosome-Mediated Cytotoxicity Against Tumor. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3).
155. Zhu L, Kalimuthu S, Gangadaran P, Oh JM, Lee HW, Baek SH, Jeong SY, Lee S-W, Lee J, Ahn B-C. Exosomes Derived From Natural Killer Cells Exert Therapeutic Effect in Melanoma. *Theranostics*. 2017;7(10):2732-2745.
156. Kim HY, Min HK, Song HW, Yoo A, Lee S, Kim KP, Park JO, Choi YH, Choi E. Delivery of human natural killer cell-derived exosomes for liver cancer therapy: an in vivo study in subcutaneous and orthotopic animal models. *Drug Deliv*. 2022;29(1):2897-2911.
157. Samara A, Anbar M, Shapira S, Zemlyansky A, Zozovsky A, Raanani P, Granot G, Rozovski U. Using natural killer cell-derived exosomes as a cell-free therapy for leukemia. *Hematol Oncol*. 2023;41(3):487-498.
158. Kim J, Kim TY, Lee MS, Mun JY, Ihm C, Kim SA. Exosome cargo reflects TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) status in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(2):643-648.
159. Jiang Y, Jiang H, Wang K, Liu C, Man X, Fu Q. Hypoxia enhances the production and antitumor effect of exosomes derived from natural killer cells. *Ann Transl Med*. 2021;9(6):473.
160. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar CM, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*. 2012;18(6):883-891.
161. Xiao X, Yu S, Li S, Wu J, Ma R, Cao H, Zhu Y, Feng J. Exosomes: Decreased Sensitivity of Lung Cancer A549 Cells to Cisplatin. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89534.
162. Jiang YH, Liu J, Lin J, Li SQ, Xu YM, Min QH, Zhong QH, Sun F, Li J, You XH, Liao KL, Qin TY, Zhao C, Huang B, Wang XZ. K562 cell-derived exosomes suppress the adhesive function of bone marrow mesenchymal stem cells via delivery of miR-711. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;521(3):584-589.
163. Huyan T, Du Y, Huang Q, Huang Q, Li Q. Uptake Characterization of Tumor Cell-derived Exosomes by Natural Killer Cells. *Iran J Public Health*. 2018;47(6):803-813.

7. ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve orta öğretimi Aksaray’da, liseyi ise Niğde’de okudum. 2015-2019 yılları arasında Bingöl Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde eğitimimi tamamladım. 2021 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.

