



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**PID-PC'LERDEN İZOLE EDİLEN EKSOZOMLARIN PANKREAS
KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

İmren HASOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR**

Ekim, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 19.10.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL
Koç Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 37205 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Çalışma kapsamında pankreatik ada türevli progenitör hücrelerden (PID-PC), MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından elde edilen eksozomların karakterizasyonunun yapılması ve her üç hücre soyundan elde edilen eksozomların boyut olarak karşılaştırılması ilk defa yapılmıştır. Ayrıca, çalışmanın diğer bir amacı olarak PID-PC'lerden ilk defa izole edilen eksozomların pankreas beta hücre tümörü olan insülinoma INS-1 ve pankreas kanseri olan MiaPaca-2 hücre soyları üzerindeki etkilerinin araştırılması gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca yanımda olan, bilgisi ve ilgisiyle her zaman beni destekleyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Karatuğ Kaçar'a, INS-1 hücre soyunu kullanmamıza izin veren İsviçre, Geneva Üniversitesi'nde görev yapan Prof. Dr. Claes B. WOLLHEIM'e, deney aşamalarım bana yardımcı olan sevgili hocalarım Prof. Dr. Selda Gezginçi Oktayoğlu'na, ve Arş. Gör. Merve Erçin'e teşekkür ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Murat Pekmez'e, Arş. Gör. Dr. Elif Mertoğlu Kamalı'ya, Arş. Gör. Burcu Kartal Sural'a, Doktora öğrencisi Aslıhan Şengelen'e tez kapsamında yapılan analizlerde protein seviyelerinin belirlenmesi için antikor temini ve cihaz kullanımı sağladıkları için teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 37205 numaralı yüksek lisans tez projesi ile destekleyen ve 32156 numaralı proje kapsamında alınan Simple Wes cihazı için İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen çok sevgili hocam Arş. Gör. Dr. Almila Çiftçi'ye teşekkür ederim.

Kız çocuklarının temel eğitim alabilmeleri için bile mücadele etmek zorunda olduğu bu topraklarda, tüm eğitim imkanlarını önüme seren babam Mustafa Hasoğlu'na, tüm zorluklarla mücadele etmeyi ondan öğrendiğim, bana olan inancını her zaman hissettiğim annem Arife Hasoğlu'na, bu hayattaki ilk arkadaşım ve tüm şartlardaki en büyük destekçim ablam Zeynep Hasoğlu Örüçü'ye, beni her zaman destekleyen ve bana hep inanan abim Tarık Örüçü'ye, tüm kalabalığa rağmen beni her daim fark eden ve dinleyen teyzem Ayfer Danalıoğlu'na

Gelişle bu hayatta sırtladığım tüm yükleri hafifleten, yüzündeki tek bir gülümsemeyle tüm yorgunluğumu alabilen sevgili yeğenim Aybüke Örüçü'ye teşekkür ederim

Ekim 2022

İmren HASOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
SUMMARY	xix
GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. PANKREAS.....	4
2.1.1. Pankreas Kanseri	5
2.1.1.1. MiaPaca-2 hücre soyu	5
2.1.1.2. İnsülinoma INS-1 hücre soyu.....	6
2.2. KÖK HÜCRE.....	7
2.2.1. Mezankimal Kök Hücre	8
2.3. EKSOZOMLAR	9
2.3.1. Eksozomların Biyogenezi.....	10
2.3.2. Eksozomların Hastalıklarla İlişkisi.....	12
2.3.2.1. Hastalık Tanısında Eksozomlar	12
2.3.2.2. Kanser Tanısında Eksozomlar	13
2.3.2.3. Pankreas Kanseri Tanısında Eksozomlar.....	14
2.3.2.4. Hastalık Tedavilerinde Eksozomlar.....	15
2.3.2.5. Eksozomların Kanseri Üzerinde Etkileri	18
2.3.2.6. Eksozomların Kanseri Gelişimi ve İlerlemesindeki Rolü	18
2.3.2.7. Eksozomların Kanseri Üzerinde İnhibe Edici Etkisi	19
2.3.2.8. Pankreas Kanseri ve Eksozomlar	21
3. MALZEME VE YÖNTEM	22
3.1. HÜCRE SOYU	22

3.1.1. Pankreatik Ada Türevli Progenitör Hücrelerin Kültüre Edilmesi	22
3.1.2. Pankreas Kanseri Hücre Soyu MiaPaca-2 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	22
3.1.3 Pankreatik Beta Hücre Tümörü İnsulinoma INS-1 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	22
3.2. EKSOZOM İZOLASYONU	23
3.2.1. Pankreatik Ada Türevli Progenitör Hücre (PID-PC)'lerden Eksozom İzole Edilmesi	23
3.2.2. MiaPaca-2 ve INS-1 Hücre Soylarından Eksozom İzole Edilmesi	24
3.3. İZOLE EDİLEN EKSOZOMLARIN NANOPARTİKÜL İZLEME ANALİZİ (NTA) İLE BOYUT ANALİZİ VE MİKTAR TAYİNİNİN YAPILMASI	25
3.4. İZOLE EDİLEN EKSOZOMLARDAN LİZAT ELDESİ	25
3.5. EKSOZOM UYGULAMASI SONRASINDA HÜCRE SOYLARINDAN SEKRESYON VE LİZAT ELDESİ	25
3.6. ELDE EDİLEN LİZATLARIN BRADFORD YÖNTEMİ İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ	26
3.7. PROTEİN SEVİYELERİNİN WESTERN BLOT TEKNİĞİ İLE GÖSTERİLMESİ	27
3.7.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	27
3.7.2. Jele Yüklenecek Örneğin Hazırlanması ve Örneğin Jelde Yürütülmesi	28
3.7.3. Islak Transfer ile Polivinilidenflorit (PVDF) Membrana Aktarım	28
3.7.4 Membrana Aktarılan Proteinlerin Kontrolü	28
3.7.5 ALİX, TSG101, CD9 ve CD81'in Western Blot Tekniği ile İşaretlenmesi	28
3.8. SİMPLE WES	29
3.8.1. Elde Edilen Hücre Lizatlarının Nanodrop ile Protein Tayini	29
3.8.2. Standartların Hazırlanması	29
3.8.3. Örneklerin Hazırlanması	29
3.8.4. Antikorların Hazırlanması	29
3.8.5. Pleytin Hazırlanması	29
3.9. MTT (TETRAZOLİUM) KOLORİMETRİK ÖLÇÜM	30
3.10. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER	30
3.10.1. Hücrelerin Fikse Edilmesi	30
3.10.2. Hücrelerin HSP90, HSF-1, Nestin, Endoglin, Kaspaz-8, Aktif Kaspaz-3, Beclin ve p-Bcl-2 Antikorları ile İşaretlenmesi	31
3.11. MİAPACA-2 HÜCRE SOYUNDA SİTOTOKSİSİTENİN (LDH) BELİRLENMESİ	32
3.12. INS-1 HÜCRELERİNDE İNSÜLİN SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ	33
4. BULGULAR	34

4.1. İZOLE EDİLEN EKSOZOMLARIN NANOPARTİKÜL İZLEME ANALİZİ (NTA) İLE BOYUT ANALİZİ VE MİKTAR TAYİNİNİN YAPILMASI	34
4.2. WESTERN BLOTİNG İLE PROTEİN SEVİYELERİNİN ANALİZİ.....	40
4.3. SİMPLE WES İLE ALİX, TSG101, CD9 VE CD81'İN ANALİZİ.....	40
4.4. MTT ANALİZ SONUÇLARI.....	41
4.4.1. PID-PC'lerden izole edilen eksozomların MiaPaca-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi	41
4.4.2. PID-PC'lerden izole edilen eksozomların INS-1 Hücre Soyu Üzerine Etkisi	43
4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYA	44
4.5.1. İmmünohistokimya ile INS-1 ve MiaPaca-2 Hücre Soylarında HSP90, HSF-1, Nestin ve Endoglin Proteinlerinin Gösterilmesi	44
4.5.2 İmmünohistokimya ile MiaPaca-2 Hücre Soyunda Kaspaz-8, Aktif Kaspaz-3, Beclin ve p-Bcl-2'nin Gösterilmesi	52
4.5. MİAPACA-2 HÜCRE SOYUNDA SİTOTOKSİTİTENİN (LDH) BELİRLENMESİ	56
4.6. INS-1 HÜCRE SOYUNDA İNSÜLİN SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2. 1: Pankreas Langerhans Adacığı (Campbell ve Newgard, 2021).	4
Şekil 2. 2: MiaPaca-2 hücre soyunun ışık mikroskobunda 10x ve 20x büyütmedeki görüntüsü.	5
Şekil 2. 3: INS-1 hücre soyunun ışık mikroskobunda 10x ve 20x büyütmedeki görüntüsü.	6
Şekil 2. 4: Pankreatik ada türevli progenitör hücrelerin ışık mikroskobunda 10x ve 20x büyütmedeki görüntüsü.	9
Şekil 2. 5: Eksozom Biyogenezi (Hessvik ve Llorente 2018).	11
Şekil 3. 1: Eksozom izolasyonu sırasında oluşan 2 ayrı tabaka.	23
Şekil 3. 2: Santrifüj sonrası oluşan 3 tabaka.	24
Şekil 3. 3: Simple Wes pleytinin hazırlanması.	30
Şekil 4. 1: PID-PC'den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve konsantrasyon (partikül/ml) değerleri.	34
Şekil 4. 2: PID-PC'den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve yoğunluk (a.u) değerleri.	35
Şekil 4. 3: MiaPaca-2'den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve konsantrasyon (partikül/ml) değerleri.	36
Şekil 4. 4: MiaPaca-2'den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve yoğunluk (a.u) değerleri.	37
Şekil 4. 5: INS-1'den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve konsantrasyon (partikül/ml) değerleri.	38
Şekil 4. 6: INS-1'den izole edilen eksozomların NTA analizi ile boyut (nm) ve yoğunluk (a.u) değerleri.	39
Şekil 4. 7: PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücrelerinden izole edilen eksozomlarda ve her üç hücre soyundan elde edilen lizatlarda eksozomal belirteçlerin Simple Wes ile gösterilmesi.	40

- Şekil 4. 8:** PID-PC'lerden izole edilen eksozomların MiaPaca-2 hücre soyu üzerine 24 saat inkübasyon sonrasında % hücre canlılığı üzerine olan etkisi. $**p<0,01$ 41
- Şekil 4. 9:** PID-PC'lerden izole edilen eksozomların MiaPaca-2 hücre soyu üzerine 72 saat inkübasyon sonrasında % hücre canlılığı üzerine olan etkisi. $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$ 42
- Şekil 4. 10:** PID-PC'lerden izole edilen eksozomların INS-1 hücre soyu üzerine 24 saat inkübasyon sonrasında % hücre canlılığı üzerine olan etkisi. $****p<0,0001$ 43
- Şekil 4. 11:** PID-PC'lerden izole edilen eksozomların INS-1 hücre soyu üzerine 72 saat inkübasyon sonrasında % hücre canlılığı üzerine olan etkisi. $**p<0,01$, $****p<0,0001$ 44
- Şekil 4. 12:** INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında gösterilen HSP90'nın ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında HSP90'nın immün işaretlenme yoğunluğu (K_INS-1: Kontrol Ins-1, Ekso_INS-1: Eksozom Uygulanan INS-1, K_MiaPaca-2: Kontrol MiaPaca-2, Ekso_MiaPaca-2: eksozom uygulanan MiaPaca-2). K_INS-1; $110,8 \pm 1,591$, Ekso_INS-1; $109,5 \pm 0,3852$, K_MiaPaca-2; $112,9 \pm 4,251$, Ekso_MiaPaca-2; $127,6 \pm 1,598$ $***p<0,001$ 45
- Şekil 4. 13:** INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında gösterilen HSF-1'in ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında HSF-1'in immün işaretlenme yoğunluğu (K_INS-1: Kontrol Ins-1, Ekso_INS-1: Eksozom Uygulanan INS-1, K_MiaPaca-2: Kontrol MiaPaca-2, Ekso_MiaPaca-2: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K_INS-1; $108,5 \pm 0,4632$, Ekso_INS-1; $108,8 \pm 0,32823$, K_MiaPaca-2; $119,0 \pm 2,2656$, Ekso_MiaPaca-2 $116,3 \pm 2,020$ $**p<0,01$ 47
- Şekil 4. 14:** INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında gösterilen Nestin'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Nestin'nin immün işaretlenme yoğunluğu (K_INS-1: Kontrol Ins-1, Ekso_INS-1: Eksozom Uygulanan INS-1, K_MiaPaca-2: Kontrol MiaPaca-2, Ekso_MiaPaca-2: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K_INS-1; $114,1 \pm 5,487$, Ekso_INS-1; $122,7 \pm 2,350$, K_MiaPaca-2; $120,0 \pm 3,068$, Ekso_MiaPaca-2; $127,2 \pm 1,749$ 49
- Şekil 4. 15:** INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında gösterilen Endoglin'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Endoglin'nin immün işaretlenme yoğunluğu. (K_INS-1: Kontrol Ins-1, Ekso_INS-1: Eksozom Uygulanan INS-1, K_MiaPaca-2: Kontrol MiaPaca-2, Ekso_MiaPaca-2: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K_INS-1; $124,7 \pm 1,751$, Ekso_INS-1; $125,8 \pm 1,611$, K_MiaPaca-2; $130,7 \pm 1,510$, Ekso_MiaPaca-2; $126,0 \pm 1,536$ 51
- Şekil 4. 16:** MiaPaca-2 hücre soyunda gösterilen Kaspaz-8'in ışık mikroskopundaki görüntüsü. (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). MiaPaca-2 hücre soyunda Kaspaz-8'in immün işaretlenme yoğunluğu (K:

Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2) K; 119,1 ± 1,183, Ekso; 119,1 ± 0,5621.....	52
Şekil 4. 17: MiaPaca-2 hücre soyunda gösterilen Aktif Kaspaz-3'ün ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). MiaPaca-2 hücre soyunda Aktif Kaspaz-3'ün immün işaretlenme yoğunluğu (K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K; 173,5 ± 0,9917, Ekso; 172,6 ± 0,7865.....	53
Şekil 4. 18: MiaPaca-2 hücre soyunda gösterilen Beclin'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). MiaPaca-2 hücre soyunda Beclin'nin immün işaretlenme yoğunluğu (K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K; 94,16 ± 1,268, Ekso; 90,06 ± 0,6299 **p<0,01.....	54
Şekil 4. 19: MiaPaca-2 hücre soyunda gösterilen p-Bcl-2'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). MiaPaca-2 hücre soyunda p-Bcl-2'nin immün işaretlenme yoğunluğu (K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K; 104,3 ± 1,106, Ekso; 95,96 ± 0,5141 ***p<0,001.....	55
Şekil 4. 20: Eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücrelerinin LDH salınımı (Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2).....	56
Şekil 4. 21: Eksozom uygulanan INS-1 Hücrelerinin lizat ve sekresyonunda insülin seviyesi (uIU/mg protein) (K_L: Kontrol INS-1 lizatı, Ekso_L: Eksozom uygulanmış INS-1 lizatı, K_S: Kontrol INS-1 sekresyonu, Ekso_S: Eksozom uygulanmış INS-1 sekresyonu). K_L; 1,243 ± 0,002673, Ekso_L; 13,04 ± 0,3815, K_S; 1,894 ± 0,0004865, Ekso_S; 1,677 ± 0,05751 ***p<0,001.....	57

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3. 1: Protein tayin yöntemi için gerekli maddeler ve miktarları.....26

Tablo 3. 2: SDS-PAGE hazırlanırken kullanılan malzemeler ve miktarları. 27



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
kDa	: Kilodalton
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
M	: Molar
mM	: Milimolar
µM	: Mikromolar
rpm	: Dönüm sayısı (devir/dakika)
g	: Gravite
a.u.	: Arbitrary Birim
UI	: Uluslararası Ünite
%	: Yüzde
°C	: Santigrat

Kısaltmalar	Açıklama
5-FU	: 5-florourasil
AD	: Alzheimer
ADSC	: Adipoz doku kökenli kök hücre
ATP	: Adenozin trifosfat
ATV	: Atorvastatin
BM-MSC	: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre
BSA	: Sığır serum Albumin
CK	: Sitokeratin
COPB2	: Koatomer protein kompleksi alt birim beta 2'
CRC	: Kolorektal Kanser

Dk	: Dakika
DN	: Diyabetik Nefropeti
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSS	: Dekstran sülfat sodyum
DTT	: Ditiotreitol
Ekso	: Eksozom uygulanan hücre soyu
Ekso_INS-1	: Eksozom uygulanmış INS-1 grubu
Ekso_L	: Eksozom uygulanmış INS-1 lizati
Ekso_MiaPaca-2	: Eksozom uygulanmış MiaPaca-2 grubu
Ekso_S	: Eksozom uygulanmış INS-1 sekresyonu
ESC	: Embriyonik kök hücre
ESCRT-0/III	: Endozomal sıralama kompleks transportu
ESE	: Erken endozom
FBS	: Fetal sığır serumu
FHC	: İnsan sağlıklı kolorektal mukozal hücreleri
GPC1	: Glipikan-1
GTPaz	: Guanozin trifosfat
HCC	: Hepatoselüler karsinom
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HLF-1	: İnsan akciğer fibroblast hücresi
HREC	: İnsan retinal vasküler endotel hücreleri
HSC	: Hematopoitik kök hücre
hucMSCs	: İnsan göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri
IBD	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
ILV	: İntralüminal vezikül
IPMN	: İntraduktal papiller müsinöz neoplazma
iPS	: Pluripotent kök hücre
JAr	: İnsan koryokarsinom hücre soyu
K	: Kontrol
K_INS-1	: Kontrol INS-1 grubu
K_L	: Kontrol INS-1 lizati
K_MiaPaca-2	: Kontrol MiaPaca-2 grubu
K_S	: Kontrol INS-1 Sekresyonu
LDH	: Laktat Dehidrojenaz

LGR1	: α - 2 - glikoprotein
LSE	: Geç endozom
MCAO	: Orta serebral arter tıkanıklığı
MensSC	: Menstrüel kök hücresi
miRNA	: Mikro ribonükleik asit
mpkCCC	: Fare kortikal toplama kanalı ana hücreleri
mRNA	: Haberci ribonükleik asit
MSC	: Mezankimal/Stromal kök hücre
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MVB	: Multiveziküler gövde
NET	: Nöroendokrin tümör
NK	: Negatif Kontrol
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanserin
NTA	: Nanopartikül İzleme Analizi
OGD	: Oksijen ve glikozdan yoksun
PBS	: Fosfat Tamponu
PDAC	: Pankreas duktal adenokarsinomu
PID-PC	: Pankreatik ada türevli progenitör hücreler
PSC	: Pankreatik stellat hücre
PVDF	: Polivinilidenflorit
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
shRNA	: Küçük firkete ribonükleik asit
siRNA	: Kısa interferans ribonükleik asit
Sn	: Saniye
SNARE	: N-etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma protein reseptörü
TBS	: Tris-tamponlu tuz çözeltisi
TBS-T	: Tween20 içeren tris-tamponlu tuz çözeltisi
TRA2B	: Transformatör 2 β
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WAT	: Beyaz yağ dokusu
WST	: 2-(2-Metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H

ÖZET

PID-PC'LERDEN İZOLE EDİLEN EKSOZOMLARIN PANKREAS KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İmren HASOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR

Pankreas ekzokrin ve endokrin salgı yapan iki kısımdan oluşur. Ekzokrin pankreas asinar ve kanal hücrelerinden oluşurken, endokrin pankreas beş farklı hücre tipine sahip Langerhans adacıklarından oluşur. Pankreas kanseri en ölümcül malign neoplazmalardan biridir ve kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerindendir. Yıllık sağ kalım oranı %5'ten az olan pankreas kanserin de semptomların ileri evrede ortaya çıkmasından ve ayırt edici olmamasından dolayı tanısında geç kalınmaktadır. Kök hücreler kendi kendini yenileme, klonalite ve farklılaşma yeteneğine sahip embriyonik ve fetal dönemlerinde doku ve organların oluşumunda rol oynayan, yetişkin dönemlerinde ise hasar onarımında etkili olan farklılaşmamış hücrelerdir. Yetişkin dönem kök hücrelerinden biri olan mezenkimal kök hücreler antiinflamatuvar, immüno-regülatör ve immüno-supresif kapasiteye sahiptirler. Pankreatik ada türevli progenitör hücreler (PID-PC) ise tipik bir mezankimal kök hücre özelliğine sahiptir. Eksozomlar 50-150 nm çapında, lipid çift katman ile kaplı veziküllerdir. Hücreler arası etkileşimde etkili olan bu vezikülleri diğer veziküllerden ayıran ve onları önemli kılan taşıdıkları RNA kargolarıdır. Salgılandıkları hücrelerden miRNA ve mRNA taşıyarak hedef hücrede değişikliğe sebep olabilmeleri, kanser dahil birçok farklı hastalığın tanı ve tedavisinde eksozomların rol alabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın amacı PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından izole edilen eksozomları karakterize etmek ve ilk defa karşılaştırılmalı olarak boyut analizi yapmaktır. Ayrıca, çalışmanın ikinci amacı olarak, ilk defa PID-PC'lerden izole ettiğimiz eksozomların insülinoma beta hücre tümörü olan INS-1 ve pankreas kanseri olan MiaPaca-2 hücre soyları üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Eksozomlar her üç hücre soyundan eksozom izolasyon kitleri ile izole edilmiştir. Hem izole edilen eksozomlar da hem de her üç hücre soyundan elde edilen lizatlarda eksozom belirteci olarak bilinen Alix, TSG101, CD9 ve CD81 proteinleri Simple Wes ile analiz edilmiştir. Üç farklı hücre soyundan elde edilen eksozomların boyutları ve konsantrasyonları Nano Partikül İzleme Analizi (NTA) ile belirlenmiştir. Karakterize edilen PID-PC'lerden izole edilen eksozomlar 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda hem INS-1 hem de MiaPaCa-2 hücre soylarına 24 ve 72 saat uygulandıktan sonra hücre canlılık testi (MTT) yapılmıştır ve IC50 değerleri belirlenmiştir. Belirlenen IC50 değerlerindeki eksozomlar INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarına 72 saat uygulandıktan sonra hücreler fiks edilip immünohistokimyasal olarak HSP90, HSF-1, Nestin, Endoglin, Kaspaz-8, Aktif Kaspaz-3, Beclin ve p-Bcl-2 antikorları ile işaretlenmiştir. Işık mikroskopunda bilgisayar destekli görüntü analiz programı NIS-Element D 3.1 programı kullanılarak proteinlerin işaretlenme yoğunlukları hesaplanmıştır. Belirlenen IC50 değerindeki eksozomlar MiaPaca-2 hücre soyuna 72 saat uygulandıktan sonra LDH kiti ile hücre sitotoksitesi ölçülmüştür. Ayrıca eksozomun INS-1 hücre soyunda fonksiyonel olarak etkisini araştırmak için belirlenen IC50 değerindeki eksozomlar 72 saat INS-1 hücrelerine uygulandıktan sonra hücre sekresyonu toplanmış ve hücre lizatı elde edilmiştir. Elde edilen hücre lizatında ve sekresyonunda İnsülin ELİSA kiti ile insülin seviyelerine bakılmıştır.

Simple Wes analizlerine göre PID-PC, Miapaca-2 ve INS-1 hücre soylarından izole edilen eksozomlarda, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre lizatlarında Alix proteini tespit edilmiştir. TSG101 proteini PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre lizatlarında bulunurken, izole edilen eksozomlarında görülmemiştir. CD9 proteini PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre lizatlarında ve INS-1 hücre soyundan elde edilen eksozomlarda gözlemlenmiştir. CD81 proteini ise sadece MiaPaca-2 hücre soyundan elde edilen lizatta çok az miktarda görülmüştür.

NTA sonuçlarına göre PID-PC'lerden izole edilen eksozomların 103.6 ± 28.6 nm, MiaPaca-2 hücre soyundan izole edilen eksozomların 100.7 ± 10 nm, INS-1 hücre soyundan izole edilen eksozomların 147.2 ± 12.3 nm olarak boyutları analiz edildi.

Hücre canlılık analizine göre, PID-PC'lerden izole edilen eksozomlar ile MiaPaca-2 hücreleri 24 saat inkübe edilmesi sonucu düşük konsantrasyonlardaki eksozom uygulaması sonucu hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik olmamaktadır. MiaPaca-2 hücrelerinin 72 saat izole edilen eksozomlar ile inkübasyonu sonucu düşük dozlardan itibaren hücre canlılığında anlamlı bir azalma meydana gelmektedir. INS-1 hücre soyunun ise eksozom ile 24 saat inkübe edilmesi sonucu 5 µg/ml konsantrasyonda eksozom uygulamasına kadar hücre canlılığında kontrole kıyasla farklılık görülmemiştir. INS-1 hücrelerinin eksozomlar ile 72 saat inkübe edilmesi sonucunda 2,5 µg/ml konsantrasyonda eksozom uygulamasına kadar değişiklik gözlenmezken, ileri dozlarda eksozom uygulaması sonucu hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azalmaya başlamıştır.

İmmünohistokimyasal işaretlenme sonuçlarına göre, INS-1 hücre soyuna eksozom uygulandığında HSP90 immünboyama yoğunluğu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermezken, eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre soyunda HSP90'nın immünboyama yoğunluğu kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Ayrıca her iki hücre soyunun da eksozom uygulanan gruplarında MiaPaca-2 hücre soyunun HSP90 immünboyama yoğunluğu INS-1 hücre soyuna göre anlamlı derecede yüksektir. HSF-1 immünboyama yoğunluğunda eksozom uygulanan INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında kendi kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlılık yokken, MiaPaca-2 hücre soyunun kontrol grubunun INS-1 hücre soyunun kontrol grubuna göre ve eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre

soyunun eksozom uygulanan INS-1 hücre soyuna göre HSF-1 immünboyama yoğunlukları anlamlı derecede fazladır. Eksozom uygulanan ve uygulanmayan INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Nestin ve Endoglin immünboyama yoğunluğunda anlamlı bir farklılık yoktur. Nestin'in immünboyanması sonucunda, her iki hücre soyunun kontrol grubunda Nestin proteinine ait hiç işaretlenme yoktur. Benzer bir şekilde Endoglin'in immünboyanması sonucunda, INS-1 hücre soyunun hem kontrol grubunda hem de eksozom uygulanan grubunda, MiaPaca-2 hücre soyunda ise sadece kontrol grubunda Endoglin proteinine ait hiç işaretlenme olmamıştır.

Miapaca-2 hücre soyunda Kaspaz-8 ve Aktif Kaspaz-3 immünboyama yoğunluklarında eksozom uygulanan grupta kontrol gruba göre farklılık görülmemiştir. Beclin ve p-Bcl-2 immünboyama yoğunluklarında eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre soyunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır.

MiaPaca-2 hücre soyuna eksozom uygulaması sonrasında MiaPaca-2 hücre soyundan salınan LDH seviyesi $13,98 \pm 3,361$ olarak analiz edilmiş ve hücre sitotoksitesi belirlenmiştir.

Eksozom uygulanan INS-1 hücrelerine ait hücre sekresyonu ve lizatında ELİSA kiti ile ölçülen insülin seviyelerine göre hücre lizatlarında insülin seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Ancak hücre sekresyonunda insülin seviyesi kontrol gruba göre farklılık göstermemiştir. Ayrıca eksozom uygulanan INS-1 hücre lizatlarında insülin seviyesi hücre sekresyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir derecede artış göstermiştir.

Sonuç olarak, PID-PC, MiPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından ilk defa tarafımızca izole edilen ve boyut analizi gerçekleştirilen eksozomların literatürde yer alan farklı kaynaklardan izole edilen eksozom boyutlarına göre benzer olduğunu gördük. Alix proteininin üç hücre soyundan izole edilen eksozomlar için ve CD9 proteininin sadece INS-1'den izole edilen eksozomlar için spesifik bir belirteç olabileceğini gözlemledik. PID-PC soyundan izole edilen eksozomların MiaPaca-2 hücrelerini zamana ve doza bağlı olarak hücre ölümüne götürdüğünü hücre canlılık analizinde tespit ettik. Bunun yanı sıra MiaPaca-2 hücreleri için belirlenen IC50 değerinin pankreatik beta hücrelerini en iyi şekilde taklit eden ve bazı çalışmalarda sağlıklı pankreatik beta hücreleri yerine de kullanılabilen INS-1 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkili olmaması, izole edilen eksozomların sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini öldürebileceğini düşündürmektedir. İmmünboyama sonucunda MiaPaca-2 hücre soyunda HSP90'nın anlamlı bir şekilde artışı, pankreas kanserinde olası eksozom ile tedavi durumunda bu proteinin artışının bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir. p-Bcl-2 seviyesinin MiaPaca-2 hücre soyunda anlamlı azalışı hücrelerin apoptotik yolla ölebileceğini gösterirken, Aktif Kaspaz-3 seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmaması apoptotik hücre ölümünün çok fazla olmadığını göstermektedir. Beclin-1'deki anlamlı azalış hücrelerin otofojik yolla ölmeyebileceğini gösterirken, MiaPaca-2 hücrelerinde ölçülen LDH seviyesi ile ölen hücrelerin bir kısmının da nekroz ile öldüğünü göstermektedir. INS-1 hücrelerinde eksozom uygulaması sonrası insülin seviyesinin anlamlı bir şekilde artması eksozomların insülin mekanizmasına etki ederek üretimini artırdığını gösterirken, insülin sekresyonunda bir değişiklik olmaması eksozomların insülin salınımına etki etmediğini ya da fazla üretilen insülinin salınımı sırasında sorunlar olabileceğini göstermektedir.

Ekim 2022, 109. sayfa.

Anahtar kelimeler: Eksozom, Pankreatik Beta Hücre Tümörü, Pankreas Kanseri, Progenitör Hücre, Biyobelirteç



SUMMARY

EFFECTS OF EXOSOMES ISOLATED FROM PID-PCs ON PANCREATIC CANCER

M.Sc. THESIS

İmren HASOĞLU

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR

The pancreas consists of two parts, endocrine and exocrine. While the exocrine pancreas includes acinar and canal cells, the endocrine pancreas consists of the Langerhans islet which has five different types of cells. Pancreas cancer is one of the deadliest malignant neoplasms and the leading cause of death because of cancer. The annual survival rate is less than 5% for pancreatic cancer, which is also late in its diagnosis due to the fact that the symptoms occur at the advanced stage and are not distinguishing. A stem cell has the capability of self-perpetuation, clonality, and differentiation and it plays a role constitution of tissue and organ in the embryonic and fetal period, it is also effective in regeneration in the adult period. Mesenchymal stem cell which is one of the adult period stem cells has the capability of antiinflammatory, immunoregulatory, and immunosuppressive. Pancreatic islet-derived progenitor cells (PID-PC) has also properties of typically mesenchymal stem cells. The size of exosomes is 50- 150 nm, and are vesicles encased in a lipid bilayer. These vesicles that its effective cell-to-cell communication differs from other vesicles due to their RNA cargo contents. The fact that they can cause changes in the target cell by carrying miRNA and mRNA from the cells they are secreted suggests that exosomes may play a role in the diagnosis and treatment of many different diseases, especially cancer. The purpose of our study is to characterize exosomes isolated from the PID-PC, MiaPaca-2, and INS-1 cell lines and make an analysis comparatively of the size of this exosome for the first time. Besides, the second aim of this study is to research the effects of exosomes which were first time isolated from PID-PC on the INS-1 cells, which is a beta cell tumor, and MiaPaca-2 cells which is a pancreatic cancer

cell line. Exosomes were isolated from all three cell lines with exosome isolation kits. Alix, TSG101, CD9, and CD81 proteins which are known as markers for exosomes were analyzed with Simple Wes in cell lysates which were obtained from the three cell lines and also exosomes isolated from cell lines. The size and concentration of exosomes that were isolated from three different cell lines were detected with Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). The cell viability test (MTT) was done and IC50 values were detected after exosomes were isolated from PID-PC and characterized and also applied to INS-1 and MiaPaca-2 cell lines in which concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 and 10 µg/ml for 24 and 72 hour. The cells were fixed and were marked immunohistochemically with HSP90, HSF-1, Nestin, Endoglin, Kaspaz-8, Active Kaspaz-3, Beclin, and p-Bcl-2 antibodies after exosomes were applied with determined IC50 value in INS-1 and MiaPaca-2 cell lines for 72 hours. The labeling intensities of the proteins were calculated using the computer-aided image analysis program NIS-Element D 3.1 under the light microscope. The cell cytotoxicity was measured by using an LDH kit after exosomes were applied with a determined IC50 value in the MiaPaca-2 cell line for 72 hours. Moreover, to investigate the functional effect of exosomes on the INS-1 cell line, cell secretion was collected, and cell lysates were obtained after exosomes were applied with a determined IC50 value in INS-1 for 72 hours. Insulin levels were analysed at by using an Insulin ELISA kit in the obtained cell lysates and secretion.

As a result of Simple Wes analysis, Alix protein was detected in exosomes isolated from PID-PC, MiaPaca-2, INS-1, and cell lysates obtained from MiaPaca-2, INS-1. TSG101 proteins were detected in cell lysates obtained from PID-PC, MiaPaca-2, and INS-1, but not isolated exosomes. CD9 protein was shown in PID-PC, MiaPaca-2, and INS-1 cell lysates and exosomes isolated from INS-1. On the other hand, CD81 protein was detected only in lysate obtained from the MiaPaca-2 cell line.

As a result of NTA, the dimensions of exosomes isolated from PID-PCs as 103.6 ± 28.6 nm, exosomes isolated from MiaPaca-2 cell line as 100.7 ± 10 nm, and exosomes isolated from INS-1 cell line as 147.2 ± 12.3 nm were analyzed.

According to cell viability analysis, incubation of MiaPaca-2 cells with exosomes isolated from PID-PCs for 24 hours was not statistically significant compared to the control group at low concentrations of exosome application. As a result of the incubation of MiaPaca-2 cells with isolated exosomes for 72 hours, a decrease in cell viability occurred beginning from low doses. In the INS-1 cell line, there was no difference in cell viability compared to the control until the application of the exosome at a concentration of 5 µg/ml after 24 hours of incubation with the exosome. As a result of incubation of INS-1 cells with exosomes for 72 hours, no change was observed until the application of exosomes at a concentration of 2.5 µg/ml, while cell viability began to decrease as a result of exosome application at higher doses.

According to the results of immunohistochemical staining, the immunostaining intensity of HSP90 when exosome was applied to the INS-1 cell line was not statistically significant compared to the control group, while the immunostaining intensity of HSP90 increased significantly in MiaPaca-2 cell line, which was applied to the exosome, compared to the control group. In addition, the HSP90 immunostaining intensity of the MiaPaca-2 cell line was significantly higher than the INS-1 cell line in the exosome-treated groups of both cell lines.

While there was no statistically significant difference in HSF-1 immunostaining intensity in the exosome-treated INS-1 and MiaPaca-2 cell lines compared to the control group, the HSF-1 immunostaining intensities were significantly higher in the control group of MiaPaca-2 cell line

compared to the control group of the INS-1 cell line, and also the exosome-treated MiaPaca-2 cell line compared to the exosome-treated INS-1 cell line. There was no significant difference in Nestin and Endoglin immunostaining intensity in INS-1 and MiaPaca-2 cell lines treated with and without exosomes. As a result of Nestin immunostaining, there is no labeling of Nestin protein in the control group of both cell lines. Similarly, as a result of Endoglin immunostaining, there was no labeling of Endoglin protein in the INS-1 cell line both in the control group and in the exosome treated group, and in the MiaPaca-2 cell line only in the control group.

In the MiaPaca-2 cell line, Caspase-8 and Active Caspase-3 immunostaining intensities were not different in the exosome-treated group compared to the control group. There was a statistically significant decrease in Beclin and p-Bcl-2 immunostaining intensities in the exosome-treated MiaPaca-2 cell line compared to the control group.

After exosome application to the MiaPaca-2 cell line, the level of LDH released from the MiaPaca-2 cell line was analyzed as $13.98 \pm 3.361\%$ and cell cytotoxicity was determined.

According to the insulin levels measured with the ELISA kit in the cell secretion and lysate of the exosome-treated INS-1 cells, the insulin level in the cell lysates increased statistically significantly compared to the control group. However, the level of insulin in cell secretion did not differ compared to the control group. In addition, insulin levels in exosome-treated INS-1 cell lysates showed a statistically significant increase compared to cell secretion.

As a result, we saw that the exosomes isolated from PID-PC, MiPaca-2, and INS-1 cell lines for the first time by us and whose size analyses were performed, were similar according to the exosome sizes isolated from different sources in the literature. We observed that the Alix protein may be a specific marker for exosomes isolated from the three cell lines and the CD9 protein may be a specific marker only for INS-1 isolated exosomes. In cell viability analysis, we detected that exosome isolated from the PID-PC cell line caused cell death in the MiaPaca-2 cells in a time- and dose-dependent manner. In addition, the IC50 value determined for MiaPaca-2 cells has no effect on cell viability in INS-1 cells, which best mimics pancreatic beta cells and can be used instead of healthy pancreatic beta cells in some studies, suggesting that isolated exosomes can kill cancer cells without damaging healthy cells. The significant increase of HSP90 in the MiaPaca-2 cell line as a result of immunostaining suggests that the increase of this protein may be a marker in the case of possible exosome treatment in pancreatic cancer. A significant decrease in the p-Bcl-2 level in the MiaPaca-2 cell line indicates that cells can die in an apoptotic way, while a significant change in the Active Caspase-3 level indicates that apoptotic cell death is not too much. While the significant decrease in Beclin-1 indicates that the cells may not die autophagically, the LDH level measured in MiaPaca-2 cells indicates that some of the cells that die also die by necrosis. A significant increase in insulin level after exosome administration in INS-1 cells indicates that exosomes increase their production by affecting the insulin mechanism, while the absence of a change in insulin secretion indicates that exosomes do not affect insulin secretion or that there may be problems during the release of excess insulin.

October 2022, 109 pages.

Keywords: Exosomes, Pancreatic Beta Cell Tumor, Pancreatic Kancer, Progenitor Cell, Biomarker

GİRİŞ

Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin salgı yapabilen bir bezdir. Pankreas kanseri pankreasta görülen hastalıklardan biridir. 2030 yılında kansere bağlı ölümler arasında ikinci sıraya gelmesi beklenen pankreas kanserinin yıllık sağ kalım oranı %5 ten azdır. Bunun en önemli nedeni ise pankreas kanserinde erken tanının zor olmasıdır (Canto ve diğ., 2013, Rahib ve diğ., 2014).

Nükleik asit ve protein içeren, 50-150 nanometre (nm) (Katsuda ve diğ., 2014) çapındaki lipit çift katmanlı salgı vezikülleri olan eksozomlar kan, idrar, anne sütü ve ağız içi salgıları gibi tüm vücut sıvılarında bulunurlar (Corrado ve diğ., 2013; Brinton ve diğ., 2015). Eksozomlar mRNA (Masciopinto ve diğ., 2004) ve miRNA (Valadi ve diğ., 2007) taşımalarından dolayı diğer salgı veziküllerinden ayrılırlar. Hedef hücreye ulaşan eksozomlar, hücreye transfer olduklarında içerdikleri RNA kargoları ile hücrenin fonksiyonunu değiştirebilirler (Van der Pol ve diğ., 2012; Minciacchi ve diğ., 2015). Bundan dolayı da eksozomların birçok farklı kaynaktan izole edilerek farklı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Yabancı mersini kaynaklı eksozomların insan akciğer karsinomu hücre soyu üzerinde sitotoksik etki göstermesi (Lapa ve diğ., 2017), diyabetik olmayan sıçan kanından izole edilen eksozomların kardiyomiyositler, iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruması, tip II diyabette de eksozomların koruyucu etki göstermesi (Davidson ve diğ., 2018) eksozomların tedaviye yönelik kullanılmasına birer örnek olarak gösterilebilir.

Eksozom ile yapılan birçok çalışmada eksozom kaynağı olarak kök hücreler kullanılmıştır. Çalışmalarda özellikle mezenkimal kök hücreler tercih edilmiştir. Antiinflatuar, immünoregülatör ve immünosupresif olmaları, ayrıca yüksek onarım kabiliyetine sahip olmaları bu tercihin ana sebeplerini oluşturmaktadır (Aggarwal ve Pittenger, 2005; Gao ve diğ., 2016).

Tüm vücut sıvılarında bulunmaları, stabil olmaları ve içeriklerinin kökenlendiği hücreye benzemelerinden dolayı (Rak ve diğ., 2013; Hornickve diğ., 2015) eksozomların çeşitli hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Örneğin Alzheimer (AD) üzerinde yapılan bir çalışmada, AD için kullanılan bir biyobelirteç olan Thr-181, semptomları

olan AD hastalarının beyin omurilik sıvısından izole edilen eksozomlarda yüksek seviyede mevcut olduğunun gösterilmesi (Saman ve diğ., 2012) gibi Lösin bakımından zengin α -2-glikoprotein (LRG1)'in, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hastaların üriner eksozomlarında yüksek seviyelerde eksprese edildiğinin bulunması (Li ve diğ., 2011) eksozomların biyobelirteç olarak tanıda kullanılabileceğini göstermiştir.

Eksozomların kanser tedavisinde de yardımcı olabilecekleri yapılan birçok çalışma ile desteklenmiştir. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomların, tümör anjiogenezini baskılayarak ve tümör büyümesini inhibe ederek meme kanseri üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2013). Meme kanseri üzerinde yapılan başka bir çalışmada endotelden izole edilen eksozomlar kullanılmıştır ve bu eksozomların miRNA-503 vasıtası ile kanser hücre yayılımı ve çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (Bovy ve diğ., 2015). İnsan yetişkin karaciğer kök hücrelerinden izole edilen eksozomlar kullanarak, HepG2 hepataselüler karsinoma hücre soyu üzerinde yapılan çalışmada tümör hücre büyümesinin baskılandığı gözlemlenmiştir (Fonsato ve diğ., 2012). Bu çalışmalara karşın Osteosarkom ve gastrik kanser hücre soyları (MG63/SGC7901 hücre soyları) (Qi ve diğ., 2017) ve akciğer kanser modeli oluşturulan fareler ile yapılan çalışmalarda uygulanan eksozomların kanser metastazı ya da tümör büyümesine neden olduğu belirtilmiştir (Wei ve diğ., 2017). Dolayısı ile farklı çalışmalarda eksozomların kanser hücreleri üzerinde farklı etkileri de olabildiği gösterilmiştir.

Eksozomların tanıda kullanılması pankreas kanseri tanısı açısından oldukça önemlidir. Cerrahi işlem yapılmadan kolaylıkla eksozom üzerinden pankreas kanser tanısının konulması pankreas hastaları için umut vadetmektedir. Yapılan bir çalışmada pankreas kanseri hastalarının serum örneklerinden elde edilen eksozomal miR-17-5p'nin, pankreas kanseri hastalarında, pankreas kanseri olmayan hastalara ve sağlıklı katılımcılara göre daha yüksek seviyede anlatımının olduğu belirlenmiştir ve aday bir biyobelirteç olduğu düşünülmektedir (Que ve diğ., 2013). %5'den az sağ kalım oranı göz önünde bulundurulduğunda, biyobelirteç olarak kullanımının yanı sıra eksozomların pankreas kanseri tedavisinde de kullanılabileceği düşünülmektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden (BM-MSC) izole edilen eksozomlar, pankreas kanser hücre soyu olan PANC-1 hücreleriyle birlikte in vitro şartlarda inkübe edilmiştir. Eksozomların miR-126-3p vasıtasıyla pankreas kanseri hücrelerinin

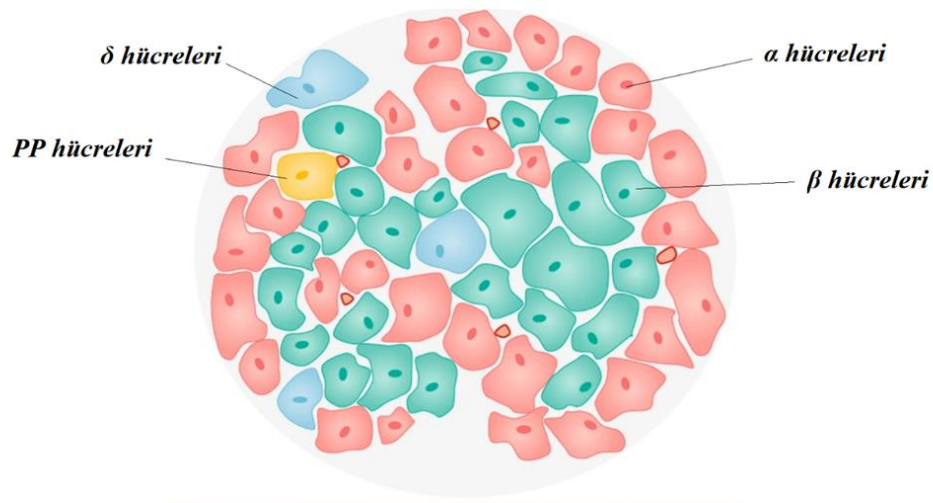
proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını inhibe ettiği ve apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Wu ve diğ., 2019).

Yapmış olduğumuz çalışmada Pankreatik ada türevli progenitör hücrelerden (PID-PC), insan pankreas adenokarsinomu olan malign özellikteki MiaPaca-2 hücrelerinden ve sıçan insülinoma hücre soyu INS-1'den izole edilen eksozomların boyut olarak karşılaştırılması çalışmanın ilk amacını oluşturmaktadır. Bu bağlamda PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından izole edilen eksozomlar ilk kez karşılaştırılmış ve karakterize edilmiştir. PID-PC'den izole edilen eksozomların MiaPaca-2 ve INS-1 hücre hattına, 24 ve 72 saat inkübasyonunun ardından hücre ölümüne olan etkilerinin araştırılması ise ikinci amacımızdır. İlk kez yapılmış olan bu çalışma hem literatürdeki boşluğu doldurması hem de tedavide kullanılabilir olması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca meydana gelen hücre ölümü ile ilgili bazı proteinlerin analizi ile de moleküler mekanizma hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PANKREAS

Pankreas ekzokrin ve endokrin salgı yapan bir bezdir. Ekzokrin pankreas, sindirim enzimleri ve sodyum bikarbonat üreten pankreas asiner hücreleri ve kanal hücrelerinden oluşur. Ekzokrin pankreasın ana görevi sindirim enzimlerini salgılamak ve besinlerin emilimini sağlamaktır. (Leung, 2010.) Pankreasın endokrin salgı yapan bölümü Langerhans adacığı ise beş farklı tip hücreden oluşur (Şekil 2.1). Bu hücreler glukagon salgılayan alfa hücreleri (α hücreleri), insülin salgılayan beta hücreleri (β hücreleri), somatostatin salgılayan delta hücreleri (δ hücreleri), pankreatik polipeptit salgılayan PP hücreleri ve ghrelin salgılayan epsilon hücrelerdir (Kulkarni, 2004; Leung, 2010). Adacığın % 80'ini beta hücreleri oluşturur ve beta hücreleri, adacık çevresinde alfa ve delta hücreleri ile çevrili merkezde yer alır, bu sayede adacıkta bir parakrin hücre-hücre etkileşimi sağlanır (Leung, 2010). İnsan pankreası ve kemiricilerin pankreası arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin fare pankreasında birden fazla yardımcı kanal varken insan pankreasında ise tek bir yardımcı kanal vardır. İnsan pankreasında Langerhans adacık sayısı fare Langerhans adacık sayısından ortalama 2000 kat daha fazladır. İnsan pankreas adacıkları tek düze ve intralobiler iken fare ve sıçan pankreasında adacıklar rastgele ve interlobülerdir (Case, 2006; Dolenšek ve diğ, 2015).



Şekil 2. 1: Pankreas Langerhans Adacığı (Campbell ve Newgard, 2021).

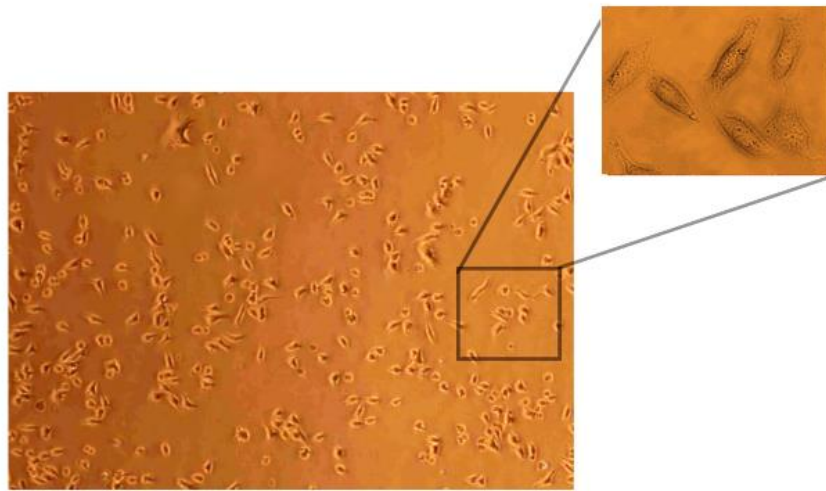
2.1.1. Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri en ölümcül malign neoplazmalardan biridir. Adenokarsinoma ve pankreas endokrin tümör olarak iki ana tümör tipinden oluşur. Gelişmiş ülkelerde kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir (Vincent ve diğ., 2011; Ferlay ve diğ., 2012; Hidalgo ve diğ., 2015; Noone ve diğ., 2017).

Pankreas kanserinde yıllık sağ kalım oranı %5'ten azdır. Bunun en büyük sebeplerinden biri pankreas kanserinin tanısının geç yapılabilmesi olmalıdır. Pankreas kanserinde spesifik olmayan semptomlar ve tümör tarafından kolaylıkla istila edilebilen ana kan damarlarının yakınlığı gibi birçok sebepten dolayı tanısal güçlük oluşur (Canto ve diğ., 2013). Ayrıca yapılan bir araştırma da şu an kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sırada olan pankreas kanserinin 2030 yılına kadar ikinci sıraya gelebileceği düşünülmektedir (Rahib ve diğ., 2014).

2.1.1.1. MiaPaca-2 hücre soyu

MiaPaca-2 hücre soyu insan pankreas dokusundan elde edilen epitel hücre kökenli karsinomadır. 65 yaşında Kafkas erkek bireyden elde edilmiştir ve bu hücre soyu hipotriploiddir. MiaPaca-2 hücreleri büyük ve küçük hücrelerden (morula) oluşan iki farklı morfolojik özellik gösterir. Aynı zamanda Sitokeratin 5/6 (CK5/6'), AE1/AE3 ve E-kaderin eksprese ettikleri için epitelyal, vimentin eksprese ettikleri için de mezenkimal özelliklere sahiptir (Gradiz ve diğ., 2016).

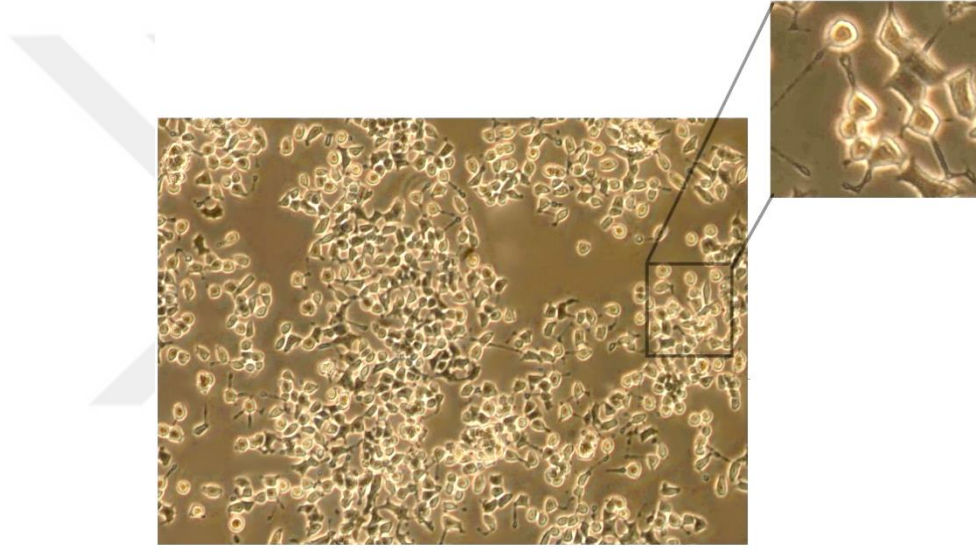


Şekil 2. 2: MiaPaca-2 hücre soyunun ışık mikroskobunda 10x ve 20x büyütmedeki görüntüsü.

2.1.1.2. *İnsülinoma INS-1 hücre soyu*

Sıçan insülinoma hücre soyu olan INS-1 aşırı insülin salgılayan beta hücreleridir. Genellikle doğal pankreatik beta-hücrelerine özgü tipik morfolojik özellikler gösterir (Asfari ve diğerleri, 1992).

INS-1 hücreleri, oksidatif strese zarar görmeye oldukça duyarlıdır, bu yüzden oksijen radikalinin aracılık ettiği işlev bozukluğu ve sitotoksikite çalışmaları ayrıca hücre büyümesi ve hayatta kalma faktörlerinin incelenmesi için çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hohmeier ve Newgard, 2004).



Şekil 2. 3: INS-1 hücre soyunun ışık mikroskopunda 10x ve 20x büyütmedeki görüntüsü.

2.2. KÖK HÜCRE

Kök hücreler kendi kendini yenileme, klonalite ve farklılaşma yeteneğine (potansi) sahip, bireyin embriyonik ve fetal dönemlerinde doku ve organların oluşumunda rol oynayan, yetişkin dönemlerinde ise hasar onarımında etkili olan farklılaşmamış hücrelerdir (Kolios ve Moodley, 2013.) Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre beş grupta incelenir:

- Totipotent kök hücreler; en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir, tüm organizmanın hücrelerine farklılaşabilirler ve hem embriyo hem de ekstra embriyonik yapılar oluşturabilirler.
- Pluripotent kök hücreler, üç germ tabakasını da oluşturabilirler ancak plasenta gibi ekstra embriyonik yapıları oluşturmaz.
- Multipotent kök hücreler, pluripotent kök hücrelere göre daha az hücre türüne farklılaşma yeteneğine sahiptir.
- Oligopotent kök hücreler, birkaç hücre tipine farklılaşabilir.
- Unipotent kök hücreler, en dar farklılaşma yeteneklerine sahiptirler ve yalnızca bir hücre tipi oluşturabilirler (Zakrzewski ve diğ., 2019).

Kök hücre tipleri embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler olarak iki ana gruba ayrılır.

Embriyonik kök hücreler (ESC); ESC'ler, blastokistin iç hücre kütesinden türetilen pluripotent kök hücrelerdir (Evans ve Kaufma, 1981). Bu hücreler, üç germ tabakasını da verebilir. (Kolios ve Moodley, 2013.)

Erişkin kök hücreler; doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan, bulunduğu dokudaki hücrelerin iyileşmesini, büyümesini ve yenilenmesini sağlayan farklılaşmamış hücrelerdir. Bu hücrelerin sınırlı bir farklılaştırma kabiliyetleri vardır (Ateş, 2016; Zakrzewski ve diğ., 2019).

Erişkin kök hücrelerin de üç tipi vardır:

- Hematopoietik kök hücreler (HSC); yetişkinlerde kemik iliğinde bulunan olgun kan hücrelerine farklılaşan kök hücrelerdir (Laurenti ve Göttgens, 2018).
- Mezenkimal/Stromal kök hücreler; birçok dokuda bulunur. Kemik iliğinde bu hücreler esas olarak kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşır (Zakrzewski ve diğ., 2019).

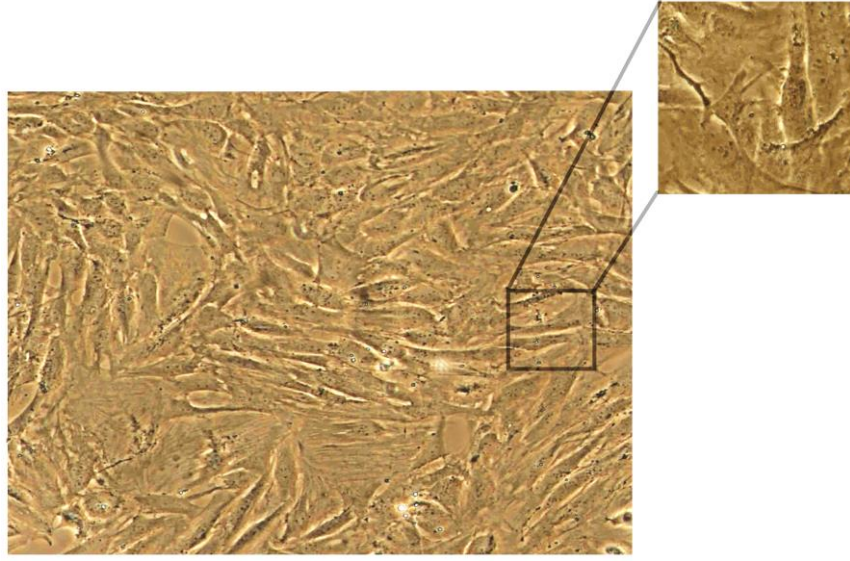
- Doku ve organlarda yerleşik kök hücreler; yetişkindeki bazı doku ve organların yaralanmayı takiben yenilenme ve onarma yeteneğine sahip dokuya özgü hücrelerdir (Passier ve Mummery, 2003).

Bu kök hücre tiplerinin yanı sıra 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka'nın beraber yapmış olduğu çalışmada Oct3/4, Sox2, c-Myc, ve Klf4 transkripsiyon faktörlerini birleştirerek, somatik hücrelerden pluripotent hücreler elde etmişlerdir ve bu hücrelere indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPS) adını vermişlerdir. Embriyonik hücrelerinin etik problemler sebebiyle kullanım alanlarının kısıtlı olmasından dolayı, iPS'lerin kök hücre tedavileri üzerine yapılan çalışmalarda etik problemlere yol açmadan kullanılabileceği için bu çalışma birçok hastalık tedavisine umut olmuştur.

2.2.1. Mezankimal Kök Hücre

Kemik iliği, adipoz ve sinovyum zarı (Campagnoli ve diğ., 2001) dahil hemen hemen tüm dokularda bulunan mezenkimal kök hücreler (MSC) Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'nin belirlediği kriterlere göre CD105, CD90 ve CD73 yüzey moleküllerini eksprese etmeli ve aynı zamanda CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 α veya CD19 ve HLA-DR yüzey moleküllerine sahip olmaması gerekmektedir. Ayrıca kültüre edilirken plastik yüzeye yapışmalı, osteositlere, kondrositlere ve adipositlere farklılaşabilmelidirler (Dominici ve diğ., 2006).

MSC'ler büyüme faktörleri ve diğer kemokinleri eksprese ederek hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi indükleyebilirler (Murphy ve diğ., 2013). Antiinflamatuvar, immünoregülatör ve immünosupresif kapasiteye sahiptirler (Aggarwal ve Pittenger 2005; Gao ve diğ., 2016). Travma oluştuğunda yara alan bölgesinde oluşan iltihap, yerel progenitör ve olgun hücrelerin onarım süreçlerini engeller, bu durumda MSC'ler, parakrin mekanizmalar yoluyla devreye girer ve rejeneratif ortamı anti-inflamatuvar ve immünomodülatör mekanizmalar yoluyla modüle ederler (Murphy ve diğ., 2013). Pankreatik ada türevli progenitör hücreler ise tipik bir MSC özelliğine sahiptir, ayrıca Pankreatik ada türevli progenitör hücrelerin sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden telomeraz aktivitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum Pankreatik ada türevli progenitör hücreleri tedavide kullanılmaları için daha avantajlı bir hale getirmektedir (Karaoz ve diğ., 2010).



Şekil 2. 4: Pankreatik ada türevli progenitör hücrelerin ışık mikroskopunda 10x ve 20x büyütmedeki görüntüsü.

2.3. EKSOZOMLAR

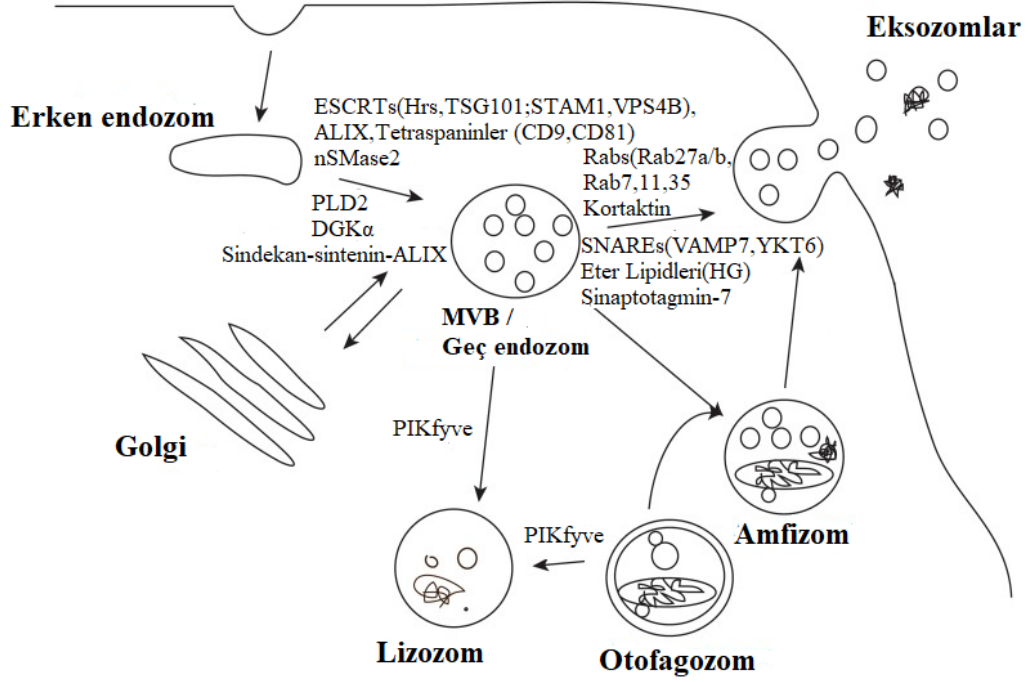
Ökaryotik hücreler, hücre dışı ortamlarında çok sayıda protein, lipid ve nükleik asit içeren hücre zarı vezikülleri adı verilen kompleks yapıları salgırlar ve bu yapılarla diğer hücreleri etkileyebilirler (Théry, 2011). Salgılanan bu zar veziküllerinin bir alt tipi de eksozomlardır (Théry ve diğ., 2009). Eksozomlar, nükleik asit ve protein içeren, 50-150 nm (Katsuda ve diğ., 2014) çapındaki lipid çift katman ile kaplı veziküllerdir. Dendritik hücreler (Zitvogel ve diğ., 1998), makrofajlar, lenfositler (Raposo ve diğ., 1996; Blanchard ve diğ., 2002) epitel (Van Niel ve diğ., 2001) ve tümör hücreleri (Wolfers ve diğ., 2001) gibi farklı hücre kaynaklarından salınırlar. Kan, idrar, anne sütü ve ağız içi salgıları gibi tüm vücut salgılarında bulunurlar (Corrado ve diğ., 2013; Brinton ve diğ., 2015). Yapılan çalışmalar ile eksozomların rastgele bir hücre içi protein dizisi içermediğini esasen plazma zarından, endositik yoldan ve sitozolden gelen ve diğer hücre içi bölmelerden çok sınırlı miktarda protein içeren birkaç protein ailesinden oluşan spesifik bir set içerdiğini gösterilmiştir. Bu durum onları apoptotik hücreler tarafından salınan zar veziküllerinden farklı kılmıştır. Eksozomlar canlı hücreler tarafından aktif olarak salgılanmakta ve intra-endozomal kökenleri bulunmaktadır (Théry ve diğ., 2009, Théry ve diğ., 1999; Mathivanan ve Simpson, 2009). Eksozomları diğer veziküllerden farklı kılan asıl etmen ise eksozomların mRNA (Masciopinto ve diğ., 2004) ve miRNA (Valadi ve diğ., 2007) taşıyor olmalarıdır. Çünkü eksozomlar hedef hücreye ulaşır transfer olduklarında

içerdikleri RNA kargoları ile hücrenin fonksiyonunu değiştirebilirler (Van der Pol ve diğ., 2012; Minciacchi ve diğ., 2015). Bu özellikleri ile hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanabilir duruma gelmektedir.

2.3.1. Eksozomların Biyogenezi

Eksozomlar, üç aşamadan meydana gelen endositik hücresel yol tarafından oluşturulur. İlk aşamada plazma membran invajinasyonu, endositik vezikülleri oluşturur. Daha sonra ikinci aşamada, endozomal membranın içe doğru tomurcuklanması başlar, bu da multiveziküler gövdeleri (MVB'ler) ortaya çıkarır. Üçüncü ve son aşamada, MVB'ler plazma membranı ile birleşir ve veziküler içerikleri (eksozom) serbest bırakır (Batista, 2011).

Plazma zarının ilk invajinasyonu, hücre yüzeyi proteinlerini ve hücre dışı ortamla ilişkili çözünür proteinleri içeren fincan şeklinde bir yapı oluşturur. Bu, erken endozomunun (ESE) de novo oluşumuna yol açar ve bazı durumlarda önceden var olan bir ESE ile doğrudan birleşebilir (Kalluri ve LeBleu, 2020). Trans-Golgi ağı ve endoplazmik retikulum, ESE'nin oluşumuna ve içeriğine de katkıda bulunabilir (Kalluri, 2016; Hessvik ve Llorente, 2018; Van Niel ve diğ., 2018; Willms ve diğ. 2018; Mathieu ve diğ., 2019; McAndrews ve Kalluri, 2019). ESE'ler geç endozomlarına (LSE'ler) olgunlaşır ve nihayetinde multiveziküler endozomlar olarak da adlandırılan MVB'ler oluşur. MVB'ler, endozomal sınırlayıcı zarın içe doğru yayılmasıyla (yani, plazma zarının ikinci invajinasyonu) oluşur. Bu süreç, birkaç intralüminal vezisülleri (ILV) içeren MVB'lerle sonuçlanır. MVB, parçalanacak lizozomlarla veya otofagozomlarla birleşebilir veya içerdiği ILV'leri eksozomlar olarak serbest bırakmak için plazma membranıyla birleşir (Kahlert ve Kalluri, 2013; Van Niel ve diğ., 2018).



Şekil 2. 5: Eksozom Biyogenezi (Hessvik ve Llorente 2018).

MVB'lerin plazma membranına taşınması, bunların aktin ve mikrotübül hücre iskeleti ile etkileşimine bağlıdır (Mittelbrunn ve diğ. 2011; Hoshino ve diğ. 2013; Villarroya-Beltri ve diğ. 2014). Aktin bağlayıcı protein kortaktinin devreden çıkarılması eksozom salınımını azalttığı, kortaktinin aşırı ekspresyonunun eksozom salınımını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca kortaktinin, MVB'lerin hem trafiğine hem de plazma membranına yerleştirilmesine dahil olduğu gösterilmiştir (Sinha ve diğ., 2016). Ek olarak bu trafiğin düzenlenmesinde Rab GTPazlar (Stenmark, 2009), vezikül tomurcuklanması, veziküllerin aktin ve tübülün boyunca taşınması ve membran füzyonu dahil olmak üzere birçok aşamasında devreye girer (Hessvik ve Llorente, 2018).

Eksozomların MVB'lerin plazma membranı ile füzyonu üzerine hücre dışı ortama salınmasında ise birkaç enerji engelinin aşılması gerekir. Bir dizi protein-lipit ve protein-protein etkileşimlerinin, bu enerji engellerini azalttığı ve füzyonu kolaylaştırdığı, ayrıca özgüllük sağladığı gösterilmiştir. Membran füzyonunda yer alan proteinler arasında çözünebilir N-

etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma protein reseptörleri (SNARE'ler), bağlama faktörleri, Rab'lar ve diğer Ras GTPazlar bulunur (Pfeffer,2007).

2.3.2. Eksozomların Hastalıklarla İlişkisi

2.3.2.1. Hastalık Tanısında Eksozomlar

Eksozomlar tüm vücut sıvılarında bulunması, stabil olması ve içeriklerinin ana (kökenlendiği) hücreye benzerliği nedeniyle, çeşitli hastalıklar için biyobelirteç olarak büyük potansiyele sahiptirler (Rak ve diğ., 2013; Hornickve diğ., 2015). Patofizyolojik koşulların göstergesi olan konak hücrelerinden nükleik asit ve protein taşımaları eksozomları klinik teşhisde kullanılabilmeleri açısından önemlerini artırır. Yapılan çalışmalarda eksozomların kanser, nörodejeneratif, metabolik, bulaşıcı ve diğer hastalıklar ile ilişkili nükleik asitler ve proteinleri içerdikleri gösterilmiştir. Ayrıca, eksozomlar, kan ve idrar gibi kolayca elde edilebilen vücut sıvılardan izole edilebilir olmaları tanısal uygulamalar için önemli hedeflerdir (Lin ve diğ., 2015).

Welker ve arkadaşları kronik hepatit C'li hastalarda serum eksozomal CD81 seviyesinin yükseldiğini ve iltihaplanma ve fibrozun şiddeti ile ilişkili görüldüğünü bildirerek, eksozomal CD81'in hepatit C teşhisi için potansiyel bir belirteç olabileceğini göstermiştir (Welker ve diğ., 2012).

Yapılan başka bir çalışmada ise eksozomal amiloid peptidlerinin, Alzheimer (AD) hastalarının beyin plaklarında biriktiği bildirilmiştir (Rajendran ve diğ., 2006). AD için kullanılan bir biyobelirteç olan Thr-181, hafif semptomları olan AD hastalarının beyin omurilik sıvısı örneklerinden izole edilen eksozomlarda yüksek seviyede mevcut olduğu belirtilmiştir (Saman ve diğ., 2012). Çalışmalarda ayrıca kümelenmesi Parkinson hastalığı patolojisinde merkezi bir rol oynayan α -sinükleinin, Parkinson hastalığının *in vitro* model sisteminde eksozomlardan salındığını da göstermiştir (Alvarez-Erviti ve diğ., 2011). Parkinson hastalığı üzerine yapılan başka bir çalışmada ise parkinson olan hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınan serum eksozomlarında proteomik profillenme sonucunda farklı şekilde proteinler tanımlanmıştır. (Tomlinson ve diğ., 2015).

Valadi'nin 2007'de eksozomların RNA'lar içerdiğine dair keşfi, eksozomal RNA'ların, özellikle de teşhis biyobelirteçleri olarak miRNA'ların araştırılmasına büyük ilgi uyandırmıştır (Valadi ve diğ., 2017). Son çalışmalar, eksozomal miRNA'ların RNaza bağlı bozunmadan korunduğunu

ve bu nedenle dolaşımdaki plazma ve serumda kararlı bir şekilde tespit edilebildiğini, (Hunter ve diğ., 2008; Mitchell ve diğ., 2008; Taylor ve Gercel-Taylor, 2008) bu da klinik tanı uygulamalar için ideal biyobelirteçler olabileceğini göstermiştir.

Eksozomal miR-1 ve miR-133a kardiyovasküler hastalıklar için (Chen ve diğ., 2006; Kuwabara ve diğ., 2011) miR-29c'nin ise renal fibroz için tanısal biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir (Lv ve diğ., 2013; Lv ve diğ., 2014). Başka bir çalışmada ise akciğer hastalığı ile ilgili olarak, astımlı hastalardan veya sağlıklı bireylerden alınan bronko-alveolar lavaj sıvılarından alınan eksozomların, farklı miRNA profilleri sergilediği gösterilmiştir. (Levanen ve diğ., 2013).

HIV-1 ile enfekte ve enfekte olmamış annelerin sütünden izole edilen eksozomların miRNA ekspresyon profilleri çıkartıldığında HIV-1'in sağlıklı kontrollere kıyasla HIV-1 ile enfekte kadınlarda 19 miRNA'nın farklı ekspresyon modeli olduğu belirlenmiştir. Bu eksozomal miRNA'ların kadınlarda HIV-1 enfeksiyonunu tanımlamak için biyobelirteç olarak kullanabilme potansiyelini göstermiş ayrıca HIV-1'in anneden çocuğa geçişinin önlenmesinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli olduğunu düşündürmüştür (Zahoor ve diğ., 2020).

Ayrıca, birkaç çalışma miRNA'lara ek olarak, eksozomal mRNA'ların potansiyel olarak klinik tanıda biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Örneğin idrardan izole edilen eksozomal mRNA'ların böbrek hastalıklarında (Lv ve diğ., 2014), kolorektar kanser hücrelerinden izole edilen eksozomal mRNA'ların ise kanser teşhisinde biyobelirteç olarak görev yapabileceği bildirilmiştir (Hong ve diğ., 2009).

2.3.2.2. Kanser Tanısında Eksozomlar

Özellikle, kanser kaynaklı eksozomlar, kanser hücrelerinde genetik veya sinyal değişikliklerini yansıtan yükü taşıdıklarından, kanserin erken teşhisi için biyobelirteç görevi görmektedir (Li ve diğ., 2015; Tang ve Wong, 2015; Melo ve diğ., 2017).

Kanser hücrelerinde lipid metabolizması sıklıkla bozulduğundan dolayı sağlıklı ve kanser hücreleri arasında farklı bir lipid bileşimi olması beklenir (Fernandis ve Wenk, 2009). Burdan yola çıkılarak yapılan bir çalışmada, eksozomların prostat kanseri biyobelirteçleri kaynağı olarak kullanımını araştırmak için, 15 prostat kanseri hastasından ve 13 sağlıklı kontrolden alınan üriner eksozomların kantitatif bir moleküler lipidomik analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak dokuz ayrı eksozomal lipid türünün seviyelerinin iki grup arasında önemli ölçüde farklı

olduğu belirlenmiştir. Bu durum üriner eksozomal lipidlerin prostat kanserinde biyobelirteç olarak kullanabileceğini göstermiştir (Skotland ve diğ., 2017).

Üriner eksozomlarda küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) ile ilişkili proteinleri taramayı amaçlayan bir çalışmada Lösin bakımından zengin α - 2 - glikoprotein (LRG1)'in, NSCLC hastalarının üriner eksozomlarında ve akciğer dokusunda daha yüksek seviyelerde eksprese edildiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, LRG1'in idrarda NSCLC'nin cerrahi işlem gerektirmeden hastalığın teşhisi için aday bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür (Li ve diğ., 2011).

2.3.2.3. Pankreas Kanser Tanısında Eksozomlar

Melo ve arkadaşlarının pankreas kanserli hastalar üzerine yaptığı bir çalışmada, kanser hücresinden izole edilen eksozomlarda, bir hücre yüzeyi proteoglikanı olan glipikan-1 (GPC1)'i tanımlamışlardır. Dolaşımdaki GPC1+ eksozomlar (crExos), hastaların serumundan izole edilmiştir. Pankreas kanserli hastaların serumunda crExos tespit edilmiş ve sağlıklı bireyler ile iyi huylu pankreas kanseri hastalarının birbirinden bu yolla ayırt edilebildiği gösterilmiştir. crExos'ın, pankreas kanserinin erken evrelerini tespit etmek için cerrahi müdahale olmadan tanıda kullanılabilir olduğu ifade edilmiştir (Melo ve diğ., 2015).

2017 yılında yapılan bir çalışmada PANC-1, MiaPaca-2 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücre soylarından, hastalığın I. ve II. evresinde olan pankreas kanseri hastalarından ve sağlıklı bireylerin plazma örneklerinden eksozomlar izole edilmiştir. Hücre soyundan hücresel ve eksozom miRNA'ları profilendirilmiş ve plazma eksozom miRNA ekspresyonu, qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Bunun sonucunda miR-196a ve miR-1246 gibi belirli miRNA'ların pankreas kanseri eksozomlarında oldukça zengin olduğunu saptanmıştır. Ayrıca, plazma eksozom miR-196a ve miR-1246 seviyeleri, sağlıklı bireylere kıyasla pankreas kanseri hastalarında önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada miR-196a'nın pankreas duktal adenokarsinomunun (PDAC) iyi bir göstergesi olduğunu, bununla beraber miR-1246'nın ise intraduktal papiller müsinöz neoplazmaları (IPMN) olan hastalarda önemli ölçüde yükseldiği gösterilmiştir. Buna karşın pankreas nöroendokrin tümörlü (NET) hastalar ve sağlıklı bireyler arasında plazma eksozom miR-196a ve miR-1246 seviyelerinde hiçbir fark olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, belirli eksozomal miRNA'ların pankreas kanseri eksozomlarında oldukça yüksek seviyede bulunduğu ve pankreas kanser teşhisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca pankreas duktal adenokarsinom ve pankreas nöroendokrin tümör

arasında farklı miRNA seviyelerinin yüksek olması farklı tip pankreas kansereleri arasında da eksozomal miRNA'ların ayırt edici bir belirteç olabileceği ortaya konulmuştur (Xu ve diğ., 2017).

Que ve arkadaşları, 22'si Pankreas kanserli, 6'sı benign pankreas tümörlü, 7'si ampuller karsinomlu, 6'sı kronik pankreatitli ve 8'i sağlıklı katılımcı olmak üzere 49 kişiden oluşan deney grubunda RT-PCR ile pankreas kanseri ile ilişkili dört miRNA (miR-17-5p, miR-21, miR-155 ve miR-196a) incelemişlerdir. Kontrole kıyasla pankreas kanseri hastalarının serum örneklerinde düşük eksozomal miR-155 ve miR-196a ekspresyonları olduğu ama eksozomal miR-17-5p, pankreas kanseri hastalarında, pankreas kanseri olmayan hastalara ve sağlıklı katılımcılara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüksek miR-17-5p seviyeleri, metastaz ve pankreas kanseri ileri evresi ile ilişkilendirilmiştir. Pankreas kanseri için yararlı bir belirteç olabileceği düşünülmektedir (Que ve diğ., 2013).

Malignat özellikleri farklı 2 pankreas hücre hattında yapılan bir çalışmada yüksek derecede malignat pankreas kanseri hücre soyu PC-1.0'dan türetilmiş eksozomlar, orta derecede malignat pankreas kanser hücre soyu PC-1'e uygulandığında kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon kabiliyetlerini artırabildiği gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak her iki hücrenin eksozomal proteinlerinin proteomik ve biyoinformatik analizleri yapıldığında, PC - 1.0' den izole edilen eksozomların kanser ilerlemesinde görev alan proteinlerce daha zengin olduğu belirlenmiştir. Bu proteinlerden PC-1.0'den izole edilen eksozomlarda en fazla bulunan çinko taşıyıcı protein ZIP4 olduğu gösterilmiştir. Eksozomal ZIP4'ün pankreas kanseri büyümesini önemli ölçüde artırabildiğini *in vitro* ve *in vivo* destekli çalışmada ZIP4'un pankreas kanseri için bir biyobelirteç olarak kullanabileceği belirtilmiştir (Jin ve diğ., 2018).

2.3.2.4. Hastalık Tedavilerinde Eksozomlar

Eksozomların kolay elde edilebilmeleri, hedef hücreye alınımının kolay olması bunların yanı sıra miRNA ve mRNA taşınmalarıyla hedef hücrenin fonksiyonlarını değiştirebilmeleri göz önünde bulundurulduğunda hastalık tedavisinde kullanılabilecekleri düşünülmüştür.

Epidemiyolojik çalışmalar diyabetik hastalarda demans insidansının diyabetik olmayan bireylere göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir (Leibson ve diğ., 1997; Ott ve diğ., 1999). Ayrıca hiperglisemi ve hipoglisemi, insülin eksikliği ve insülin direnci, vasküler anormallikler ve merkezi sinir sisteminde oksidatif stres gibi çeşitli mekanizmaların diyabetle ilişkili demansa

neden olduğu düşünülmektedir (Wrighten ve diğ., 2009; Kawamura ve diğ., 2012). Diyabette bilişsel bozukluklara neden olan en önemli problemin hipokampusta hasar görmüş nöron ve astrosit olduğu düşünülen bir çalışmada diyabete bağlı bilişsel bozukluğun tedavisi için eksozomların etkinliği araştırılmıştır. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomların diyabetik farelere intraserebroventriküler olarak enjekte edilmesi sonucu eksozomların astrositler ve nöronlar tarafından alındığı gösterilmiştir. Eksozom uygulamasının ardından öğrenme ve hafızada oluşan bilişsel bozukluklar ve nöronlardaki, astrositlerdeki ve kan damarlarındaki ultrastrüktürel anormallikler, MSC'ler ve MSC'lerden izole edilen eksozomlarla tedavi edildiğinde farelerde iyileşme gözlemlenmiştir. Mevcut sonuçlar, BM- MSC'lerden türetilen eksozomların, diyabetin neden olduğu bilişsel bozukluk için umut verici bir terapötik araç olabileceğini göstermektedir (Nakano ve diğ., 2016). Diyabetin sebep olduğu diyabetik retinopati üzerine yapılan bir çalışmada ise streptozotosin enjeksiyonu ile indüklenmiş diyabetli tavşanlara adipoz doku kaynaklı MSC'lerden izole edilen eksozomlar enjekte edilmiştir. Eksozomların etkinliği retina dokularının histopatolojik incelemesi ve diyabetik retinopatide gözlemlenen neovaskülarizasyonu düzenlemede rolü tespit edilen miRNA-222'nin ekspresyonunun değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. MSC'lerden türetilen eksozomların uygulanmasını takiben artan miRNA-222 ekspresyonu, adipoz dokusundan türetilen MSC eksozomlarının retina onarımında etkili olabileceği gösterilmiştir (Safwat ve diğ., 2018).

Ebrahim ve arkadaşları otofaji aktivitesinin artırılması için kemik iliği kaynaklı MSC'den türetilen eksozomların potansiyel rolünü ve bunların diyabetin ciddi bir komplikasyonu olan diyabetik nefropeti (DN) üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Eksozom uygulaması sonrası böbreğin fonksiyonu, morfolojisini ve fibrozu değerlendirildiğinde eksozomların böbrek fonksiyonunu belirgin şekilde iyileştirdiği, böbrek dokularında histolojik olarak restorasyonun meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca otofaji belirteci olan LC3 ve Beclin-1'in önemli ölçüde artışı, böbrek dokusunda mTOR, fibronektin ve TGF- β ekspresyonunun önemli derecede azalması gösterilmiştir. Sonuç olarak eksozomlar ile otofaji indüksiyonunun, streptozotosin ile indüklenen diyabetli sıçan modelinde DN'yi zayıflatabileceği sonucuna varılmıştır (Ebrahim ve diğ., 2018).

Xin ve arkadaşları mezenkimal kök hücreler mikroRNA 133b'yi aşırı eksprese ettirilerek, orta serebral arter tıkanıklığına (MCAO) maruz kalan sıçanlara uygulanmıştır. mikroRNA 133b

ekspresyonu için herhangi bir uygulama yapılmayan MSC'lere kıyasla orta serebral arter tıkanıklığının iyileşmesi yönünde önemli olduğu ve inme için MSC tedavisinin terapötik olarak fayda sağladığı ortaya konulmuştur. Daha sonra yaptıkları çalışmada ise 2 saat orta serebral arter tıkanıklığına tabi tutulan sıçanlara, intra-arteriyel olarak miR-133b aşırı ekspresyonu olan MSC'lerden (Ex-miR-133b +) izole edilen eksozomlar ve kör vektör (Ex-Con) veya fosfat tamponu (PBS) ile muamele edilmiş MSC'lerden alınan eksozomlar enjekte edilmiştir. PBS uygulaması ile karşılaştırıldığında, her iki eksozom tedavi grubu, fonksiyonel olarak önemli bir iyileşme sergilemiştir. Ex-miR-133b + tedavisi, Ex-Con tedavisine kıyasla iskemik sınır alanında fonksiyonel iyileşmeyi ve nörit yeniden şekillenmesini / beyin plastisitesini önemli ölçüde artırmıştır. Ex-miR-133b + uygulaması ayrıca Ex-Con tedavisine kıyasla beyin eksozom içeriğini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Ex-miR-133b+ 'nın gelişmiş terapötik etkilerinin altında yatan mekanizmaları açıklığa kavuşturmak için, oksijen ve glikozdan yoksun (OGD) koşullar altında kültürlenmiş astrositler, miR-133b ekspresyonu için uygulama yapılmamış MSC'lerden (Ex-Naive), miR-133b ekspresyonu azaltılmış MSC'lerden (Ex-miR-133b-) ve Ex-miR-133b+ 'dan toplanan eksozomlarla inkübe edilmiştir. Ex-Naive ile diğer iki grup karşılaştırıldığında, Ex-miR-133b+'ın OGD astrositleri tarafından salınan eksozomları önemli ölçüde artırırken, Ex-miR-133b- eksozom salınımı önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, Ex-miR-133b+ ile muamele edilen OGD astrositlerinden izole edilen eksozomlar, Ex-Con'a tabi tutulan OGD astrositlerinden izole edilen eksozomlara kıyasla, nörit dallanmasını ve kültürlenmiş kortikal embriyonik sıçan nöronlarının uzamasını önemli ölçüde artırmıştır. Bu sonuçlar, miR-133b'yi aşırı ekprese eden MSC'lerden izole edilen eksozomların felçten sonra nöral plastisiteyi ve fonksiyonel iyileşmeyi sağladığını göstermektedir (Xin ve diğ., 2017).

İnflamatuar bağırsak hastalığı (IBD) tedavisi üzerine yapılan bir çalışmada insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinden (hucMSCs) salınan eksozomlar dekstran sülfat sodyum (DSS) ile indüklenen IBD farelerine enjekte edilmiştir. Eksozom uygulamasından sonra farelerde IBD'nin şiddetinin önemli ölçüde azaldığı ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 geninin ekspresyonu artarken, proinflamatuar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β , IL-6'nın ve IBD'nin gelişmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilen (Nemoto ve diğ., 2013) IL-7 geninin ekspresyonunun kolon dokularında ve dalakda azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, makrofajların kolon dokularına infiltrasyonu, IBD farelerinde eksozom uygulaması ile azaltılmıştır. Bu bulgular, hucMSC'lerden izole edilen eksozomların, DSS ile indüklenen IBD'nin hafifletilmesi

üzerinde önemli etkilere sahip olduğu ve etkilerini makrofajlarda IL-7 ekspresyonunun modülasyonu yoluyla uygulayabileceği gösterilmiştir (Mao ve diğ., 2017).

Adipoz dokudan kökenlenmiş kök hücreler (ADSC'ler), obezite ile ilişkili iltihaplanma ve metabolik bozuklukların kontrolünde kritik roller oynar. ADSC kaynaklı eksozomlarla yapılan bir çalışmada obez farelerin ADSC kaynaklı eksozomlarla tedavisinin, gelişmiş insülin duyarlılığı (%27,8 iyileşme), azalmış obezite ve hafifletilmiş hepatik steatoz dahil olmak üzere metabolik homeostazını kolaylaştırdığını göstermiştir. ADSC'den türetilen eksozomlar, diyetle indüklenen obez farelerin beyaz yağ (WAT) dokusunda aktive edilmiş M2 makrofaj polarizasyonunun ve inflamasyonun azalmasını sağlamıştır. Ayrıca, ADSC kaynaklı eksozomlar tarafından indüklenen M2 makrofajları, yalnızca katekolamin salınımından sorumlu yüksek tirozin hidroksilaz seviyelerini ekprese etmek ile kalmayıp, aynı zamanda ADSC proliferasyonunu ve laktat üretimini de teşvik etmiştir. Böylece yüksek yağ yüklemesine yanıt olarak WAT oluşmasını ve homeostazı desteklemiştir. Bu bulgular, WAT'de immün ve metabolik homeostazı kolaylaştıran, böylece obezite ve diyabet için potansiyel tedavi sağlayan ADSC-makrofaj arası iletişim için eksozom aracılı yeni bir tedavi yöntemini düşündürmektedir (Zhao ve diğ., 2018).

2.3.2.5. Eksozomların Kansere Üzerinde Etkileri

Eksozomların aracılık ettiği hücreler arası iletişim normal fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde, birçok hastalığın patolojik süreçlerinde ve kanser patolojisinde de önemli rol oynar (Barteneva ve diğ., 2013; Kucharzewska ve Belting, 2013; Meckes, 2015). Ayrıca eksozomlar kanserin ilerlemesinde, metastazında ve terapötik etkinliğinde de çok önemlidir (Li ve diğ., 2017).

Eksozomlar hücreler arası iletişimde büyük bir öneme sahiptir. Kökenlendikleri hücreye hatta salındığı zamana göre taşıdıkları kargo içerikleri değişmektedir. Bu sayede eksozomlar kanser üzerinde farklı etkilere sebep olmaktadır. Kanser hücre kökenli eksozomlar, tümörü oluşturabilen veya tümörü engelleyebilen ortam oluşturabilirler ya da stromal hücrelerden salınan eksozomlar, kanser ilerlemesini teşvik edebilir veya sınırlandırabilirler (Kalluri, 2016).

2.3.2.6. Eksozomların Kansere Gelişimi ve İlerlemesindeki Rolü

Kanser hücreleri normal hücrelere göre en az 10 kat daha fazla eksozom salgırlar. Onkojenik proteinleri ve nükleik asitleri transfer ederek kanserin başlaması, büyümesi, ilerlemesi ve ilaç

direncinde rol oynarlar. (Roma-Rodrigues ve diğ., 2014; Minciacci ve diğ., 2015; Zhang ve diğ., 2015; Kosaka, 2016).

Eksozomlar, hem salındıkları bölgedeki hücreler arasında hem de uzak bölgelerdeki hücreler arasında etkileşime girebilirler (Kalluri, 2016). Bu etkileşimler sonucu, tümör kaynaklı eksozomlar, otokrin sinyallerle kanser proliferasyonunu teşvik edebilirler (Tai ve diğ., 2015). Stromal hücreleri yeniden programlayarak, bağışıklık sistemini düzenleyerek ve anjiyogenezi teşvik ederek kanser ilerlemesinde etkin olarak görev alabilirler (Maia ve diğ., 2018). Bunun yanı sıra tümör hücresinden salınan eksozomlar, endotel tübül ağlarının oluşumunu destekleyerek endotelial anjiyojenik tepkileri düzenlerler (Hood ve diğ., 2009). Tümör anjiyogenezinin düzenlenmesine katılan tümör kaynaklı eksozomlar yeniden damarlanmaya etki etmesi tümör büyümesinin yanı sıra, metastazı da etkileyebilir (Kalluri, 2016). Salındıkları hücrelere göre içerik olarak heterojenlik gösteren eksozomlar, kanser hücresinden türetildiğinde, uzak organlara metastazı teşvik edebilirler (Peinado ve diğ., 2012; Costa-Silva ve diğ., 2015).

Tümör kaynaklı eksozomlar mezenkimal kök hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasını indükler ve bu farklılaşmış MSC'ler, belirli faktörleri salgılayarak kanser proliferasyonunu ve istilasını artırabilirler (Chowdhury ve diğ., 2015). Buna ek olarak eksozom biyogenezi veya salgılanması inhibe edildiğinde, olgun invadopodia oluşumunun önemli ölçüde azalması ve invadopodanın eksozom sekresyonu için kritik bölgede yer alması, eksozomların invazif aktiviteyi düzenlediğini göstermektedir (Hoshino ve diğ., 2013).

2.3.2.7. Eksozomların Kanser Üzerinde İnhibe Edici Etkisi

Birçok hastalık tedavisinde kullanımı amaçlanan eksozomların aynı şekilde kanser tedavisinde de kullanılmak için farklı kanser tiplerinde etkisi araştırılmıştır.

Pakrayan ve arkadaşları 2017 yılında insan meme kanseri hücre soyları (MDA-MB-231 ve MCF-7) üzerine yaptıkları çalışmada kemik iliği kaynaklı MSC'den türetilen eksozomları kullanmışlardır. MSC'lerden izole edilen eksozomlar meme kanseri hücre soylarına uygulandığında mTOR / HIF-1a sinyalini modüle ettiklerini ve bu yolla vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonunda da önemli bir düşüşe sebep olduklarını göstermişlerdir. Buna ilaveten VEGF ekspresyonunu düzenlemede meme kanseri hücrelerine eksozomal miR-100 transfer edilmesiyle VEGF'nin ekspresyonunun azaldığı belirtilmiştir.

Ayrıca anti-miR-100 vasıtasıyla artan VEGF ekspresyonunu göstererek, MSC'den türetilmiş eksozomların meme kanseri hücrelerinde VEGF ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisini doğrulamışlardır.

2020 yılında osteosarkoma üzerinde yapılan bir çalışmada, transformatör 2β'nin (TRA2B) aşırı ekspresyonunun osteosarkomda tümör ilerlemesi ile ilişkili olduğu ve TRA2B'nin osteosarkom dokularında ekprese olmayan miR-206'nın hedef geni olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmanın devamında ise kemik iliği mezenkimal kök hücre (BMSC) kaynaklı eksozomların miR-206'yı osteosarkom hücrelerine transfer edip edemeyeceği araştırılmıştır. BMSC'den türetilen eksozomal miR-206'nın osteosarkom hücrelerine transfer edebildiği hem *in vitro* hem de *in vivo* sonuçlar ile gösterilmiştir. Eksozomal miR-206'nın osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu inhibe edebileceğini, bu durumun apoptozu indükleyebileceğini bildirmişlerdir (Zhang ve diğ., 2020).

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden (BM-MSC) kökenlenen eksozomal miR-4461'in kolorektal kanserde (CRC) araştırmayı hedefleyen bir çalışmada, DLD1, HCT116 ve SW480 kolorektal kanser hücre soylarında ve kolorektal kanser dokularında miR-4461 ekspresyon seviyesinin insan sağlıklı kolorektal mukozal (FHC) hücreleri ile sağlıklı dokulardakinden daha düşük seviyede olduğu bildirilmiştir. miR-4461'in koatomer protein kompleksi alt birim beta 2'yi (COPB2) hedeflediği ortaya konulan çalışmada, BMSC'lerden türetilen eksozomal miR-4461, COPB2 ekspresyonunu azaltarak ve HCT116 ve SW480 kanser hücrelerinin göçünü ve istilasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2020) Buna benzer başka bir çalışmada prostat kanserinde miR-205 ekspresyonu azalırken, miR-205'in bir hedefi RHPN2 prostat kanseri hücrelerinde ekspresyonun arttığı gösterilmiştir. miR-205'in prostat kanseri hücre proliferasyonunu, istilasını ve göçünü inhibe ettiği ve RHPN2'yi inhibe ederek apoptozu indüklediğini belirten çalışmada, miR-205 taşıyan hBMSC'lerden türetilmiş eksozomların, prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasının, istilasının, göçünün inhibe olmasına ve apoptotik hücre ölümünün meydana gelmesine katkıda bulunduğu da gösterilmiştir. Buna ek olarak *in vivo* da, hBMSC'lerden türetilen eksozomal miR-205'in prostat kanserini önleyici etkilerini doğrulanmıştır (Jiang ve diğ., 2019).

Endometriyal hücreler, adet döngüsü sırasında, döngünün sonu ile ilişkili bir anjiyojenik sürecin düzenleyicileri (Maas ve diğ., 2001) olmalarından dolayı bir çalışmada, menstrüel kök hücrelerinden (MenSC'ler) izole edilen eksozomların prostat kanser PC3 hücre soyu üzerindeki

etkisi araştırılmıştır. Araştırmalar sonucunda eksozomların VEGF sekresyonunda ve NF- κ B aktivitesinde bir azalmaya neden olduğu ve eksozom uygulaması yapılmış hücrelerde daha düşük reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin olduğu bildirilmiştir. MenSCs-eksozomlarının, ROS'a bağlı bir şekilde hem NF- κ B hem de VEGF yollarını etkileyerek PC3 hücrelerinde pro-anjiyojenik faktörlerin salgılanmasını baskıladığı ortaya konulmuştur (Alcayaga-Miranda ve diğ., 2016).

2.3.2.8. Pankreas Kanseri ve Eksozomlar

Farklı kaynaklardan izole edilen eksozomların farklı pankreas kanser türlerinde etkileri araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada BMSC'lerden izole edilen eksozomlar, pankreas kanser hücre soyu olan PANC-1 hücrelerine uygulanmıştır. Eksozomların miR-126-3p vasıtasıyla pankreas kanseri hücrelerinde proliferasyonu, invazyonu ve metastazı inhibe ettiği, apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Wu ve diğ., 2019).

GTPaz KRAS'ın mutant formu, pankreas kanserinde önemli bir faktör ama terapötik olarak zor bir hedeftir (Kamerkar ve diğ., 2017). Bu sebeple eksozomların verimli taşıyıcılar olarak işlev görüp göremeyeceği araştırılan çalışmada normal fibroblast benzeri mezenkimal hücrelerden izole edilen eksozomlar, onkojenik KRASG12D'ye (iExosomes) özgü siRNA veya shRNA'yı taşımak üzere tasarlanmışlardır. Çalışmada eksozomlarla lipozomlar kıyaslandığında dolaşımda eksozomların daha fazla tutulduğu bunun sebebinin de eksozomların monositler ve makrofajlar tarafından fagositozdan CD47 aracılı korunmasından kaynaklandığı gösterilmiştir. iExosomes tedavisinin birden fazla fare pankreas kanseri modelinde kanseri baskıladığı ve genel sağ kalımı önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Kamerkar ve diğ., 2017).

Çalışmamızda yüksek lisans tez projesi kapsamında ilk defa Pankreatik ada türevli progenitör hücrelerden eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Pankreas kanser hücre soyu olan MiaPaca-2 hücreleri ve pankreas tümörü olan insulinoma INS-1 hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarına PID-PC hücrelerinden izole edilen eksozomlar ilk defa bu çalışma ile uygulanmıştır. Hem üç hücre hattından izole edilen eksozomların karşılaştırılması hem de PID-PC hücrelerinden izole edilen eksozomların pankreas kanseri ve tümörü üzerindeki etkileri tez çalışması kapsamında analiz edilmiştir

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE SOYU

3.1.1. Pankreatik Ada Türevli Progenitör Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Gezginci-Oktayoğlu ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada erkek Wistar sıçanlarından pankreas adacıkları izole edilmiştir (Gezginci-Oktayoğlu ve diğ., 2018). %10 fetal sıgır serumu (FBS) (Gibco), 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin (Gibco) ve 2mM glutamin içeren RPMI-1640 (Gibco) kültür medyumunu içinde, 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren standart kültür koşullarında izole edilen pankreas adacıkları inkübe edilmiştir. 3 gün Pankreatik ada türevli progenitör hücre (PID-PC)'lerin ayrılması ve çoğalması için bekletildikten sonra adacıklar flakstan kaldırılmış ve %15 FBS, 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 2mM glutamin içeren 5.5mM glukozlu MEM (Gibco) kültür medyumunda PID-PC'lerin çoğalması için bırakılmıştır. FACS flow ile CD29, CD45, CD54, CD90 ve CD106 markırlarına, Western Blotting tekniği ile Vimentin, CD105/Endoglin, Fibronektin ve Nestin proteinlerine ve WST-1 yöntemi ile profilerasyon kapasitesi bakılarak karakterize edilen PID-PC'ler bu tez projesi kapsamında kullanılmıştır. PID-PC'ler %15 FBS, 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 2mM glutamin içeren 5.5mM glukozlu MEM medyumda kültüre edilmiştir. Hücrelerin medyumları gün aşırı değiştirilerek, haftada bir %0,025 Tripsin-EDTA (Sigma) ile pasajı yapılmıştır.

3.1.2. Pankreas Kanseri Hücre Soyu MiaPaca-2 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

İnsan pankreas kanser hücre soyu MiaPaca-2 hücreleri 2mM glutamin (Sigma), %10 FBS ve yüksek glukoz (4500 mg/L) içeren DMEM (Gibco) medyumda kültüre edilmiştir. Hücrelerin medyumları gün aşırı değiştirilerek, haftada bir %0,025 Tripsin-EDTA (Sigma) ile pasajı yapılmıştır.

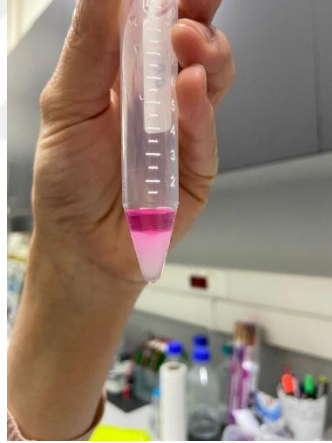
3.1.3 Pankreatik Beta Hücre Tümörü İnsulinoma INS-1 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

Sıçan insülinoma hücre soyu olan INS-1 hücreleri 10 mM HEPES (Sigma), 50 µM 2-merkapto-etanol (Biorad), 1 mM sodyum piruvat (Sigma), %10 FBS, 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml Streptomisin içeren RPMI 1640 medyumda kültüre edilmiştir. Hücrelerin medyumları gün aşırı değiştirilerek, haftada bir %0,025 Tripsin-EDTA (Sigma) ile pasajı yapılmıştır

3.2. EKSOZOM İZOLASYONU

3.2.1. Pankreatik Ada Türevli Progenitör Hücre (PID-PC)'lerden Eksozom İzole Edilmesi

PID-PC'lerden eksozom izolasyonu PureExo® Eksozom İzolasyon kiti (BioVision, K1239-10) kullanılarak yapılmıştır. PID-PC'ler T175 flasklara ekilmiştir. Flaskta hücreler %80 konfluent olduktan sonra hücre medyumunu FBS'siz medyum ile değiştirilerek 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra flasktan 20 ml hacim olarak (10^7 hücre) toplanan hücre medyumunu 15 dakika (dk), 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır. Kit içerisinde bulunan solüsyon A'dan 0,75 ml, solüsyon B'den 0,75 ml, solüsyon C'den 3 ml sırası ile eklenerek 5-10 saniye vortekslenmiştir. Toplamda 4,5 ml olan bu solüsyon karışımı 20 ml süpernatantın olduğu tüpe eklenmiştir. Tüp içindeki karışım iyice karıştırıldıktan sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında aşağıdaki görseldeki gibi 2 ayrı tabaka oluşmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1: Eksozom izolasyonu sırasında oluşan 2 ayrı tabaka

Üst tabaka atılıp geri kalan kısım temiz bir tüpe alınmıştır. 5000 g'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 3 tabaka oluştuğunda, üst ve alt tabakalar atılarak geriye orta tabaka bırakılmıştır. Orta tabaka 3 dk 5000 g'de santrifüj edildiğinde tekrar oluşan tabakalardan üst ve alt tabaka atılıp yine orta tabaka alınmış ve 5 dk 10000 g' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan tabakalardan üst ve alt tabaka yeniden atılıp, orta tabakanın bulunduğu tüp 5-10 dk tüpte kalan sıvının kuruması için kapağı açık vaziyette $+4^{\circ}\text{C}$ bekletilmiştir. Aynı tüpe örnek miktarının 2 katı kadar PBS eklenerek pipetaj yapıldıktan sonra yaklaşık 10 dk vortex ile karıştırılarak süspansiyon hale getirilmiştir. Daha sonra 3 dk 8000 g'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, kit içerisinde bulunan PureExo® Kolonuna

aktarılmıştır. Son olarak kolon 5 dk boyunca 1000 g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır.



Şekil 3. 2: Santrifüj sonrası oluşan 3 tabaka.

3.2.2. MiaPaca-2 ve INS-1 Hücre Soylarından Eksozom İzole Edilmesi

MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından eksozom izolasyonu PureExo® Eksozom İzolasyon kiti (Biovision, K1237-10) kullanılarak yapılmıştır. Hücreler FBS'siz medyum kullanılarak 48 saat inkübe edildikten sonra 4 ml (5×10^5 hücre) toplanan hücre medyumunu 15 dk, 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır. Kit içerisinde bulunan solüsyon A'dan 0,25 ml, solüsyon B'den 0,25 ml, solüsyon C'den 1 ml sırası ile eklenerek 5-10 saniye vortekslenmiştir. Toplamda 1,5 ml olan bu solüsyon karışımı 4 ml süpernatantın olduğu tüpe eklenmiştir. Tüp içindeki karışım iyice karıştırdıktan sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 2 tabaka oluşmuştur. Üst tabaka atılıp, geri kalan kısım temiz bir tüpe alınarak ve 5000 g'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 3 tabaka oluştuğunda, üst ve alt tabakalar atılarak geriye sadece orta tabaka bırakılmıştır. Orta tabaka daha sonra 3 dk 5000 g'de santrifüj edildiğinde tekrar oluşan tabakalardan üst ve alt tabaka atılıp yine orta tabaka 5 dk 10000 g' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan tabakalardan üst ve alt tabaka yeniden atılıp, orta tabakanın bulunduğu tüp 5-10 dk kuruması için kapağı açık vaziyette bekletilmiştir. Aynı tüpe örnek miktarına göre 2 veya 3 katı kadar PBS eklenerek pipetaj yapılmıştır. Aralarda pipetaj yapılarak 2 kez 3 dk vortex ile karıştırılarak süspanse hale getirilmiştir. Daha sonra 3 dk 8000 g'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kit içerisinde bulunan PureExo® Kolonuna aktararak 5 dk 1000 g'de

santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır. Deney süresine kadar -86°C’de saklanmıştır.

3.3. İZOLE EDİLEN EKSOZOMLARIN NANOPARTİKÜL İZLEME ANALİZİ (NTA) İLE BOYUT ANALİZİ VE MİKTAR TAYİNİNİN YAPILMASI

Eksozomlar nanopartikül izleme analizi ile ölçülerek karakterize edilmiştir. Nanopartikül izleme analizi Brownian hareket hızını partikül boyutuyla ilişkilendiren sıvılardaki partikülleri görselleştirmek, boyutlarını bulmak ve konsantrasyonlarını analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Eksozomlar 1:500 oranında PBS ile sulandırılarak NanoSight NS300 cihazı ile ölçülmüştür. Eksozomlar, sıcaklığı 25°C olan Flow-cell üst plaka haznesine yerleştirilerek kamera seviyesi, video kaydı ile arka plan gürültüsünü en aza indirilerek parçacıkları net bir şekilde tanımlamak için yeterli kontrasta sahip bir görüntü elde edilecek şekilde ayarlanmıştır. Her bir örnek analizi için 30 saniyelik okumalar ile 5 ayrı sonuç elde edilmiştir.

3.4. İZOLE EDİLEN EKSOZOMLARDAN LİZAT ELDESİ

İzole edilen eksozom süspansiyonuna 1:1 oranında RIPA eklenerek 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 15 kez 1’er dk sonike edilmiştir. Akabinde +4°C 16000 g’de 15 dk santifüj edilerek süpernatant temiz bir tüpte aktarılmıştır.

3.5. EKSOZOM UYGULAMASI SONRASINDA HÜCRE SOYLARINDAN SEKRESYON VE LİZAT ELDESİ

MiaPaca-2 hücreleri her kuyuda 50.000, INS-1 hücreleri ise her kuyuda 200.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu pleyte ekildikten sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında eksozomlar daha öncesinde belirlenen IC50 değerleri hücrelere 72 saat boyunca uygulanmıştır. 72 saat inkübasyonun ardından kuyulardaki medyumlar toplanıp temiz bir tüpe alındıktan sonra 5 dk 1500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücre sekresyonu olarak kullanılacak olan süpernatant temiz bir tüpe alınıp deney zamanına kadar -20°C’de saklanmıştır. Medyumları toplanan kuyular PBS ile yıkanmıştır ve yıkanan her bir kuyuya 200 µl PBS ile MiaPaca-2 hücreleri için 20 µl, INS-1 hücreleri için 10 µl tripsin eklenmiştir. 3 dk etüvde inkübe edildikten sonra 400 µl hücre medyumu eklenmiştir. İyi bir pipetaj sonrasında hücre medyumu

toplanıp 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve pelete 1:1 oranında liziz buffer eklenmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra 5 dk +4°C'de bekletilmiştir. Daha sonrasında örnekler 10 saniye ultrasonik su banyosunda sonike edilip, 10 saniye buz üzerinde bekletilecek şekilde bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır. Akabinde +4°C'de 14000 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantlar temiz bir tüpe aktarılmıştır.

3.6. ELDE EDİLEN LİZATLARIN BRADFORD YÖNTEMİ İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

İzole edilen eksozomların total protein konsantrasyonları Bradford tekniği ile ölçülmüştür. Stok BSA (1,46 mg/ml)'dan 80 mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 8 mg/ml BSA içeren standart solüsyonlar her seferinde yeniden hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu pleyte ultra saf su (kör), standartlar ve örnekler konulduktan sonra boya ayırıcı (Biorad konsantre protein analiz boya ayırıcı-500-0006) ilave edilerek pipetaj yapılmıştır. 5 dk sonrasında 595 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okunup, absorbans değerleri alınmıştır. Elde edilen grafik doğrultusunda örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır. Protein miktar tayini için gerekli maddeler ve miktarları tabloda verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1: Protein tayin yöntemi için gerekli maddeler ve miktarları.

	Kör	Standart	Örnek
Ultra saf su	160 µl	-	-
Standart	-	160 µl	-
Örnek	-	-	160 µl
Boya	40 µl	40 µl	40 µl

3.7. PROTEİN SEVİYELERİNİN WESTERN BLOT TEKNİĞİ İLE GÖSTERİLMESİ

3.7.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

Alix (sc-53540, Santa Cruz), TSG101(NB200-112, Novus), CD9 (sc-13118, Santa Cruz) ve CD81(NB100-65805, Novus) antikorları için %7,5'lik alt ve %3'lük üst sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) jel hazırlanmıştır.

1 jel için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) hazırlanırken kullanılan maddeler ve miktarları aşağıda verilmiştir.

Tablo 3. 2: SDS-PAGE hazırlanırken kullanılan malzemeler ve miktarları.

	Alt jel (%7,5'lik)	Üst jel (%3'lük)
Ultra saf su	5425 µl	3125 µl
Akrilamid (%40)	1875 µl	550 µl
Tris HCL (1.5 mM) Ph:8.8	2500 µl	-
Tris HCL (0.5 mM) Ph:6.8	-	980 µl
Amonyum persülfat	66 µl	50 µl
Temed	5 µl	7 µl
SDS %10	100 µl	50 µl

Jelin döküleceği cam levhalar %70 alkol ile temizlenerek sisteme yerleştirilmiştir. Yerleştirilen levhalar arasına alt jel döküldükten sonra jelin üst kısmının hava ile temasını kesmek için ultra saf su eklenerek jelin donması için beklenilmiştir. Alt jel donduktan sonra üstündeki su alınarak üst jel dökülmüştür. Üst jel dökülünce hemen taraklar takılarak üst jelin donması için beklenilmiştir. Jel donduktan sonra sisteme (Biorad Mini Protein Tetracell) yerleştirilmiştir. Sistem içine yürütme tamponu koyularak taraklar çıkarılmış ve yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Jele Yüklenecek Örneğin Hazırlanması ve Örneğin Jelde Yürütülmesi

Protein konsantrasyonları bilinen 30-50 µg/mL konsantrasyondaki örnekler son konsantrasyonları ve son hacimleri eşit olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler 1:1 oranında Laemmli tamponu (Biorad-161- 0737) ve 2-merkapto etanol (Biorad-161-0710) karışımı ile karıştırılmıştır. 70°C’de 10 dk kuru blok ısıtıcıda inkübe edilmiştir. Jele yüklenen örnekler +4°C’de 70 voltta yürütülmüştür.

3.7.3. Islak Transfer ile Polivinilidenflorit (PVDF) Membrana Aktarım

Yürütülme sonunda jel kasetten çıkarılarak üst yükleme jeli kesilmiştir. Jel saf suya alınarak yıkanmıştır. Daha sonra transfer tamponu içine bırakılmıştır. PvdF membran kullanılmadan önce 20 sn metanolde bekletilip saf suya alınmıştır. Daha sonra sırasıyla transfer tamponu ile ıslatılan fiber ped, mini-transfer blot filtre kâğıdı (1703932), jel, transfer tamponu içine alınan pvdF membran, tekrar filtre kâğıdı ve fiber ped olacak şekilde sandviç halinde kaset içerisine yerleştirilmiştir. Sistem +4°C’de, 80 Amper, 100 Voltta 12 saat aktarımı gerçekleştirilmiştir. Membran aktarımdan sonra ultra saf suya alınmıştır.

3.7.4 Membrana Aktarılan Proteinlerin Kontrolü

Membran Ponceau S (BioShop-PON002.1) ile protein bantları görünür hale getirilmiştir. Boyayı membrandan uzaklaştırmak için önce ultra saf su ile birkaç kez yıkanmış, sonra 0,1 M NaOH ile 3 dk inkübe edilmiştir. Tekrar ultra saf su ile yıkanarak işaretleme öncesine kadar ultra saf suda bekletilmiştir.

3.7.5 ALIX, TSG101, CD9 ve CD81’in Western Blot Tekniği ile İşaretlenmesi

Aktarımın gerçekleştirildiği membran, %5’lik yağsız süt tozundan hazırlanan blok solüsyonu ile 1 saat oda ısısında, sonra da primer antikör ile +4°C’de 16 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Ertesi gün membran 37°C’de 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilerek, 3 kere 15’er dk Tween20 içeren Tris-tamponlu tuz çözeltisi (TBS-T) ile yıkanmıştır. Akabinde oda ısısında 1 saat sekonder antikör (Mouse BA1050, rabbit BA1054, goat BA1060) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kere 15’er dk, TBS (Tris-tamponlu tuz çözeltisi) ile 2 kere 5 dk yıkanmıştır. Yıkanan membran, oda ısısında 5 dk luminol ayırıcı (Thermo-34580) ile muamele edilerek bantlar ChemiDoc XRS Sistem Cihazı (Biorad) ile görünür hale getirilmiştir.

3.8. SIMPLE WES

3.8.1. Elde Edilen Hücre Lizatlarının Nanodrop ile Protein Tayini

Ölçüm Nanodrop (BioSpec-nano, Shimadzu) cihazı ile yapılmıştır. İlk olarak 1 µl dH₂O kör olarak kullanılıp ölçüm cihazı sıfırlanmıştır. Daha sonra PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından elde edilen lizat örneklerinden 1 µl kullanılarak ölçüm alınmıştır.

3.8.2. Standartların Hazırlanması

Standart Pack 1 (SM-W004, Biotechne) ile standartlar hazırlanmıştır. Ditiotreitol (DTT) içerisine 40 µl, Biyotinli-Markır içerisine ise 20 µl dH₂O ilave edilip iyice pipetaj yapılmıştır. Floresanlı Master Mix'in içerisine ise hazırlanan DTT'den 20 µl ve Sample Buffer'dan 20 µl ilave edilmiştir.

3.8.3. Örneklerin Hazırlanması

Örnekler totalde 0,5 mg/ml olacak şekilde dH₂O ile totalde 62,5 µl olacak şekilde sulandırılmıştır. Daha sonra örnekler temiz birer tüpe 10 µl olarak alındıktan sonra her birine 2,5 µl hazırlanan Master Mix eklenmiştir. Vortexlendikten sonra spin atırılıp 95°C'de 5 dk kuru blok ısıtıcıda inkübe edilmiştir.

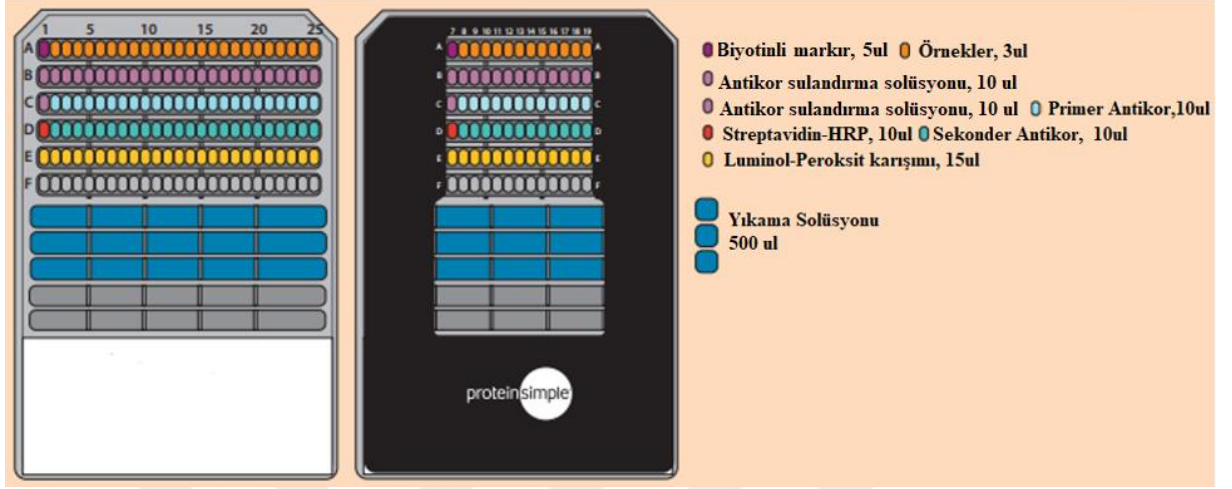
3.8.4. Antikorların Hazırlanması

ALIX (sc-53540, Santa Cruz) ve CD9 (sc-13118, Santa Cruz) antikorları 1:10, TSG101 (NB200-112, Novus) 1:500 ve CD81 (NB100-65805, Novus) 1:1000 oranında Antikor sulandırma solüsyonu (DM-001, Biotechne) ile sulandırılmıştır. Sistem Antikoru 1:10 oranında hazırlanmıştır.

3.8.5. Pleytin Hazırlanması

Pleytin (SM-W004, Biotechne) ilk sırasındaki ilk kuyucuğa 5 µl markır ve diğer kuyucuklara 3 µl hazırlanan örnekler konulmuştur. İkinci sırayadaki tüm kuyulara ve üçüncü sıradaki ilk kuyuya 10 µl Antikor sulandırma solüsyonu konulmuştur. Üçüncü sıradaki geri kalan kuyulara ise hazırlanan 10 µl primer antikor eklenmiştir. Dördüncü sıradaki kuyuların ilkinde 10 µl Streptavidin-HRP geri kalan kuyulara ise 10 µl sekonder antikor konulmuştur. Beşinci sıradaki tüm kuyulara 1:1 oranında hazırlanan Luminol-Peroksit (DM-001, Biotechne), karışımı her bir kuyuya 10 µl olarak konulmuştur. Hazırlanan pleyt 5 dk 2.500 rpm'de santrifüj edildikten sonra pleytin ikinci kısmındaki ilk üç büyük kuyuya yıkama solüsyonu 500 µl olarak konulup ve pleyt

Simple Wes cihazına yerleştirilmiştir. İlgili kapillerde cihaza yerleştirildikten sonra sistem çalıştırılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3: Simple Wes pleytinin hazırlanması.

3.9. MTT (TETRAZOLİUM) KOLORİMETRİK ÖLÇÜM

MiaPaca-2 hücreleri her kuyuda 10.000 hücre, INS-1 hücreleri ise her kuyuda 50.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu pleytlere ekilmiştir. 1 gece 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. İzole edilen eksozomlar deney için planlanan dozlarda ve sürede (24 ve 72 saat) hücrelere uygulandıktan sonra hücreler 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücre medyumunu çekilerek her hücre soyunun kendi medyumunu ile hazırlanan MTT (Applichem-A2231) hücrelere ilave edilmiştir. 2 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki MTT alınmıştır. Hücrelere izopropanol (Sigma-19516) ilavesi ile reaksiyon sonucu oluşan formazan kristalleri çözünerek ELISA okuyucusu ile 540 nm'de absorbans değerleri alınmıştır. Elde edilen kontrol grubuna ait değerler %100 kabul edilerek, deney gruplarına ait yüzde değerler hesaplanmıştır.

3.10. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER

3.10.1. Hücrelerin Fikse Edilmesi

MiaPaca-2 hücreleri her kuyuda 10.000, INS-1 hücreleri her kuyuda 50.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu pleyte ekilmiştir. Eksozomlar belirlediğimiz IC₅₀ değerinde hücrelere uygulandıktan sonra 72 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonrasında kuyulardaki medyumlar toplanmıştır. Akabinde %4 Paraformaldehit her kuyuya 50 µl eklenerek 15 dk oda ısısında inkübasyona bırakılmış ve hücreler fikse edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır ve yıkama sonrasında hücrelerin üzerini kapatacak şekilde PBS eklenerek deney zamanına kadar +4°C’de saklanmıştır.

3.10.2. Hücrelerin HSP90, HSF-1, Nestin, Endoglin, Kaspaz-8, Aktif Kaspaz-3, Beclin ve p-Bcl-2 Antikorları ile İşaretlenmesi

Fikse edilen hücrelerin üzerindeki PBS toplanıp, her kuyuya 50 µl olmak üzere %5 BSA ve %0,1 Tween20 içeren PBS ile hazırlanan solüsyon konulmuş ve bloking işlemi yapılmıştır. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra bloking solüsyonu toplanmıştır. %0,1 BSA içeren PBS ile hazırlanan HSP90 (NB100-1972, Novus), HSF-1 (PA1606, Boster), Nestin (PA1606, Santa Cruz) Endoglin (sc-19793, Santa Cruz), Kaspaz-8 (9746, Cell Signaling), Aktif Kaspaz-3 (M00334-3, Boster), Beclin (PA1847, Boster), p-Bcl-2 (2827, Cell Signaling) primer antikorları her kuyuya 50 µl olarak konulmuştur. Negatif kontrol olarak %0,1 BSA içeren PBS ilave edilmiştir. 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 gece +4°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında %0,1 BSA ve %0,1 Tween20 içeren PBS ile hazırlanan yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası UltraVision LP Kiti (TP-125-HL, Thermo) içerisinde bulunan Biotin Konjige Sekonder Solüsyonu her kuyuya 100 µl eklenip, 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tekrar 3 kez yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra kit içerisinde bulunan Streptavidin Peroksidaz her kuyuya 100 µl eklenip, 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Sonrasında 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra AEC Substrat Kit (TP-125-HA, Thermo) içerisindeki substrat ve kromojen ile hazırlanan karışım kuyulara 50 µl olarak konulmuştur. İmmünohistokimyasal reaksiyonun yoğunluğunu ölçmek için, pozitif boyamanın yoğunluğu, Leica ışık mikroskopunda bilgisayar destekli görüntü analiz programı (NIS-Element D 3.1) kullanılarak en az on rastgele alan çekilmiştir. Fotoğraflar x40 büyütmede değerlendirilmiştir. İmmünohistokimya deneylerinde boyama yoğunluğu ortalama yoğunluk değeri olarak gösterilmiştir. (0: işaretlenme yok, 140,83: en yüksek işaretlenme).

3.11. MİAPACA-2 HÜCRE SOYUNDA SİTOTOKSİSİTENİN (LDH) BELİRLENMESİ

Laktat Dehidrojenaz (LDH), hemen hemen tüm dokularda özellikle kas, karaciğer ve böbrek dokularında yüksek miktarda bulunan sitoplazmik bir enzimdir (Farhana ve Lappin, 2022). LDH, NADH kullanarak pirüvatın laktata dönüşümünü geri dönüşümlü bir şekilde katalize eden oksidoredüktaz enzimlerinden biridir. Temel olarak enzim, oksijen olmadığında veya sınırlı miktarda tedarik edildiğinde glikozun anaerobik metabolizmasında yer alır (Adeva-Andany ve diğ., 2014). Hücreler anaerobik veya hipoksik koşullara maruz kaldığında, oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi bozulur. Bu süreç, hücrelerin alternatif metabolizma ile enerji üretmesini gerektirir ve LDH enerji üretimi ihtiyacını karşılamak için bu gibi koşullarda devreye girer (Farhana ve Lappin, 2022).



96 kuyucuklu pleytin her bir kuyusuna 10.000 hücre olacak şekilde ekilen MiaPaca-2 hücrelerine eksozomlar belirlenen IC50 değerinde uygulandıktan sonra 72 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Bu analiz için Sitotoksitite Analiz Kiti (LDH) (04 744 926 001, Sigma) kullanılmıştır. Kitin prosedürüne uygun olacak şekilde iki kontrol grubu oluşturulmuştur. Yüksek kontrol grubu için 100 µl medyum bulunan hücrelere kit içeriğindeki liziz solüsyondan 2.5 µl eklenip, hücreler 15 dk etüvde inkübe edilmiştir. Düşük kontrol grubu için sadece hücre medyumunu uygulanmıştır. Daha sonra kit içerisinde bulunan katalist ve boya solüsyonu taze olarak karıştırılmıştır. Bu karışımdan her bir kuyuya 100 µl olarak eklenmiştir ve 30 dk oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. Kit içerisinde bulunan reaksiyonu durdurma solüsyonu her kuyuya 50 µl eklendikten sonra ELİSA okuyucusunda 490 nm dalga boyunda absorbans alınmıştır. Sitotoksitite aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır

Sitotoksitite (%) =

$$\frac{\text{Deney Grubunun Absorbansı} - \text{Düşük Kontrolün absorbansı}}{\text{Yüksek Kontrolün absorbansı} - \text{Düşük Kontrolün absorbansı}} \times 100 \quad (3.1)$$

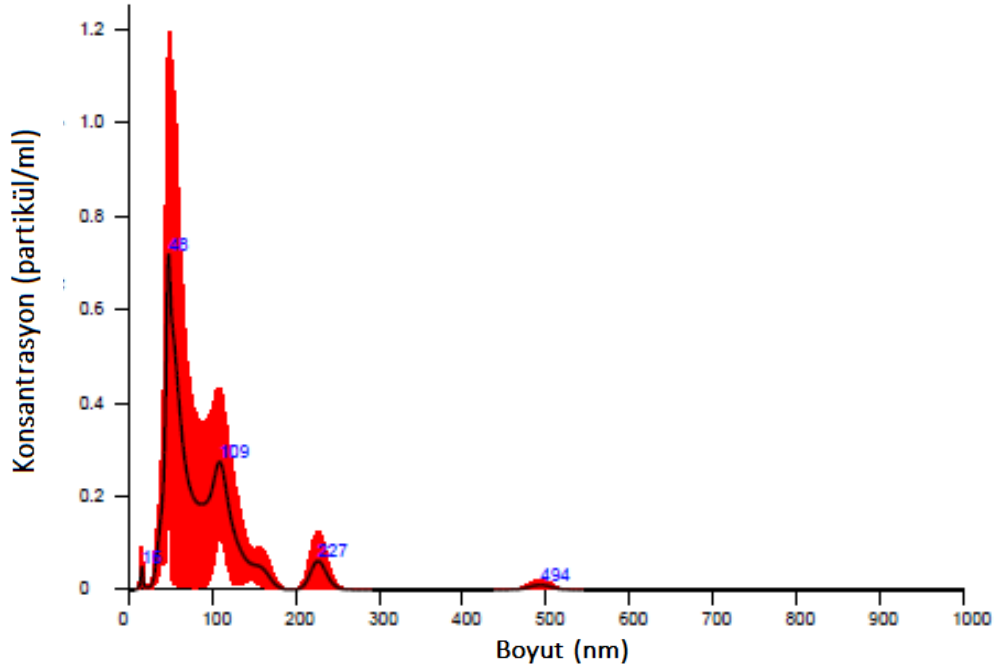
3.12. INS-1 HÜCRELERİNDE İNSÜLİN SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ

İnsülin seviyesi Rat İnsulin ELİSA Kiti (201-11-0708, Sunred) ile analiz edilmiştir. Kör olarak 100 µl Standart Dilusyon solüsyonu kullanılmıştır. 1.5, 3, 6, 12 ve 24 mIU/L hazırlanan standartlar düşükten yükseğe doğru olmak üzere kuyulara 50 µl konulmuştur. Daha sonra kontrol grubu olarak herhangi bir madde uygulanmayan INS-1 hücrelerinin lizat ve sekresyon örnekleri, deney grubu olarak da eksozom uygulanmış INS-1 hücrelerinin lizat ve sekresyon örnekleri 40 µl olarak kuyulara konulmuştur. Sadece örneklerin olduğu kuyulara 10 µl kit içerisinde bulunan İnsülin antikor eklenmiştir. Son olarakta kör hariç her kuyuya Streptavidin-HRP 50 µl olarak eklenmiştir. Çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra, 60 dk 37°C etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkanmıştır. Sonrasında her kuyuya kromojen A'dan 50 µl, kromojen B'den 50 µl eklenip, karanlıkta etüvde 37°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 50 µl Stop Solüsyonu eklenip, 450 nm dalga boyunda ELİSA okuyucusunda absorbans değerleri alınmıştır.

4. BULGULAR

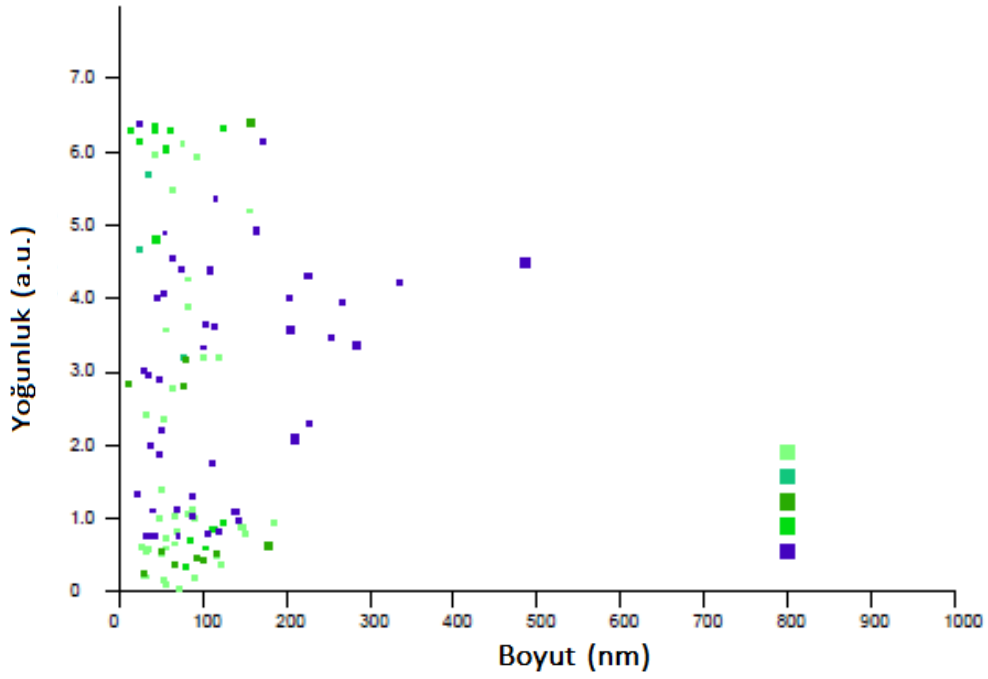
4.1. İZOLE EDİLEN EKSOZOMLARIN NANOPARTİKÜL İZLEME ANALİZİ (NTA) İLE BOYUT ANALİZİ VE MİKTAR TAYİNİNİN YAPILMASI

PID-PC (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2), MiaPaca-2 (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) ve INS-1 (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) hücre soylarından izole edilen eksozomların NTA ile boyut ve miktar tayini yapılmıştır.



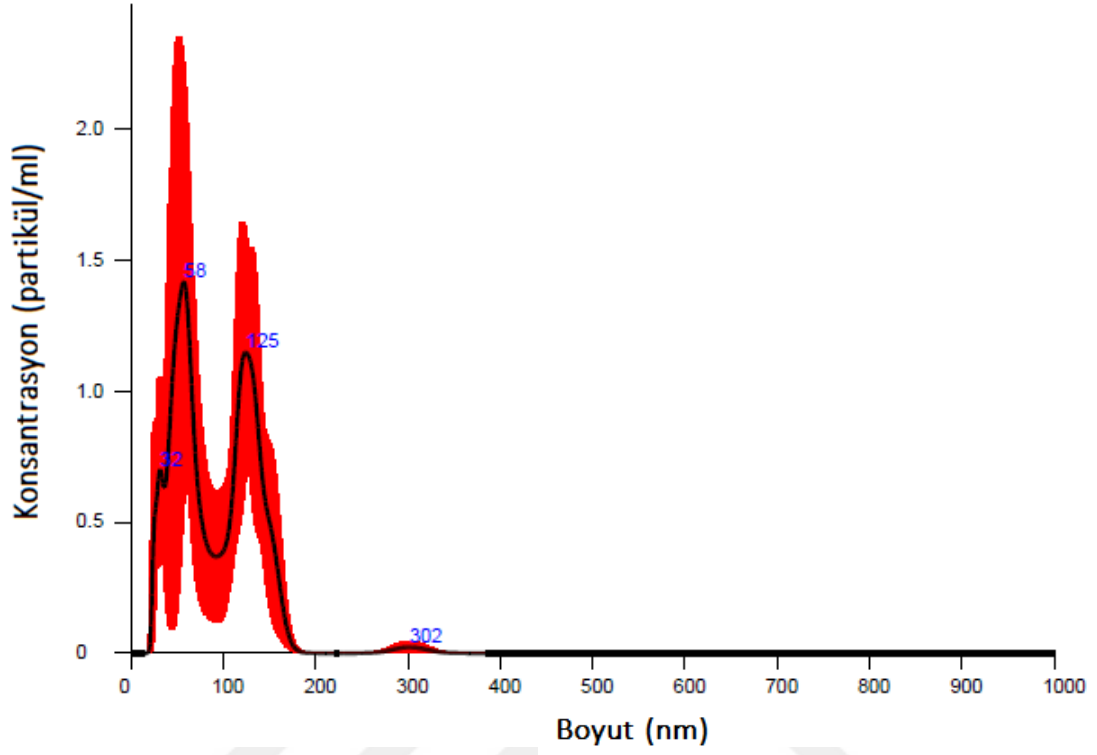
Şekil 4. 1: PID-PC'den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve konsantrasyon (partikül/ml) değerleri.

Sonuçlara göre PID-PC'den izole edilen eksozomların boyutları ortalama 103.6 ± 28.6 nm olarak belirlenmiştir.



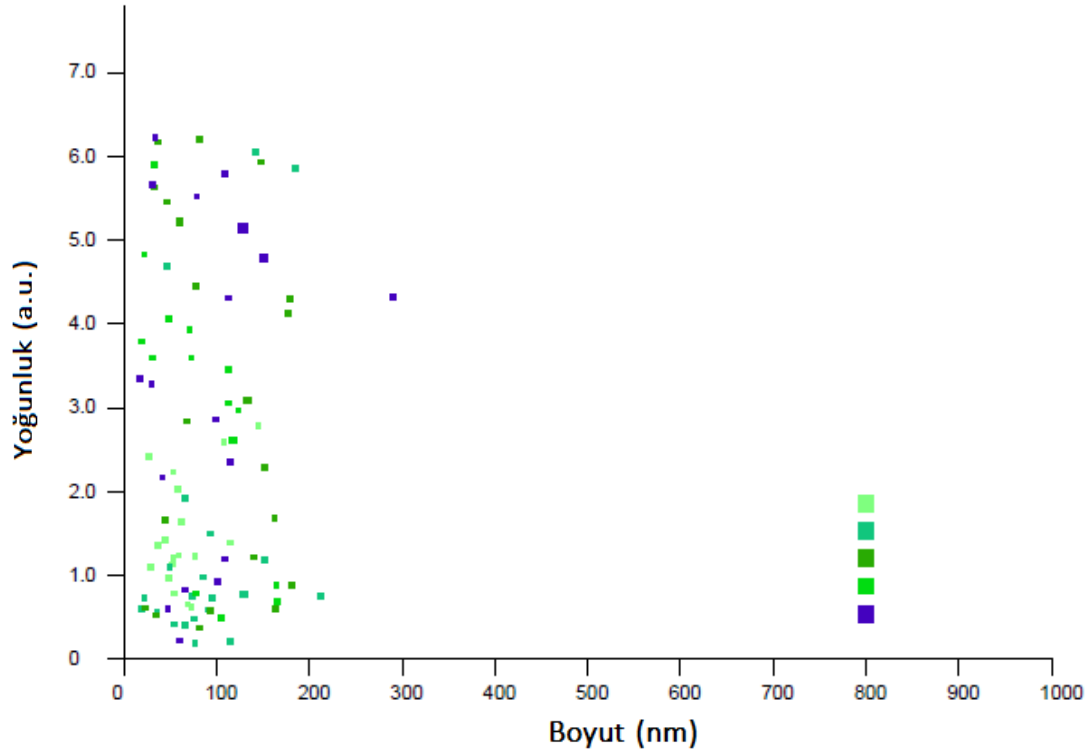
Şekil 4. 2: PID-PC'den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve yoğunluk (a.u) değerleri.

Sonuçlara göre PID-PC'den izole edilen eksozomların konsatrasyonları yapılan 5 tekrar ile 1.16×10^{11} , 4.55×10^9 , 8.29×10^9 , 9.33×10^9 , 1.53×10^{10} partikül/ml olmak üzere $3.0694 \times 10^{10} \pm 2.1396 \times 10^{10}$ partikül/ml ortalama değer olarak belirlenmiştir.



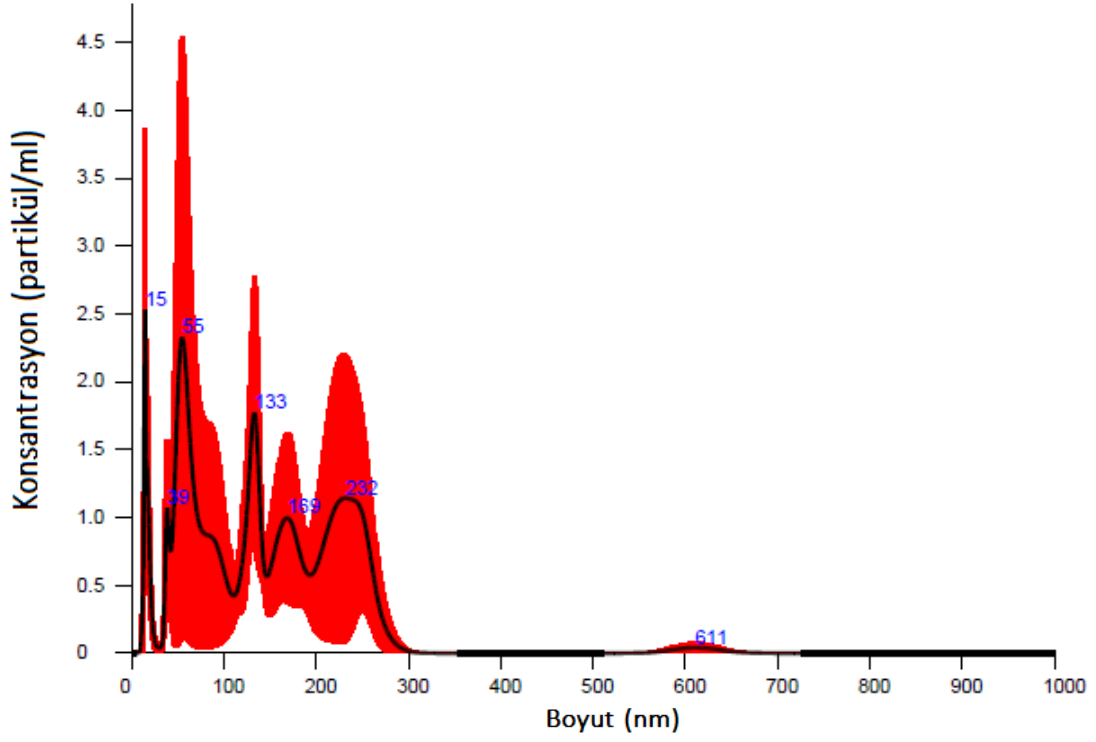
Şekil 4. 3: MiaPaca-2’den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve konsantrasyon (partikül/ml) değerleri.

Sonuçlara göre MiaPaca-2’den izole edilen eksozomların boyutları ortalama 100.7 ± 10 nm olarak belirlenmiştir



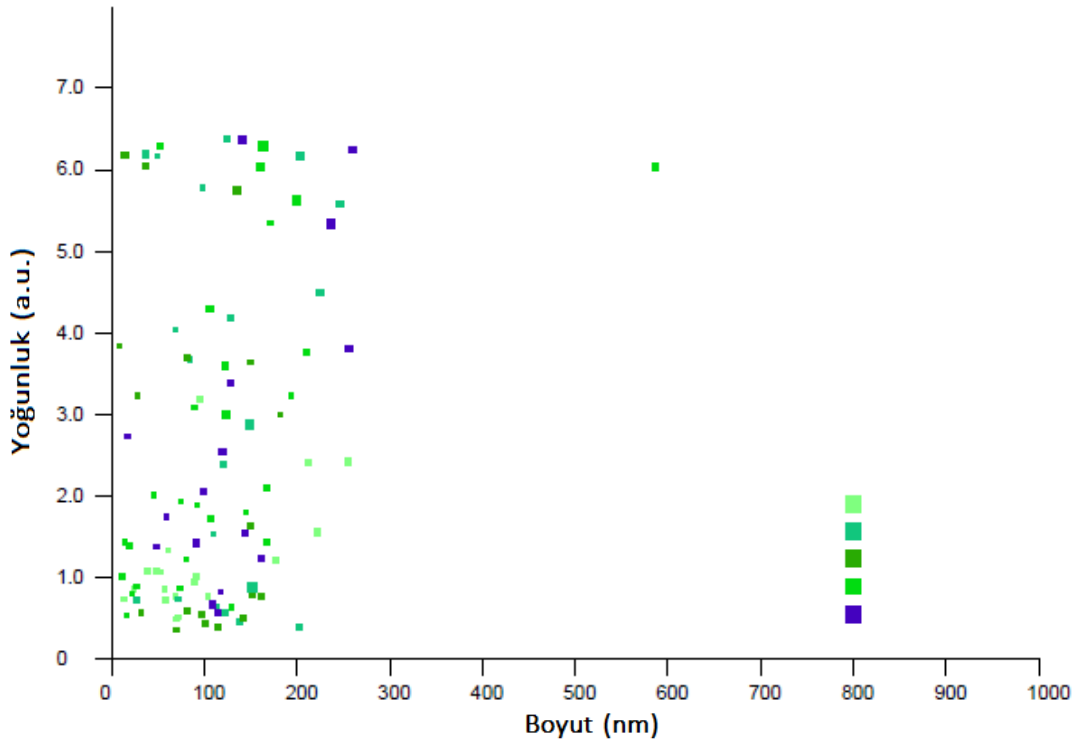
Şekil 4. 4: MiaPaca-2’den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve yoğunluk (a.u) değerleri.

Sonuçlara göre MiaPaca-2’den izole edilen eksozomların konsantrasyonları yapılan 5 tekrar ile 2.02×10^{10} , 1.25×10^{10} , 6.30×10^9 , 7.14×10^9 , 7.03×10^9 partikül/ml olmak üzere $1.0643 \times 10^{10} \pm 2.636 \times 10^9$ partikül/ml ortalama değer olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 5: INS-1’den izole edilen eksozomların NTA ile boyut (nm) ve konsantrasyon (partikül/ml) değerleri.

Sonuçlara göre INS-1’den izole edilen eksozomların boyutları ortalama 147.2 ± 12.3 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 6: INS-1’den izole edilen eksozomların NTA analizi ile boyut (nm) ve yoğunluk (a.u) değerleri.

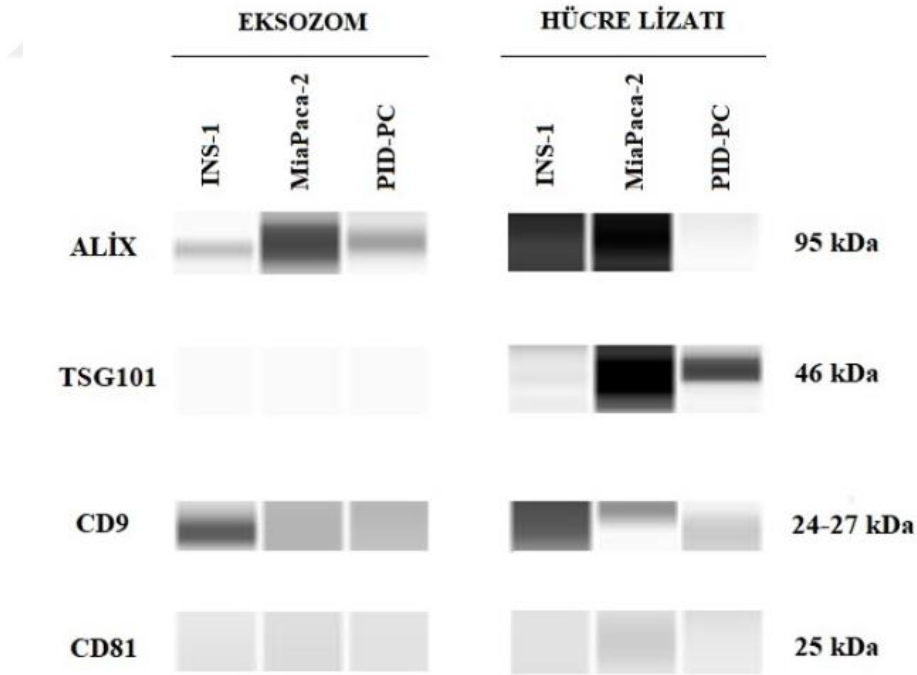
Sonuçlara göre INS-1’den izole edilen eksozomların konsantrasyonları yapılan 5 tekrar ile 7.38×10^{10} , 1.04×10^{10} , 9.38×10^9 , 1.72×10^{10} , 1×10^{10} partikül/ml olmak üzere $2.4156 \times 10^{10} \pm 1.249 \times 10^{10}$ partikül/ml ortalama değer olarak belirlenmiştir.

4.2. WESTERN BLOTİNG İLE PROTEİN SEVİYELERİNİN ANALİZİ

PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücrelerinden izole edilen eksozomlarda, eksozom biyobelirteci olan CD9, Alix, TSG101 ve CD81'in seviyeleri ilk etapta Western Blotting ile gösterilmek istenilmiştir. Ancak yapılan çoklu denemeler sonucu bant gözlenememiştir. Daha önce bu hücre soylarında belirtilen proteinlerin analizleri yapılmadığı için hücrelerde bu proteinlerin olup olmadığı ya da miktarları bilinmemektedir. Çoklu denemeler sonucu geleneksel western blot yöntemi ile ilgili proteinlere ait bant görüntüsünün analiz edilememesinin sonucunda daha hassas bir yöntem olan Simple Wes ile analiz yapılması kararlaştırılmıştır.

4.3. SIMPLE WES İLE ALİX, TSG101, CD9 VE CD81'İN ANALİZİ

PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından izole edilen eksozomlarda ve her üç hücre soyundan elde edilen hücre lizatlarında Alix, TSG101, CD9 ve CD81 proteinleri Simple Wes ile analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucu aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.7).

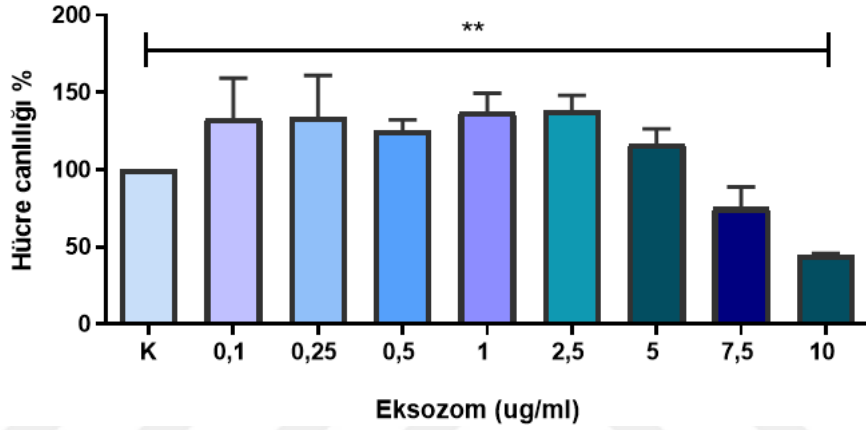


Şekil 4. 7: PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücrelerinden izole edilen eksozomlarda ve her üç hücre soyundan elde edilen lizatlarda eksozomal belirteçlerin Simple Wes ile gösterilmesi.

4.4. MTT ANALİZ SONUÇLARI

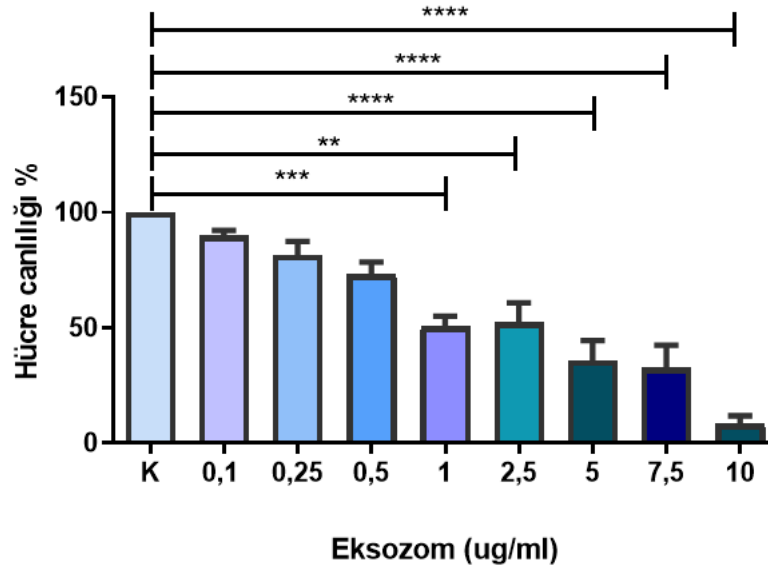
4.4.1. PID-PC'lerden izole edilen eksozomların MiaPaca-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi

MiaPaca-2 hücre soyuna 0,1-10 µg/ml konsantrasyon aralığında PID-PC'lerden izole edilen eksozomlar uygulanmıştır. Belirli doz aralığında verilen eksozomların hücre canlılığına olan etkisi 24 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hesaplanmış ve aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9).



Şekil 4. 8: PID-PC'lerden izole edilen eksozomların MiaPaca-2 hücre soyu üzerine 24 saat inkübasyon sonrasında % hücre canlılığı üzerine olan etkisi. **p<0,01.

Sonuçlara göre % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0,1 µg/ml eksozom uygulanan grupta $132,9 \pm 15,17$; 0,25 µg/ml eksozom uygulanan grupta $133,8 \pm 15,58$; 0,5 µg/ml eksozom uygulanan grupta $125,3 \pm 3,953$; 1 µg/ml eksozom uygulanan grupta $137,1 \pm 7,133$; 2,5 µg/ml eksozom uygulanan grupta $138,4 \pm 5,532$; 5 µg/ml eksozom uygulanan grupta $116,6 \pm 5,586$; 7,5 µg/ml eksozom uygulanan grupta $75,43 \pm 7,660$; 10 µg/ml eksozom uygulanan grupta $44,59 \pm 0,6032$ olarak hesaplanmıştır.

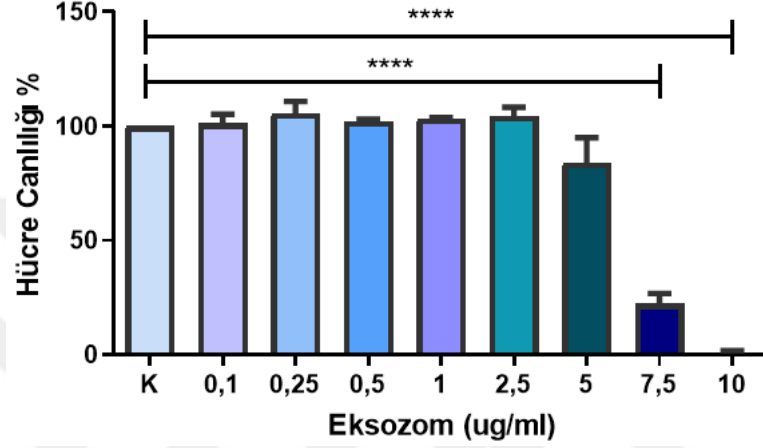


Şekil 4. 9: PID-PC'lerden izole edilen eksozomların MiaPaca-2 hücre soyu üzerine 72 saat inkübasyon sonrasında % hücre canlılığı üzerine olan etkisi. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Sonuçlara göre % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0,1 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $89,95 \pm 2,399$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $81,54 \pm 5,844$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $73,11 \pm 5,393$; 1 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $50,51 \pm 4,627$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $52,30 \pm 8,551$; 5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $35,81 \pm 8,760$; 7,5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $32,81 \pm 9,855$; 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $8,197 \pm 3,683$ olarak hesaplanmıştır.

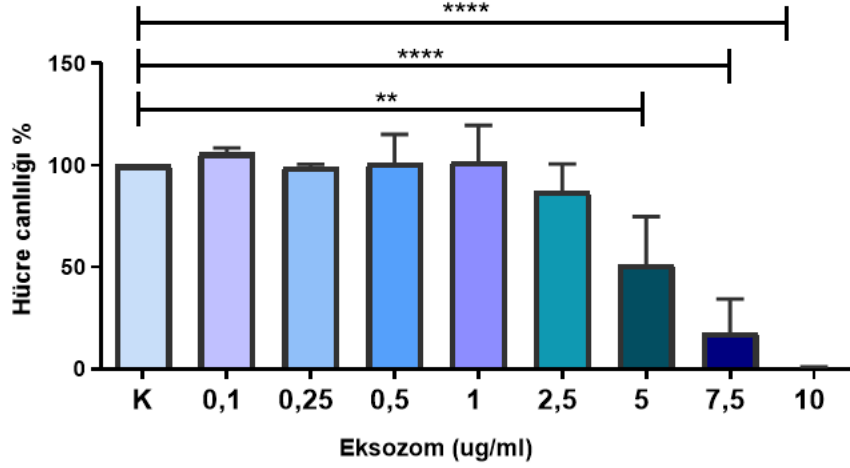
4.4.2. PID-PC'lerden izole edilen eksozomların INS-1 Hücre Soyu Üzerine Etkisi

INS-1 hücre soyuna 0,1-10 µg/ml konsantrasyon aralığında PID-PC'lerden izole edilen eksozomlar uygulanmıştır. Belirli doz aralığında verilen eksozomların hücre canlılığına olan etkisi 24 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hesaplanmış ve aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. (Şekil 4.10, Şekil 4.11)



Şekil 4. 10: PID-PC'lerden izole edilen eksozomların INS-1 hücre soyu üzerine 24 saat inkübasyon sonrasında % hücre canlılığı üzerine olan etkisi. ****p<0,0001.

Sonuçlara göre % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0,1 µg/ml eksozom uygulanan grupta $101,1 \pm 4,062$; 0,25 µg/ml eksozom uygulanan grupta $105,3 \pm 5,404$; 0,5 µg/ml eksozom uygulanan grupta $102,0 \pm 1,014$; 1 µg/ml eksozom uygulanan grupta $103,2 \pm 0,5902$; 2,5 µg/ml eksozom uygulanan grupta $104,5 \pm 3,718$; 5 µg/ml eksozom uygulanan grupta $84,04 \pm 10,84$; 7,5 µg/ml eksozom uygulanan grupta $22,17 \pm 4,528$; 10 µg/ml eksozom uygulanan grupta $0,6808 \pm 1,130$ olarak hesaplanmıştır.



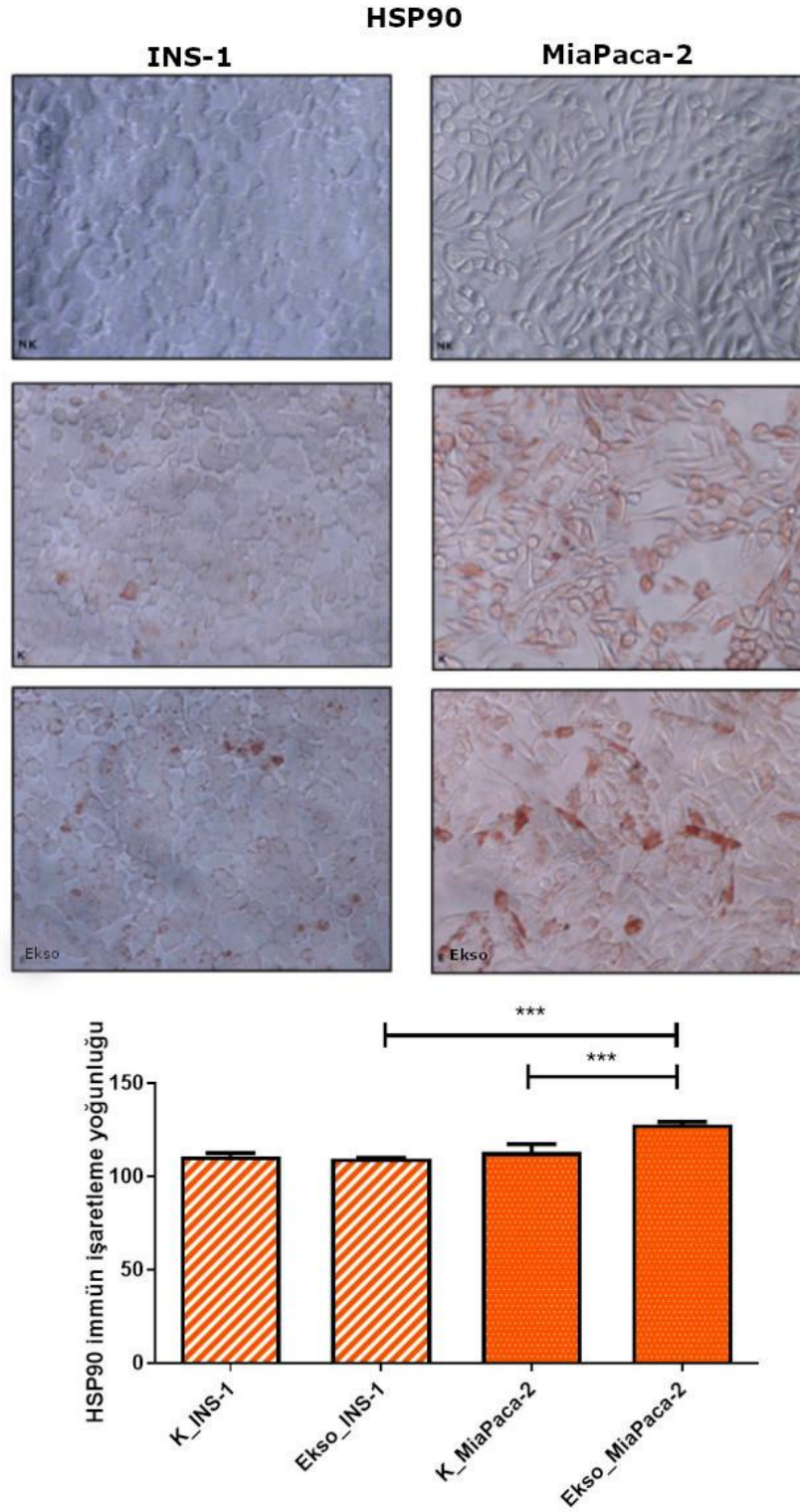
Şekil 4. 11: PID-PC’lerden izole edilen eksozomların INS-1 hücre soyu üzerine 72 saat inkübasyon sonrasında % hücre canlılığı üzerine olan etkisi. **p<0,01, ****p<0,0001.

Sonuçlara göre % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0,1 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $106,1 \pm 1,793$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $98,96 \pm 0,9298$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $101,0 \pm 8,269$; 1 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $101,8 \pm 10,34$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $87,25 \pm 7,762$; 5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $51,18 \pm 13,62$; 7,5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $17,68 \pm 9,635$; 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom uygulanan grupta $0,2340 \pm 0,3435$ olarak hesaplanmıştır.

4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYA

4.5.1. İmmünohistokimya ile INS-1 ve MiaPaca-2 Hücre Soylarında HSP90, HSF-1, Nestin ve Endoglin Proteinlerinin Gösterilmesi

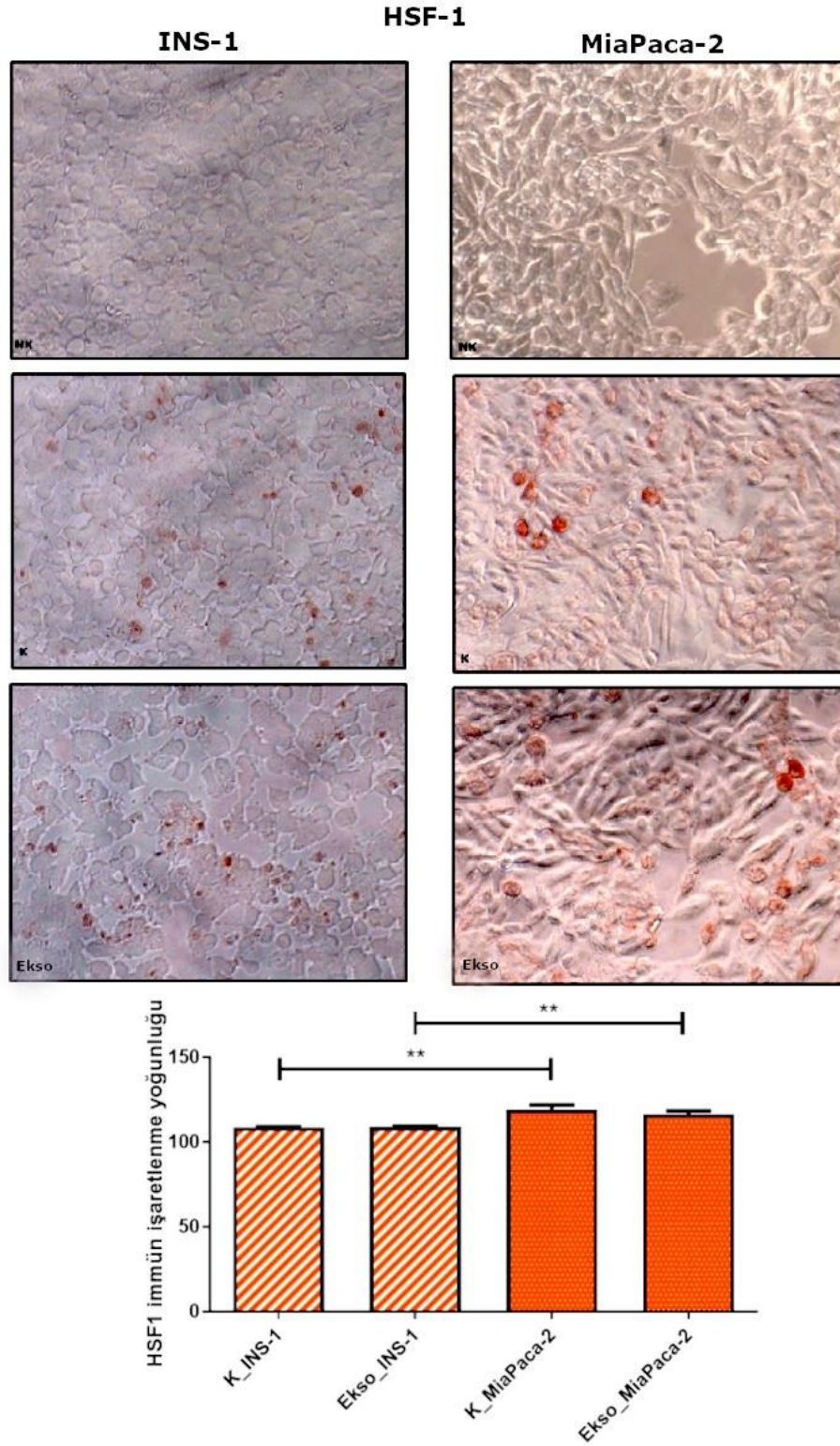
İmmünohistokimyasal olarak işaretlenen ve ışık mikroskopunda analiz edilen HSP90 (Şekil 4.12), HSF-1 (Şekil 4.13), Nestin (Şekil 4.14), Endoglin (Şekil 4.15) proteinlerinin yoğunlukları bilgisayar destekli analiz programı ile hesaplanmış ve analiz sonuçlarına ait grafikler aşağıda verilmiştir.



Şekil 4. 12: INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında gösterilen HSP90'nın ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında HSP90'nın immün işaretlenme yoğunluğu (K_INS-1: Kontrol Ins-1, Ekso_INS-1: Eksozom Uygulanan INS-1, K_MiaPaca-2: Kontrol MiaPaca-2, Ekso_MiaPaca-2: eksozom uygulanan MiaPaca-2). K_INS-1; $110,8 \pm 1,591$, Ekso_INS-1; $109,5 \pm 0,3852$, K_MiaPaca-2; $112,9 \pm 4,251$, Ekso_MiaPaca-2; $127,6 \pm 1,598$ *** $p < 0,001$.

Sonuçlara göre, INS-1 hücre soyuna eksozom uygulandığında HSP90 immünboyama yoğunluğu kontrol grubuna istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir ($p>0,05$). Eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre soyunda HSP90'nın immünboyama yoğunluğu kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($***p<0,001$). Her iki hücre soyunun da eksozom uygulanan gruplarında MiaPaca-2 hücre soyunun HSP90 immünboyama yoğunluğu INS-1 hücre soyuna göre anlamlı derecede yüksektir. ($***p<0,001$).

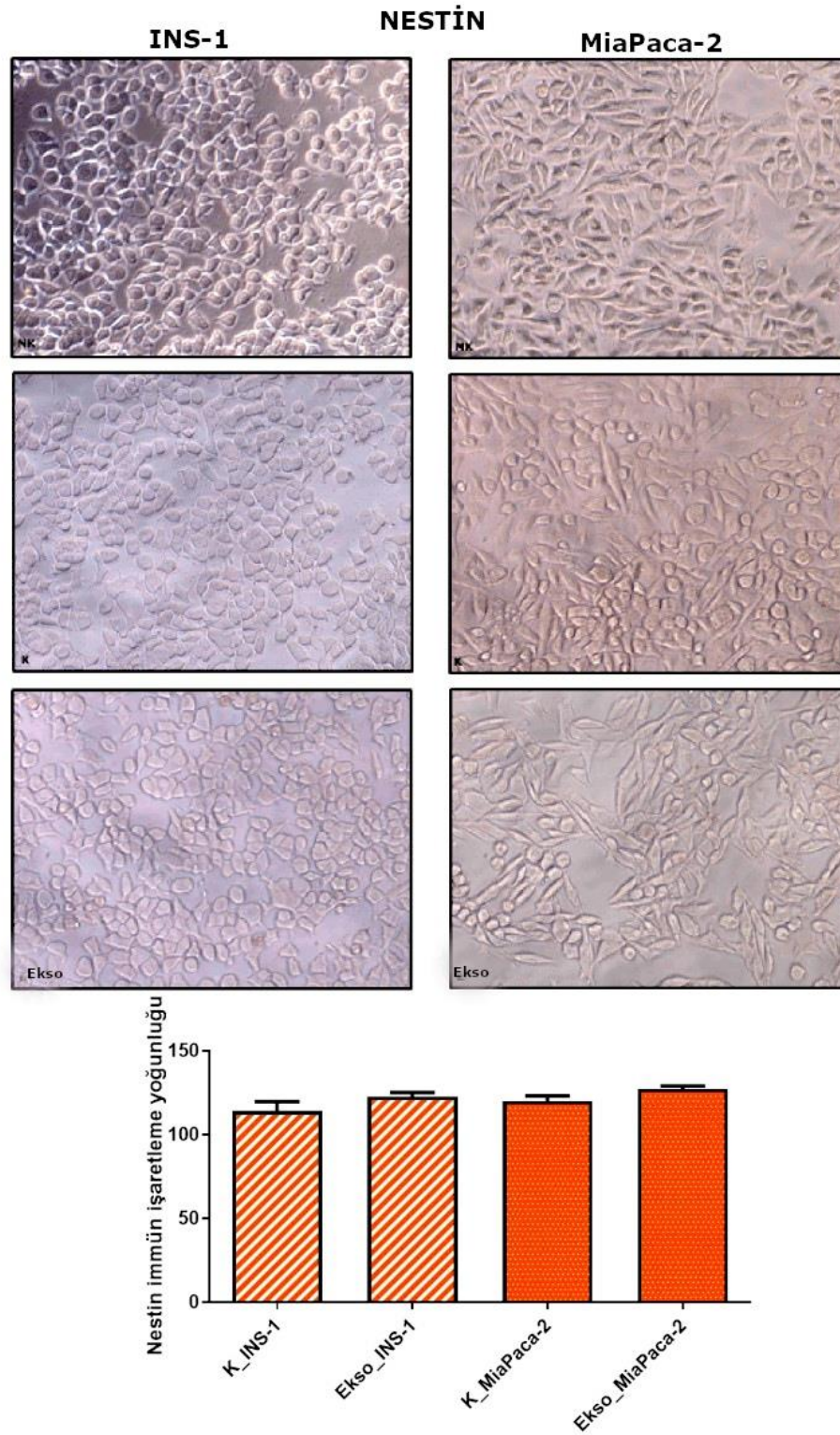




Şekil 4. 13: INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında gösterilen HSF-1'in ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında HSF-1'in immün işaretlenme yoğunluğu (K_INS-1: Kontrol Ins-1, Ekso_INS-1: Eksozom Uygulanan INS-1, K_MiaPaca-2: Kontrol MiaPaca-2, Ekso_MiaPaca-2: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K_INS-1; 108,5 ± 0,4632, Ekso_INS-1; 108,8 ± 0,32823, K_MiaPaca-2; 119,0 ± 2,2656, Ekso_MiaPaca-2 116,3 ± 2,020 **p<0,01.

Sonuçlara göre HSF-1 immünboyama yoğunluğunda eksozom uygulanan INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında kendi kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlılık yoktur ($p>0,05$). MiaPaca-2 hücre soyunun INS-1 hücre soyunun kontrol grubuna göre ve eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre soyunun eksozom uygulanan INS-1 hücre soyuna göre HSF-1 immünboyama yoğunlukları anlamlı derecede fazladır (** $p<0,01$).

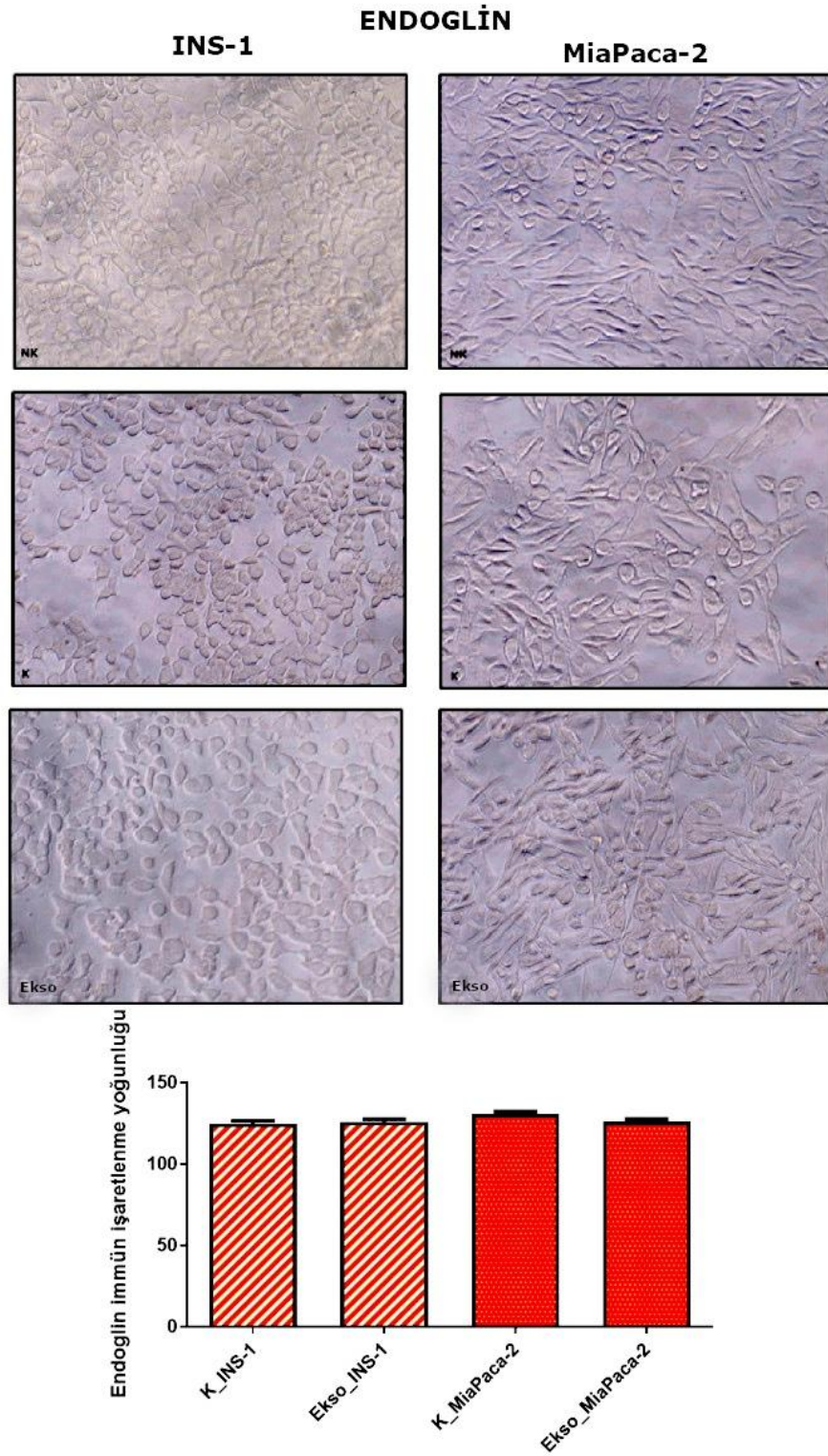




Şekil 4. 14: INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında gösterilen Nestin'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Nestin'nin immün işaretlenme yoğunluğu (K_INS-1: Kontrol Ins-1, Ekso_INS-1: Eksozom Uygulanan INS-1, K_MiaPaca-2: Kontrol MiaPaca-2, Ekso_MiaPaca-2: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K_INS-1; $114,1 \pm 5,487$, Ekso_INS-1; $122,7 \pm 2,350$, K_MiaPaca-2; $120,0 \pm 3,068$, Ekso_MiaPaca-2; $127,2 \pm 1,749$.

Sonuçlara göre eksozom uygulanan ve uygulanmayan INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Nestin immünboyama yoğunluğunda anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Her iki hücre soyunun kontrol grubunda immün boyama sonucunda Nestin proteinine ait hiç işaretlenme olmamıştır.



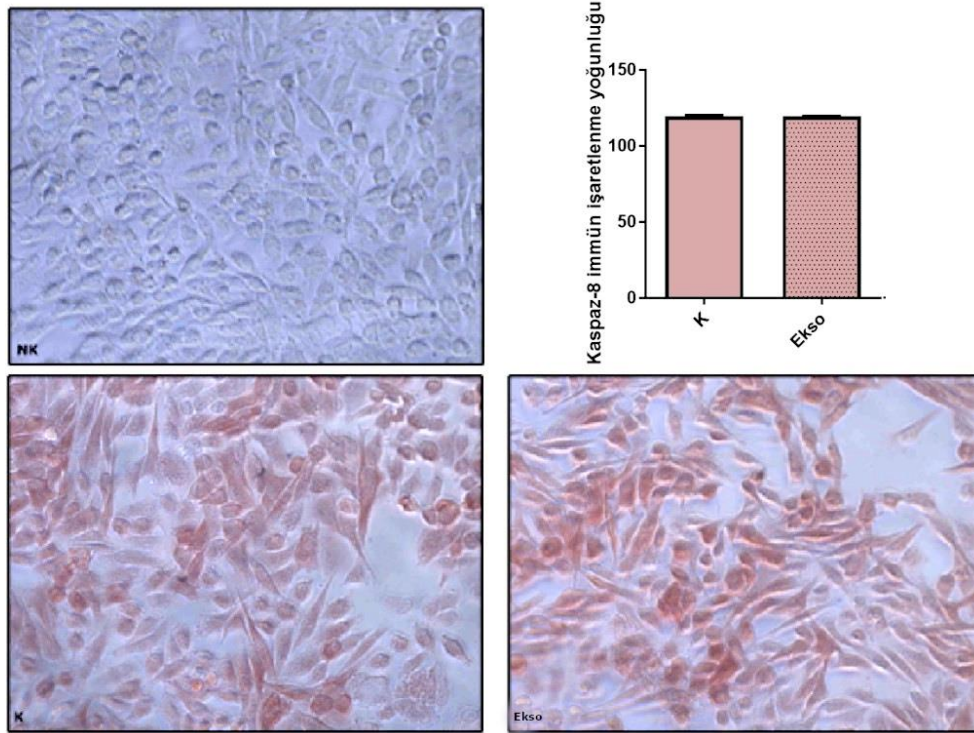


Şekil 4. 15: INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında gösterilen Endoglin'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Endoglin'nin immün işaretlenme yoğunluğu. (K_INS-1: Kontrol Ins-1, Ekso_INS-1: Eksozom Uygulanan INS-1, K_MiaPaca-2: Kontrol MiaPaca-2, Ekso_MiaPaca-2: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K_INS-1; $124,7 \pm 1,751$, Ekso_INS-1; $125,8 \pm 1,611$, K_MiaPaca-2; $130,7 \pm 1,510$, Ekso_MiaPaca-2; $126,0 \pm 1,536$.

Sonuçlara göre eksozom uygulanan INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Endoglin immünboyama yoğunluğunda kontrol gruplarına göre anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). INS-1 hücre soyunun hem kontrol grubunda hem de eksozom uygulanan grubunda, MiaPaca-2 hücre soyunda ise sadece kontrol grubunda immün boyama sonucunda hiç işaretlenme olmamıştır.

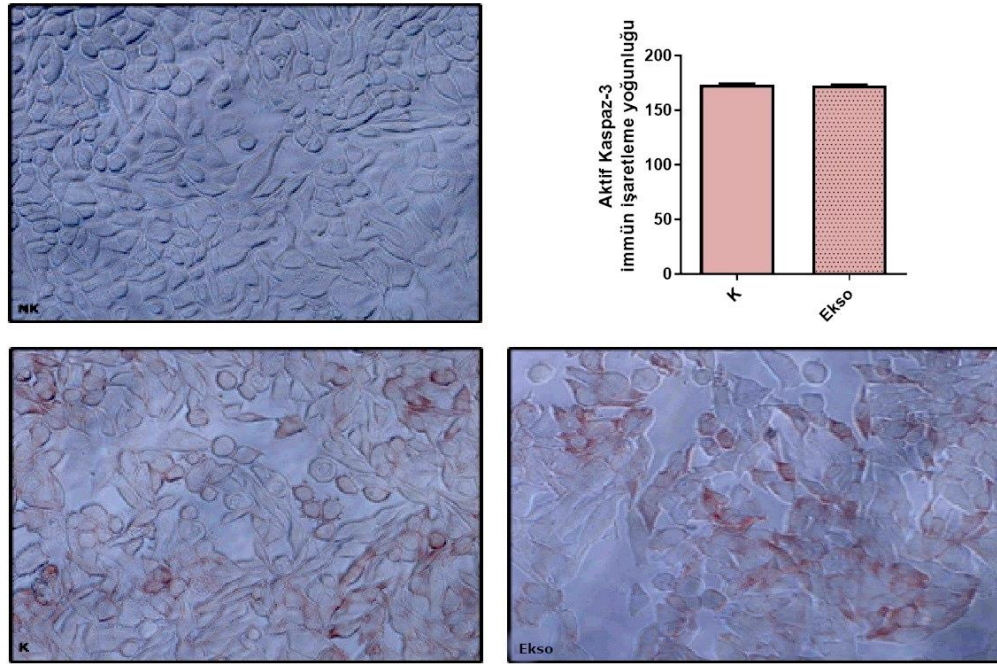
4.5.2 İmmünohistokimya ile MiaPaca-2 Hücre Soyunda Kaspaz-8, Aktif Kaspaz-3, Beclin ve p-Bcl-2'nin Gösterilmesi

İmmünohistokimyasal olarak işaretlenen Kaspaz-8 (Şekil 4.16), Aktif Kaspaz-3 (Şekil 4.17), Beclin (Şekil 4.18) ve p-Bcl-2 (Şekil 4.19) proteinlerinin yoğunlukları bilgisayar destekli analiz programı ile hesaplanmış ve analiz sonucu immün işaretleme yoğunluklarına ait grafikler aşağıda verilmiştir.



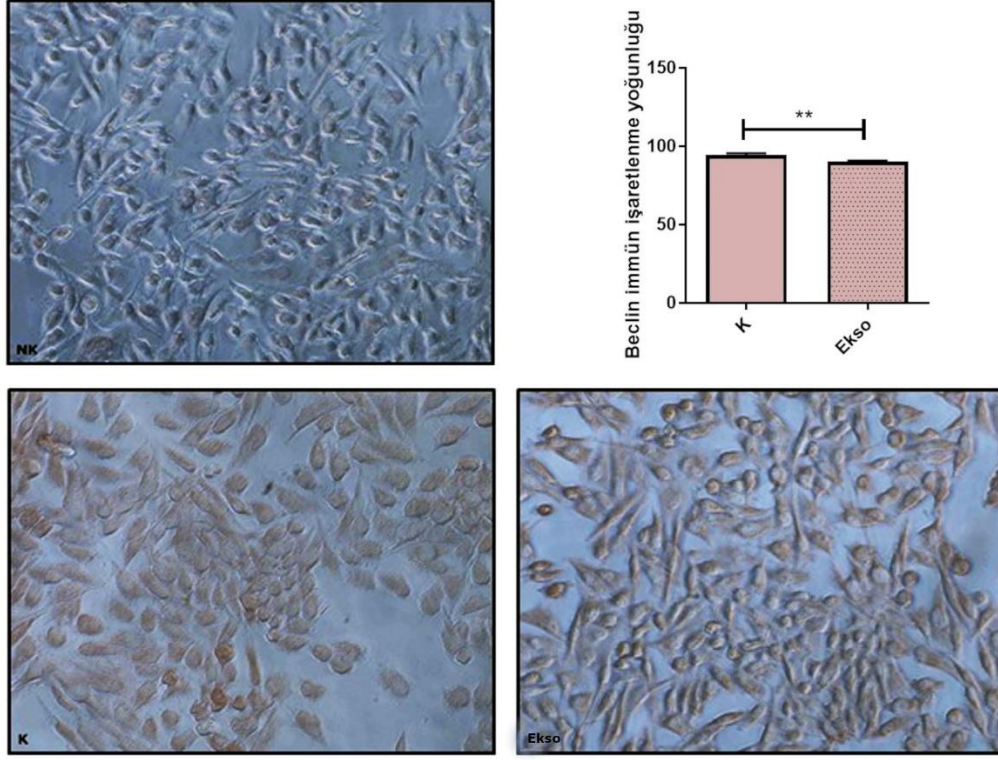
Şekil 4. 16: MiaPaca-2 hücre soyunda gösterilen Kaspaz-8'in ışık mikroskopundaki görüntüsü. (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). MiaPaca-2 hücre soyunda Kaspaz-8'in immün işaretlenme yoğunluğu (K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2) K; 119,1 ± 1,183, Ekso; 119,1 ± 0,5621.

Sonuçlara göre Kaspaz-8 immünboyama yoğunluğu eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre soyunda kontrol grubuna göre farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).



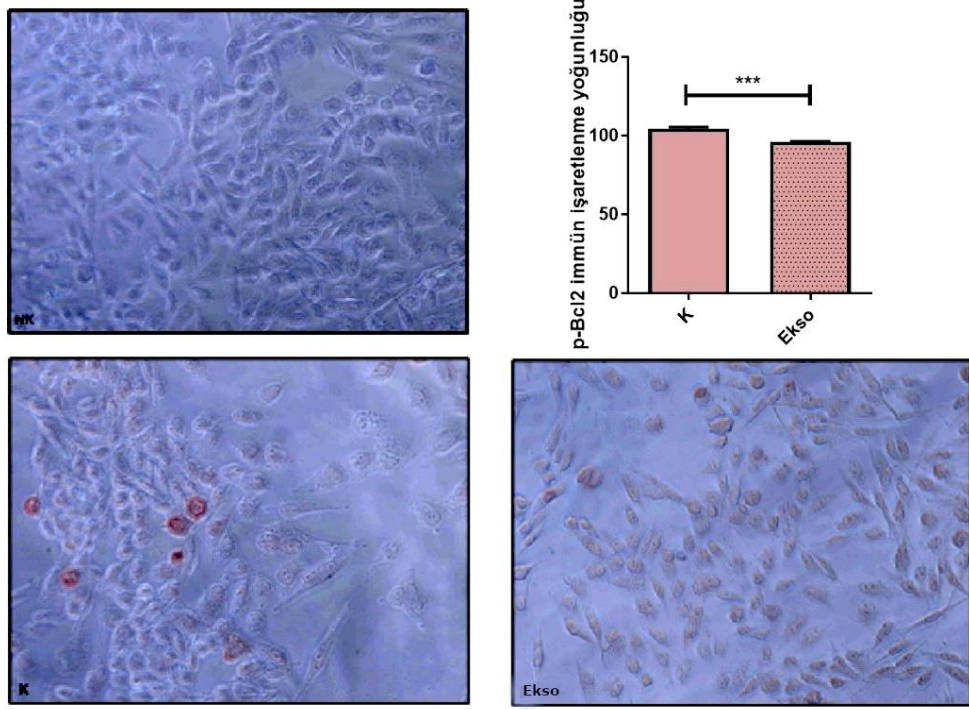
Şekil 4. 17: MiaPaca-2 hücre soyunda gösterilen Aktif Kaspaz-3'ün ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). MiaPaca-2 hücre soyunda Aktif Kaspaz-3'ün immün işaretlenme yoğunluğu (K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K; $173,5 \pm 0,9917$, Ekso; $172,6 \pm 0,7865$.

Sonuçlara göre Aktif Kaspaz-3 immünboyama yoğunluğu eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre soyunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4. 18: MiaPaca-2 hücre soyunda gösterilen Beclin'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). MiaPaca-2 hücre soyunda Beclin'nin immün işaretlenme yoğunluğu (K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K; $94,16 \pm 1,268$, Ekso; $90,06 \pm 0,6299$ $**p < 0,01$.

Sonuçlara göre Beclin immünboyama yoğunluğunda eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre soyunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır ($**p < 0,01$).

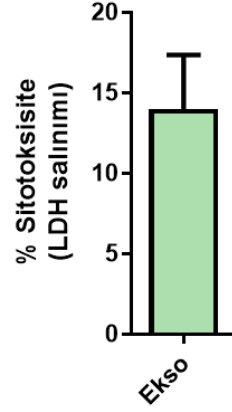


Şekil 4. 19: MiaPaca-2 hücre soyunda gösterilen p-Bcl-2'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan hücre soyu). MiaPaca-2 hücre soyunda p-Bcl-2'nin immün işaretlenme yoğunluğu (K: Kontrol, Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2). K; $104,3 \pm 1,106$, Ekso; $95,96 \pm 0,5141$ *** $p < 0,001$.

Sonuçlara göre p-Bcl-2 immünboyama yoğunluğunda eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücre soyunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır (*** $p < 0,001$).

4.5. MİAPACA-2 HÜCRE SOYUNDA SİTOTOKSİTİTENİN (LDH) BELİRLENMESİ

Nekrotik hücre ölüm yüzdesinin analiz edilmesi amacı ile sitotoksitite Kiti ile yapılan deney sonucu elde edilen grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 4.20)

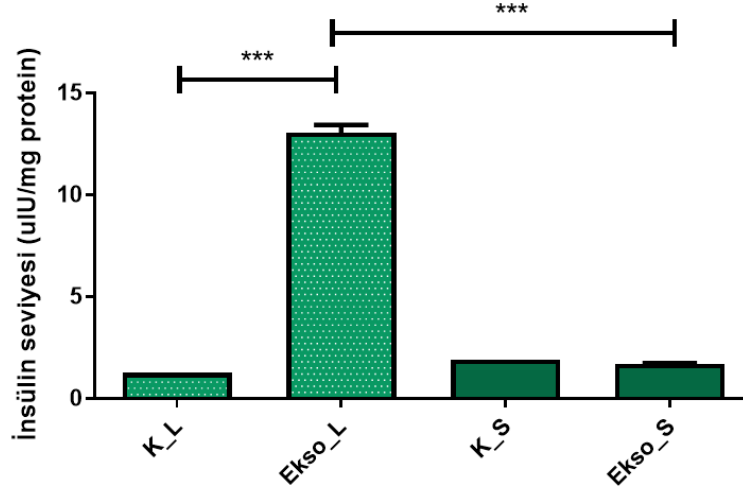


Şekil 4. 20: Eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücrelerinin LDH salınımı (Ekso: Eksozom uygulanan MiaPaca-2).

Sonuçlara göre MiaPaca-2 hücre soyundan salınan LDH değeri $13,98 \pm 3,361$ olarak belirlenmiştir.

4.6. INS-1 HÜCRE SOYUNDA İNSÜLİN SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ

İnsülin ELİSA kiti (201-11-0708, Sunred) ile INS-1 hücre lizat ve sekresyonlarında eksozom uygulaması sonucu belirlenen insülin seviyesi aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4. 21: Eksozom uygulanan INS-1 Hücrelerinin lizat ve sekresyonunda insülin seviyesi (uIU/mg protein) (K_L: Kontrol INS-1 lizatı, Ekso_L: Eksozom uygulanmış INS-1 lizatı, K_S: Kontrol INS-1 sekresyonu, Ekso_S: Eksozom uygulanmış INS-1 sekresyonu). K_L; $1,243 \pm 0,002673$, Ekso_L; $13,04 \pm 0,3815$, K_S; $1,894 \pm 0,0004865$, Ekso_S; $1,677 \pm 0,05751$ *** $p < 0,001$.

Sonuçlara göre eksozom uygulanan INS-1 hücre lizatlarında insülin seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir derecede artmıştır (** $p < 0,001$). Ancak eksozom uygulanan INS-1 hücre sekresyonunda ise insülin seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$). Eksozom uygulanan INS-1 hücre lizatlarında insülin seviyesi ise eksozom uygulanan INS-1 hücre sekresyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir derecede artış göstermiştir (** $p < 0,001$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ekstraselüler veziküllerin bir çeşidi olan eksozomları diğer veziküllerden ayırt edebilmek için boyutların genel olarak 50-150 nm şeklinde tanımlanmıştır. Ancak literatürde varolan birçok çalışmada bu aralığın farklılık gösterdiği görülmektedir. Zare ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada primer fibroblast hücrelerinden salınan eksozomlar araştırılmıştır. Bu çalışmada Zetasizer ile yapılan boyut analizinde ortalama eksozom boyutu 37.62 nm olarak belirlenmiştir ve 50 nm'nin altında da eksozom olabileceği gösterilmiştir (Zara ve diğ., 2020). SW480-7 koleraktal kanser hücre hattından izole edilen eksozomların Zetasizer ile boyut analizi yapıldığında ise eksozomların ortalama boylarının 274.6 nm olduğunun gösterilmesi sonucu (Ng ve diğ., 2021) 150 nm'den çok daha büyük boyutlarda eksozom olabileceği de görülmektedir. Farklı kaynaklardan izole edilen eksozomlarda da benzer sonuçlar görülebilmektedir. Gastrik kanser hastalarının serumlarından izole edilen eksozomların ortalama boyutları 200 nm iken (Hui ve diğ., 2020), insan epitel hücre soyu olan HUVEC'den salınan eksozomların ortalama 211.8 nm olduğu belirtilmiştir (Bagheri ve diğ., 2018). Hajipour ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylerden alınan rahim sıvısından elde edilen eksozomların boyutlarının 30 ile 300 nm (ortalama 91.8 nm) olduğu gösterilmiştir (Hajipour ve diğ., 2021). İnsan koryokarsinom hücre soyundan (JAR) izole edilen eksozomların da 30 ile 200 nm arasında olduğu belirtilmiştir (Midekessa ve diğ., 2020).

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında üç farklı hücre soyundan eksozom izolasyonunu yaptık. Eksozomların boyutlarını NTA ile ölçtük. Çalışma kapsamında üç farklı hücre soyundan salınan eksozomları karakterize ederken boyut olarak da karşılaştırmayı amaçladık. PID-PC'lerden izole edilen eksozomların boyutlarını 103.6 ± 28.6 nm, MiaPaca-2 hücre soyundan izole edilen eksozomların boyutlarını 100.7 ± 10 nm, INS-1 hücre soyundan izole edilen eksozomların boyutlarını 147.2 ± 12.3 nm olarak ölçtük.

PID-PC ile ilgili sadece diyabetli farelerde yapılan bir çalışma mevcuttur. Obez olmayan diyabetik farelerin Langerhans adacıklarından elde edilen ada MSC benzeri hücrelerden izole edilen eksozomların ada immünopatolojisindeki rolü araştırılmıştır (Rahman ve diğ., 2014). Ancak izole edilen eksozomların karakterizasyonu ile ilgili çalışma yapılmamıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada sağlıklı sıçan pankreasından elde edilen PID-PC'lerden ilk defa tarafımızca eksozomlar izole edilmiş, NTA ile boyut analizleri yapılmış ve ilgili olabilecek

biyobelirteçler analiz edilerek olası markır belirlenmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda farklı kaynaklardan elde edilen MSC'lerden izole edilen eksozomlarda da benzer sonuçların olduğu görülmektedir. İnsan kemik iliği kaynaklı MSC'lerden izole edilen eksozomların ortalama 145 nm (Shang ve di., 2019), insan göbek kordonu kaynaklı MSC'lerden izole edilen eksozomların ise ortalama 139 nm olduğu gösterilmiştir (Ding ve diğ., 2021). Yapılan bir çalışmada INS-1 hücre soyundan izole edilen eksozomların boyutunun 145.4 ± 4.3 nm olduğu belirtilmiştir (Kamalden ve ark., 2017). Bu değerler bizim sonuçlarımızla da uyumludur. MiaPaca-2 hücre soyundan izole edilen eksozomlar ile yapılan bir çalışmada eksozom boyutlarının ortalama 107 nm olduğu belirtilmiştir (Nakaoka ve diğ., 2021). Bu hücre soyu için de elde edilen değerler bizim sonuçlarımızla uyumludur. İzole edilen eksozomların aynı kaynaktan elde ediliyor olmasına rağmen farklı boyutlarda olabileceği de yapılan farklı çalışmalar ile gösterilmiştir. Ding ve arkadaşları insan göbek kordonu kökenli eksozomların boyutunu 72.3-206.2 nm olarak ölçerken, Tan ve arkadaşları aynı kaynaktan izole ettikleri eksozomların boyutlarını 50-150 nm olarak ölçmüştür (Tan ve diğ., 2019; Ding ve diğ., 2021). Ayrıca kemik iliği kaynaklı MSC'lerden izole edilen eksozomların boyutları 80-200 nm olarak ölçülürken (Shang ve diğ., 2019), başka bir çalışmada aynı kaynaktan izole edilen eksozomların boyutlarının $75.5 \pm 1,4$ olduğu dikkat çekmiştir (Zhou ve diğ., 2020). Aynı kaynaklardan izole edilen eksozomların boyutlarının farklı olmasının birçok sebebi olabilmektedir. Bu sebeplerden biri eksozomların nasıl izole edildiğidir. Yapılan bir çalışmada MiPaca-2 hücre soyundan eksozomlar izole edilirken biri ultrasantrifüj olmak üzere 4 farklı ticari kit ile yapılan toplam 5 izolasyon sonucu karşılaştırılmış ve eksozomların boyut analizi yapılmıştır. Ultrasantrifüj ile yapılan izolasyon sonucu eksozom boyutunun 120.07 ± 8.26 nm iken, sırasıyla 4 farklı kit ile ölçülen eksozomların boyutlarının 182.23 ± 13.92 , 114.93 ± 11.92 , 132.7 ± 2.65 , 134.13 ± 6.46 nm olduğu gösterilmiştir (Patel ve diğ., 2019). Buna benzer başka bir çalışmada ise İnsan Wharton'un jöle türevli MSC'lerden eksozomlar üç farklı şekilde izole edilmiştir. Bunlardan biri ultrasantrifüj, diğeri sukroz gradientli ultrasantrifüj yöntemi ve üçüncüsü de izolasyon kitidir. İzole edilen eksozomlar sırası ile ortalama 202.2, 170.9, 186.8 nm boyutlarında analiz edilmiştir (Chopra ve diğ., 2019). Ayrıca bu çalışmalar aynı hücre soyu olmasına rağmen yukarıda da bahsettiğimiz gibi farklı boyutlarda eksozom elde edilebileceğinin farklı bir örneğidir. Aynı hücre soyundan aynı yöntem ile eksozom izole edilmesine rağmen eksozom boyutları farklı çıkabilmektedir. Dang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada fare kortikal toplama kanalı ana hücreleri (mpkCCD) kullanılmış ve apikal hücreler ile basolateral

hücrelerden ayrı ayrı olarak eksozomlar ultrasantrifüj yöntemi ile izole edilmiştir. Eksozomların boyut analizi yapıldığında mpkCCD apikal hücrelerden izole edilen eksozomların 147.9 ± 55.9 nm, mpkCCD basolateral hücrelerden izole edilen eksozomların ise 100 ± 39.2 nm olduğu gösterilmiştir (Dang ve diğ., 2017). Aynı hücre soyundan aynı yöntem ile eksozom izole edilmesine rağmen hücrenin bulunduğu konum da eksozom boyutunu etkilemiştir.

İzole edilen eksozomların boyut farklılığının bir diğer sebebi ise eksozomları saklama koşulları ve süreleri olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada erkek farelerin bronkoalveolarından eksozom izole edilmiştir. Eksozomların saklanma sıcaklığının eksozom boyutu üzerindeki etkisini belirlemek için, izole edilen eksozomlar farklı sıcaklıklarda saklanmıştır. Hemen izolasyonu yapıp boyut analizi yapılan eksozomlar, 4 gün boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve -80°C 'de bekletilen eksozomlar olmak üzere üç gruba ayrılıp boyut analizi yapılmıştır. Hemen izolasyonu yapıp boyut analizi yapılan eksozomların boyutları ortalama 94.5 ± 1.7 nm, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 4 gün bekleyen eksozomların boyutları ortalama 104 ± 1.15 nm, -80°C 'de 4 gün bekleyen eksozomların boyutları ise 125 ± 1.15 nm olarak belirlenmiştir (Maroto ve diğ., 2017). Sonuç olarak eksozomların boyutlarının farklılık göstermesi eksozomun kaynağı, izole edilme yöntemi, izole edilen eksozomun saklama koşulları ve süreleri, hatta eksozomun salındığı hücrenin konumunun etkili olduğunu göstermektedir. İzole edilen eksozomların kaynağı olarak kullanılan hücre soylarının pasaj sayılarının da etkili olabileceği muhtemeldir. Tüm farklılıklar göz önüne alındığında farklı zamanlarda farklı pasaj sayısına sahip hücrelerden eksozom izole edilip farklı şartlarda saklamadan deney sürecinin tamamlanması gerekliliği önem arz etmektedir. Bu neden ile de deneylerimizde aynı aralıktaki pasaj sayısına sahip hücrelerden tüm izolasyonlar gerçekleştirilmiş, hepsi aynı şartlarda saklanmış ve analizi yapılan eksozomlar tüm deneylerde ortak olarak kullanılmıştır. Tekrar izolasyonunun yapılması halinde tüm karakter analizlerinin tekrarlanması gerekliliği söz konusu olabilecektir.

Yapılan çalışmalarda eksozom belirteci olarak gösterilmiş ancak çalışmamız kapsamında PID-PC'lerden izole edilen eksozomlar için biyobelirteç olup olmadığı bilinmeyen Alix, TSG101, CD9 ve CD81'in analizini geleneksel western blot yöntemi ile araştırdık. Ancak izole edilen eksozomların ve kullanılan antikörlerin konsantrasyonunu, inkübasyon sürelerini değiştirerek tekrarlı denemeler yapmamıza rağmen Alix, TSG101, CD9 ve CD81 proteinlerine ait bant

gözlemleyemedik. PID-PC'lerden izole edilen eksozomlarda bu proteinlerin bulunup bulunmadığının bilinmemesi sonucu, bu proteinlerin bu eksozomlarda bulunmayabileceğini ya da miktarlarının çok az olabileceğini düşündük. Simple Wes geleneksel western blot yöntemine göre aşamalı olarak yapılan uygulamaları sırasında bu tekniği uygulayan kişiden de kaynaklı meydana gelebilecek hataları ortadan kaldırmanın yanı sıra çok daha az miktardaki örnekte çok daha kısa sürede ve daha hassas bir değerlendirme yapılabilme imkânı tanımaktadır. Bu nedenle Simple Wes tekniği geleneksel western blot yöntemine göre üstünlük sağlamaktadır (Nguyen ve diğ., 2011). Çalışmamız sonucu geleneksel western blot tekniği ile sonuç alamadığımız eksozomal proteinler Simple Wes ile analiz edilmiştir.

Alix endositoz, MVB oluşumu, membran onarımı, sitokinez, apoptoz gibi çeşitli yerlerde görev olan çok işlevli bir proteindir. Eksozom biyogenizde önemli olan ESCRT-0/III (Endozomal Sıralama Kompleks Transportu) kompleksi ile ilişkilidir (Matsuo ve diğ., 2004). Sonuçlara göre her üç hücre soyundan izole edilen eksozomlarda Alix proteini gözlemlendi. Alix, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre lizatında bulunurken, PID-PC hücre lizatında bant gözlenmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Alix proteini INS-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinin hem lizatında hem de eksozomlarında bulunurken, PID-PC'lerin sadece eksozomunda bulunması ile bu protein her üç hücreden izole edilen eksozomlar için biyobelirteç olabilirken, PID-PC'de izole edilen eksozomlar için daha spesifik bir biyobelirteç olabileceğini söyleyebiliriz.

ESCRT-I kompleksinin bir üyesi olan TSG101, çoklu veziküler yapıların biyogeneze aracılık eder ve bu veziküllerin kargo degradasyonunda önemli bir rol oynar (Slagsvold ve diğ., 2006; Kumar ve diğ., 2016). Alix ile TSG101'in hasarlı lizozomların onarımında etkin olduğu ve lizozomal hasara bağlı hücre ölümüne etki ettiği gösterilmiştir (Radulovic ve diğ., 2019). TSG101'in azalmasıyla beraber lizozomal kargonun temizlenmesi bloke edilir. Ayrıca endoplazmik retikulum stresini arttırmada potansiyel faktör olacağı öne sürülmektedir (Kaul ve diğ., 2020). Çalışmamızda TSG101 proteini her üç hücre soyundan elde edilen eksozomlarda görülmemiştir. Ancak PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarına ait hücre lizatlarında görülmüştür. Bu sonuçlar PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından izole edilen eksozomlar için TSG101'in spesifik bir makır olmadığını göstermektedir.

Tetraspaninler, dört transmembran alanı, küçük ve büyük bir hücre dışı döngü, nispeten kısa C-terminal ve N-terminal sitoplazmik kuyruklardan oluşan zar proteinleridir (Hemler, 2005). İnsanlarda tanımlanmış 33 üyeden oluşan transmembran glikoprotein ailesidir. CD9 ve CD81

bu ailenin birer üyesidir (New ve diğ., 2021). CD9 veziküler ve hücrel füzyonun yanısıra hücre yapışması ve hücre trafiğinde rol oynar (Hemler, 2005). CD9 proteini sadece INS-1 hücre soyundan izole edilen eksozomlarda ve her üç hücre soyundan elde edilen lizatlarda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda da CD9'un sadece INS-1 hücre soyundan elde edilen eksozomlar için spesifik bir biyobelirteç olabileceğini söyleyebiliriz. Tetraspaninlerden bir diğeri CD81 hücre göçü ve B hücresi aktivasyonunda yer alır (Hosokawa ve diğ., 2021). CD81 proteini ise her üç hücre soyundan elde edilen eksozomlarda tespit edilmemiştir. Lizat örneklerinde ise sadece MiaPaca-2 hücre soyundan elde edilen lizatda görülmüştür. Bu durumda CD81'in PID-PC, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından izole edilen eksozomlar için spesifik bir makır olmadığı görülmektedir.

Eksozomlar taşıdıkları kargo içerikleri sayesinde özellikle miRNA ve mRNA taşımaları ile alıcı hücrede değişikliklere sebep olmasıyla diyabet (Ebrahim ve diğ., 2018), inflamatuvar bağırsak hastalığı (Nemoto ve diğ., 2013), obezite (Zhao ve diğ., 2018) ve kanser (Jiang ve diğ., 2019, Zhang ve diğ., 2020) gibi çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılmasını hedefleyen birçok çalışma vardır. Farklı kaynaklardan kökenlenmiş eksozomlar hastalıkları tedavi etmek ya da hastalığın etkisini zayıflatmak amacı ile farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda kullanılan eksozomların farklı konsantrasyon aralıklarında hücrelere uygulandığı görülmektedir. Nefrotoksisiteye sebep olduğu bilinen kemoteropatik ilaç olan Sisplatin'nin etkilerinin azaltılması hedeflenen bir çalışmada insan göbek kordonu kök hücresi kaynaklı eksozomlar kullanılmıştır. Böbrek epitel hücre soyu olan NrK-52E hücre soyuna kontrol olarak PBS, PBS içinde çözündürülen Sisplatin, insan göbek kordonu MSC'den izole edilen eksozomlar ve insan akciğer fibroblast hücresi (HLF-1)'nden izole edilen eksozomlar uygulanarak dört deney grubu oluşturulmuştur. Eksozom uygulanan grupların 200 µg/ml eksozom ile 30 dk inkübe edilmesinin ardından 8 saat Sisplatin uygulanmıştır. Erken apoptozun hassas bir ölçümü olarak mitokondriyal membran potansiyelinin analizinde Sisplatin'nin mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı gösterilmiştir. İnsan göbek kordonu MSC'lerinden izole edilen eksozomların uygulandığı grupta ise mitokondriyal membran potansiyelinde Sisplatin kaynaklı azalmayı antagonize ettiği gösterilmiştir. Ayrıca TUNEL yöntemi kullanılarak da insan göbek kordonu MSC'lerinden izole edilen eksozomların apoptoz üzerindeki etkisi de doğrulanmıştır. TUNEL-pozitif hücre sayısının, insan göbek kordonu MSC'lerinden izole edilen eksozomların uygulandığı grupta daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda insan göbek kordonu MSC'lerinden izole edilen eksozomlar ile

insan akciğer fibroblast hücresi gibi farklı bir kaynaktan izole edilen eksozomların etkisi birbiri ile kıyaslanmış olup, MSC'lerden izole edilen eksozomların daha etkili olduğu gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2017).

Adipoz doku kök hücrelerinden (ADSC) izole edilen eksozomlar tedavi amacı ile Alzheimer hastalığı için fare birincil nörosfer hücreleri ile tasarlanan *in vitro* modelde 200 µg/ml konsantrasyonda uygulandığında 2 gün sonra hastalık modeli oluşturulan hücrelerde, hastalık seyrinde artan p53, Bax ve Kaspaz-3 ile azalan Bcl-2 seviyelerinin normal düzeye geldiği gösterilmiştir. Bu sonuçlarla beraber ADSC'lerden izole edilen eksozomların nöronal hücrelerin apoptoz sinyalleşmesindeki artışı azalttığı da bildirilmiştir (Lee ve diğ. 2018). Burada kullanılan yüksek doz eksozom uygulamasının aksine insan retinal vasküler endotel hücreleri (HREC) ile yapılan bir çalışmada insan göbek kordonu kanı MSC'den izole edilen eksozomların 25 µg/ml, 50 µg/ml 100 µg/ml konsantrasyonda kullanılması sonucunda eksozom dozu arttıkça VEGF-A ekspresyonunun azaldığı ve anjiogenezin inhibe olduğu gösterilmiştir (He ve diğ., 2021). Diyabetten dolayı oluşan yaralar üzerine yapılan bir çalışmada ise insan kemik iliği kaynaklı eksozomlar kullanılmıştır. Çalışmada HUVEC hücreleri yüksek glikoz ve eksozomla muamele edilmiştir. Diğer bir gruba ise yüksek glikozla beraber doku rejenerasyonunu, hücre büyümesini ve sitokinleri düzenleyen Atorvastatin (ATV) verilmiş ve insan kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden izole edilen eksozomlar 50 µg/ml konsantrasyonda 48 saat uygulanmıştır. Sadece eksozom grubuna kıyasla ATV ve eksozom verilen grupta daha fazla endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü, tüp oluşumunu ve VEGF seviyesini arttırdığı bildirilmiştir. ATV eksozom uygulamasının AKT/eNOS sinyal yolunu aktive ettiği gösterilmiştir. Bu sinyal yolağının damar oluşumunda önemli olduğu ifade edilmiştir. Sinyal yolağı bloke edildikten sonra da ATV-Exo'nun pro-anjiyojenik etkileri zayıflattığı gösterilerek bu çalışma doğrulanmıştır (Yu ve diğ., 2020).

Yapılan çalışmalarda eksozomların kanser hücreleri üzerinde iki farklı şekilde etki gösterdiği görülmektedir. Bunlardan ilki eksozomların kanserin ilerlemesinde ve yayılmasındaki etkisidir. Örneğin insan kemik iliğinden kaynaklı MSC'den (hBMSC) kökenli eksozomlar osteosarkom (MG63) ve mide kanseri (SGC7901) hücre soylarına uygulanmışlardır. Hedgehog yolağının inhibitörünün varlığında ve yokluğunda hBMSC'den türetilen eksozomlar 400 µg/ml konsantarsyonda 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Bu çalışmada, hBMSC'den izole edilen eksozomların, Hedgehog sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla MG63 ve SGC7901 hücre

soylarında hücre büyümesini desteklediği gösterilmiştir. Hedgehog sinyal yolunun inhibisyonu sonucu, tümör büyümesi üzerindeki hBMSC'lerden izole edilen eksozomların etkisinin önemli ölçüde baskılandığı gösterilmiştir (Qui ve diğ., 2017). Başka bir çalışmada ise pankreatik stellat hücrelerinden (PSC) izole edilen eksozomların tümör büyümesini desteklediği gösterilmiştir. Eksozomlar 0, 1, 5, 10 ve 50 µg/ml konsantrasyonda insan pankreatik hücre soyu olan PANC-1 ve SUIT-2 hücre soylarına uygulanmıştır. Eksozomların pankreas kanseri hücrelerinde artan doza bağlı bir şekilde çoğalmayı arttırdığı gösterilmiştir. PANC-1'de 5 µg/mL konsantrasyonda ve SUIT-2 hücrelerinde 1 µg/mL konsantrasyonda hücre proliferasyonunda artış başlamış ve doz arttıkça hücre proliferasyonu da artmıştır. Ek olarak, PSC'den izole edilen eksozomlar, pankreas kanseri hücrelerinin göçünü de artırmıştır (Takikawa ve diğ., 2017).

Bizim çalışmamızda da gördüğümüz gibi eksozomların kanser üzerindeki bir diğer etkisi ise kanserin ilerlemesini inhibe ederek ya da kanserin gerilemesini sağlayarak kanser tedavisinde eksozomların birer aday olduğunu gösteren çalışmalardır. Örneğin hepatoselüler karsinom (HCC) üzerinde yapılan bir araştırmada insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinden izole edilen eksozomlar kullanılmıştır. Eksozomlar 48 saat HCC hücre soyu olan Hep3B ve SMMC-7721 hücre soylarına 200 µg/ml konsantrasyonda uygulanmıştır. Çalışmada hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre, eksozom uygulanan ve eksozomla beraber eksozom inhibitörü olan GW4869 uygulanan grupta hücre göçü ve istilas azalmıştır. Eksozom ve inhibitörün beraber verildiği grupta sadece eksozom uygulanan gruba göre de hücre göçü ve istilasında artış olduğu bildirilmiştir (Xu ve diğ., 2021).

Meme kanseri ile yapılan bir çalışmada insan kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden izole edilen eksozomlar 20, 40, 80 µg/ml konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat uygulanmıştır. Uygulama sonrasında ise endotel hücre proliferasyonun ve göçünün inhibe olduğu, meme kanseri hücrelerinde VEGF ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Pakrayan ve diğ., 2017) Meme kanseri üzerine yapılan başka bir çalışmada ise fare kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden izole edilen eksozomlar uygulanmıştır. 25, 50, 100 µg/ml konsantrasyonda 24 saat uygulanan eksozomların anjiyogenezi baskıladığı ve meme hücrelerinde VEGF ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2013). Karaciğere özgü miR-122'nin karaciğer fizyolojisi ve patolojisinde rol oynadığı (Bandiera ve diğ., 2015) ve özellikle miR-122'nin az olması ya da olmaması durumu HCC gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmektedir (Tsai, ve diğ., 2012). miR-122'nin etkisini araştıran bir çalışmada adipoz doku mezenkimal kök hücre kaynaklı

eksozomlar bir aracı olarak kullanılmıştır. İlk olarak adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler miR-122 ile transfekte edilmiştir ve daha sonra eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen eksozomlar miR-122 eksprese etmeyen HCC hücre soyu olan HepG2'ye 72 saat boyunca 50 µg/ml konsantrasyonda uygulanmıştır. HepG2 hücre soyunun kemosenitivitesini etkileyip etkilemediğini belirlemek için eksozomlar kemoterapötik ajanlar olan 5-Florourasil (5-FU) ve Sorafenibin ile ayrı ayrı kombine edilerek hücrelere uygulanmıştır. Ayrıca miR-122'nin etkisinin daha iyi anlaşılması için kontrol grubu olarak miR-67 ile aynı uygulamalar yapılmıştır. Tek başına kemoterapötik ajanla verilen ve miR-67'yi taşıyan eksozom ile oluşturulan gruplara kıyasla, 5-FU ve Sorafenibin ile kombine şekilde verilen eksozomların inhibitör etkisi önemli ölçüde artmış, hücre canlılığı azalmış ve apoptotik hücre sayısı diğer gruplara göre artmıştır (Lou ve diğ., 2015). Yumurtalık kanseri üzerine yapılan bir çalışmada ise yumurtalık kanseri hücre soyu olan SKOV3 ve A2780 hücrelerine insan göbek bağı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomlar 24 saat boyunca 20 µg/ml olarak uygulanmıştır. Ayrıca SKOV3 hücre soyu Dosetaksel'e, A2780 hücre soyu Taksan dirençli hale getirilmiş ve 20 µg/ml eksozom uygulanmıştır. Daha sonra eksozom ile muamele edilen hücre soylarına Dosetaksel ve Taksan uygulanmıştır. İlaç direnci olmayan hücrelere eksozom uygulandığında her iki hücre soyunda da hücre canlılığı PBS uygulanan kontrole göre azalmıştır. Dosetaksel dirençli SKOV3 hücrelerinde ve Taksan dirençli A2780 hücrelerin de ise ilaç direnci olan hücre soylarına PBS uygulanarak oluşturulan kontrol grubuna göre hücre canlılığı azalmıştır. Bu çalışma ile eksozomların kemoterapötik ilaçlara dirençli hale gelen hücre soylarının direncini azalttığı gösterilmiştir (Qiu ve diğ., 2020).

Eksozomların kanser üzerinde farklı etkilerinin olmasının temel sebebinin eksozomların izole edildiği hücre tipinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hatta aynı hücre tipinden salgılanan eksozomların farklı etkilere neden olması eksozomların taşıdıkları kargonun önemini göstermektedir. Özellikle eksozomların hastalık tedavisi ya da belirteçlerinde kullanılması için ana sebep olan içerdikleri miRNA ve mRNA'ların farklı olması hedef hücrede eksozomların etkilerini değiştirdiğini düşündürmektedir.

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında eksozomlar 24 ve 72 saat olmak üzere 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarına uygulanmıştır. MiaPaca-2 hücre soyunun canlılık analizi sonuçlarına göre eksozomların hücreler ile 24 saat

inkübasyon sonucu ilk dozlar da kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik olmamıştır. 10 µg/ml eksozom uygulanan hücrelerde %44,59 ile hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. 24 saat PID-PC'lerden izole edilen eksozom ile inkübe edilen MiaPaca-2 hücrelerinde IC50 değeri 9,560 µg/ml olarak hesaplanmıştır. 72 saat PID-PC'lerden izole edilen eksozom ile inkübe edilen MiaPaca-2 hücrelerinde ise 1 µg/ml'lik dozdan itibaren hücre canlılığında anlamlı bir azalma meydana gelmektedir. Uygulanan eksozom konsantrasyonu artıkça hücre canlılığı da azalmaktadır. Bu analiz için IC50 değeri ise 1,137 µg/ml'dir. Sonuç olarak MiaPaca-2 hücrelerinde PID-PC'lerden izole edilen eksozomların zamana ve doza bağlı olarak hücre ölümüne sebep olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda IC50 değerimizin 1,137 µg/ml olması literatüre kıyasla düşük konsantrasyonlarda PID-PC'lerden izole edilen eksozomların kanser hücreleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Kanser hücresi üzerine etkisi bilinmeyen PID-PC'lerden izole edilen eksozomlar ilk defa tarafımızca pankreas kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Düşük konsantrasyonda yüksek etki göstermesi ile de başta pankreas kanseri üzerine olmak üzere diğer kanser türlerinde de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda pankreas kanserinin teşhis ve tedavisinde önem arz edeceğini düşünmekteyiz.

PID-PC'lerden izole edilen eksozomların 24 saat INS-1 hücreleri ile inkübe edilmesi sonucu 5 µg/ml konsantrasyonda eksozom uygulamasına kadar hücre canlılığında kontrole kıyasla farklılık görülmemiştir. 7,5 µg/ml konsantrasyonda eksozom uygulaması ile hücre canlılığında anlamlı bir azalma başlamıştır. Bu analiz için IC50 değeri 6,375 µg/ml hesaplanmıştır. INS-1 hücrelerinin 72 saat PID-PC'lerden izole edilen eksozomlar ile inkübe edilmesi sonucunda ise 2,5 µg/ml konsantrasyonda eksozom uygulamasına kadar değişiklik gözlenmezken, 5 µg/ml konsantrasyonda eksozom uygulaması sonrasında hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azalmaya başlamıştır. Bu analiz sonucu hesaplanan IC50 değeri ise 5,088 µg/ml'dir. Düşük konsantrasyonda eksozom uygulamalarında INS-1 hücrelerinde 24 ve 72 saat deneyleri benzer sonuçlar sergilemektedir.

Sonuçlara göre, INS-1 hücreleri hem 24. hem de 72. saatlerde hücre canlılığı üzerine daha geç etki göstermiştir. MiaPaca-2 hücrelerinde ise 24. saatte ilk dozlarda anlamlı bir değişiklik olmazken 72. saatte hızlı bir şekilde hücre canlılığı azalmıştır. Bilindiği üzere INS-1 hücreleri pankreatik beta hücre tümörleridir. Bening karakterdedir. Normal sağlıklı pankreatik beta hücrelerini en iyi taklit eden hücrelerdir. Bazı çalışmalarda normal pankreatik beta hücrelerinin

yerine kontrol amaçlı kullanıldığı görülmüştür (Becker ve diğ., 2021; Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2021). MiaPaca-2 hücreleri ise agresif, malign karakterde kanser hücresidir. INS-1 hücrelerinde, MiaPaca-2 hücrelerinin IC50 değerindeki dozunda eksozom uygulamasında herhangi bir değişikliğin olmaması bu dozda yapılacak uygulamanın sağlıklı hücrelere zarar vermeyebileceğini düşündürmektedir. MiaPaca-2 hücrelerinde ise önce 24 saat inkübasyonda ilk dozlarda anlamlı bir değişiklik olmazken sonrasında aynı dozda 72 saat inkübasyonda ciddi hücre ölümünün olması bu doz aralığında yapılacak uzun süreli uygulamanın kanser hücreleri için ölümcül olacağını düşündürmektedir. Dolayısı ile kanser tedavilerinde kanser hücrelerini öldürmenin yanı sıra sağlıklı hücreleri korumak ve uygulanan kemoterapide yan etkileri ortadan kaldırmak önem arz etmektedir. Çalışmamızda bulgularımız bu yöndedir. Elde edilen bulgular dahilinde PID-PC'lerden izole edilen eksozomların pankreas kanserinin tedavisi için önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Isı şoku proteinlerinden biri olan HSP90 hem fizyolojik hem de stres koşulları altında ökaryotik hücrelerde protein dinamiğinin önemli bir düzenleyicisidir. HSP90 DNA onarımı, gelişimi, bağışıklık tepkisi ve nörodejeneratif hastalıklar dahil protein katlanmasının ötesinde birçok hücresel süreçte görev alır (Schopf ve diğ., 2017). HSP90 çoğu tümör oluşumu, kanser ilerlemesi, metastaz ve bağışıklık baskılanmasında kritik rol oynayan çok sayıda protein ile etkileşime girer (Graner, 2016). Akciğer kanseri üzerine yapılan bir çalışmada akciğer kanseri dokularının, normal dokulardan daha yüksek HSP90-beta ekspresyonuna sahip olduğu ve akciğer kanseri hastalarının serumlarında HSP90-beta'nın kontrol gruplarından daha yüksek seviyede eksprese olduğu belirtilmiştir. Serum HSP90-beta'nın ekspresyonunun artışı, akciğer kanseri hastalarının patolojik derecesi ve klinik evresi ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte akciğer kanserinde tanı ve prognoz için HSP90-beta'nın moleküler biyobelirteç olarak kabul edilebileceği gösterilmiştir (Rong ve diğ., 2014). Meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada ise Hsp90'nın inhibitörü olan AT-533'ün HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 sinyal yollarını bloke ederek meme kanseri büyümesini ve anjiyogenezi baskıladığı gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2020). Bir başka HSP90 inhibitörü olan 17-DMAG ile yapılan bir çalışmada, PI3K/mTOR yolağının inhibitörü olan NVP-BEZ235 ile kombine hazırlanan terapi Sisplatin'e dirençli hale getirilen insan mesane kanseri hücrelerine uygulanmıştır. Sisplatin'e dirençli mesane kanserlerinde bu terapiler sinerjistik bir antitümör etki göstererek G1 fazında hücre döngüsünün durmasına ve kaspaz bağımlı apoptotik yolun indüklenmesine neden olduğu gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2020). Pankreas kanseri üzerine yapılan çalışmalara baktığımızda ise Gemsitabin ve 5-

FU dirençli pankreas kanserinde üç farklı HSP90 inhibitörünün (17-AAG, 17-DMAG ve 17-AEPGA) farklı etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan pankreas 5061, 5072 ve 5156 hücre soyları Gemsitabin ve 5-FU'ya dirençli hale getirilmiştir. Hücre soylarına uygulanan inhibitörler 17-DMAG ve 17-AEPGA en yaygın kullanılan 17-AAG inhibitörü gibi yüksek anti-proliferatif aktivite sergilemiştir. HSP90 inhibisyonu, Gemsitabin ve 5-FU dirençli hücre soylarında aynı anda birden fazla sinyalleşme kaskadını bozduğu ve kanser hücresi apoptozunu desteklediği bildirilmiştir. (Ghadban ve diğ., 2017). Başka bir çalışmada ise pankreas kanserinde radyasyon tedavisine olan duyarlılık için terapötik bir strateji olarak HSP90'ın inhibisyonu değerlendirilmiştir. HSP90'ın inhibitörü olan Ganetespib PDAC hücrelerine uygulanmıştır. HSP90'ın Ganetespib tarafından inhibisyonu, radyasyon tedavisinin hücre proliferasyonunu ve koloni oluşumunu in vitro sınırlama yeteneğini güçlendirdiği gösterilmiştir. HSP90'ın Ganetespib ile inhibisyonu proliferatif, anjiyojenik ve anti-apoptotik yollar yoluyla sinyalleşmeyi azaltmıştır. Sonuç olarak, HSP90 inhibisyonu ile PDAC hücre soylarının kemoterapiye ve radyoterapiye duyarlı hale getirebildiği gösterilmiştir (Nagaraju ve diğ., 2019). Bizim sonuçlarımıza baktığımızda, INS-1 hücre soyunda kontrol grubu ve eksozom uygulanan grup arasında HSP90 immün boyanma yoğunluğunda bir değişiklik yoktur. MiaPaca-2 hücre soyunda ise kontrol grubuna kıyasla eksozom uygulanan grupta HSP90 yoğunluğunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalardaki HSP90'ın kanserdeki etkileri baz alındığında, kanser hücrelerinin ölümüne sebep olduğunu gösterdiğimiz PID-PC'den izole edilen eksozomların hücrelere uygulanması sonrası HSP90'ın yoğunluğunun azalması beklenmektedir. Fakat burada anlamlı bir artışın olması bize HSP90'ın hem eksozom içinde hem eksozom yüzeyinde varolması (Graner, 2016) ve eksozomal belirteç olarak da bilinmesinden dolayı (He ve diğ., 2018) artan HSP90 seviyesinin eksozomal HSP90'dan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bunun haricinde ilk defa tarafımızca PID-PC hücre soyundan izole edilmiş, INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soyuna uygulaması yapılmış olan bu eksozomların HSP90 ile ilişkisi bilinmemektedir. Pankreas kanserinde PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların uygulanması ile belirlenen HSP90 seviyeleri bu çalışma ile ilk defa gösterilmektedir. Ayrıca görülmektedir ki eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücrelerinde HSP90 yoğunluğu, eksozom uygulanan INS-1 hücre soyuna kıyasla anlamlı derecede fazladır. Bu durum pankreas tümörü ve kanseri arasındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilmektedir. Hücre ölüm oranlarına bakıldığında da bu dozda hücrelere uygulanan eksozom sonucu INS-1 hücrelerinde ölüm olmazken, MiaPaca-2 hücrelerinde ölüm meydana gelmiştir. Dolayısı ile

PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların pankreas kanseri olan MiaPaca-2 hücre soyuna uygulanması ile HSP90 seviyesi artmaktadır. PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomlar ile yapılacak olan pankreas kanseri tedavisinde HSP90 seviyesinin artışının tedavi yönünde bir ilerleme olacağını gösterir nitelikte bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

HSF-1 hücre içi ya da dışı etkenlerden kaynaklanan stres sırasında protein homeostazını koruyan şaperon ağını düzenler (Baird ve diğ., 2014). HSF-1'in kanserde sahip olduğu en önemli rol hipoksi, asidoz ve besin mevcudiyetindeki değişiklikler de dahil olmak üzere kanser hücrelerinin karşılaştığı hızla değişen ve stresli koşullarda kanser hücrelerin adaptasyonunu ve hayatta kalmasını teşvik etmektir (Dai ve diğ., 2007). Ayrıca HSF-1'in ısı şok proteinlerini düzenlemesinin dışında kanser kök hücre fenotipini değiştirerekde kanser mekanizmasına etki ettiği bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2015). Pankreas kanserinde HSF-1'in ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada, normal pankreas dokusuna karşı pankreas kanseri dokusunda HSF-1'in ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Bu da HSF-1'in pankreas kanseri için bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir (Lin ve diğ., 2020). Pankreas kanserinde HSF-1 inhibisyonu ile beraber kanser kök hücreleri ile ilişkili belirteçlerin ekspresyonunun önemli ölçüde bastırıldığı gösterilmiştir. HSF-1 inhibisyonunun Gempitabin'in etkinliğini artırdığı ve *in vivo* olarak Gempitabin'e karşı olan duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir. Çalışmada, bu yolla HSF-1'in, pankreas kanserinde hücrelerin kemoteropatlara karşı direncini desteklediği gösterilmiştir (Qin ve diğ., 2022). Bizim sonuçlarımıza göre ise INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarının kontrol grubuyla eksozom uygulanan grupları arasında HSF-1'in yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Pankreas kanserinde PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların uygulanması ile HSF-1 seviyeleri bu çalışma ile ilk defa gösterilmektedir. Dolayısı ile izole edilen eksozomlar ile HSF-1 ilişkisi bilinmemektedir. Sonuçlarımız doğrultusunda pankreas kanserine tedavi amaçlı yapılabilecek PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomlar sonucu HSF-1 proteininde herhangi bir etkileşim olmamaktadır. INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soyları arasında HSF-1 protein seviyeleri arasında anlamlı farklılıklar vardır. Bu durum da pankreas tümörü ve kanseri arasındaki farklılıktan kaynaklanabilmektedir.

Nestin tümörlerde ve kök hücrelerde yaygın olarak eksprese edilen ara filament proteinidir (Wang ve diğ., 2019). Nestin'i kanser hücrelerinin göç etme ve metastaz yapma yeteneğine katkı sağladığı bilinmektedir (Chung ve diğ., 2013). Son zamanlarda yapılan çeşitli

çalışmalarda, farklı kanserlerde artan Nestin ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Nestin inhibisyonu, migrasyon ve invazyonun baskılanmasıyla ilişkilendirilmiştir (Yamagishi ve diğ., 2019). Bizim sonuçlarımıza baktığımızda ise eksozom uygulanan INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Nestin'nin yoğunluğunda kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlılık yoktur. Endoglin anjiyogenez ile ilişkili olan bir transmembran reseptörüdür, bununla beraber çeşitli fizyolojik ve malign süreçlerde yer aldığı bilinmektedir (Amaral, ve diğ., 2021). Endoglin, tümör hücresi davranışını doğrudan etkileyen bir dizi süreçte yer alır (Rosen ve diğ.,2014). Meme, yumurtalık, endometriyal ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde yüksek seviyelerde Endoglin eksprese edilmektedir (Amaral, ve diğ., 2021). Endoglin'nin tümör gelişimini ve ilerlemesini teşvik ederken, bazı durumlarda ise tümör baskılanması ile ilişkilendirilmiştir (Rosen ve diğ.,2014). Örneğin meme kanseri hücrelerinde Endoglin'nin aşırı ekspresyonu migrasyon ve invazyon süreçlerini olumlu yönde etkilemiş ve *in vivo* akciğer metastazını azaltmıştır (Henry ve diğ., 2011). Bizim sonuçlarımızda ise eksozom uygulanan INS-1 ve MiaPaca-2 hücre soylarında Endoglin'nin immun işaretlenme yoğunluğunda kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlılık yoktur. Pankreas kanserinde PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların uygulanması ile Nestin ve Endoglin seviyeleri bu çalışma ile ilk defa analiz edilmiştir. Sonuç olarak PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların uygulanması sonucu meydana gelen hücre ölümü ile Nestin ve Endoglin arasında bir ilişki bulunmamaktadır.

PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların pankreas kanser hücre soyu olan MiaPaca-2 hücre soyuna uygulanması sonucu meydana gelen hücre ölümünü incelemek adına çalışmamız MiaPaca-2 hücre soyu ile devam etmiştir. Apoptotik hücre ölümünü analiz etmek için bazı apoptoz ile ilişkili protein seviyelerine bakılmıştır. Apoptoza dahil olan kaspazlar genellikle başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9,10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, 6 ve 7) olarak iki gruba ayrılırlar (Shi, 2002). İmmün boyama sonuçlarına göre MiaPaca-2 hücrelerinde total Kaspaz-8 ve Aktif Kaspaz-3 yoğunluğunda kontrol grubuna göre eksozom uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Apoptoz düzenlenmesinde görev alan Bcl-2 ailesi hem proapoptotik hem antiapoptotik rol oynayan üyeler içerir. Proapoptotik grubu oluşturan üyelerden bazıları Bad, Bim Bax'dır, antiapoptotik grubu oluşturan üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ile Mcl-1'dir (Coşkun ve Özgür, 2011). Bizim yapmış olduğumuz immünohistokimyasal analiz sonucunda p-Bcl-2'nin yoğunluğu, MiaPaca-2 hücrelerinde eksozom uygulandığında kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Antiapoptotik bir belirteç olan Bcl-2'nin deney

grubunda kontrole kıyasla daha az olması eksozom uygulaması sonrası ölen kanser hücrelerinin apoptoz ile ölebileceğini düşündürmektedir. Ancak Aktif Kaspaz-3 seviyesindeki anlamlı olmayan sonuçlar apoptotik hücre ölümünün bu deney şartlarında çok fazla olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca Bcl-2'nin NF- κ B aktivasyonuna katkı sağladığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Regula ve diğ., 2002; Froehlich ve diğ., 2019) Bu doğrultuda Bcl-2'nin azalması ile NF- κ B'nin aktivasyonunda bir azalama meydana gelecektir. Eksozom uygulanması sonucu meydana gelecek olan aktivasyondaki azalma, kanser hücrelerini apoptotik hücre ölümünden bağımsız bir hücre ölümüne götürebileceğini düşündürmektedir.

Bir diğer hücre ölüm mekanizması olan otofoji analizi için immünohistokimyasal olarak Beclin-1 proteinin yoğunluğu araştırılmıştır. Beclin-1 proteininin otofaji için gerekli olduğu ve otofaji düzenlemesinin moleküler mekanizmasında önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir (Xu ve Qin, 2019). Bizim sonuçlarımıza bakıldığında MiaPaca-2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla eksozom uygulanan grupta Beclin-1 yoğunluğu anlamlı derecede azalmıştır. Daha fazla otofaji ile ilişkili proteinlerin analizi sonucu net bir karar verilebileceği durumu söz konusu olsa da, bu veriler ışığında otofoji için önemli bir belirteç olan Beclin-1'in bu azalışı eksozom uygulaması sonrası ölen hücrelerin otofoji yoluyla ölmediklerini düşündürmektedir.

Nekrotik hücre ölümü, plazma zarının hasar görmesi ve daha sonra hücre içi moleküllerin hasarlı plazma zarından sızmasına dayanır (Chan ve diğ., 2013). LDH, hemen hemen tüm hücrelerde bulunan ve plazma zarı hasar gördüğünde hücre dışı boşluğa salınan sitoplazmik enzimdir (Burd ve Usategui-Gomez, 1973). Apoptoz ve otofajiden sonra bir diğer ölüm şekli olan nekroz analizi için eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücrelerinde LDH seviyeleri araştırılmıştır. Eksozom uygulaması sonrası hücrelerden salınan LDH %13,9 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç doğrultusunda yapılan çalışma sonucu bir kısım hücrelerin de nekroz ile öldüğü görülmektedir.

PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların MiaPaca-2 hücre soyuna uygulanması ile belirlenen IC50 değerinin, INS-1 hücrelerine uygulanması sonucu hücre ölümü meydana gelmemiştir. Ancak pankreatik beta hücre tümörü olan INS-1 hücreleri için önem arz eden insülin seviyeleri, INS-1 hücre lizat ve sekresyon örneklerinde analiz edilmiştir. Sonuçlara göre INS-1 hücrelerinin lizat grubunda kontrol grubuna kıyasla, eksozom uygulanan hücrelerde insülin seviyesinin anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. Ancak hücre sekresyonlarında kontrol

grubuna kıyasla eksozom uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur. Bu verilerin ışığında eksozom uygulandıktan sonra INS-1 hücrelerinde insülin üretimi artmış fakat üretilen insüline karşı salınan insülin miktarında bir değişiklik olmamıştır. Bu durum, eksozomların INS-1 hücrelerine uygulanması sonucu hücre ölümünün olmadığı, ancak hücrelerde insülin üretimi üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla eksozomun insülin mekanizmasına etki ederek insülinin fazla üretimine sebep olduğunu ama insülin salınım miktarını da değiştirmeyerek hücre ölümü ya da hücre çoğalması olaylarının meydana gelmediğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak PID-PC'lerden, MiaPaca-2 ve INS-1 hücre soylarından başarılı bir şekilde eksozomların izole edildiği NTA analizi ile gösterilmiştir. Simple Wes tekniği ile yapılan araştırma sonucuna göre üç farklı hücre soyundan izole edilen eksozomlar için Alix proteinin, ayrıca sadece INS-1 hücre soyundan izole edilen eksozomlar için CD9 proteinin biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir. TSG101 ve CD81 proteinlerinin ise üç farklı hücre soyundan izole edilen eksozom için spesifik bir biyobelirteç olmadığı gösterilmiştir. Hücre canlılığı analizlerinde PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların literatüre kıyasla çok daha düşük konsantrasyonlarda MiaPaca-2 hücre soyuna etki ettiği belirlenmiştir. PID-PC hücre soyundan izole edilen eksozomların doza ve zamana bağlı olarak MiaPaca-2 hücre soyunda hücre ölümünü meydana getirdiği gösterilmiştir. MiaPaca-2 hücreleri için belirlenen IC50 değerindeki eksozomların beta hücrelerini en iyi şekilde taklit eden INS-1 hücrelerinde hiçbir değişikliğe sebep olmaması eksozomların kanser hücrelerini öldürürken sağlıklı hücrelere zarar vermeyeceğini düşündürmüş ve pankreas kanseri tedavisi için bu eksozomların önemini göstermiştir. MiaPaca-2 hücre soyuna PID-PC'lerden izole edilen eksozomların uygulanması ile HSP90'nın anlamlı bir şekilde artması pankreas kanseri tedavisinde HSP90 artışının nitelikli bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir. Eksozom uygulandıktan sonra p-Bcl-2'nin MiaPaca-2 hücre soyunda anlamlı bir azalış göstermesi eksozomların kanser hücrelerini apoptotik hücre ölümüne götürdüğünü akla getirmektedir. Ayrıca eksozom uygulanan MiaPaca-2 hücrelerinde azalan Beclin-1 seviyesi eksozom uygulaması ile ölen hücrelerin otofojik ölüm ile ölmediğini gösterirken, %13,9 olarak belirlenen LDH seviyesi ile hücrelerin bir kısmının nekroz ile öldüğünü göstermektedir. Ayrıca MiaPaca-2 hücrelerinde hücre ölümüne neden olan dozda eksozom uygulaması sonucu hücre canlılığının korunduğu, INS-1 hücre lizatlarında insülin seviyesinin arttığını, eksozomların insülin mekanizmasına etki ederek insülin üretimine sebep olduğunu göstermektedir. İlave olarak yapılacak çalışmalar PID-

PC'lerden izole edilen eksozomaların pankreas kanseri üzerine etki mekanizmasını aydınlatmak adına faydalı olacak ve pankreas kanserinin tedavisi amacı ile eksozomları kullanılabilir duruma getirebilecektir. Yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarına göre PID-PC'lerden izole edilen eksozomlar pankreas kanserinin tedavisi için umut vadetmekte, bu alan ile ilgili çalışmalara ışık tutmakta ve literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır.



KAYNAKLAR

- Adeva-Andany, M., López-Ojén, M., Funcasta-Calderón, R., Ameneiros-Rodríguez, E., Donapetry-García, C., Vila-Altesor, M., & Rodríguez-Seijas, J., 2014, Comprehensive review on lactate metabolism in human health, *Mitochondrion*, 17, 76-100.
- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F., 2005, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood*, 105 (4), 1815-1822.
- Alcayaga-Miranda, F., González, P. L., Lopez-Verrilli, A., Varas-Godoy, M., Aguila-Díaz, C., Contreras, L., Khoury, M., 2016, Prostate tumor-induced angiogenesis is blocked by exosomes derived from menstrual stem cells through the inhibition of reactive oxygen species, *Oncotarget*, 7 (28), 44462.
- Alvarez-Erviti L., Seow Y., Schapira A.H, Gardiner C., Sargent I.L., Wood M.J.A, Cooper J.M., 2011, Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission, *Neurobiology of Disease*, 42 (3), 360–367.
- Amaral, A., Puerto-Camacho, P., Peinado, H., de Álava, E., Hawinkels, L., Goumans, M., 2021, Endoglin in the Spotlight to Treat Cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6).
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., Wollheim, C. B., 1992, Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines, *Endocrinology*, 130 (1), 167-178.
- Ateş, U., 2016, Kök Hücreyi Tanıyalım, *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon*, 1 (1), 19-28.
- Bagheri, H. S., Mousavi, M., Rezabakhsh, A., Rezaie, J., Rasta, S. H., Nourazarian, A., Sokullu, E., 2018, Low-level laser irradiation at a high power intensity increased human endothelial cell exosome secretion via Wnt signaling, *Lasers in medical science*, 33 (5), 1131-1145.
- Baird, N. A., Douglas, P. M., Simic, M. S., Grant, A. R., Moresco, J. J., Wolff, S. C., Dillin, A., 2014, HSF-1–mediated cytoskeletal integrity determines thermotolerance and life span. *Science*, 346(6207), 360-363.
- Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T. F., & Zeisel, M. B., 2015, miR-122–a key factor and therapeutic target in liver disease, *Journal of hepatology*, 62 (2), 448-457.
- Barteneva, N. S., Maltsev, N., Vorobjev, I. A., 2013, Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 49.
- Batista, B. S., Eng, W. S., Pilobello, K. T., Hendricks-Muñoz, K. D., Mahal, L. K., 2011, Identification of a conserved glycan signature for microvesicles, *Journal of proteome research*, 10 (10), 4624-4633.
- Becker, A., Götz, C., Montenarh, M., Philipp, S. E., 2021, Control of TRPM3 ion channels by protein kinase CK2-mediated phosphorylation in pancreatic β -cells of the line INS-1, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13133.

- Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., Hivroz, C., 2002, TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/ ζ complex, *The Journal of Immunology*, 168 (7), 3235-3241.
- Brinton, L.T., Sloane, H.S., Kester, M., Kelly, K.A., 2015, Formation and role of exosomes in cancer, *Cell Mol Life Sci*, 72 (4), 659-671.
- Burd, J. F., Usategui-Gomez, M., 1973, A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase, *Clinica Chimica Acta*, 46(3), 223-227.
- Campagnoli C., Roberts I. A., Kumar S., Bennett P. R., Bellantuono I., Fisk N. M., 2001, Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 98 (8), 2396-2402.
- Campbell, J. E., Newgard, C. B., 2021, Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion, *Nature reviews molecular cell biology*, 22 (2), 142-158.
- Canto, M. I., Harinck, F., Hruban, R. H., Offerhaus, G. J., Poley, J. W., Kamel, I., Bruno, M., 2013, International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer, *Gut*, 62 (3), 339-347.
- Case, R. M., 2006, Is the rat pancreas an appropriate model of the human pancreas?, *Pancreatology*, 6(3), 180-190.
- Chan, F. K. M., Moriwaki, K., Rosa, M. J. D., 2013, Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity, *In Immune Homeostasis*, 65-70.
- Chen J., Mandel E.M., Thomson J.M., Wu Q., Callis T.E., Hammond S.M., Conlon F.L., hi Wang D., 2006, The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation, *Nature Genetics*, 38 (2), 228–233.
- Chen, H. L., Li, J. J., Jiang, F., Shi, W. J., & Chang, G. Y., 2020, MicroRNA-4461 derived from bone marrow mesenchymal stem cell exosomes inhibits tumorigenesis by downregulating COPB2 expression in colorectal cancer, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 84 (2), 338-346.
- Chopra, N., Dutt Arya, B., Jain, N., Yadav, P., Wajid, S., Singh, S. P., Choudhury, S., 2019, Biophysical characterization and drug delivery potential of exosomes from human wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, *ACS omega*, 4 (8), 13143-13152.
- Chowdhury, R., Webber, J. P., Gurney, M., Mason, M. D., Tabi, Z., Clayton, A., 2015, Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblast, *Oncotarget*, 6 (2), 715.
- Chung, B. M., Rotty, J. D., Coulombe, P. A., 2013, Networking galore: intermediate filaments and cell migration, *Current opinion in cell biology*, 25(5), 600-612.
- Corrado, C., Raimondo, S., Chiesi, A., Ciccia, F., De Leo, G., Alessandro, R., 2013, Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications, *Int J Mol Sci*, 14 (3), 5338-5366.

- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Lyden, D., 2015, Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver, *Nature cell biology*, 17 (6), 816-826.
- Coşkun, G., Özgür, H., 2011, Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A. B., Lindquist, S., 2007, Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis, *Cell*, 130(6), 1005-1018.
- Dang, V. D., Jella, K. K., Ragheb, R. R., Denslow, N. D., Alli, A. A., 2017, Lipidomic and proteomic analysis of exosomes from mouse cortical collecting duct cells, *The FASEB Journal*, 31 (12), 5399-5408.
- Davidson, S.M., Riquelme, J.A., Takov, K., Vicencio, J.M., Boi-Doku, C., Khoo, V., Doreth, C., Radenkovic, D., Lavandero, S., Yellon, D.M., 2018, Cardioprotection mediated by exosomes is impaired in the setting of type II diabetes but can be rescued by the use of non-diabetic exosomes in vitro, *Journal of cellular and molecular medicine*, 22 (1), 141-151.
- Ding, Y., Mei, W., Zheng, Z., Cao, F., Liang, K., Jia, Y., Li, F., 2021, Exosomes secreted from human umbilical cord mesenchymal stem cells promote pancreatic ductal adenocarcinoma growth by transferring miR-100-5p, *Tissue and Cell*, 73, 101623.
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S., Stožer, A., 2015, Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas, *Islets*, 7(1), e1024405.
- Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Horwitz, E. M., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4), 315-317.
- Ebrahim N, Ahmed IA, Hussien NI, Dessouky AA, Farid AS, Elshazly AM, Mostafa O, Gazzar WBE, Sorour SM, Seleem Y, Hussein AM, Sabry D., 2018, Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorated Diabetic Nephropathy by Autophagy Induction through the mTOR Signaling Pathway, *Cells*, 7 (12), 226.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H., 1981, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *nature*, 292 (5819), 154-156.
- Farhana, A., Lappin, S. L., 2022, Biochemistry, lactate dehydrogenase. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Ferlay, J. S. E. M., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Bray, F., 2012, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase, *GLOBOCAN*, 2013 (1), 11.
- Fernandis, A. Z., & Wenk, M. R., 2009, Lipid-based biomarkers for cancer, *Journal of Chromatography B*, 877 (26), 2830-2835.
- Froehlich, T. C., Müller-Decker, K., Braun, J. D., Albrecht, T., Schroeder, A., Gülow, K., Nicolay, J. P., 2019, Combined inhibition of Bcl-2 and NFκB synergistically induces cell death in

cutaneous T-cell lymphoma, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 134(5), 445-455.

- Gao F., Chiu S. M., Motan D. A. L., Zhang Z., Chen L., Ji H. L., Lian, Q., 2016, Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects, *Cell death & disease*, 7 (1), e2062-e2062.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Onay-Ucar, E., Sancar-Bas, S., Karatug-Kacar, A., Arda, E. S., Bolkent, S., 2018, Involvement of dying beta cell originated messenger molecules in differentiation of pancreatic mesenchymal stem cells under glucotoxic and glucolipotoxic conditions, *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 4235-4244.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Sancar, S., Karatug-Kacar, A., Bolkent, S., 2021, miR-375 induces adipogenesis through targeting Erk1 in pancreatic duct cells under the influence of sodium palmitate, *Journal of Cellular Physiology*, 236(5), 3881-3895.
- Ghadban, T., Dibbern, J. L., Reeh, M., Miro, J. T., Tsui, T. Y., Wellner, U., Vashist, Y. K., 2017, HSP90 is a promising target in gemcitabine and 5-fluorouracil resistant pancreatic cancer, *Apoptosis*, 22(3), 369-380.
- Gradiz, R., Silva, H. C., Carvalho, L., Botelho, M. F., Mota-Pinto, A., 2016, MIA PaCa-2 and PANC-1-pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors, *Scientific reports*, 6 (1), 1-14.
- Graner, M. W., 2016, HSP90 and immune modulation in cancer, *Advances in cancer research*, 129, 191-224.
- Hajipour, H., Farzadi, L., Roshangar, L., Latifi, Z., Kahroba, H., Shahnazi, V., Nouri, M., 2021, A human chorionic gonadotropin (hCG) delivery platform using engineered uterine exosomes to improve endometrial receptivity, *Life Sciences*, 275, 119351,
- He, G. H., Ma, Y. X., Dong, M., Chen, S., Wang, Y. C., Gao, X., Wang, J. H., 2021, Mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit the VEGF-A expression in human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose, *International Journal of Ophthalmology*, 14(12), 1820.
- Hemler, M. E., 2005, Tetraspanin functions and associated microdomains, *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(10), 801-811.
- Henry, L. A., Johnson, D. A., Sarrió, D., Lee, S., Quinlan, P. R., Crook, T., Isacke, C. M., 2011, Endoglin expression in breast tumor cells suppresses invasion and metastasis and correlates with improved clinical outcome, *Oncogene*, 30(9), 1046-1058.
- Hessvik, N. P., Llorente, A., 2018, Current knowledge on exosome biogenesis and release, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75 (2), 193-208.
- Hidalgo, M., Cascinu, S., Kleeff, J., Labianca, R., Löhr, J. M., Neoptolemos, J., Heinemann, V., 2015, Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes, *Pancreatology*, 15 (1), 8-18.

- Hohmeier, H. E., Newgard, C. B. 2004, Cell lines derived from pancreatic islets, *Molecular and cellular endocrinology*, 228 (1-2), 121-128.
- Hong B.S., Cho J., Kim H., Choi E., Rho S., Kim J., Kim J.H., Choi D., Kim Y., Hwang D., Gho Y.S., 2009, Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells, *BMC Genomics*, 10, 556.
- Hood, J. L., Pan, H., Lanza, G. M., Wickline, S. A., 2009, Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes, *Laboratory investigation*, 89 (11), 1317-1328.
- Hornick, N. I., Huan, J., Doron, B., Goloviznina, N. A., Lapidus, J., Chang, B. H., Kurre, P., 2015, Serum exosome microRNA as a minimally-invasive early biomarker of AML, *Scientific reports*, 5, 11295.
- Hoshino, D., Kirkbride, K. C., Costello, K., Clark, E. S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Weaver, A. M., 2013, Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior, *Cell reports*, 5 (5), 1159-1168.
- Hosokawa, K., Ishimaru, H., Watanabe, T., Fujimuro, M., 2021, Pax5 mediates the transcriptional activation of the CD81 gene, *Scientific reports*, 11(1), 1-14.
- Hui, C., Tian, L., & He, X., 2020, Circular RNA circNHSL1 contributes to gastric Cancer progression through the miR-149-5p/YWHAZ Axis, *Cancer Management and Research*, 12, 7117.
- Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee E.J., Yu L., Xiao T., Schafer J., Lee M.T., Schmittgen T.D., Nana-Sinkam S.P., Jarjoura D.J., Marsh C.B., 2008, Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles, *PLoS ONE*, 2008, 3 (11).
- Jiang, S., Mo, C., Guo, S., Zhuang, J., Huang, B., & Mao, X., 2019, Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived microRNA-205-containing exosomes impede the progression of prostate cancer through suppression of RHPN2, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38 (1), 1-16.
- Jin, H., Liu, P., Wu, Y., Meng, X., Wu, M., Han, J., & Tan, X., 2018, Exosomal zinc transporter ZIP4 promotes cancer growth and is a novel diagnostic biomarker for pancreatic cancer, *Cancer science*, 109 (9), 2946-2956.
- Kahlert, C., Kalluri, R., 2013, Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis, *Journal of molecular medicine*, 91 (4), 431-437.
- Kalluri, R., 2016, The biology and function of exosomes in cancer, *The Journal of clinical investigation*, 126 (4), 1208-1215.
- Kalluri, R., LeBleu, V. S., 2020, The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, 367 (6478).
- Kamalden, T. A., Macgregor-Das, A. M., Kannan, S. M., Dunkerly-Eyring, B., Khaliddin, N., Xu, Z., Das, S., 2017, Exosomal microRNA-15a transfer from the pancreas augments diabetic complications by inducing oxidative stress, *Antioxidants & redox signaling*, 27 (13), 913-930.

- Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., Kalluri, R., 2017, Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer, *Nature*, 546 (7659), 498-503.
- Karaoz, E., Ayhan, S., Gacar, G., Aksoy, A., Duruksu, G., Okçu, A., Kasap, M., 2010, Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics, *Cytotherapy*, 12 (3), 288-302.
- Katsuda, T., Kosaka, N., Ochiya, T., 2014, The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers, *Proteomics*, 14 (4-5), 412-425.
- Kaul, Z., Mookherjee, D., Das, S., Chatterjee, D., Chakrabarti, S., Chakrabarti, O., 2020, Loss of tumor susceptibility gene 101 (TSG101) perturbs endoplasmic reticulum structure and function, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(9), 118741.
- Kawamura, T., Umemura, T., Hotta, N., 2012, Cognitive impairment in diabetic patients: can diabetic control prevent cognitive decline, *Journal of Diabetes Investigation*, 3(5), 413-423.
- Kim, H. J., Gong, M. K., Yoon, C. Y., Kang, J., Yun, M., Cho, N. H., Choi, Y. D., 2020, Synergistic antitumor effects of combined treatment with HSP90 inhibitor and PI3K/mTOR dual inhibitor in cisplatin-resistant human bladder cancer cells, *Yonsei medical journal*, 61(7), 587.
- Kolios, G., & Moodley, Y., 2013, Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85 (1), 3-10.
- Kosaka, N., 2016, Decoding the secret of cancer by means of extracellular vesicles, *Journal of clinical medicine*, 5 (2), 22.
- Kucharzewska, P., Belting, M., 2013, Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress, *Journal of extracellular vesicles*, 2 (1), 20304.
- Kulkarni RN., 2004, The islet β -cell, *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 365-371.
- Kumar, B., Dutta, D., Iqbal, J., Ansari, M. A., Roy, A., Chikoti, L., Chandran, B., 2016, ESCRT-I protein Tsg101 plays a role in the post-macropinocytic trafficking and infection of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, *PLoS pathogens*, 12(10), e1005960.
- Kuwabara Y., Ono K., Horie T., Nishi H., Nagao K., Kinoshita M., Watanabe S., Baba O., Kojima Y., Shizuta S., Imai M., Tamura T., Kita T., Kimura T., 2011, Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage, *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4 (4), 446-454.
- Lapa, M.R., Kırbaş, O.K., Bozkurt, B., Taşlı, P., Avcı, M.K., Şahin F. 2017. *Vaccinium myrtillus* (Yaban Mersini) kaynaklı Eksozomların İnsan Akciğer Karsinomu (A549 hücre hattı) Üzerine Sitotoksik Etkilerinin MTT testi ile Araştırılması, Uluslararası Moleküler Biyoloji Ve Genetik Kış Okulu/ İstanbul Üniversitesi, Biotechnology and Genetic Engineering Club (IUGEN) / Vezneciler, İstanbul.

- Laurenti E., Göttgens B., 2018, From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes, *Nature*, 553 (7689), 418-426.
- Lee, J. K., Park, S. R., Jung, B. K., Jeon, Y. K., Lee, Y. S., Kim, M. K., Kim, C. W., 2013, Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells, *PloS one*, 8 (12), e84256.
- Lee, M., Ban, J. J., Yang, S., Im, W., & Kim, M., 2018, The exosome of adipose-derived stem cells reduces β -amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Brain research*, 1691, 87-93.
- Leibson, C. L., Rocca, W. A., Hanson, V. A., Cha, R., Kokmen, E., O'Brien, P. C., Palumbo, P. J., 1997, Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study, *American journal of epidemiology*, 145(4), 301-308.
- Leung, P. S., 2010, Physiology of the pancreas, *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas*, 13-27.
- Leung, P. S., 2010., The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas, *Overview of the pancreas*, 3-12.
- Levänen B, Bhakta NR, Torregrosa Paredes P, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, Sköld CM, Svartengren M, Grunewald J, Gabrielsson S, Eklund A, Larsson BM, Woodruff PG, Erle DJ, Wheelock ÅM., 2013, Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients, *J Allergy Clin Immunol*, 131 (3), 894-903.
- Li, W., Li, C., Zhou, T., Liu, X., Liu, X., Li, X., Chen, D., 2017, Role of exosomal proteins in cancer diagnosis, *Molecular cancer*, 16 (1), 145.
- Li, Y., Zhang, Y., Qiu, F., Qiu, Z., 2011, Proteomic identification of exosomal LRG1: a potential urinary biomarker for detecting NSCLC, *Electrophoresis*, 32 (15), 1976-1983.
- Li, Y., Zheng, Q., Bao, C., Li, S., Guo, W., Zhao, J., Huang, S., 2015, Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis, *Cell research*, 25 (8), 981-984.
- Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X. M., Wang, X. Z., 2015, Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis, *The Scientific World Journal*, 2015.
- Lin, Q., Xiao, G., Wang, G., He, Q., Xu, L., Qiu, P., Xiao, X., 2020, Heat Shock Factor 1 in Relation to Tumor Angiogenesis and Disease Progression in Patients With Pancreatic Cancer, *Pancreas*, 49(10), 1327-1334.
- Lou, G., Song, X., Yang, F., Wu, S., Wang, J., Chen, Z., Liu, Y., 2015, Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma, *Journal of hematology & oncology*, 8 (1), 1-11.
- Lv L., Cao Y., Ni H., Xu M., Liu D., Liu H., Chen P., Liu B., 2013, MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis, *The American Journal of Physiology—Renal Physiology*, 305 (8), F1220–F1227.

- Lv L., Cao Y., Pan M., Liu H., Tang R., Ma K., Chen P., Liu B., 2014, CD2AP mRNA in urinary exosome as biomarker of kidney disease, *Clinica Chimica Acta*, 428, 26–31.
- Maas, J. W., Groothuis, P. G., Dunselman, G. A., de Goeij, A. F., Boudier, H. A. S., Evers, J. L., 2001, Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle, *Human reproduction*, 16 (8), 1557-1561.
- Maia, J., Caja, S., Strano Moraes, M. C., Couto, N., Costa-Silva, B., 2018, Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment, *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 18.
- Mao F., Wu Y., Tang X., Kang J., Zhang B., Yan Y., Qian H., Zhang X., Xu W., 2017, Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve inflammatory bowel disease in mice, *BioMed research international*, 2017.
- Maroto, R., Zhao, Y., Jamaluddin, M., Popov, V. L., Wang, H., Kalubowilage, M., Brasier, A. R., 2017, Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses, *Journal of extracellular vesicles*, 6 (1), 1359478.
- Masciopinto, F., Giovani, C., Campagnoli, S., Galli-Stampino, L., Colombatto, P., Brunetto, M., Yen, T.S., Houghton, M., Pileri, P., Abrignani, S., 2004, Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes, *Eur J Immunol*, 34 (10), 2834-2842.
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., Thery, C., 2019, Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication, *Nature cell biology*, 21 (1), 9-17.
- Mathivanan, S., Simpson, R. J., 2009, ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA, *Proteomics*, 9 (21), 4997-5000.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Fauré, J., Gruenberg, J., 2004, Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization, *Science*, 303(5657), 531-534.
- McAndrews, K. M., Kalluri, R., 2019, Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer, *Molecular cancer*, 18 (1), 52.
- Meckes, D. G., 2015, Exosomal communication goes viral, *Journal of virology*, 89 (10), 5200-5203.
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., Kalluri, R., 2015, Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer, *Nature*, 523 (7559), 177-182.
- Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lättekivi, F., Dissanayake, K., Fazeli, A., 2020, Zeta potential of extracellular vesicles: toward understanding the attributes that determine colloidal stability, *Acs Omega*, 5 (27), 16701-16710.
- Minciacchi, V.R., Freeman, MR., Di Vizio, D., 2015, Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes, *Semin Cell Dev Biol*, 40, 41-51.

- Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S, Martin D.B., 2008, Muneesh Tewari Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (30), 10513–10518.
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., Sánchez-Madrid, F., 2011, Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells, *Nature communications*, 2 (1), 1-10.
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I., 2013, Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine, *Experimental & molecular medicine*, 45 (11), e54-e54.
- Nagaraju, G. P., Zakka, K. M., Landry, J. C., Shaib, W. L., Lesinski, G. B., & El-Rayes, B. F. (2019). Inhibition of HSP90 overcomes resistance to chemotherapy and radiotherapy in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 145(6), 1529-1537.
- Nakano M., Nagaishi K., Konari N., Saito Y., Chikenji T., Mizue Y., Fujimiya M., 2016, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes, *Scientific reports*, 6, 24805.
- Nakaoka, A., Nakahana, M., Inubushi, S., Akasaka, H., Salah, M., Fujita, Y., Sasaki, R., 2021, Exosome-mediated radiosensitizing effect on neighboring cancer cells via increase in intracellular levels of reactive oxygen species, *Oncology reports*, 45 (4), 1-1.
- Nemoto Y., Kanai T., Takahara M., Oshima S., Nakamura T., Okamoto R., Tsuchiya K., Watanabe M., 2013, Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells, *Gut*, 62 (8), 1142-1152.
- New, C., Lee, Z. Y., Tan, K. S., Wong, A. H. P., Wang, D. Y., Tran, T., 2021, Tetraspanins: host factors in viral infections, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11609.
- Ng, C. T., Azwar, S., Yip, W. K., Zahari Sham, S. Y., Faisal Jabar, M., Sahak, N. H., Seow, H. F., 2021, Isolation and Identification of Long Non-Coding RNAs in Exosomes Derived from the Serum of Colorectal Carcinoma Patients, *Biology*, 10 (9), 918.
- Nguyen, U., Squaglia, N., Boge, A., Fung, P. A., 2011, The Simple Western™: a gel-free, blot-free, hands-free Western blotting reinvention, *Nature Methods*, 8(11), v-vi.
- Noone, A. M., Cronin, K. A., Altekruse, S. F., Howlader, N., Lewis, D. R., Petkov, V. I., Penberthy, L., 2017, Cancer incidence and survival trends by subtype using data from the surveillance epidemiology and end results program, 1992–2013, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 26 (4), 632-641.
- Ott, A., Stolk, R. P., Van Harskamp, F., Pols, H. A. P., Hofman, A., Breteler, M. M. B., 1999, Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study, *Neurology*, 53 (9), 1937-1937.

- Pakravan, K., Babashah, S., Sadeghizadeh, M., Mowla, S. J., Mossahebi-Mohammadi, M., Ataei, F., Javan, M., 2017, MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells, *Cellular oncology*, 40 (5), 457-470.
- Passier R., Mummery C., 2003, Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair, *Cardiovascular research*, 58 (2), 324-335.
- Patel, G. K., Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Singh, S., Singh, A. P., 2019, Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications, *Scientific reports*, 9 (1), 1-10.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Lyden, D., 2012, Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET, *Nature medicine*, 18 (6), 883-891.
- Pfeffer, S. R., 2007, Unsolved mysteries in membrane traffic, *Annu. Rev Biochem*, 76, 629-645.
- Qi, J. Zhou, Y., Jiao, Z., Wang, X., Zhao, Y., Li, Y., Chen, H., Yang, L., Zhu, H., Li, Y., 2017, Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth through hedgehog signaling pathway, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42 (6), 2242-2254.
- Qin, T., Chen, K., Li, J., Qian, W., Xiao, Y., Wu, E., Wu, Z., 2022, Heat shock factor 1 inhibition sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine via the suppression of cancer stem cell-like properties, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 148, 112713.
- Qiu, L., Wang, J., Chen, M., Chen, F., & Tu, W., 2020, Exosomal microRNA-146a derived from mesenchymal stem cells increases the sensitivity of ovarian cancer cells to docetaxel and taxane via a LAMC2-mediated PI3K/Akt axis, *International journal of molecular medicine*, 46 (2), 609-620.
- Que, R., Ding, G., Chen, J., Cao, L., 2013, Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma, *World journal of surgical oncology*, 11 (1), 1-9.
- Radulovic, M., Schink, K. O., Wenzel, E. M., Nähse, V., Bongiovanni, A., Lafont, F., Stenmark, H., 2018, ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival, *The EMBO journal*, 37(21), e99753.
- Rahib. L, Smit, B.D., Aizenberg, R. Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M., 2014, Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States, *Cancer research*, 74 (11), 2913-2921.
- Rahman, M. J., Regn, D., Bashratyan, R., Dai, Y. D., 2014, Exosomes released by islet-derived mesenchymal stem cells trigger autoimmune responses in NOD mice, *Diabetes*, 63(3), 1008-1020.

- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., Simons, K., 2006, Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (30), 11172-11177.
- Rak, J., 2013, Extracellular vesicles—biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer, *Frontiers in pharmacology*, 4, 21.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., Geuze, H. J., 1996, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *Journal of Experimental Medicine*, 183 (3), 1161-1172.
- Regula, K. M., Ens, K., Kirshenbaum, L. A., 2002, IKK β is required for Bcl-2-mediated NF- κ B activation in ventricular myocytes, *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38676-38682.
- Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R., Baptista, P. V., 2014, Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells, *BioMed research international*, 2014.
- Rong, B., Zhao, C., Liu, H., Ming, Z., Cai, X., Gao, W., Yang, S., 2014, Identification and verification of Hsp90-beta as a potential serum biomarker for lung cancer, *American journal of cancer research*, 4(6), 874.
- Rosen, L. S., Gordon, M. S., Robert, F., Matei, D. E., 2014, Endoglin for targeted cancer treatment, *Current oncology reports*, 16(2), 1-9.
- Safwat A., Sabry D., Ragiae A., Amer E., Mahmoud R. H., Shamardan R. M., 2018, Adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes attenuate retina degeneration of streptozotocin-induced diabetes in rabbits, *Journal of circulating biomarkers*, 7.
- Saman S., Kim W., Raya M., Visnick Y., Miro S., Saman S., Jackson B., McKee A.C., Alvarez V.E., C Y Lee N.C.Y., 2012, Garth F Hall Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (6), 3842–3849.
- Schopf, F. H., Biebl, M. M., Buchner, J., 2017, The HSP90 chaperone machinery, *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(6), 345-360.
- Shang, S., Wang, J., Chen, S., Tian, R., Zeng, H., Wang, L., Zuo, C., 2019, Exosomal miRNA-1231 derived from bone marrow mesenchymal stem cells inhibits the activity of pancreatic cancer, *Cancer medicine*, 8 (18), 7728-7740.
- Shi, Y., 2002, Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis, *Molecular cell*, 9(3), 459-470.
- Sinha, S., Hoshino, D., Hong, N. H., Kirkbride, K. C., Grega-Larson, N. E., Seiki, M., Weaver, A. M., 2016, Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin Dynamics, *Journal of Cell Biology*, 214 (2), 197-213.

- Skotland, T., Ekroos, K., Kauhanen, D., Simolin, H., Seierstad, T., Berge, V., Llorente, A., 2017, Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers, *European Journal of Cancer*, 70, 122-132.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerød, L., Stenmark, H., 2006, Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins, *Trends in cell biology*, 16(6), 317-326.
- Stenmark, H., 2009, Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nature reviews Molecular cell biology*, 10 (8), 513-525.
- Tai, Y. L., Chen, K. C., Hsieh, J. T., Shen, T. L., 2018, Exosomes in cancer development and clinical applications, *Cancer science*, 109 (8), 2364-2374.
- Takahashi K., Yamanaka S., 2006, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *cell*, 126 (4), 663-676.
- Takikawa, T., Masamune, A., Yoshida, N., Hamada, S., Kogure, T., Shimosegawa, T., 2017, Exosomes derived from pancreatic stellate cells: MicroRNA signature and effects on pancreatic cancer cells, *Pancreas*, 46 (1), 19-27.
- Tan, Y., Nie, W., Chen, C., He, X., Xu, Y., Ma, X., Wang, W., 2019, Mesenchymal stem cells alleviate hypoxia-induced oxidative stress and enhance the pro-survival pathways in porcine islets, *Experimental Biology and Medicine*, 244 (9), 781-788.
- Tang, M. K., Wong, A. S., 2015, Exosomes: Emerging biomarkers and targets for ovarian cancer, *Cancer letters*, 367 (1), 26-33.
- Taylor D.D., Gercel-Taylor C., 2008, MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer, *Gynecologic Oncology*, 110 (1), 13–21.
- Théry, C., 2011, Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications, *F1000 biology reports*, 3.
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009, Membrane vesicles as conveyors of immune responses, *Nature reviews immunology*, 9 (8), 581-593.
- Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Amigorena, S., 1999, Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73, *The Journal of cell biology*, 147 (3), 599-610.
- Tomlinson PR, Zheng Y, Fischer R, Heidasch R, Gardiner C, Evetts S, Hu M, Wade-Martins R, Turner MR, Morris J, Talbot K, Kessler BM, Tofaris GK, 2015, Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease, *Ann Clin Transl Neurol*, 2 (4), 353-61.
- Tsai, W. C., Hsu, S. D., Hsu, C. S., Lai, T. C., Chen, S. J., Shen, R., Tsou, A. P., 2012, MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis, *The Journal of clinical investigation*, 122 (8), 2884-2897.

- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat Cell Biol*, 9 (6), 654-659.
- Van der Pol, E., Böing, AN., Harrison, P., Sturk, A., Nieuwland, R., 2012, Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles, *Pharmacol Rev*, 64 (3), 676-705.
- Van Niel, G., d'Angelo, G., Raposo, G., 2018, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nature reviews Molecular cell biology*, 19 (4), 213.
- Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2001, Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles, *Gastroenterology*, 121 (2), 337-349.
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., Mittelbrunn, M., 2014, Sorting it out: regulation of exosome loading, In *Seminars in cancer biology*, 28, 3-13
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M., 2011, Pancreatic cancer, *The lancet*, 378 (9791), 607-620.
- Wang, B., Jia, H., Zhang, B., Wang, J., Ji, C., Zhu, X., Xu, W., 2017, Pre-incubation with hucMSC-exosomes prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by activating autophagy, *Stem cell research & therapy*, 8 (1), 1-14.
- Wang, B., Lee, C. W., Witt, A., Thakkar, A., Ince, T. A., 2015, Heat shock factor 1 induces cancer stem cell phenotype in breast cancer cell lines, *Breast cancer research and treatment*, 153(1), 57-66.
- Wang, J., Lu, Q., Cai, J., Wang, Y., Lai, X., Qiu, Y., Peng Xiang, A. 2019, Nestin regulates cellular redox homeostasis in lung cancer through the Keap1–Nrf2 feedback loop, *Nature communications*, 10(1), 1-17.
- Wei, F., Ma, C., Zhou, T., Dong, X., Luo, Q., Geng, L., Ding, L., Zhang, Y., Zhang, L., Li, N., Li, Y., Liu, Y., 2017, Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p, *Molecular cancer*, 16 (1), 132.
- Welker, M. W., Reichert, D., Susser, S., Sarrazin, C., Martinez, Y., Herrmann, E., Kronenberger, B., 2012, Soluble serum CD81 is elevated in patients with chronic hepatitis C and correlates with alanine aminotransferase serum activity, *PloS one*, 7 (2), e30796.
- Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M. J., Vader, P., 2018, Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression, *Frontiers in immunology*, 9, 738.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Angevin, E., 2001, Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming, *Nature medicine*, 7 (3), 297-303.

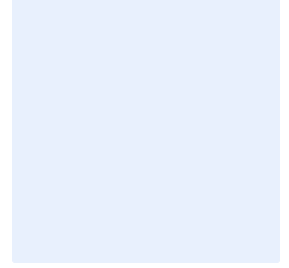
- Wrighten, S. A., Piroli, G. G., Grillo, C. A., Reagan, L. P., 2009, A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792 (5), 444-453.
- Wu, D. M., Wen, X., Han, X. R., Wang, S., Wang, Y. J., Shen, M., Zheng, Y. L., 2019, Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-126-3p inhibits pancreatic cancer development by targeting ADAM9, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 16, 229-245.
- Xin H., Wang F., Li Y., Lu Q., Cheung W.L., Zhang Y., Zhang Z.G., Chopp M., 2017, Secondary release of exosomes from astrocytes contributes to the increase in neural plasticity and improvement of functional recovery after stroke in rats treated with exosomes harvested from microRNA 133b-overexpressing multipotent mesenchymal stromal cells, *Cell transplantation*, 26 (2), 243-257.
- Xu, H. D., Qin, Z. H., 2019, Beclin 1, Bcl-2 and autophagy, *Autophagy: Biology and Diseases*, 109-126.
- Xu, Y. F., Hannafon, B. N., Zhao, Y. D., Postier, R. G., Ding, W. Q., 2017, Plasma exosome miR-196a and miR-1246 are potential indicators of localized pancreatic cancer, *Oncotarget*, 8 (44), 77028.
- Xu, Y., Lai, Y., Cao, L., Li, Y., Chen, G., Chen, L., Ye, Y., 2021, Human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-451a represses epithelial–mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting ADAM10, *RNA biology*, 18 (10), 1408-1423.
- Yamagishi, A., Susaki, M., Takano, Y., Mizusawa, M., Mishima, M., Iijima, M., Nakamura, C., 2019, The structural function of nestin in cell body softening is correlated with cancer cell metastasis, *International journal of biological sciences*, 15(7), 1546.
- Yu, M., Liu, W., Li, J., Lu, J., Lu, H., Jia, W., Liu, F., 2020, Exosomes derived from atorvastatin-pretreated MSC accelerate diabetic wound repair by enhancing angiogenesis via AKT/eNOS pathway, *Stem cell research & therapy*, 11(1), 1-17.
- Zahoor, M. A., Yao, X. D., Henrick, B. M., Verschoor, C. P., Abimiku, A. L., Osawe, S., Rosenthal, K. L., 2020, Expression profiling of human milk derived exosomal microRNAs and their targets in HIV-1 infected mothers, *Scientific reports*, 10 (1), 1-16.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., Rybak, Z., 2019, Stem cells: past, present, and future, *Stem cell research & therapy*, 10 (1), 1-22.
- Zhang, H., Wang, J., Ren, T., Huang, Y., Liang, X., Yu, Y., Guo, W., 2020, Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-206 inhibits osteosarcoma progression by targeting TRA2B, *Cancer Letters*, 490, 54-65.
- Zhang, P. C., Liu, X., Li, M. M., Ma, Y. Y., Sun, H. T., Tian, X. Y., Liu, Z., 2020, AT-533, a novel Hsp90 inhibitor, inhibits breast cancer growth and HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo, *Biochemical Pharmacology*, 172, 113771.
- Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H., Xu, W., 2015, Exosomes in cancer: small particle, big player, *Journal of hematology & oncology*, 8 (1), 83.

- Zhao, H., Shang, Q., Pan, Z., Bai, Y., Li, Z., Zhang, H., Wang, Q., 2018, Exosomes from adipose-derived stem cells attenuate adipose inflammation and obesity through polarizing M2 macrophages and beiging in white adipose tissue, *Diabetes*, 67 (2), 235-247.
- Zhou, Y., Zhou, W., Chen, X., Wang, Q., Li, C., Chen, Q., Jiang, C., 2020, Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes for penetrating and targeted chemotherapy of pancreatic cancer, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10 (8), 1563-1575.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Amigorena, S., 1998, Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes, *Nature medicine*, 4 (5), 594-600.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	İmren HASOĞLU
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Moleküler Biyoloji

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	
"Exosome isolation and characterization from PID-PC, INS-1, and MiaPaca-2 cells and investigation of the effect of isolated exosomes from PID-PC on pancreatic cancer" başlıklı bildiri, 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022)'da 23-25 Kasım 2022'de sözlü olarak sunulması için kabul edilmiştir.	