



siRNA TAŞINMASI İÇİN BİTKİSEL KAYNAKLI EKSOZOM

ELDESİ ve DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Burak ÖZCAN

Eskişehir 2024

**siRNA TAŞINMASI İÇİN BİTKİSEL KAYNAKLI EKSOZOM ELDESİ ve
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Burak ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Behiye ŞENEL

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2024

Bu tez çalışması AUBAP Komisyonunca kabul edilen 2304S025 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Burak ÖZCAN'ın "siRNA taşınması için bitkisel kaynaklı eksozom eldesi ve değerlendirilmesi" başlıklı tezi 25/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Behiye ŞENEL	
Üye	: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU	
Üye	: Dr. Öğretim Üyesi Onur UYSAL	

Prof. Dr. Saime ÖNCE

Enstitü Müdürü

ÖZET

siRNA TAŞINMASI İÇİN BİTKİSEL KAYNAKLI EKSOZOM ELDESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Burak ÖZCAN

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2024

Danışman: Doç. Dr. Behiye ŞENEL

Lipidik, polimerik ya da inorganik nanopartiküller, çeşitli antikanser, antifungal, analjezik ilaçların ve önemli biyolojik moleküllerin vücut içerisinde taşınabilmesi için kapsamlı bir şekilde uzun yıllardır araştırılmaktadır. Bununla birlikte, kararsızlık ve toksisite olmadan uzun süre dolaşım sisteminde kalma kabiliyetine sahip, bağışıklık sisteminden kaçabilen, hedef bölgeye ulaşan ve uzun süre kalabilen, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir güvenli bir taşıma sistemi hala bulunamamıştır. Son yıllarda hücrelerden salınan ve doğal bir taşıyıcı olarak nitelendirilen eksozomlar, bu açılardan nanopartiküller sistemlerin dezavantajlarını önleyebilmektedir. Bu tez çalışmasında bitki kaynaklı olarak limondan elde edilen eksozomlar, akciğer kanser hücrelerinde etkili olabilecek bir siRNA taşıma sistemi olarak kullanılmıştır. Çalışma kapsamında limondan üç yöntem ile elde edilen eksozomların NTA, DLS, zeta potansiyel, TEM analizleri ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiş, protein içerik tayini, immünofenotipleme, siRNA yükleme ve siRNA yüklenmiş eksozomların transfeksiyonu araştırılmış, HUVEC, A549 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki hücre canlılığı etkileri ve apoptotik etki düzeyi değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile ilk defa limon kaynaklı eksozomlara BCL-2 siRNA yüklenmiş ve etkisi değerlendirilmiştir. Nano boyutta elde edilen eksozomların, tek başına hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği ancak, A549 hücrelerinde BCL-2 siRNA yüklü olanlarının hücre canlılığını düşürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda kanser tedavisinde kullanılabilecek bitki kaynaklı eksozomların, genetik materyal taşıyıcı sistem olarak geliştirilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Limon, eksozom, siRNA, akciğer kanseri

ABSTRACT

EVALUATION AND OBTAINING of PLANT DERIVED EXOSOME for siRNA DELIVERY

Burak ÖZCAN

Department of Pharmaceutical Biotechnology

Anadolu University, Postgraduate Education Institute, July 2024

Supervisor: Assoc. Prof. Behiye ŞENEL

For many years, lipidic, polymeric or inorganic nanoparticles have been extensively investigated for the transport of various anticancer, antifungal, analgesic, drugs and important biological molecules within the body. However, a safe delivery system that is biocompatible and biodegradable, capable of remaining in the circulatory system for a long time without instability and toxicity, evading the immune system, remaining at the target site for a long time, has still not been found. Exosomes, which have been released from cells in recent years and act as natural carriers, can prevent the disadvantages of nanoparticle systems in these respects. In this thesis study, plant-derived exosomes obtained from lemon were used as an siRNA delivery system that could be effective in lung cancer cells. Within the scope of the study, characterization analyzes (NTA, DLS, zeta potential, TEM), protein content determination, immunophenotyping, transfection, siRNA loading and cell viability effects of siRNA-loaded exosomes on HUVEC, A549 and MCF-7 cells on exosomes obtained from lemon by three methods were evaluated as MTT and apoptotic effect level. As a result, with this thesis study, BCL-2 siRNA was loaded into lemon-derived exosomes for the first time and its effect was evaluated. As a result of the analyses, it is thought that it will pave the way for the development of plant-derived exosomes that can be used in cancer treatment as a candidate genetic material carrier system.

Keywords: Lemon, exosomes, siRNA, lung cancer

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konusunun belirlenmesinde, yönlendirilmesinde ve düzenlenmesinde büyük emeği olan, pes ettiğim her noktada beni yüreklendirdiği ve lisans eğitimimden beri her zaman yanımda olduğu için danışmanım Sayın Doç. Dr. Behiye ŞENEL'e,

Her türlü konuda desteklerini esirgemeyen Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na

Bu süreçte hem laboratuvarıda hem de tez konusunda her türlü elinden gelen yardımı yapan ve yanımda olan Arş. Gör. Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN'e

Tez çalışmamın en önemli yerlerinde bana yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvarlarını açan Sayın Prof. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI, Dr. Öğretim Üyesi Onur UYSAL, Dr. Bahar CEVİZLİDERE ve tüm ESOGÜ ESTEM Kök Hücre Merkezi ailesine

Akım sitometrisi çalışmalarımda çok yardımcı olan ve bilgilerini bizimle paylaşma nezaketi gösteren Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK'e

Tez çalışmam süresince bana laboratuvarlarını açan ve yanımda olan Farmasötik Teknoloji ABD hocalarına,

Her zaman arkamda olup bana inanan ve beni her koşulda destekleyen babam Ali ÖZCAN'a, annem Sevtap ÖZCAN'a, ablam Ayşe KOÇ'a ve eniştem Erman KOÇ'a sonsuz **TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.**

Aynı zamanda tez sürecinde kaybettiğimiz yeğenim Denizhan KOÇ'a bana pes etmemenin ne demek olduğunu öğrettiği ve hissettirdiği tüm duygular için teşekkür ederim.

Ecz. Burak ÖZCAN

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ecz. Burak ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Kanser.....	3
2.2 Kanser ve Apoptoz	4
2.2.1 Akciğer Kanseri	5
2.3 Ekstrasellüler Veziküller	8
2.3.1 Eksozom Yapısı	10
2.3.2 Eksozomların hücre içine girişi	12
2.3.3 Bitki Kaynaklı eksozomlar	13
2.3.3.1 Limon.....	14
2.3.4 Eksozom İzolasyonu.....	15
2.3.4.1 Ultrasantrifüj.....	15
2.3.4.2 İmmünoaffinite	16
2.3.4.3 Boyut Dışlama İzolasyon Yöntemleri	16

2.3.4.4	<i>Boyut dışlama kromatografisi (Size-exclusion Chromatography)</i>	16
2.3.4.5	<i>Poli-Etilen Glikol (PEG) bazlı Çöktürme</i>	17
2.3.4.6	<i>Mikroakışkan Yöntemler</i>	17
2.4	Eksozomların taşıyıcı sistem olarak kullanılmaları	17
2.5	RNAi Teknolojisi	18
3.	Kullanılan sarflar ve cihazlar	21
3.1	Kullanılan sarflar	21
3.2	Kullanılan Cihazlar	22
4.	YÖNTEMLER	23
4.1	Limondan eksozom İzolasyonu	23
4.1.1	Limon kabuğundan eksozom izolasyon çalışmaları	23
4.1.2	Limon suyundan eksozom izolasyon çalışmaları	23
4.1.3	Limon kabuğu ve suyunda ultrasantrifüj işlemleri	23
4.1.3.1	<i>Diferansiyel Ultrasantrifüjleme (DF)</i>	24
4.1.3.2	<i>Yoğunluk Gradyan Ultrasantrifüjleme</i>	24
4.2	Eksozom karakterizasyonu	25
4.2.1	NTA analizi	25
4.2.2	BCA kiti ile konsantrasyon belirleme	25
4.2.3	TEM analizi	26
4.2.4	Eksozomların immunofenotipik karakterizasyonu	26
4.3	Eksozomlara genetik materyal yüklenmesi çalışmaları	27
4.3.1	Genetik materyal yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi	27
4.3.2	Genetik materyalin üzerinde sonikasyonun etkisi	28
4.4	Eksozomlarda Biyolojik Aktivite Çalışmaları	28

4.4.1 Hücre Kültürü	28
4.4.2 MTT analizi.....	29
4.4.3 Akım Sitometri analizi	30
4.4.4 Eksozomların hücre içine geçiş analizleri	32
5. BULGULAR.....	33
5.1 Limon eksozomlarının izolasyonu ve karakterizasyonları.....	33
5.1.1 NTA analiz sonuçları.....	35
5.1.2 TEM analiz sonuçları	40
5.2 BCA analizi sonuçları	42
5.3 Eksozom fenotipleme sonuçları.....	43
5.4 Genetik materyal ile ilgili analiz sonuçları	44
5.4.1 Genetik materyal yükleme etkinliği sonuçları	44
5.4.2 Sonikasyonun genetik materyal üzerindeki etkisinin analiz sonuçları	44
5.5 Transfeksiyon çalışmaları.....	45
5.6 Hücre canlılık analiz sonuçları.....	48
5.6.1. MTT analiz sonuçları	48
5.6.2 Akım sitometri ile apoptotik etki değerlendirilmesi.....	55
6. TARTIŞMA.....	59
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
8.KAYNAKÇA	78

TABLÖLAR/ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Ekstrasellüler vezikül tipleri ve karakteristik özellikleri	10
Tablo 5.1. NTA analizi yakalama ayarları ve bulguları.....	35
Tablo 5.2. Yükleme işlemleri sonucunda analiz edilen genetik materyal.....	44
Tablo 5.3. DF ve ÇG ile elde edilmiş ve BCL-2 siRNA yüklenmiş eksozomların HUVEC ve A549 hücre hatlarındaki apoptotik etkileri.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Hücreden salınan ekstrasellüler veziküller	9
Şekil 2.2. Eksozom yapısı.....	12
Şekil 5.1. Soldaki tüp ultrasantrifüj öncesi sıkma limon suyunun görüntüsü, ortadaki resim DF ile elde edilmiş US sonrası ve en sağdaki SY ile elde edilmiş US sonrası görüntü	34
Şekil 5.2. Kabuk kısmının parçalayıcı sonrası süzülme işlemi	34
Şekil 5.3. Kabuk kısmının normal santrifüj ve ultrasantrifüj sonrası görüntüleri	35
Şekil 5.4. Elde edilen eksozomlarda FTLA (Sonlu hat uzunluğu ayarı) konsantrasyon / boyut grafiği (A), Ortalama FTLA konsantrasyon/ boyut(B), Yoğunluk/boyu.....	37
Şekil 5.5. DF ile elde edilen eksozomların Malvern Zeta Sizer cihazı ile boyut (r.nm) ve boyut dağılımı (PDI) analizi sonuçları.....	38
Şekil 5.6. ÇG ile elde edilen eksozomların Malvern Zeta Sizer cihazı ile Partikül boyutu (r.nm) ve Partikül boyut Dağılımı (PDI) analizi sonuçları.....	39
Şekil 5.7 SY ile elde edilen eksozomların Malvern Zeta Sizer cihazı ile Partikül boyutu (r.nm) ve Partikül boyut Dağılımı (PDI) analizi sonuçları.....	39
Şekil 5.8. DF yöntemi ile elde edilen eksozomların TEM analiz görüntüsü	40
Şekil 5.9. ÇG yöntemi ile elde edilen eksozomların TEM analiz görüntüsü.....	41
Şekil 5.10. SY yöntemi ile elde edilen eksozomların TEM analiz görüntüsü	41
Şekil 5.11. BCA Standart eğrisi ve denklemi	42

Şekil 5.12. DF, ÇG ve SY'ye ait CD9 ve CD81 tetraspanin açısından immünofenotipik karakterizasyon sonuçları.....	43
Şekil 5.13. 1 defa, 3 defa ve 6 defa sonikasyon uygulamasının genetik materyal üzerindeki etkisinin jel elektroforezde görüntülenmesi.....	45
Şekil 5.14. A549 hücrelerinde Ultrasantrifüj işlemi yapmadan (A) ve ultrasantrifüj işleminden sonra (B) hücreler üzerine uygulanan eksozomların ışık mikroskobu (1) ve Floresan Mikroskop altındaki görüntüleri.....	46
Şekil 5.15. HUVEC hücrelerinde Ultrasantrifüj işlemi yapmadan (A) ve ultrasantrifüj işleminden sonra (B) hücreler üzerine uygulanan eksozomların ışık mikroskobu (1) ve Floresan Mikroskop altındaki görüntüleri.....	47
Şekil 5.16. Eksozomların HUVEC hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	49
Şekil 5.17. BCL-2 siRNA yüklü eksozomların HUVEC hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	49
Şekil 5.18. Eksozomların A549 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	50
Şekil 5.19. BCL-2 siRNA yüklü eksozomların A549 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	50
Şekil 5.20. Eksozomların MCF-7 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	51
Şekil 5.21. BCL-2 siRNA yüklü eksozomların MCF-7 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	51

Şekil 5.22. HUVEC hücrelerinde BCL-2 siRNA içermeyen ve içeren eksozomların karşılaştırmalı hücre canlılığı grafiği.....	52
Şekil 5.23. A549 hücrelerinde BCL-2 siRNA içermeyen ve içeren eksozomların karşılaştırmalı hücre canlılığı grafiği.....	52
Şekil 5.24. MCF-7 hücrelerinde BCL-2 siRNA içermeyen ve içeren eksozomların karşılaştırmalı hücre canlılığı grafiği.....	56
Şekil 5.25. HUVEC hücrelerinde siRNA'lı eksozomların hücreler üzerindeki apoptotik etkilerinin analiz sonuçları.....	56
Şekil 5.26. A549 hücrelerinde siRNA'lı eksozomların hücreler üzerindeki apoptotik etkilerinin analiz sonuçları.....	57
Şekil 5.27. MCF-7 hücrelerinde siRNA'lı eksozomların hücreler üzerindeki apoptotik etkilerinin analiz sonuçları.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APL	:Alkilfosfolipid analoglarını
ASO	:Antisens oligonükleotitleri
ATCC	:Amerikan Doku Kültürü Koleksiyonu
BCA	:Bisinkoninik asit
CMFDA	:5 klorometilfloresein diasetat
CO₂	:Karbondioksit
CSC	:Kanser kök hücresi
ÇG	:Çoklu gradient
DDS:	:İlaç taşıyıcı sistem (Drug Delivery system)
DF	:Diferansiyel Ultrasantrifüjleme
DMEM	:Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNA	:Deoksiriboz nükleik asit
EDTA	:Etilendiamintetraasetik asit
EMT	:Epitelden mezenkimal geçiş
ER	:Östrojen reseptörü
EV	:Hücre dışı vezikül (Ekstrasellüler Vezikül)
FBS	:Fetal Sığır Serum
FDA	:Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTLA	:Sonlu hat uzunluğu ayarı
HER2	:İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HUVEC	:İnsan umbilikal damar endotel hücreleri (Human umbilical vein endothelial cells)
IC50	:Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu

ILV	:İntraluminal veziküller
KHAK	:Küçük hücreli akciğer karsinomu (SCLC: small cell lung cancers)
KHDAK	:Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (NSCLC: non small cell lung cancers)
LDEN	:Limondan türetilen eksozom benzeri nanopartiküller
MDE	:Memeli hücrelerden elde edilmiş eksozomlar
MDR	:Çoklu ilaç direnci
miRNA	:MikroRNA
mL	:Mililitre
mRNA	:Mesajcı RNA
MSC	:Mezenkimal stromal hücreler
MTT	:3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium bromür
MVB	:Multiveziküler cisimler
NaCl	:Sodyum klorür
nm	:Nanometre
NTA	:Nanoparçacık izleme analizi(Nanoparticle Tracking Analysis)
PBS	:Fosfat tamponlu tuz
PCD	:Programlanmış hücre ölümü
PDI	:Boyut dağılımı
PDV	:Bitki kaynaklı vezikül (Plant-derived vesicle)
PEG	:Poli-Etilen Glikol
PEN	:Bitkiden elde edilen eksozom benzeri nanopartiküller
PI	:Propidyum iyodür
PR	:Progesteron reseptörü

PS	:Fosfotidilserin
RES	:Retikülo Endotelyal Sistem
RISC	:RNA kaynaklı susturma kompleksine
RNA	:Ribonükleik asid
RNAi	:RNA interferaz
ROS	:Reaktif oksijen türleri
RPM	:Dakikadaki devir sayısı
SEC	:Boyut dışlama kromatografisi (Size-exclusion Chromatography)
siRNA	:Küçük susturucu/interferans RNA (small interfering RNA'lar)
SY	:Sükroz yatağı
TEM	:Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy)
TME	:Tümör mikroçevresi
XIAP	:X'e bağlı apoptoz protein inhibitörü
µg	:Mikrogram
µm	:Mikrometre
µM	: Mikromol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ökaryot ve prokaryot hücrelerde, fosfolipid çift-tabakalı, sferoid biçiminde ve plazma membranından doğrudan ya da dolaylı yollarla çeşitli veziküller meydana gelir. Bu veziküller eksozomlar, mikroveziküller ve apoptozomlar olarak üçe ayrılırlar. Bu ayırım veziküllerin boyutlarına, kargo içeriğine, plazma membranından nasıl oluştuklarına ve salgılanma şekillerine göredir. Veziküllerin en küçük alt grubu 'Eksozomlar'dır. Tüm vücut sıvılarından elde edilebilen, kendilerine ait biyogenezleri, lipit yapıları ve kargo içerikleri ile diğer veziküllerden ayrılan eksozomlar, hücreler arası iletişim, bağışıklığı düzenleme, sinyal iletmeye, protein, RNA, DNA, miRNA gibi salgılandıkları hücreye ait bazı meteryalleri hücreler arası taşımak gibi görevleri bulunan, 30-150 nm boyutlarındaki keseciklerdir. Eksozomlar bu güne kadar beyin omurilik sıvısı, amniyotik sıvı, anne sütü, idrar, meni, tükürük, kan gibi bir çok vücut sıvısından elde edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında son dönemlerde dikkat çeken eksozomların doğal yapıları, kandaki stabiliteleri ve doğal hedefleme özellikleri nedeniyle genetik materyal kapsüllemesi için ideal bir nanotaşıyıcı olduğu gösterilmiştir. Eksozomların memeli hücrelerinde daha çok bulunduğu bilinmekle birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalarla birçok meyve ve bitkiden de eksozomlar elde edilmeye başlanmıştır. Bunlar arasında üzüm, greyfurt, zencefil, havuç, limon ve yaban mersini örnek verilebilir. Bitki kaynaklı gıdaların tüketimi ile kanser insidansı arasındaki ilişkinin ters bir ilişki olduğu çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Turuncgiller de dahil olmak üzere, bitkilerin sulu ekstraktlarının veya bitkilerden elde edilen bileşiklerin antikanser aktivite gösterdikleri çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Bununla birlikte yenilebilir bitkilerden elde edilen eksozomların kemoterapötik etkinliği arttırmak ve kemoterapötik ajanın toksisitesini azaltmak gibi yardımcı etkileri olabileceği konusu üzerinde durulmakta ve bunun üzerine çalışmalar yapılamaya devam edilmektedir. Bu tezde de seçilen limon meyvesi günlük tüketim meyvesi olarak insan vücudu için güvenlidir ve limon suyundan elde edilen eksozomlarla hazırlanan taşıyıcı güvenli nanopartiküller olabileceği düşünülmektedir.

RNA bazlı gen terapisi, son dönemlerde ilgi çekmektedir ve terapötik RNA'nın olumsuz bağışıklık cevapları ortaya çıkarmadan hedef hücreler içinde

işlev görmesini mümkün kılmaktadır. Terapötik RNA'lar, antisens oligonükleotitleri (ASO'lar), küçük susturucu RNA'ları (small interfering RNA'lar; siRNA'lar) veya mikro RNA (miRNA) gibi RNA'ları ifade etmektedir. Bu terapiler, RNA veya proteinleri hedefleyerek, ya proteinlerin oluşmasını engelleme ya da DNA veya RNA düzenlemesine aracılık ederek etki etmektedir. Terapötik etki mekanizmalarından bağımsız olarak, bu terapötik RNA'ların boyutları, sahip oldukları anyonik yükleri ve hem kan dolaşımında hem de dokularda bulunan RNAzlara karşı duyarlılıkları, hücrelere verimli bir şekilde alınmasını ve üzerinde işlev görmesini zorlaştırmaktadır. Güvenli ve etkili RNA iletiminin sağlanabilmesi için, RNA'yı bozunmadan hedef hücrelere ulaştırılmasını en üst düzeye çıkarmak ve hedef dışı hücrelere maruz kalmasını önlemek ya da en aza indirmek için viral ve viral olmayan (nonviral) taşıma sistemleri geliştirmiştir. Eksozomların doğal olarak hücreler arasında RNA taşıdığı bilindiğinden, hedeflenen hücrelere terapötik nükleik asitleri taşımak için uygun vektör olarak kullanılmasının, gen terapisinde etkin olabileceği tahmin edilmektedir. Bu sebeple de son dönemde eksozomlara artan ilgi ile RNA taşınması içinde kullanılabilmesi öngörülmüş ve yapılan çalışmalarda umut verici sonuçlar alınmıştır. Fakat hala çalışılan bu konuda yeterli bilgiler mevcut değildir.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında limon meyvesinden elde edilen eksozom tabanlı siRNA taşıyıcı sistem geliştirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla limon sularından farklı yöntemlerle eksozom elde edilmiş, bu eksozomlarda eksozom boyutu, zeta potansiyeli, yüzey belirteçlerinin belirlenmesi, TEM analizi ile yüzey morfolojilerinin belirlenmesi gibi karakterizasyon çalışmaları ile BCA yöntemi ile miktar tayini, transfeksiyonu, BCL-2 siRNA yükleme, hücrelerde MTT ile sitotoksosite ve apoptotik etkilerin belirlenmesi analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Kanser

Kanser, dünya çapında insan hayatını tehdit eden hastalıklar arasında önemli yeri olan bir hastalıktır. Kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünya çapında ikinci önde gelen ölüm olan kanserde sorumlu hücreler, yüksek çoğalma hızı, kendini yenileme yeteneği, kanser kök hücresi (CSC) özellikleri, metastaz ve ilaç direnci geliştirmek için farklı moleküler yollar arasında geçiş yapma yeteneği gibi benzersiz özelliklere sahiptir (Paskhe ve ark., 2022)

Çoğu durumda, onkogenlerin aktivasyonu ve/veya tümör baskılayıcı genlerin deaktivasyonu, kontrolsüz hücre döngüsü ilerlemesine ve apoptotik mekanizmaların inaktivasyonuna yol açar. Kanserler ortaya çıktıkları hücre tiplerine ve bu hücrelerin özelliklerine göre iyi huylu ya da kötü huylu olarak sınıflandırılırlar. Kötü huylu kanserlerde hücreler arasındaki bağlantının zayıflaması böylelikle çevredeki normal dokuları istila edebilmesi ve hareketliliği (EMT ya da MET dönüşümü) ile dolaşım ya da lenfatik sistem yoluyla vücuda yayılabilmesi ile karakterizedir. Bununla birlikte çeşitli mutasyonlar, kromozomlar üzerindeki translokasyon ya da delesyon/amplifikasyon düzensizlikleri, hücre içindeki sinyal yollarındaki anormal değişimlerde yine bu hücrel ve genetik değişimlere katkıda bulunan mekanizmalar arasındadır. Bu değişim ya da düzensizliklerin hepsi düzensiz bir hücre döngüsüne ya da apoptotik yolların inaktif olmasına neden olmaktadır. Bu süreçler mevcut literatürde iyi tanımlanmıştır ve her konuda çok sayıda araştırma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir (Sarkar ve ark., 2013).

Son yıllarda kişiselleştirilmiş tedaviler, geliştirilen yeni küçük moleküller, hücre tedavileri, gen düzenlemeleri ya da mikrobiyom tedavileri gibi yeni tanı ve tedavi teknolojileri kanser hastalığının tedavisinde önemli ilerleme sağlanmasına yardımcı olmuş ve sağ kalım oranlarını arttırdığı görülmüştür. Bununla birlikte hala kanser ilaçlarına karşı kazanılmış direnç gelişimleri kanser tedavilerini sınırlayan noktalar arasındadır. Kanser hücreleri için tamamen farklı etki mekanizma ile etki eden ve/veya kimyasal yapıları farklılık gösteren iki veya daha fazla ilaca kanser

hücresinin dirençli hale gelmesi durumunu Çoklu İlaç Direnci (Multidrug Resistance: MDR) olarak ifade edilir (Siegel ve ark., 2020).

İlaç inaktivasyonu, detoksifikasyon mekanizmaları, artan ilaç sızıntıları (drug efflux), ilaç hedeflerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, epigenetik değişiklikler, DNA hasarı/onarım süreçlerindeki ya da kök hücrelerindeki değişimler, artmış tümör heterojenliği, tümör mikroçevresi (TME), epitelden mezenkimal geçişteki (EMT) mekanizmalar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) modülasyonu ve hücre ölüm yollarının inhibisyonu dahil olmak üzere çeşitli faktörler ve mekanizmalar kanser hücrelerinde ilaç direncine yol açmaktadır. Aynı zamanda apoptoz veya otofajininde katılımıyla gerçekleşen programlanmış hücre ölümü (PCD) mekanizmalarından kaçışta yine kanserin en önemli özelliklerinden biri olarak tanımlanmıştır. Tümör oluşumu, otoimmün ve dejeneratif hastalıklar, apoptotik yollarda meydana gelen yeniden düzenlenmeler nedeniyle oluşabilir (Plati ve ark., 2011).

Bu nedenle hem ilaç direnci hem de apoptotik yollardaki bozukluk nedeniyle kanser türlerinin tedavisi zorlaşmaktadır. Bunlar esas olarak meme, akciğer, kolorektal ve prostat kanserini içerir ve en sık görülen ve en yüksek mortalite oranlarına sahip maligniteleri temsil etmektedirler (Siegel ve ark., 2020).

2.2 Kanser ve Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü anlamına gelen bir ifade olan apoptoz, hücrenin doğal bir mekanizmasıdır. Gereksiz, istenmeyen ya da yanlış bir şekilde bölünmeye gidecek hücrelerin ortadan kaldırılması işlemidir. Bu mekanizmanın düzensizliği ya da bu programlanmış ölümden kaçabilme başta kanser olmakla birlikte immün yetmezlik, akut veya kronik dejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojilere yol açmaktadır. (Hassan ve ark., 2014).

Bununla birlikte, apoptozun düzensizliği karsinogenezde önemli sonuçlara yol açmaktadır. Kötü huylu tümörlerin ayırt edici özellikleri arasında kontrolsüz büyüme, anjiyogenez ve apoptozdan kaçınma yer almaktadır. Bu nedenle, normal fizyolojik süreçler için esas olan, proliferasyon ve hücre ölümü arasındaki hücresel homeostazın sürdürülmesidir (Giorgi ve ark. 2008).

Kanserde bir çok apoptotik mekanizma sorumlu olsa da genellikle intrinsik yolak dediğimiz içsel yolağın inhibisyonu söz konusudur. İntrinsik yolda görevli sinyal molekülleri, apoptoz sürecinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle özellikle apoptozun tedavi sürecinde hedeflenmesi en başarılı cerrahi olmayan tedavi seçeneğidir. Apoptotik süreçte görevli moleküler proteinler tedavi için hedeflenebilecek potansiyel apoptotik biyobelirteçler olarak düşünülebilmektedir. Burada da özellikle yeni gen terapi yöntemleri proapoptotik moleküllerin uyarılması ya da BCL-2, XIAP gibi antiapoptotik moleküllerin inhibisyonu göze çarpmaktadır (Chaubry ve ark., 2022).

Kanser hücrelerinde görülen kontrolsüz büyümeyi kontrol altına almak ya da büyümeyi sonlandırmak kanser tedavisinde kullanılabilecek önemli bir yoldur. Özellikle de bu kontrol altına alma ya da sonlandırma işleminde hücrenin kendi doğal mekanizmasını kullanmak oldukça etkili bir yöntem olarak görülmektedir. Hücrenin apoptozdan kaçınması, kanserin nedenine veya türüne özgü değildir ama kanserin ayırt edici bir özelliğidir. Tüm kanser türleri için apoptozu hedeflemek etkili olarak bulunmuştur. Birçok antikanser ilaç, hem içsel (mitokondriyel yolak) hem de dışsal (ölüm reseptörleri) yolaklarda çeşitli aşamaları hedefler özelliğindedir. Terapötik hedefleme için iki yaygın strateji, proapoptotik moleküllerin uyarılması ve antiapoptotik moleküllerin inhibisyonudur. Araştırılan hedeflerden bazıları, ölüm reseptörleri için ligandları, BCL-2 için inhibitörleri, XIAP inhibisyonu ve apoptotik sinyaller olarak işlev gören alkilfosfolipid analoglarını (APL) içerir. Yollardaki herhangi bir aşama tedavi için hedeflenebilir, ancak hangi hedefin en etkili olduğuna dair bir gösterge yoktur. Apoptoza neden olan daha fazla antikanser ilaçlar tasarlandıkça, en etkili hedefler belirlenecektir (Pfeffer ve ark., 2018).

2.2.1 Akciğer Kanseri

Yüksek ölüm oranına sahip en ölümcül kanserlerden biri akciğer kanseridir ve ölümlerin en sık nedeni tümöre bağlıdır. Temel sınıflandırılması ise birincil ve ikincil kanserler olarak yapılır. Akciğer karsinomu, histolojik örneklerin incelenmesi sonucunda, küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK=SCLC), küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (KHDAK=NSCLC), karsinoid, sarkom ve mezotelyoma olarak alt bölümlere ayrılır (Kumar ve ark., 2021).

En yaygın görülenler KHDAK ve KHAK'dır ve tüm akciğer kanseri türlerinin yaklaşık % 90'ını temsil ederler. Diğer türler ise nadir görülme sıklığına sahiptir. KHDAK, 4 alt sınıfa daha ayrılmaktadır ve bunlar büyük hücreli farklılaşmamış karsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve Pancoast tümörüdür. Yavaş büyüme özelliği gösteren KHDAK daha yaygın görülür. Agresif bir şekilde büyüyen ve bir az görülen KHAK tümörleridir. Bu tip akciğer kanserlerinin patogeneze katkıda bulunan başlıca faktörler, kalıtsal ve çevresel faktörler ile sigara içme alışkanlıklarıdır (Sharma ve ark., 2022).

Dünya sağlık örgütünün istatistiksel verilerine göre 2020 yılında, dünya çapında, 2.21 milyon akciğer kanserli hasta teşhis edilmiş ve 1.80 milyon ölümle sonuçlanan vakanın olduğu belirtilmiştir. Türkiye de ise yine aynı yılda 41 bin vaka telhis edilirken, 37 bini ölümle sonuçlanan vaka bulunmaktadır. Bu 37 bin vakanın yaklaşık 30 binini erkek bireylerin oluşturduğu gözlenmiştir (<http-1>,<http-2>).

Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi rezeksiyon gibi geleneksel stratejiler, ayrı ayrı veya kombinasyon halinde akciğer kanserleri için mevcut tedavi rejimlerinin temelini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu tür geleneksel tedavi yöntemlerinde ciddi yan etkilerin olması bununla birlikte kemoterapi ve radyoterapinin çevredeki sağlıklı hücrelere verdiği zarar bilinmektedir. Bu nedenle akciğer sistemleri ciddi şekilde bozulmuş hastalarda akciğerlerin işlevselliğinde kayıplara yol açabileceği için yeni tedavi stratejileri araştırılmaktadır (Yadav ve ark., 2021).

Bu stratejilerden bir tanesi de RNAi teknolojisidir. RNAi tedavileri, farmakolojik etkilerini, proteinlere dönüşmek yerine hücrenin olaylarını düzenleyen kodlamayan RNA'lar aracılığıyla ortaya koyar. Bu tedavi stratejisinde yer alan 20-25 baz çifti uzunluğunda, çift sarmallı yapıdaki küçük kodlamayan RNA molekülleri RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) bağlanarak translasyondan önce hedef gene ait mRNA'yı parçalayarak proteinin sentezlenmesini engellemektedir (Ferguson ve ark., 2020).

Küçük susturucu RNA'lar (small interfering RNA=siRNA) ve mikroRNA'lar (miRNA'lar) olarak iki önemli moleküle sahip bu strateji birçok genetik veya nadir hastalık için erişilebilir bir seçenek olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte

yapılarındaki fosfodiester bağlarının endosomal nükleazlar tarafından çabuk parçalanabilmeleri, büyük molekül olmaları ve RES elemanları tarafından tanınabilmeleri sebebiyle dolaşımda çok uzun kalamazlar. Bu sebeplede bu tedavi edici moleküllerin tedavi edici dozda ve sağlam bir şekilde hedef bölgeye ulaşabilmesi önemli bir noktadır (Bobbin ve ark., 2016) .

2.2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri meme dokusunda hücrelerin anormal büyümesi ile başlayan bir kanser türüdür. Sadece kadınlarda değil erkeklerde de görülebilen bu kanser türü kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebeplerinden birisidir. Çoğu zaman kesin nedeni bilinmemekle birlikte kalıtsal özellikler, farklı genetik değişiklikler, hormonlar ve çevresel etkiler bu kanser türünün riskini arttıran nedenlerdendir. Bu nedenlerin hepsi meme kanserlerinin tiplerinin gelişimi ya da tedaviye yanıtı etkileyen faktörlerdir (Tian ve ark., 2021).

Dünya sağlık örgütünün istatistiksel verileri, 2020 yılında dünya çapında, 2.26 milyon meme kanserli hastanın teşhis edildiğini ve 685 bin de ölümle sonuçlanan vakanın bulunduğunu göstermektedir. Türkiye’de yapılan bir araştırmada 2019 yılında yaklaşık 4300 kadının meme kanserine bağlı olarak öldüğü bildirilmiştir (http-1, http-2).

Cerrahi, meme kanserinin genel olarak ana tedavisidir. Kemoterapi, radyoterapi, hormonlarla tedavi (hormon tedavisi), hedeflendirilmiş ilaçlar ve immünoterapi diğer yaygın tedaviler olarak uygulanmaktadır (Wang ve ark., 2023).

Meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) geninin aşırı ekspresyonu/amplifikasyonunun varlığına veya yokluğuna göre farklı tiplerde sınıflandırılabilir. Bu durum göz önüne alındığında meme kanseri, hormon reseptörü pozitif (ER+ ve/veya PR+), bu genin aşırı ekspresyonu/amplifikasyonu olduğunda HER-2 ile zenginleştirilmiş (HER2+) veya tüm belirteçlerin (ER–, PR–, HER2–) ekspresyonunda eksik olan üçlü negatif olarak isimlendirilebilir (Lu ve ark., 2023).

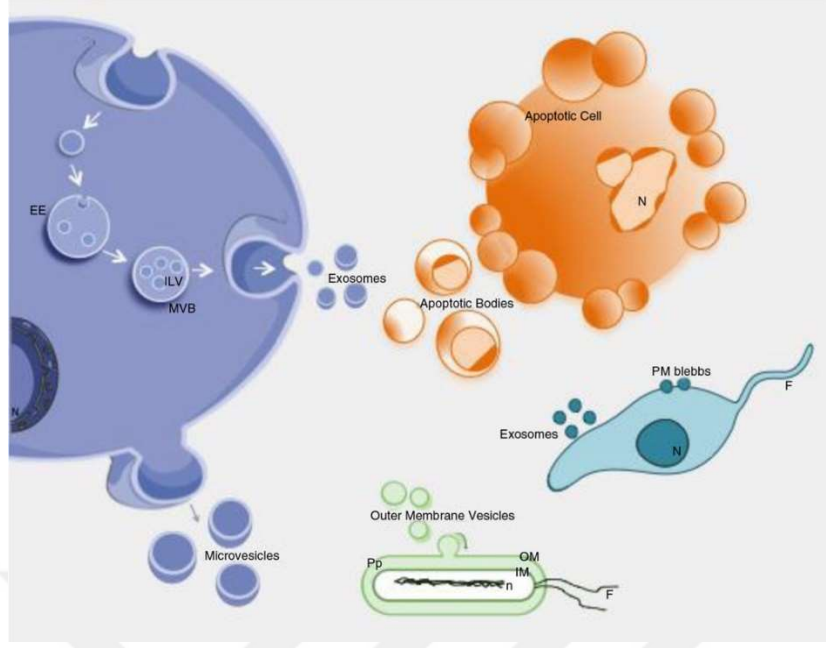
Farklı genetik değişiklikler ve gen ekspresyon profilleri, meme kanseri alt tiplerinin gelişimi ve ilerlemesinde, bireysel vakaların sonuçlarında ve tedaviye yanıt üzerinde farklı etkilere sahiptir. Bu bağlamda gen terapisi yoluyla kusurlu genlerin düzeltilmesinde ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi meme kanserinin tedavisi için önemli bir strateji haline gelmektedir. Hedef hücrelerin genetik modifikasyonu, *in vivo* veya *in vitro* olsun, siRNA'lar ve miRNA'lar dahil olmak üzere genlerin, gen fragmanlarının veya oligonükleotidlerin ilgili hücrelere aktarılmasıyla sağlanabilir (Bottai ve ark., 2017).

2.3 Ekstrasellüler Veziküller

Homeostazın sürdürülmesi için hücreler arası iletişim vazgeçilmezdir ve bu çeşitli sinyalleşme süreçleriyle gerçekleşebilir. Bu süreçlerden biri, hücrelerden hücre dışı veziküllerin (Ekstrasellüler Vezikül =EV) salgılanma ve yine hücreler tarafından içeriye alınmasıdır. EV'lerin hücrelerden salgılanması, fizyolojik koşullar altında veya spesifik uyaranlara tepki olarak gerçekleşmektedir ve bunlar lipid çift tabakalı, kapalı membranöz yapılardır (Bazzan ve ark., 2021).

EV'lerin sınıflandırılması, yapılan araştırmalar ile sürekli olarak gelişse de genel olarak 3 ana kategoriye göre yapılır. Bunlar (1) boyutları 50 nm ila 5 µm arasında değişen apoptoz sırasında meydana gelen apoptotik cisimcikler, (2) boyutları ~50 nm ila 1 µm boyut aralığında olan ve büyük veziküller üreten plazma zarının doğrudan dışa doğru tomurcuklanmasıyla üretilen mikroveziküller (ektozomlar), (3) boyutları ~40 ila 160 nm çapında (ortalama ~100 nm) olan ve endozomal kökene sahip olan en küçük EV'ler olan eksozomlardır (Ginini ve ark., 2022).

Şekil 2.1'de hücrelerden salınan ekstrasellüler vezikül tiplerini ve **Tablo 2.1'de** bu veziküllerin köken aldıkları orjin, şekil ve boyut dağılımları ile ana bileşenleri açısından karakteristikleri belirtilmiştir.



Şekil 1.1. Hücreden salınan ekstrasellüler veziküller (Yáñez-Mó ve ark., 2015 çalışmasından alınarak düzenlenmiştir.)

Tablo 2.1. Ekstrasellüler vezikül tipleri ve karakteristik özellikleri (Antimisiaris ve ark. 2018'den düzenlenerek alınmıştır.)

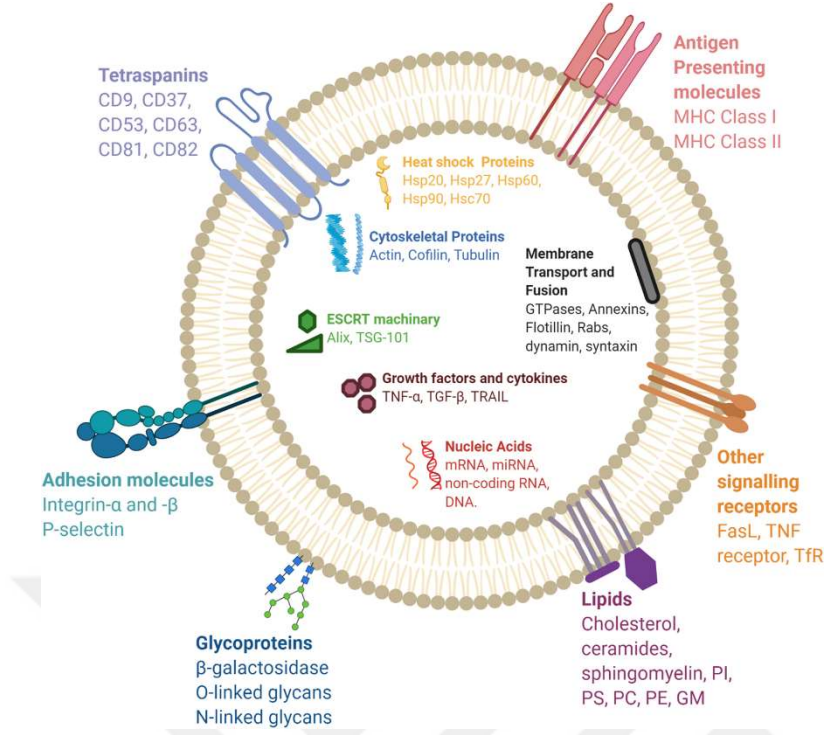
Apoptotik Cisimcikler	Mikroveziküller	Eksozomlar
Apoptotsiz süresince plazma membranından oluşurlar	Sitozolik proteinlerin eşzamanlı olarak dahil edilmesiyle hücre zarından kopmayla oluşur	Plazma zarının içe doğru tomurcuklanmasıyla başları multiveziküler cisimlerin (MVB'ler) oluşumuyla sonuçlanır. Bundan sonra, bileşimlerine bağlı olarak, MVB'ler ya lizozomlarla füzyondan sonra bozunur ya da plazma zarı ile kaynaşır ve hücrelerden salınan eksozomlar oluştururlar
Heterojen şekilli 50-5000nm	Çok homojen değildir 20-1000nm	Homojen şekilli 50-120nm
DNA, RNA; histon ve sinyallem molekülleri zarlarında yüksek miktarda fosfatidilserin (PS) bulunur	Yüksek membran PS seviyeleri ve bazı yaygın yüzey belirteçleri (CD40 ligandları, integrinler ve selektinler) bulunur	Proteinleri: CD9, CD63, CD81 tetraspaninler; Isı şok proteinleri (Hsc70), lizozomal proteinler, tümör sensitif gen (Tsg101), füzyon proteinleri, nükleik asitler, membranlarında yüksek kolesterol diaçilgliserol bulundurulur

2.3.1 Eksozom Yapısı

Eksozomlar, eksositoz sırasında oluşan bir protein ve nükleik asit taşıyan intraluminal veziküllerdir (ILV). Literatürde farklı boyutlar belirtilmekle birlikte en geniş anlamda 30-150 nm boyut aralığına sahip olan eksozomlar, içeriği oldukça çeşitli bir hücre dışı veziküllerdir. Vücutta çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde hücreler arası iletişime katılarak işlev görürler. Çoğu proteinler, nükleik asitler, lipitler ve hücrel sinyal molekülleri gibi çeşitli biyolojik bileşenleri içerebilirler.

Vezikül içine alım veya farklı bir hücreye sinyal iletme kapasiteleri büyük ölçüde kökenlerine veya durumlarına bağlıdır. Hatta izole edildiği yollara göre bile değişiklik gösterebilmektedir (Rome, 2019). Son çalışmalar, eksozomların, biyoaktif bileşikleri yüklerinin bir parçası olarak veya lipid yapılarına katarak dağıtmak için kullanabilecek bir kesecik olarak potansiyeli görülmüştür. Eksozomlar, tüm ökaryotik hücre türleri tarafından genel olarak salınırlar ve hemen hemen tüm vücut sıvılarında (beyin omurilik sıvısı, anne sütü, periferik kan, tükürük ve idrar dahil) yaygın olarak bulunur (Aryani ve ark., 2014) .

Eksozomların dış yüzeyini oluşturan lipid zar, hücre zarının yapısına benzer. Fosfolipidler, kolesterol ve proteinlerden oluşan çift katmanlı bir zar yapısı vardır (**Şekil 2.2**). Bu zar, eksozomun içeriğini hücre dışındaki çevresel faktörlerden ayırarak korur. Eksozomlar genellikle hücre yüzey proteinleri, taşıyıcı proteinler, enzimler ve hücresel sinyal molekülleri gibi çeşitli proteinleri içerir. Bu proteinler, eksozomun hedef hücrelerle etkileşimini ve işlevini belirler. Rab GTPaz, annexin, integrin ve fibronektin membran füzyon proteinleri olarak bilinir ve taşıma proteini özelliğini gösterirler. CD9, CD63, CD81 ve CD82 gibi tetraspaninler, ısı şoku proteinleri (Hsp27 ve Hsp20) ve lipid ile ilgili proteinler eksozomların tipik bileşenleridir (Pluchino ve ark., 2019). Özellikle tetraspaninler eksozom yüzeyinde bolca bulunur. Bu sayede karakterizasyon için de kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. Eksozom yapısı (Gurung ve ark., 2021'deki yaptığı çalışmadan alınarak düzenlenmiştir.)

2.3.2 Eksozomların hücre içine girişi

Günümüze kadar, eksozomların hücre içerisine alınmasında, hücre dışı reseptörlerle doğrudan etkileşime girerek sinyalleşmeyi tetikleme yoluyla ya da plazma zarı ile doğrudan füzyon yapma yoluyla alınma/işselleştirilme olmak üzere, iki strateji ile tanımlanmıştır. (Gurung ve ark., 2021).

Reseptörlerle doğrudan etkileşimde, alıcı hücre üzerindeki yüzey reseptörlerine eksozom yüzeyindeki transmembran ligandların doğrudan bağlanması ve hedef hücrede bir sinyal kaskadı oluşturması söz konusudur. Eksozomun füzyonu ise, plazma zarı ile eksozomların birleşmesi ve içerdikleri kargoyu hedef hücrelerin sitozolüne doğrudan bırakması durumunu oluşturur (Montecalvo ve ark., 2012).

Eksozomal içeriklerin hücreler arası taşınma mekanizmaları olarak işselleştirmede ise daha çok makropinositoz, fagositoz, klatriin aracılı, kaveolin bağımlı ve klatriin-/kaveolinden bağımsız gibi çeşitli endositoz yolları devreye girmektedir (Amber ve ark., 2019).

İşselleştirildikten sonra eksozomlarda bulunan biyoaktif moleküllerin aşağıdaki mekanizmalar yoluyla hedef hücreleri etkilediği gösterilmiştir: (1) hedef hücrelerin yüzeye bağlı ligandlar yoluyla doğrudan uyarılması; (2) aktive edilmiş reseptörlerin alıcı hücrelere transferi; ve (3) fonksiyonel proteinlerin, lipidlerin ve RNA'ların verilmesi yoluyla alıcı hücrelerin epigenetik olarak yeniden programlanmasıdır (Zhang ve ark., 2019)..

2.3.3 Bitki Kaynaklı eksozomlar

Bitki hücrelerinden salgılanan çoklu veziküllerin varlığı ilk kez 1967'de W.Halperin ve R. Marchant adlı iki bilim adamı tarafından iki bağımsız makalede ele alınmış ve çoklu veziküllerin plazma zarı ile füzyonunun mantarlarda ve yüksek bitkilerde eksozom benzeri yapıların hücre dışı boşluğa salınmasına rol oynayabileceğini öne sürülmüştür. Bugün artık gelişen teknoloji ve bu veziküller üzerindeki çalışmalar sonucunda artık bitkilerin "eksozom benzeri" hücre dışı kesecikler salgıladığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Pucci ve ark., 2020).

Bitkiden elde edilen eksozomları tanımlamak için literatürde bitkiden elde edilen eksozom benzeri nanopartiküller, bitkiden türetilmiş nanoveziküller, yenilebilir bitkiden türetilmiş nanoveziküller, bitkilerden izole edilen nano ve mikro boyutlu kesecikler (50-1000 nm) gibi terimler kullanılmaktadır (Lian ve ark., 2022).

Bitkisel EV'ler, lipidler, proteinler ve miRNA'lar dahil olmak üzere çok sayıda biyoaktif madde taşıyan heterojen boyutlardaki lipoprotein yapıları olduğundan memeli kökenli veziküllere benzemektedir. Bitki kökenli eksozomların biyoaktif kargoların hücreler arası taşınması yoluyla fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde, hücre duvarının yeniden şekillenmesi için gerekli olan enzimlerin yanı sıra antifungal ve antimikrobiyal özelliklere sahip proteinlerde taşınmasında, gen düzenlemesinde hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde görevli küçük kodlamayan RNA'ları (miRNA, siRNA'lar) transfer edilmesinde potansiyel bir rolü olduğunu düşünülmektedir (Cui ve ark., 2020).

Bitki kaynaklı eksozomlar gelecek vaat eden yeni bir terapötik sınıfı olmanın yanı sıra, mevcut ilaç taşıma sistemlerine ek faydaları olan, yeni biyolojik olarak türetilmiş ilaç taşıyıcıları olarak da düşünülmektedir. Literatürde hidrofilik veya hidrofobik yükleri koruma ve hedef sahalara teslim etme yeteneğine sahip olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Rapor edilen bu eksozomların çoğu yenilebilir bitkilerden izole edildiğinden, insan tüketimi için de güvenli oldukları belirtilmektedir. İn vitro ve in vivo çalışmalar da PDV'lerin toksik olmadığını göstermiştir (Raimondo ve ark., 2015) .

Bu, onları yeni nesil ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi için oldukça çekici adaylar haline getirmektedir. Ayrıca, sitotoksiteyi ve istenmeyen hedef dışı etkileri en aza indirirken, kapsüllenmiş molekülleri hedef bölgelere ileterek içsel hedefleme sergileyebilmeleri ve büyük ölçekte üretilebilmeleri onları daha da cazip hale getirmektedir (Zhang ve ark., 2016).

Bu güne kadar üzüm, greyfurt, zencefil, havuç, limon ve yaban mersini gibi yenilebilir bitkilerden elde edilen eksozomların belirgin terapötik etkileri ortaya konulmuştur. Eksozomların bu kısıtlı sayıda bitkiden eldesi, gerek karakterizasyon gerekse biyolojik aktivite tayin çalışmaları ya da onların bu özelliklerinin daha ayrıntılı açıklanabilmesi için oldukça sınırlıdır.

2.3.3.1 Limon

Turunçgiller dünyadaki ekonomik açıdan en önemli meyve mahsulüdür ve C vitamininin (C Vitamini) ana kaynaklarından birini oluşturur. Herhangi bir meyvede bulunandan daha fazla sayıda karotenoidi ve çok önemli besinsel özelliklere sahip çeşitli ikincil bileşikler içerir. Bu maddeler antikanser ajanların ve anti-oksidan, inflamatuvar, kolesterol ve alerjik aktivitelere sahip diğer nutrasötik bileşiklerin tedarikine büyük ölçüde katkıda bulunur. Bu maddeler, meyve suyu kesesinin apoplastında bitki kaynaklı sekretom olarak salınır ve muhtemelen eksozom benzeri nanopartiküller halinde paketlenildiği düşünülmektedir (Baldini ve ark., 2018).

Limon ise Citrus türleri arasında en yaygın üçüncü yetiştirilen bitkidir (<http-3>, <http-5>). Besin olarak daha çok suyu, yiyecekler ve içecekleri tatlandırmak

amacıyla; antioksidan etkisiyle de bağışıklığı güçlendirmek için takviye gıda olarak ve içeriğinde bulunan askorbik asit sayesinde de cildi aydınlatma amacıyla dermokozmetik açıdan kullanılmaktadır. İçeriğinde polifenoller, flavonoidler (Flavonon, flavon, flavonol gibi alt gruplara ayrılmaktadır.), limonoidler, karotenoidler ve C vitamini olmak üzere birçok biyoaktif bileşik bulunmaktadır (http-4, http-5).

Literatürde limon bitkisinin farklı bölümlerinin farklı aktivitelere sahip olduğu ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, yaprak/tohumlarının fenolik içerikler sayesinde antioksidan özellik göstermesi (http-6, Singh ve ark., 2020), uçucu yağlarının gram (+) ve (I) bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisi olduğu (http-7), kabuğunun monoterpenler sayesinde antifungal etki gösterdiği (http-8, Egbonu ve ark., 2016) ya da kabuğunun/tohumunun insan mide ve meme kanseri üzerinde antikanser etki (http-9,http-10, Yuan ve ar., 2022) gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır.

2.3.4 Eksozom İzolasyonu

Eksozomları hücrelerden veya biyolojik sıvılardan saflaştırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Boyutları, yoğunlukları, yüzey antijenleri gibi özellikleri kullanılarak izolasyonları yapılmaktadır. Farklı boyuttaki EVleri ve hücrenin farklı bileşenlerinden eksozomları ayırmak zor olduğu için her izolasyon yönteminden sonra boyut, boyut dağılımı, protein miktarı gibi karakterizasyonlarını yapmak önemlidir. Bu parametreler için çeşitli teknikler kullanılmıştır (Khatun ve ark., 2016).

Literatürde eksozom izolasyonları için genel olarak aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır (Antimisiaris ve ark.i 2018):

2.3.4.1 Ultrasantrifüj

Eksozom izolasyonun en yaygın kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen yöntemlerinden biridir (Ter-Ovanesyan ve ark., 2021).

Diferansiyel ve yoğunluk (gradient:gradyan) olmak üzere iki tür ayırma ilkesi uygulanabilir. Diferansiyel ultrasantrifüjde eksozom içeren çözelti kademeli santrifüjleme işlemine maruz bırakılır. Yoğunluk ve boyut farkından kaynaklı

eksozomlar diğer bileşenlerinden ayrılmaktadırlar. Yoğunluk ultrasantrifüjünde ise genellikle sükröz gibi bir gradyan kullanılmaktadır. Eksozomdan daha az yoğun ve daha fazla yoğun sükröz çözeltileri hazırlanarak kademeli ultrasantrifüj işleminde eksozomlara yatak görevi görerek en az hasar alması sağlanmaktadır. Diferansiyel ultrasantrifüjü gibi aynı ayırma ilkeleri ve yöntemleri kullanılmaktadır. Ultrasantrifüj genellikle boyut farkına dayandığı için boyut dağılımı incelenerek eksozom saflaştırması ile ilgili bir yorum yapılabilse de eksozom ile aynı boyutta başka mikroveziküller olma ihtimalini eleyememektedir (Gupta ve ark., 2018).

2.3.4.2 İmmünoaffinite

Eksozom yüzeylerinde yer alan seçici yüzey reseptörleri ile antikorların etkileşmesine sonucu eksozomlar izole edilmektedir. Boyuta dayalı izolasyon yöntemlerine göre daha çeşitli eksozomlar sunması avantajları arasında yer almaktadır. Bununla birlikte ultrasantrifüj yöntemleriyle karşılaştırıldığında karşılaştırılabilir bir üretim verimi ile sonuçlansa da, immünoaffinite çok daha az numune hacmi kullanır ve vezikül boyutu farklılıklarından bağımsız olarak daha büyük miktarlarda saflaştırılmış eksozom çıkarır (Li ve ark.i 2017).

2.3.4.3 Boyut Dışlama İzolasyon Yöntemleri

Boyuta dayalı izolasyon yöntemlerinden bir diğer en popüler yöntem ise ultrafiltrasyondur. Eksozom boyutlarına bağlı olarak spesifik membran gözenek boyutlarına göre sıralı bir biçimde filtrelerden geçirilerek eksozomlar izole edilebilir. Ultrasantrifüje göre daha az zaman alırlar (Heinemann ve ark., 2014).

2.3.4.4 Boyut dışlama kromatografisi (Size-exclusion Chromatography)

Kısaca SEC olarak isimlendirilen bu yöntemde, molekülleri boyutlarıyla ters bir hız ilişkisi ile diferansiyel olarak elüe etmek için gözenekli bir sabit faza karşı mobil bir faz olarak biyoakışkanlar kullanılır. Başka bir deyişle, önce daha büyük parçacıklar elüe olur, ardından gözeneklere girecek ve gözeneklerden akacak daha küçük veziküller ve daha sonra zara bağlı olmayan proteinler gelir. Bu da daha uzun bir yol ve dolayısıyla artan elüsyon süresi ile sonuçlanır (Sidhom ve ark., 2020).

2.3.4.5 Poli-Etilen Glikol (PEG) bazlı Çöktürme

Eksozomların çözünürlüklerini değiştirerek elde edilen bir yöntemdir. Eksozomların özelliklerine göre daha az çözünmesini sağlayacak bir polimer kullanılmaktadır. Bu sayede eksozomlar daha az çözünecek ve düşük hızda santrifüjleme işlemi ile pellet kısmında toplanabilecektir. Ultrasantrifüjleme yöntemine göre daha çok eksozom saflaştırıldığı gözlemlenmiş olsa da bu yöntemin en büyük dezavantajı elde edilen eksozomların polimerle beraber çökelti oluşturmalarıdır (Kang ve ark., 2017; Sidhom ve ark., 2020).

2.3.4.6 Mikroakışkan Yöntemler

Mikroakışkanlar son zamanlarda eksozom izolasyonu veya saflaştırma için de kullanılmaya başlanmıştır. Farklı yöntemlerle geliştirilen bu çiplerde yüksek verimlilik ve saflık amaçlanmıştır. Bu teknik, immünoafinite, boyut ve yoğunluk dahil olmak üzere çeşitli ilkelere dayalı olarak eksozomları izole etmek için mikroakışkan cihazlar kullanan yüksek verimli bir yöntemdir. En yaygın kullanılanı, immünoafinite (yakalama ya da bağlama) izolasyon yöntemine benzeyen immüno-mikroakışkan tekniğidir. Eksozomlar, çipler olarak da bilinen mikroakışkan cihazlar üzerinde hareketsiz hale getirilen antikörlerin eksozom belirteçlerine spesifik bağlanmasıyla ayrılır. Cihazın tipine ve akış kanalının uzunluğuna bağlı olarak, eksozomları izole etmek için 10 µL kadar küçük numune hacimlerini kullanabilir. Bununla birlikte bu yöntem, özel ekipman ihtiyacına ihtiyaç duymaktadır. Cihazlar, immünoafinite izolasyondan daha ucuz olmasına rağmen, oldukça karmaşık ve pahalıdır. Mikroakışkanlar, umut verici beklentileri olan yeni bir teknolojidir, ancak henüz standart bir eksozom izolasyonu yöntemi olarak kabul edilmemektedir (Chen ve ark., 2010; Carnino ve ark. 2019).

2.4 Eksozomların taşıyıcı sistem olarak kullanılmaları

İlk başta eksozomların gereksiz hücre moleküllerinin uzaklaştırılmasından sorumlu araçlar olduğu düşünülüyordu ancak yapılan araştırmalar sonucunda hücreler arası iletişim ve taşımada da görev alarak vücut dengesinin korunmasında önemli bir yere sahip oldukları ortaya çıktı. Eksozomların biyolojik süreçlerin kontrolündeki temel rolleri göz önüne alındığında, bu hücre dışı keseciklerin birçok

bakteriyel, parazit veya viral bulaşıcı hastalıkta, hastalık patogenezinde hayati bir rol oynadığı keşfedilmiştir. Bu fonksiyonlarına ek olarak immünolojik yanıtlarda ve immün homeostazda da kritik rol oynadıkları belirtilmiştir. Ayrıca eksozomların bağışıklık sistemi iletişiminde, hem bağışıklık sistemini uyarıcı hem de baskılayıcı etkilerle düzenlemeyi kolaylaştırdığı bilinmektedir (Yılmaz, 2022).

Son yıllarda hücre dışı veziküllerin spesifik hücre tipleri için yüksek hedefleme potansiyeline sahip olduğu kanıtlanmıştır, ancak çoğu durumda, sistemik uygulamayı takiben, beklenen terapötik sonuçları gösterememişlerdir. Fakat bu hücre dışı veziküllerin;

- Terapötik bir yanıtı alabilmek için ilaçla yüklenebilmesi
- Dolaşımda stabil kalabilmesi
- RES (Retikulo Endotelial Sistem) elemanlarından kaçabilmesi
- Biyouyumlu olması
- Toksik ya da immünojenik olmaması gibi olumlu özelliklerinin yanında (Antimisialis ve ark., 2008; Johnsen ve ar., 2014; Stremersch ve ark., 2016)
 - İlaçların eksozomlara yüklenmesi ve/veya tutulmasının yeterli olmaması,
 - Biyoaktif ajanlarla yüklendiğinde doğal hücre dışı veziküllerin zayıf farmakokinetiği
 - Endüstriyel boyutta üretilmelerindeki sorunların devam etmesi
 - Biyolojik ortamdan veya hücre kültürlerinden çok düşük izolasyon verimleri sağlamaları gibi olumsuz özellikleri

sebebiyle ilaç taşıma sistemleri olarak daha çok çalışma yapılmasına geliştirilmesine ihtiyaç duyan sistemlerdir (Antimisialis ve ark., 2008).

2.5 RNAi Teknolojisi

RNA interferansı (RNAi), hücre içerisindeki mRNA'ya tamamlayıcı ~21-25 nükleotid uzunluğundaki çift sarmallı küçük RNA yapılarıdır. Bu küçük genetik diziler protein kodlayan genlerle ilişkili olup ve sentezlendikten sonra sitoplazmaya çıkan mRNA'nın ekspresyonunun baskılanması işlevini gerçekleştiren bir biyolojik süreçtir. Bu küçük RNA yapıları bitkilerde ve ökaryotlarda transkripsiyonel ve

transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Xu ve ark., 2019).

Bu teknolojide öncü çift iplikli endojen RNA molekülleri Dicer ya da Drosha adında RNase II enzimleri yaklaşık 21-25 nükleotidlik daha kısa ipliklere dönüşürler. Oluşan bu kısa RNA zincirleri RNA Kaynaklı Susturma Kompleksine (RISC) yüklenir. Bu sırada tek iplikli hale gelen RNA molekülü hedef mRNA molekülü ile birleşir. RISC'in temel bileşeni Argonaute proteini mRNA kesimi için temel katalitik bölge olup bu proteinin PAZ domaini rehber zincirin 3' ucuna bağlanmada rol alırken, yapısal olarak RNase H'nin aktif bölgesine benzeyen PIWI domaini hedef mRNA'nın kesiminde rol almaktadır (Nakanishi, 2016). Literatürde genel olarak biyolojik rollerine ve yapılarına bağlı olarak, kodlama yapmayan bu küçük RNA'lar miRNA , siRNA ve shRNA olarak üç ana kategoriye ayrılmaktadır.

Kanser tedavilerinde onvensiyonel kemoterapötiklerin spesifik olmayan dağılımları nedeniyle ciddi toksisiteye sebep olmaları ve diğer gen terapi ürünlerinin de işlevlerini gösterebilmek için hücre çekirdeğine kadar ulaşabilme zorunlulukları sebebiyle son zamanlarda araştırmacıların ilgisi RNAi teknolojisine kaymış bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu RNAi teknolojisi ürünlerinin yüksek özgünlükleri ve verimlilikleri sayesinde kanserden sorumlu hücrelerin daha iyi bir şekilde azaltılabileceği ve ilaca dirençli tümörlerde daha başarılı sonuçlar alınabileceği gösterilmiştir. Devam eden araştırmalarda kanser hücresi popülasyonunu azaltmak veya kemoterapinin duyarlılığını artırmak için susturulabilecek genleri belirlemeye çalışılmaktadır. Çünkü bu seçici hedefleme ile komşu sağlıklı hücrelere zarar vermeden, kansere özgü hücrelerin tedavi edilmesi ve hastaların klinik açıdan daha iyi yönetimi için çok önemlidir (Afrin ve ark., 2023) . Bu güne kadar RNAi teknolojisi kapsamında nadir hastalıklar için FDA onayı almış siRNA bazlı Patisiran, Givosiran, Lumasiran, Inclisiran, Nedosiran, and Vutrisiran isimli ilaçlar piyasada bulunmaktadır. Kanser tedavisinde ise katı tümör ya da pankreas kanseri için geliştirilen ve klinik çalışmaları devam eden birkaç terapötik ürün (NCT01591356,NCT03608631,NCT03087591, NCT00672542,NCT01437007) bulunmaktadır (Padda ve ark., 2024).

Tüm bu bilgiler ışığında limon bitkisinden elde edilen veziküllerle ilgili çalışmalarında literatürde sınırlı olması ve bu eksozomların siRNA gibi eksojen molekülleri taşınmasındaki araştırmaların eksikliğinden yola çıkılarak, bu tez çalışmasındaki amaç, limon bitkisinden eksozomların elde edilmesi, karakterizasyonlarının analiz edilmesi ve bir çok kanser türünde aşırı eksprese olan antiapoptotik BCL-2 genine özgü ticari olarak satılan siRNA BCL-2 molekülünün kullanılması hedeflenmiş ve eksozomlara bu genetik materyalin yüklemesi çalışmaları yapılarak hücreler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.



3. KULLANILAN SARFLAR VE CİHAZLAR

3.1 Kullanılan sarflar

Sarf madde

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit
CML Latex Beads
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO
EDTA
Etil Alkol (Absolüt)
Fötal Bovine Serum (FBS)
MTT boyası
PE anti-human CD9 antibody
PE anti-human CD81 antibody
PE Mouse IgG1 κ Isotype Antibody
Penisilin/Streptomisin
Phosphate Buffer Saline (PBS)
PKH26 boya
Tripan mavisi
Trypsin-EDTA 10X
siRNA-BCL-2
siRNA-FITC konjuge
Ultra-LEAF Purified anti-human CD63 antibody

Firma adı

BioLegend, Amerika
Invitrogen, Almanya
Sigma Aldrich, Almanya
VWR Prolabo, ABD
Sigma Aldrich, Almanya
Merck, Almanya
Sigma-Aldrich, Almanya
Applichem, Almanya
BioLegend, Amerika
Elabscience, Amerika
Biolegend, Amerika
GIBCO, İngiltere
Invitrogen, Almanya
Merck, Almanya
Roche, Almanya
Pan, Biotech, Almanya
Santa Cruz Biotechnology, Almanya
Santa Cruz Biotechnology, Almanya
Biolegend, Amerika

3.2 Kullanılan Cihazlar

Makine-Teçhizat

Ultrasantrifüj
Hassas terazi
Küçük kapasiteli masa üstü santrifüj
Otoklav
CO₂'li Etüv
İnvert Mikroskop
Büyük kapasiteli santrifüj
Distile su cihazı
Cytatin 5 Çoklu Plaka okuyucu
Derin dondurucu (-20)
Derin dondurucu (-80)
10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipetör
15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri
25 cm²-75 cm²'lik hücre kültür flaskı
2mL'lik Eppendorf tüp
6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası
12 kanallı otomatik pipet
Sonikatör
Laminar Flow kabin
Masa üstü Mikro santrifüj
Su banyosu
NanoDrop™ UV Spektrofotometre
Akış sitometri cihazı
-80 Derece dondurucu,
Nanosight NS300
Sterile 0.22 µm filter

Firma-Model

Beckman Coulter, Almanya
Mettler AM 100, ABD
Sigma-Aldrich, Almanya
Hirayama HVE 50, Japonya
Hera Cell 240i, Amerika
Leica DMI 400, Almanya
Rotina 420R, Almanya
Millipore, Amerika
BioTek, ABD
Liebherr Medline, Almanya
New Brunswick Sci, ABD
Eppendorf, Kanada,
Isolab, Almanya
Greiner bio-one, ABD
Greiner bio-one, ABD
TPP, İsviçre
Axygen, İngiltere
Sonics,
Heal Force, Çin
Sigma, Almanya
Nüve, Türkiye
(Schimadzu, Amerika)
BD Accuri™ C6, ABD
New Brunswick, U410, Almanya
Malvern, İngiltere
Merck,Almanya

4. YÖNTEMLER

4.1 Limondan eksozom İzolasyonu

Bu çalışmada Citrus limon bitkisine ait limon meyvelerinin suları ve kabukları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan limonlar Antalya Adrasan mevkiinde yerel üreticiden temin edilmiştir. Çalışmada ultrasantrifüj ile 3 farklı yöntem (Diferansiyel, Çoklu gradient ve Sükroz yatağı) ile limon kabuğu ve limon suyundan eksozom elde etme çalışmaları yapılmıştır.

4.1.1 Limon kabuğundan eksozom izolasyon çalışmaları

Öncelikle 5 adet limon kabuğu tamamıyla soyulmuş ve tartılmıştır. Limon kabuklarının üzerine 300 mL 1 X PBS tamponu eklenerek parçalayıcıdan geçirilmiştir. Parçalayıcıdan çıkan limon kabuğu kütlesi temiz bir tülbent yardımıyla süzölmüştür. Süzöntüler 50mL olarak 3 falkon tüpüne bölünmüş ve üzerine yeniden 1 X PBS tamponu eklenerek önce 1000 g'de 10 dk sonra 2000 g'de 30 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonlarında süpernatant kısımları toplanmış ve pellet kısımları atılmıştır. Süpernatant 0.22'lik filtreden geçirilerek ileri işlemler için +4°C'ye kaldırılmıştır.

4.1.2 Limon suyundan eksozom izolasyon çalışmaları

5 adet limonun suyu limon suyu sıkma aleti ile sıkılmıştır. Süzöntüler 3 falkon tüpüne bölünmüş ve üzerine yeniden 1 X PBS tamponu eklenerek ilk önce 1000 g'de 10 dk sonra 2000 g'de 30 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Her santrifüjleme sonrası pellet atılmış ve süpernatant kullanılmıştır. Santrifüj sonunda süpernatant kısımları toplanmış 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek ileri işlemler için +4°C'ye kaldırılmıştır.

4.1.3 Limon kabuğu ve suyunda ultrasantrifüj işlemleri

Limon kabuğu ve sıkma limon suyundan elde edilen süzöntülerden santrifüj sonrası ileri aşamalara geçilmiş ve 2 farklı yöntem ile eksozom izolasyon çalışmaları denenmiştir. Bu yöntemler arasında literatürde de sıklıkla tercih edilen ultrasantrifüjleme yanında yine literatürde kullanılmış olan yoğunluk gradyanlı santrifüjleme işlemleri uygulanmıştır. Tüm santrifüjleme işlemleri +4°C'de gerçekleştirilmiştir (Gao ve ark.,2023).

4.1.3.1. Diferansiyel Ultrasantrifüjleme (DF)

0.22 µm'lik filtreden süzülen sıvı dikkatlice ultrasantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüpler 100.000 g'de 90 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve pellet kısmına 2 mL PBS eklenerek resüspande edilmiştir. Resüspande edilen örnekler vakit kaybetmeden -20 °C ya da -80°C'ye kaldırılmıştır.

4.1.3.2 Yoğunluk Gradyan Ultrasantrifüjleme

Yoğunluk gradyan santrifüjleme de iki yöntem denenmiştir. Birisi çoklu gradient diğeri ise süktroz yatağı şeklindedir. %'lik birimler literatüre göre ayarlanmıştır (Raimondo ve ark., 2015; Zarà ve ark., 2020; Srivastava ve ark., 2022).

Çoklu gradient (ÇG) yöntemi için;

- Ultrasantrifüj tüpüne sırasıyla % 68'lik süktroz, % 27'lik süktroz çözeltileri koyulup en üste filtreden geçmiş eksozom pelleti yavaş bir şekilde eklenmiştir. Daha sonra 100.000 g'de 90 dk santrifüj yapılmıştır.
- Ara katmandaki eksozomlar toplanmıştır.
- Başka bir ultrasantrifüj tüpüne sırasıyla % 60, % 45, % 30, % 8 süktroz çözeltileri eklenmiş ve en üste bir önceki basamakta toplanan eksozomlar koyulmuştur.
- Tüpler yeniden 200.000 g'de 90 dk santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonunda % 8 ile % 30 süktroz katmanları arasındaki eksozom bulunan sıvı katman toplanmış ve örnekler vakit kaybetmeden -20 °C ya da -80°C'ye kaldırılmıştır.

Süktroz yatağı (SY) için;

- Ultrasantrifüj tüpüne % 30'luk süktroz çözeltisi koyulup en üste filtreden geçmiş eksozom pelleti yavaş bir şekilde eklenmiştir. Daha sonra 100.000 g'de 90 dk santrifüj yapılmıştır
- Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve pellet kısmına 2 mL PBS eklenerek resüspande edilmiştir.

- Örnekler vakit kaybetmeden -20 °C ya da -80°C'ye kaldırılmıştır.

4.2 Eksozom karakterizasyonu

4.2.1 NTA analizi

Limondan elde edilen eksozomların karakterizasyonu için niceleme ve boyut dağılımı (nm) lazerli NTA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. NTA analizleri Hacettepe Üniversitesi HÜNİTEK Merkez'de yapılmıştır. Burada 3 farklı konsantrasyonu hazırlanan eksozomlar öncelikle CMFDA (5 klorometilfloresin diasetat) boyası ile boyanmıştır. Boyama işlemleri ve kolon yıkama işlemlerinin hepsi için tarafımızdan gönderilen PBS tampon kullanılmıştır. Örnekler Nanosight NS300 (Malvern, İngiltere) cihazında ve NTA yazılımının 3.4.003 versiyon programı ile analiz yapılmıştır.

NTA analizi dışında elde edilen eksozomlarda Malvern Nano ZS cihazı ile boyut ve zeta potansiyel değerlendirilmesi de yapılmıştır. Örnekler 50 alınarak üzeri PBS ile tamamlanmış ve zeta kuvvetlerine koyularak 3 tekrarlı ölçümler gerçekleştirilmiştir.

4.2.2 BCA kiti ile konsantrasyon belirleme

Eksozomlarda protein konsantrasyonunu belirlemek için hazır olarak satılan *Micro BCA* (ThermoFisher Scientific, Amerika) kiti kullanılmıştır. Yöntemde Cu^{+2} 'nin alkali bir ortamda protein tarafından indirgenmesiyle oluşan Cu^{+1} 'in tespit reaktifi olarak bisinkoninik asit (BCA) kullanılmaktadır. Analiz için öncelikle firmanın önerdiği protokole göre protein standardı olarak bovin serum albümini, 0.5-200 µL konsantrasyon aralığında, çözücü olarak % 0.9 NaCl çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan standart ile örneklerde aşağıdaki yöntem ile 96 kuyucuklu plakada 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır.

Micro BCA protein testinin uygulanması;

- 96 kuyucuklu plakanın kuyularına 150 µL Micro BCA çalışma çözeltisi (1:24:25 oranında MC:MB:MA çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır) ve 150 örnek/standart eklenerek mikropipet yardımıyla karıştırılmıştır. Ardından folyo ile kaplanmış ışıktan korunmuştur

- Plaka çalkalayıcı üzerinde 30 saniye hafifçe çalkalanmış, daha sonra 2 saat 37°C derecede inkübasyona bırakılmıştır
- İnkübasyon sonrasında plakalar oda ısısına alınıp soğumaya bırakılmıştır.
- Absorbans değerleri 570 nm’de kör olarak kullanılan % 0.9 NaCl çözeltisine karşı BioTek Cytation 5 çoklu plaka okuyucu ile ölçülmüştür.
- Kör için ölçülen absorbans değeri tüm örneklerin absorbans değerlerinden çıkartılmıştır.
- Standart içeren kuyulardan elde edilen veriler Exel programına girilerek standart eğri grafiği oluşturulmuş ve eşitlik belirlenmiştir.
- Örneklerin protein miktarının belirlenmesi için okunan absorbans verileri ile oluşturulan eşitlikten yararlanılarak belirlenmiştir.

4.2.3 TEM analizi

İzole edilen eksozomlarda morfolojik olarak karakterizasyonu için TEM (Transmission Electron Microscopy) analizi yapılmıştır. Elde edilmiş eksozom süspansiyonlarından yaklaşık 200 µL alınan örnekler formvar/karbon gridler üzerinde kurutulduktan sonra % 3’lük uranil asetat ile boyaması negatif boyama yapıp JEOL JEM 1220 marka cihaz ile 120 kV altında görüntülenmiştir (Yang ve ark., 2020). Analizler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi (ESOGÜ-ARUM) tarafından yapılmıştır.

4.2.4 Eksozomların immunofenotipik karakterizasyonu

Eksozomlara özgü CD9 ve CD81 yüzey belirteçlerinin analizleri akım sitometri cihazı ile yapılmıştır. Bu analizin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle literatürde verilen protokolde modifikasyonlar yapılarak işlemler gerçekleştirilmiştir (Faruqu ve ark., 2018).

Bunun için ilk önce eksozomlarda lateks boncuklar ile kaplama yapılmıştır. Yapılan çalışmada öncelikle lateks boncuklarla CD63 antikoru karıştırılarak gece boyu +4°’de rotator üzerinde karıştırılarak inkübasyon sağlanmıştır. Ertesi gün ortamda spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için sodyum azid içeren 100 mM

BSA solüsyonu eklenmiş ve yine bir gece boyu +4°'de rotator üzerinde karıştırılarak inkübasyon sağlanmıştır. Kaplanmış eksozomlar ertesi gün 3 tüpe ayrılmış bir tüpe PE işaretli CD9 , diğer tüpe PE işaretli CD81 ve 3. tüpe de izotip antikor eklenerek oda sıcaklığında 30-45 dk bekletilmiş ve akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Kontrol olarak CD63 bulunan isotipli eksozomlar kullanılmıştır.

Bu işlemde her 3 yöntem (DF, ÇG, SY) ile elde edilen eksozomlar için ayrı tüp hazırlanmıştır

4.3 Eksozomlara genetik materyal yüklenmesi çalışmaları

Eksozomların FITC konjugeli siRNA ile hem hücre girişini değerlendirmek hem de siRNA-BCL-2 yükleyebilmek için sonikasyon ve inkübasyon yöntemleri denenmiştir. Buna göre;

Inkübasyon yöntemi için;

10 µg eksozoma 1µg siRNA eklenmiş ve 2 saat ile 24 saat olarak iki farklı sürede çalkalayıcı üzerinde 37 °C derecede inkübe edilmiştir.

Sonikasyon metodu için;

10 µg eksozoma 1µg siRNA eklenmiş % 20 güçte 30 saniye tutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu sonikasyon işlemi 3 veya 6 defa yapılmış ve her 30 saniye bitiminde 2 dk soğutma işlemi yapılmıştır. 3 veya 6 defa inkübasyon süresi bitiminde 1 saat 37°C derecede inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda eksozomlar hücreler üzerine uygulanmıştır (Wang ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2021).

4.3.1 Genetik materyal yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi

Çalışmamızda siRNA yükleme etkinliğini belirleyebilmek için literatürde kullanılmış ultrasentrifüjleme işlemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Çalışmada DF yöntemi ile elde edilen eksozomlar kullanılmıştır. Buna göre inkübasyon ve sonikasyon yöntemleri ile siRNA yükleme işleminden sonra eksozomları çöktürmek ve fazla siRNA'yı uzaklaştırmak için 60 dakika boyunca 150.000 g'de ultrasentrifüjlemeye tabi tutulmuştur. Sonrasında pellet yeniden PBS ile resüspande edilmiştir. Süpernatant ayrı bir falkona alınıp üzerine soğuk % 99'lık

soğuk alkol eklenmiştir. Ayrı tüpte yer alan siRNA yüklü eksozomlar üzerine 500 µL Diklorometan ve 500 µL % 99'luk alkol eklenerek tüpler birkaç kez alt üst edilmiştir. Sonrasında bütün tüpler 1.500 rpm'de 45 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst kısım atılmış ve pellet üzerine 1 mL % 99'luk soğuk alkol eklenip yeniden santrifüj işlemi uygulanmış ve genetik materyalin çöktürülmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonunda alkol atılıp tüpler oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra ticari olarak satılan siRNA tamponu (Santa Cruz Biotechnology, Almanya) içerisinde resüspande edilip Shimadzu BioSpecNano (Almanya) spektrofotometre vasıtasıyla hem süpernatant hem de pellette eksozom içerisine hapsedildiği düşünülen genetik materyal miktarı analiz edilmiştir (Banizs ve ark., 2014; Rong ve ark., 2022).

4.3.2 Genetik materyalin üzerinde sonikasyonun etkisi

Genetik materyalin eksozomlara yükleme esnasında kullanılan sonikasyon işleminin genetik materyalin bütünlüğü üzerinde bir etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Bunun için siRNA tamponu içerisinde yer alan genetik materyali 3 ve 6 defa olacak şekilde % 20 güçte sonike edilmiş, her bir aralıkta 2 dk buz üzerinde bekletilmiştir. İşlemler sonunda 1 saat 37 °C'de oda ısısında bekletilen genetik materyal daha sonra % 1,5'luk TBE tamponu ile hazırlanmış agaroz jele yüklenmiş ve 1 saat 50 mV'da yürütülmüştür. Oluşan bantlar jel dökümantasyon analiz cihazı ile görsel olarak değerlendirilmiştir.

4.4 Eksozomlarda Biyolojik Aktivite Çalışmaları

4.4.1 Hücre Kültürü

Biyolojik aktivite çalışmaları için öncelikle ilgili hücrelerde hücre kültürü yapılmıştır. Tez çalışmasında hücre çeşidi olarak HUVEC, MCF-7 ve A549 hücre dizileri kullanılmıştır. -80'den çıkarılan hücreler % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren yüksek glukozlu DMEM besiyerinde kültüre edilmiştir. Kültür koşulları ortak 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren atmosfer ortamı kullanılmıştır. Hücreler uygun büyüme fazına ulaştıktan sonra 0.25X Tripsin/EDTA çözeltisi ile flasklardan kaldırılıp alt kültürlerle ayrılmıştır. Çalışması

biten hücreler ise %10 DMSO ve FBS içeren besi ortamında kısa süreli -80°C’de saklanmak üzere kaldırılmıştır. Eksozom ile yapılan çalışmalarda FBS’den gelebilecek eksozom kontaminasyonunu engelleyebilmek için DMEM içerisine FBS ya da antibiyotik eklenmemiştir.

4.4.2 MTT analizi

İzole edilen eksozomların hem tek başına hemde siRNA-BCL2 yüklenmiş eksozomların hücrelerin canlılığı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için MTT analizleri yapılmıştır. Tek başına eksozomlar öncelikle 5-35µg/mL konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Daha sonra siRNA-BCL2 yüklü eksozomlar çalışılırken hücre canlılığı üzerindeki etkisinin % 70’in altına düşmediği en yüksek konsantrasyon 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 15 µg/mL seçilmiş ve çalışılmıştır. MTT testi, hücrelerin metabolik aktivitesinin değerlendirilmesine dayanan kolorimetrik bir tahlildir. MTT reaktifi (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür), iki fenil parçası ve bir tiazolil halkası dahil olmak üzere üç aromatik halka ile çevrili dört nitrojen atomu içeren pozitif yüklü bir kuaterner tetrazol halka çekirdeğinden oluşan bir mono-tetrazolyum tuzudur. MTT’nin azalması çekirdek tetrazolyum halkasının bozulmasına ve formazan adı verilen mor-mavi suda çözünmeyen bir molekülün oluşmasına neden olur. MTT reaktifi, pozitif yükünün yanı sıra lipofilik yapısı nedeniyle canlı hücrelerin mitokondriyal iç zarının yanı sıra hücre zarından da geçebilir ve metabolik olarak aktif hücreler tarafından formazana indirgenir. Bu redoks kimyasal reaksiyonu sayesinde hücre içi formazan üretiminin kolorimetrik bazlı bir ölçümünü sağlar. Mor rengin yoğunluğu hücre sayısı ile doğru orantılı olduğundan hücrenin canlılığını gösterir. Sonuç olarak, tahlil, bir hücre metabolik aktivite tahlili olarak geniş bir kullanıma sahiptir (Ghasemi ve ark., 2021).

Yöntem kısaca;

- Hücre kültür kaplarından 0.25 X Trypsin/EDTA çözeltisi ile kaldırılan hücreler santrifüjlenip enzim çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra yeniden FBS ve antibiyotik içermeyen DMEM besiyerinde süspansiyon haline getirilmiştir.

- Süspande hücreler 96 plakalara ekilmeden önce Triphan mavisi yöntemi *Thoma* lamı ile canlı/ölü hücre sayımları yapılmıştır.
- Canlı hücrelerden 2×10^4 /mL hücre süspansiyonu olacak şekilde kuyucuklara aktarılmış ve kültür koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 24 saat sonunda kuyucuklardaki besiyeri atılmış ve hücreler üzerine taze besiyeri yerinde hazırlanan eksozomlar belirlenen konsantrasyonlarda eklenmiştir.
- Sadece besiyeri eklenen kuyucuklar kontrol olarak kullanılmış ve plakla yeniden kültür koşullarında 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon süreleri sonunda her bir kuyucuğa 5mg/mL konsantrasyonunda MTT boyası eklenmiş ve canlı hücrelerin formazan tuzu oluşturabilmesi için yeniden 2-4 saat arası inkübasyona bırakılmıştır.
- Bu inkübasyon süresi sonunda MTT boyası kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve üzerine 200 μ L DMSO eklenerek 15 dk daha inkübe edilmiştir.
- 15dk'lık inkübasyon sonunda plakalar BioTek Cytation 5 çoklu plaka okuyucuda 570nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur.
- Deney her bir derişim için 3 kez tekrar edilmiş olup hiç sadece besiyeri ile muamele edilen hücreler kontrol olarak değerlendirilmiş ve hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilmiştir (Uchida ve ark., 2009)

4.4.3 Akım Sitometri analizi

Bu tezde eksozomların hücreler üzerindeki apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi için akım sitometrisi çalışmaları yapılmıştır. Bunun için PI'li FITC Annexin V-FITC Apoptoz Tespit Kiti (FITC Annexin V Apoptosis detection

Kit with PI, BioLegend) kullanılmıştır. Yötem firmanın önerdiği protokole göre uygulanmıştır. Apoptoz sürecinin başlangıcında, normalde plazma zarının iç kısmında bulunan fosfatidilserin (PS), membranın dış kısmına taşınır. Fosfatidilserin, kalsiyum varlığında anneksin V-FITC konjugatına bağlanmaya uygun hale gelir. Prosedür, apoptotik süreci başlatan hücrelerin zarında Anneksin V-FITC'nin fosfatidilserine bağlanmasını ve hücre zarının tamamen tehlikeye girdiği hücrelerde propidyum iyodürün (PI) hücresel DNA'ya bağlanmasını içerir. Erken apoptotik hücreler PI'yi dışlarken, geç evre apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler, bu boyaların DNA'ya bağlandıkları çekirdeğe geçişi nedeniyle pozitif olarak boyanacaktır.

Yöntemde sırasıyla aşağıdaki adımlar uygulanmıştır;

- Bölüm 4.4.1'de anlatıldığı gibi hücreler kültüre edilip sayımı yapıldıktan sonra 6'lık plakalara yaklaşık 50.000 hücre olacak şekilde kuyulara ekimi yapılmıştır.
- Ertesi gün hücreler üzerine MTT analizlerine göre belirlenen 1 µg siRNA-BCL2 içeren 10 µL konsantrasyonunda eksozom örnekleri eklenmiştir. Bu çalışmada da her üç yöntem (DF, ÇG, SY) için analiz yapılmıştır.
- 24 saat sonunda hücreler 0.25 X Trypsin/EDTA ile kaldırılmış ve mikrotüplere alınarak 5 dk 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda süpernatant atılmış pellet üzerine kit içeriğinde bulunan 400 µL Annexin V Binding Buffer eklenerek resüspande edilmiştir.
- Yeniden süspande edilen örnekler üzerine kit içinden çıkan FITC Annexin V'ten 5 µL ve Propidium İyodür'den 10 µL eklenerek tüp yavaşça karıştırılmıştır.
- Tüpler incelemenden önce 15 dk oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
- Örneklerin BD Accuri™ C6 cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir.
- Kontrol olarak sadece besiyeri ile muamele edilen hücreler kullanılmıştır. Sonuçlarda canlı, erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik hücrelerin % oranları belirlenmiştir.

4.4.4 Eksozomların hücre içine geçiş analizleri

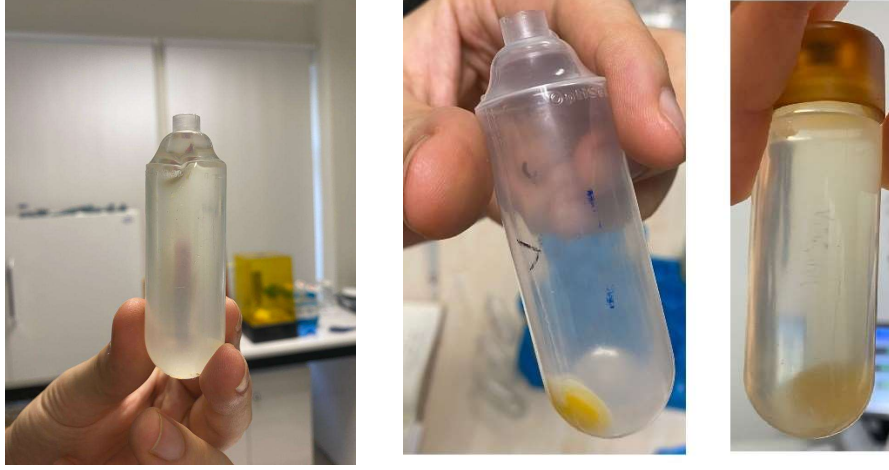
Eksozomların hücre içine girip girmediğinin kontrol işleminde transfeksiyon yöntemi denemiştir. Burada öncelikle FITC (yeşil) konjugeli siRNA'lar sonikasyon ve inkübasyon yöntemi ile eksozomlara yüklenmiştir. Transfeksiyon işleminde eksozomları boyayan floresan PKH26 (kırmızı) boyası kiti ile eksozom boyaması da gerçekleştirilmiştir. Buna göre kit içeriğinde yer alan dilüentten 80 µL, PKH26 boyasından 1µL alınarak 10 µg eksozom içeriğı üzerine eklenmiş ve 4 dk oda ısısında bekletilmiştir. PKH26 ile boyanan ve FITC siRNA içeren eksozomlar 150.000 g'de 1 saat ultrasantrifüj yapıldıktan sonra hücreler üzerine uygulanmıştır. Hücreler 24 saat sonra floresan mikroskop altında görüntülenmiştir.

5. BULGULAR

5.1 Limon eksozomlarının izolasyonu ve karakterizasyonları

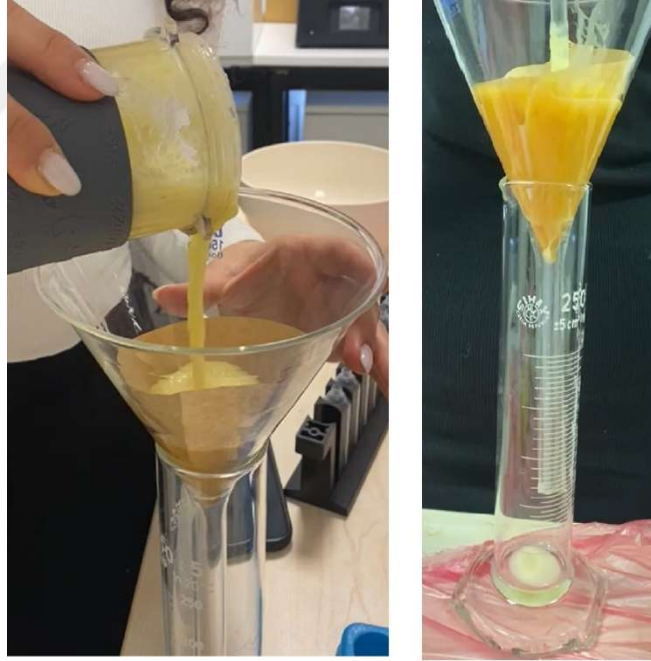
Limondan eksozom izolasyonunda hem kabukları hem suyu kullanılmıştır. Ultrasantrifüj işlemi öncesinde kabuk kısmında yapılan ön denemeler yapılmış ve normal santrifüj işlemlerinde ilk önce 1000 g'de 20 dk santrifüj işlemi denenmiştir. Fakat pelletin havalanması sebebi ile ek santrifüjün 2000 g'de 30 dk olmasına karar verilmiştir. Sıkma limon suyunda pellet havalanması gözükmemiş olmasına rağmen aynı işlemler gerçekleştirilmiştir. Her iki tüpte de süpernatant kısımda hafif bulanıklık gözlenmiştir. Bunun üzerine süpernatant kısımlar 0.22'luk filtreden geçirilmiştir.

Ultrasantrifüj işleminde ise filtreden geçirilen sıvı kısımlar diferansiyel (DF), çoklu gradyan (ÇG) ve sükroz yatağı (SY) olarak üç tüpe ayrılmış ve metotda anlatıldığı gibi santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yöntemler arasında çoklu gradient yönteminde tam bir ayrılma maalesef gözle görülememiş fakat tüp üzerine çizilen yerlerden, tahmini olarak eksozomların bulunabileceği bölgeden sıvı kısım pipetle toplanmıştır. Daha sonra sükroz yatağındaki gibi % 30'luk sükroz tüpe eklenerek toplanan kısım bunun üzerine alınmış ve yine 100.000 g'de 90 dk santrifüj yapılmıştır. En son tüpün alt kısmındaki toplanmıştır. Elde edilen eksozomlarda daha sonra karakterizasyon işlemleri yapılmıştır. Ultrasantrifüj (US) öncesi ve sonrası PBS ile seyreltilmeden tüplerdeki görüntülerden örnek **Şekil 5.1'de** verilmiştir. Burada ultrasantrifüj öncesinde sıkma limon suyunda herhangi bir parçacık ya da partikül gözükmezken kabuktan elde edilen sıvıda hem bir tam ayrışma sağlanamamış hem de istenilen süpernatant pellet görüntüsü elde edilememiştir. Bu ayrımın yapılamaması yüzünden çalışmalar sıkma limon suyu üzerinden devam edilmiştir.



Şekil 5.1. Soldaki tüp ultrasantrifüj öncesi sıkma limon suyunun görüntüsü, ortadaki resim DF ile elde edilmiş US sonrası ve en sağdaki SY ile elde edilmiş US sonrası görüntü

Kabuk kısmının parçalanmadan sonra süzülmesi ve santrifüj sonrası görüntüleri de Şekil 5.2 ve 5.3'te verilmiştir.



Şekil 5.2 Kabuk kısmının parçalayıcı sonrası süzülme işlemi



Şekil 5.3. Kabuk kısmının normal santrifüj ve ultrasantrifüj sonrası görüntüleri

5.1.1 NTA analiz sonuçları

İlk yapılan karakterizasyon işlemi NTA ile boyut analizinin gerçekleştirilmesidir. Analiz koşulları **Tablo 5.1'** de ve analiz sonucunda ölçülen eksozom boyutları **Şekil 5.4'**te verilmiştir.

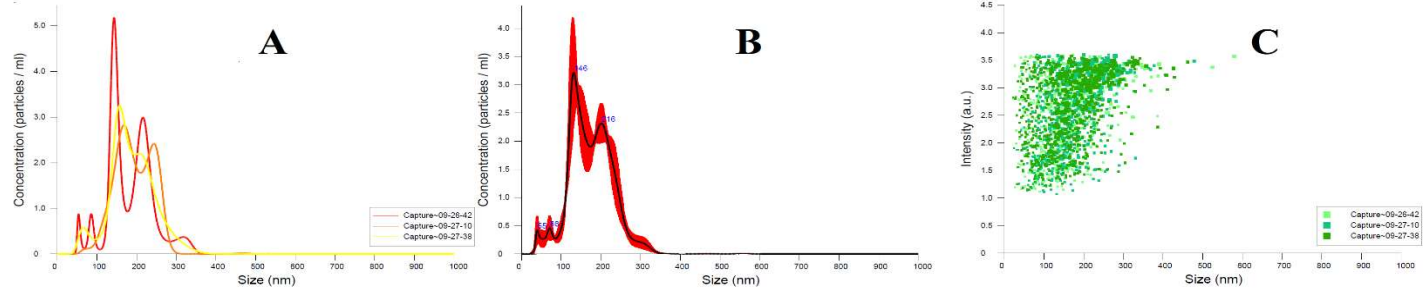
Tablo 5.1. NTA analizi yakalama ayarları ve bulguları

Yakalama Ayarları			
	DF	ÇG	SY
Kamera Tipi:	sCMOS	sCMOS	sCMOS
Lazer Tipi	Kırmızı	Kırmızı	Kırmızı
Kamera seviyesi	13	14	sCMOS
Kaydırıcı denkleştirme	1232	1259	1259
Kaydırıcı kazancı	175	245	245
Sıcaklık	22.7	23.6	23.7
Viskozite	0.936308 cP	0.9 cP	0.9 cP
Çerçeve hızı /FPS	25.0	25.0	25.0
Çerçeve sayısı	499	499	499
Dilüsyon faktörü	1x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ³
Bulgular (± Standart Hata)			
Mean:	125.75 ± 2.7 nm	116.0 ± 2.4 nm	133.1 ± 3.6 nm
Mode:	133.7 ± 7.3 nm	110.1 ± 9.9 nm	122.2 ± 6.4 nm

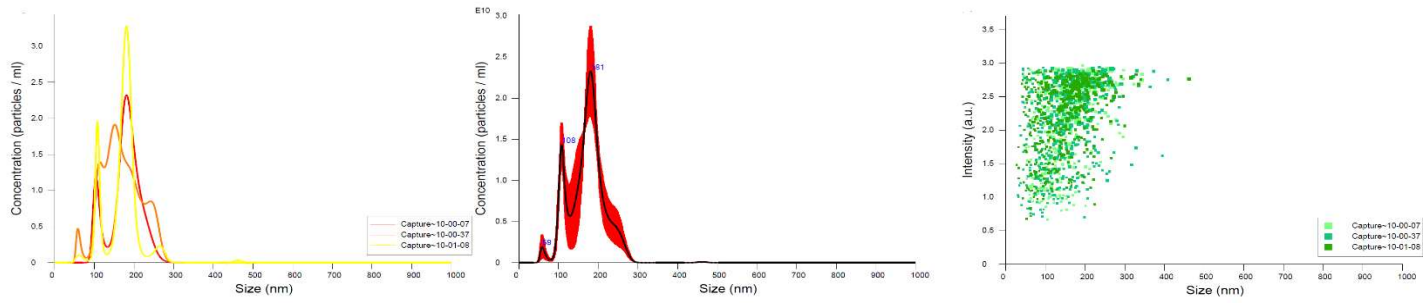
SD	56.4 ± 4.4 nm	44.9 ± 2.7 nm	59.9 ± 5.0 nm
D10	50.3 ± 2.5 nm	60.2 ± 0.6 nm	126.4 ± 4.4 nm
D50	127.3 ± 3.6 nm	117.5 ± 5.3 nm	130.2 ± 2.5 nm
D90	255 ± 2.7 nm	222.9 ± 4.7 nm	267.2 ± 2.4 nm
Partikül Sayısı (Konsantrasyon)	3.45x10 ^{e11} +/- 6.6x10 ^{e9} partikül/mL 39.6+/-1.6 partikül/çerçeve	1.78x10 ^{e11} +/- 1.89x10 ^{e10} partikül/mL 24.2+/-1.2 partikül/çerçeve	2.29x10 ^{e11} +/- 8.87x10 ^{e10} partikül/mL 31.8+/-1.0 partikül/çerçeve

Analiz sonuçlarına göre parçacıkların çapı **Şekil 5.4** 'e göre 116 nm ile 133.1 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Eksozomların yoğunluğu ise DF'lerde 3.45x10^{e11} +/- 6.6x10^{e9} partikül/mL , ÇG'lerde 1.78x10^{e11} +/- 1.89x10^{e10} partikül/mL ve SY'lerde 2.29x10^{e11} +/- 8.87x10^{e10} partikül/mL olarak belirlenmiştir.

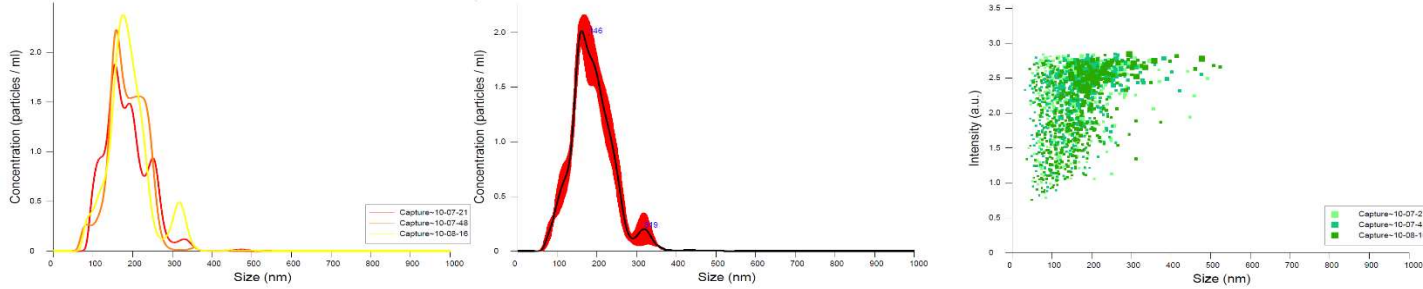
Diferansiyel US



Çoklu Gradient US

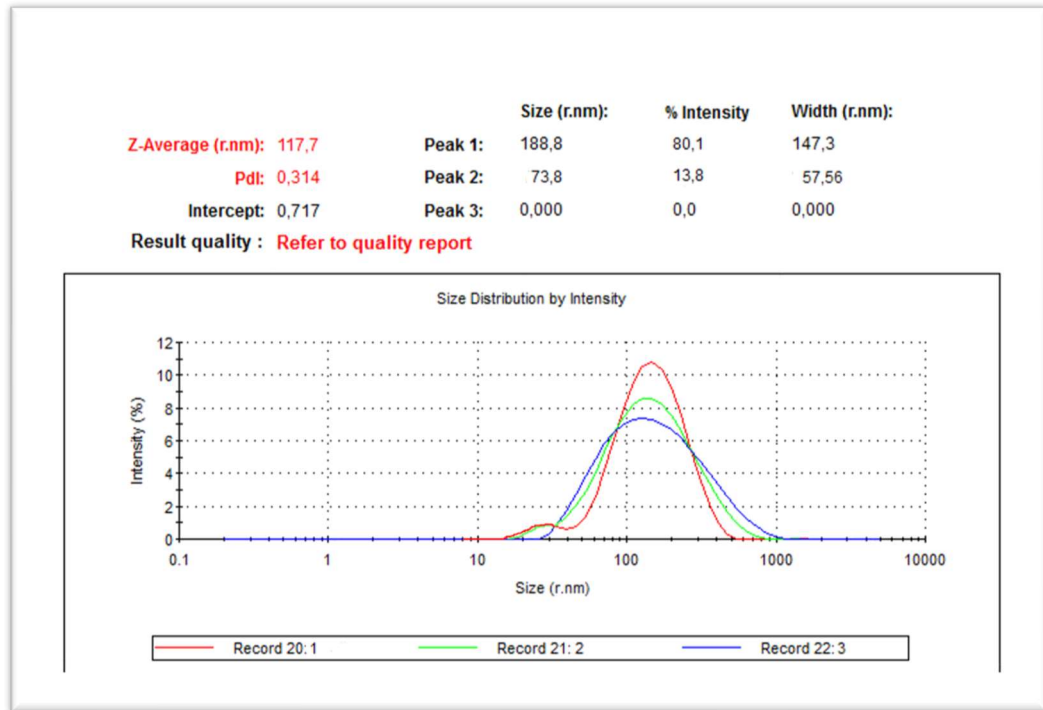


Sukroz Yatağı



Şekil 5.4. Elde edilen eksozomlarda FTLA (Sonlu hat uzunluğu ayarı) konsantrasyon / boyut grafiği (A) , Ortalama FTLA konsantrasyon / boyut (B), Yoğunluk/boyut

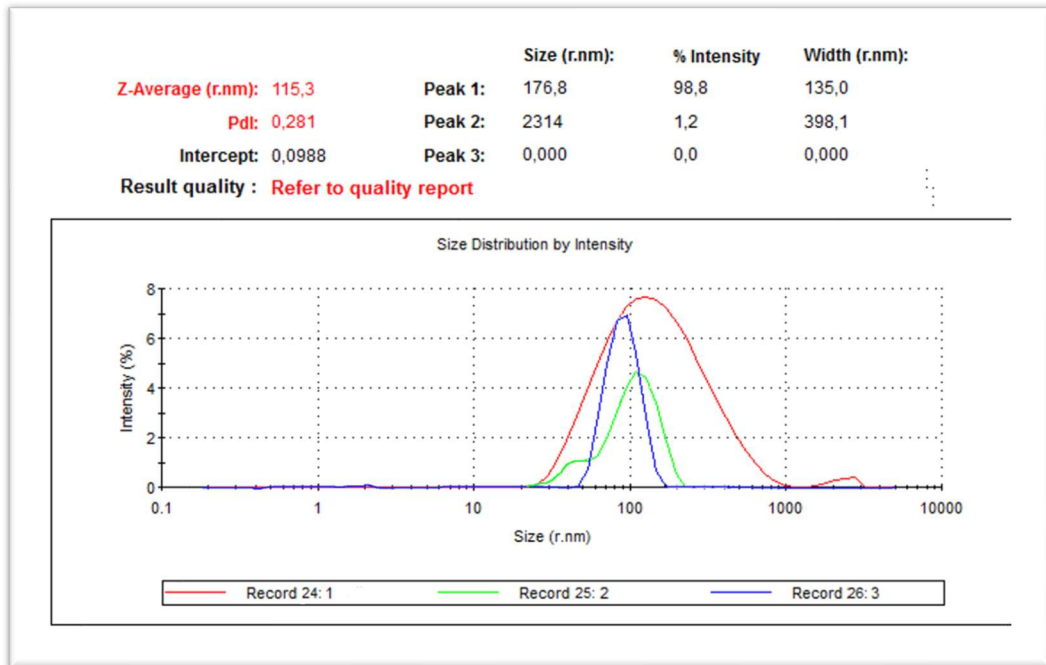
Çalışmada eksozom boyutlarının, boyut dağılımlarının ve zeta potansiyellerinin analizi Malvern NanoZS Zeta Sizer cihazı ile de yapılmıştır. Bu ölçümlerin sonuçları da aşağıda **Şekil 5.5, 5.6, ve 5.7** 'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre DF ile elde edilen eksozomların boyutu 117.7 ± 2.33 nm ve zeta potansiyel değerleri -4.59 ± 1.23 mV, ÇG ile elde edilen eksozomların boyutları 112 ± 3.51 nm ve zeta potansiyel değerleri -4.05 ± 1.22 mV, SY ile elde edilen eksozomların boyutları 115.3 ± 2.81 nm ve zeta potansiyelleri -4.24 ± 1.12 mV olarak ölçülmüştür.



Şekil 5.5. DF ile elde edilen eksozomların Malvern Zeta Sizer cihazı ile boyut (r.nm) ve boyut dağılımı (PDI) analizi sonuçları



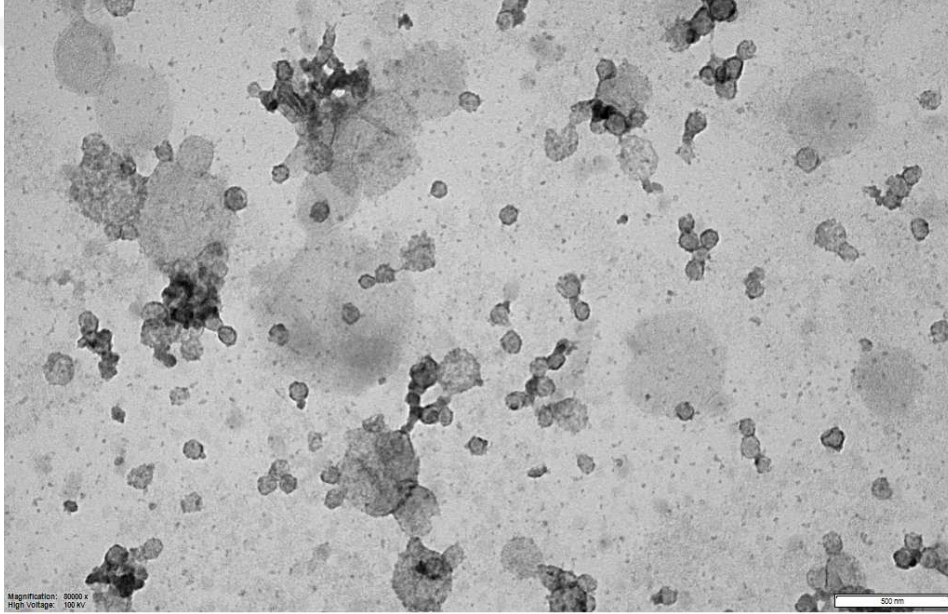
Şekil 5.6. ÇG ile elde edilen eksozomların Malvern Zeta Sizer cihazı ile Partikül boyutu (r.nm) ve Partikül boyut Dağılımı (PDI) analizi sonuçları



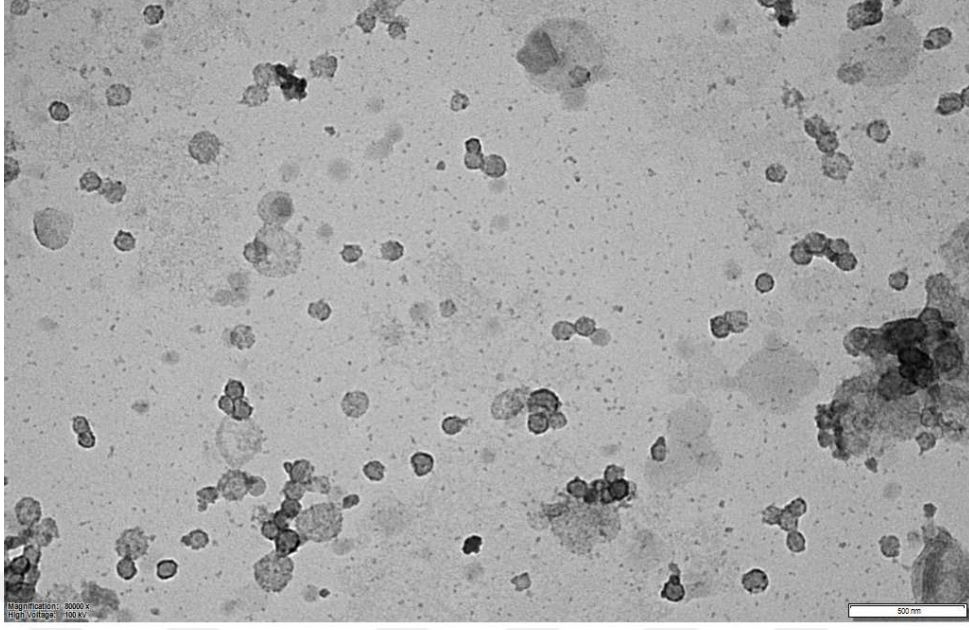
Şekil 5.7. SY ile elde edilen eksozomların Malvern Zeta Sizer cihazı ile Partikül boyutu (r.nm) ve Partikül boyut Dağılımı (PDI) analizi sonuçları

5.1.2 TEM analiz sonuçları

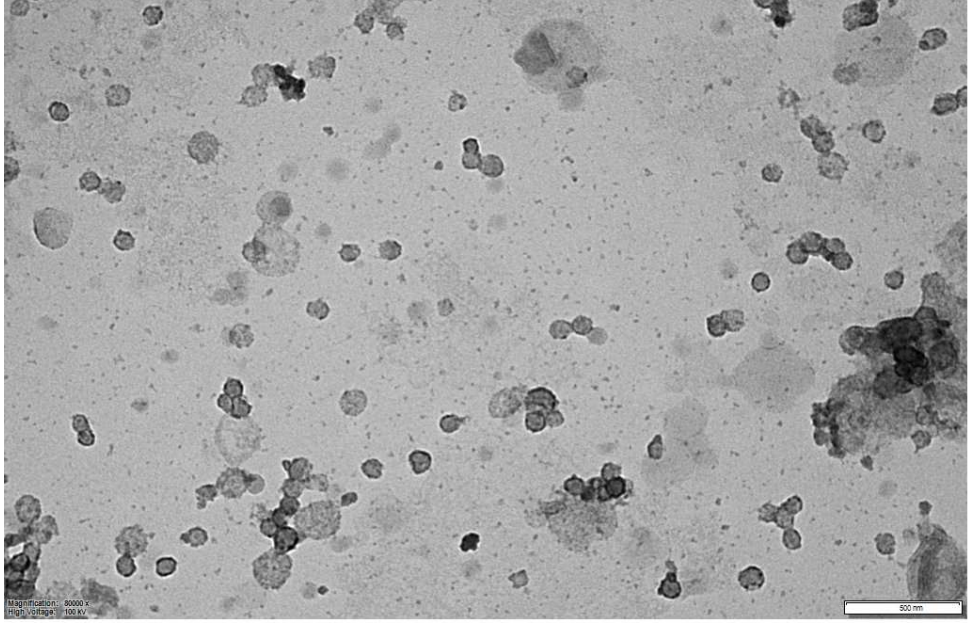
İzole edilen eksozomların morfoloji ve boyutları TEM analizi ile de gerçekleştirilmiştir. Buna göre TEM görüntüleme sonucu elde edilen eksozomların görüntüsü **Şekil 5.8, 5.9 ve 5.10** 'da verilmiştir. Yapılan analizlerde yuvarlak şekilli koyu renkli boyanan yapıların eksozom olduğu görülmüştür. Her iki yöntemde de eksozomların yaklaşık 100 nm civarında boyutlara sahip olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte % 3 uranil asetat boyama ile eksozom membranlarının daha koyu renkli boyandığı ve küresel bir morfolojiye sahip oldukları saptanmıştır.



Şekil 5.8. *DF yöntemi ile elde edilen eksozomların TEM analiz görüntüsü*



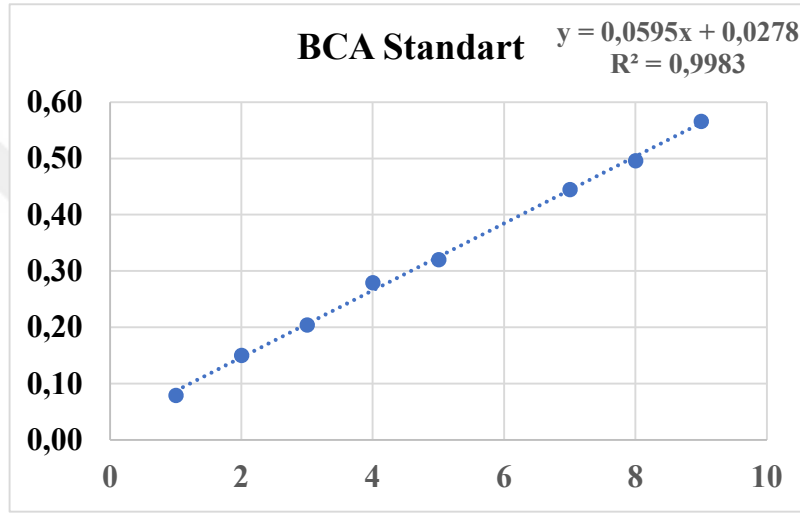
Şekil 5.9. ÇG yöntemi ile elde edilen eksozomların TEM analiz görüntüsü



Şekil 5.10. SY yöntemi ile elde edilen eksozomların TEM analiz görüntüsü

5.2 BCA analizi sonuçları

İzole edilen eksozomlarda Micro BCA kiti ile protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Kit içerisindeki Albümin ile hazırlanan standartların analizinden elde edilen eğri grafiği ve denklem aşağıda verilmiştir. Standart ile yapılan analizlerde R^2 0.99927 ve denklem $y=0.0639x+0.01$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.11).



Şekil 5.11. BCA Standart eğrisi ve denklemi

Eksozom elde etme yöntemleri sonucunda elde edilen eksozom içeriğindeki protein miktarının analizi için örneklerden 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L şeklinde miktarlar alınıp ölçümler yapılmış ve bu ölçümlere göre elde edilen absorbanlardan denklem yardımıyla içerik tayini yapılmıştır.

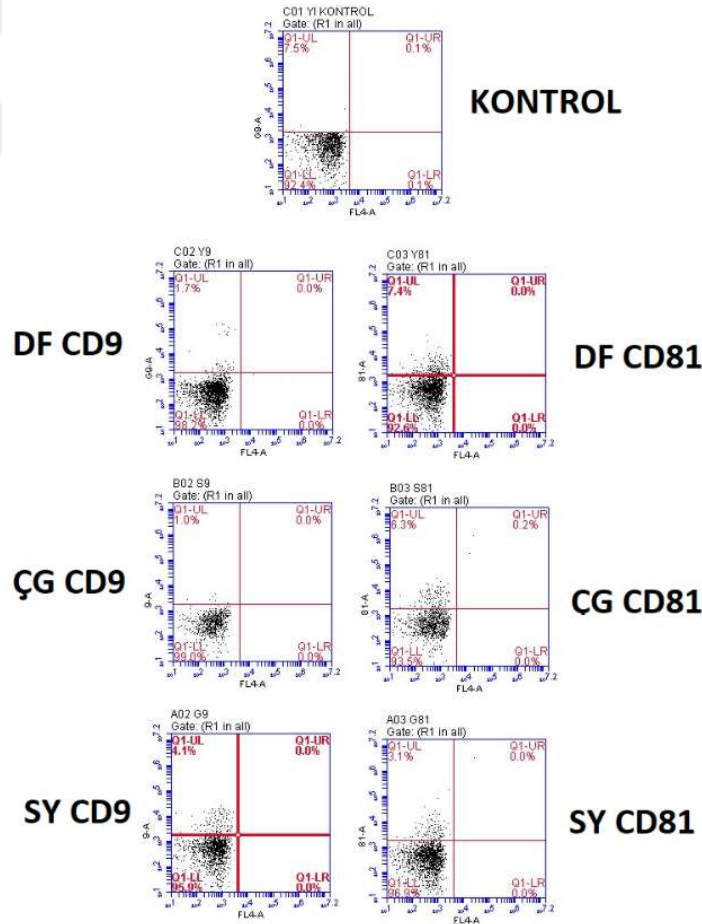
Plakalarda 3 tekrarlı olarak okunan örneklerin absorbanlarının ortalaması alınmış ve sonuç olarak DF'lerde 200,3 mg/mL, ÇG'de 130,4 mg/mL ve SY'de 153,7 mg/mL konsantrasyonları saptanmıştır.

BCA analizleri sırasında elde edilen eksozomlarda kit ile ölçümden önce RIPA Lizis tamponu uygulaması yapılarak da gerçekleştirilmiştir. RIPA Tamponu (Radyoimmünopresipitasyon Testi), sitoplazmik, nükleer ve membran proteinlerini etkili bir şekilde ekstrakte ederek hem yapışık hem de süspansiyon kültürü memeli

hücrelerinden proteinin hızlı ve etkili toplam lizisi ve çözündürülmesi için kullanılan bir lizis çözeltisi reaktifdir. Tampon protein analizleri, immünolojik testler ve protein saflaştırması dahil çeşitli uygulamalarla uyumludur. Yaptığımız ölçümlerde RIPA uygulanmış eksozomalarda DF’lerde 211,15 mg/mL, ÇG’de 135,25 mg/mL, ve SY’de 160,71 mg/mL konsantrasyonları saptanmıştır.

5.3 Eksozom fenotipleme sonuçları

Eksozomların karakterizasyonlarında immün fenotipleme de sıklıkla kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda da limondan ekstre edilen eksozomlarda CD9 ve CD81 tetraspaninlerin varlığı akım sitometri analizi ile araştırılmıştır. Buna göre elde edilen sonuçlar **Şekil 5.12**’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda CD81’in çok azda olsa eksprese edildiği gözlenmiştir.



Şekil 5.12. DF, ÇG ve SY’ye ait CD9 ve CD81 tetraspanin açısından immünofenotipik karakterizasyon sonuçları

5.4 Genetik materyal ile ilgili analiz sonuçları

5.4.1 Genetik materyal yükleme etkinliği sonuçları

Genetik materyalin uygulanan inkübasyon ve sonikasyon sonucunda DF yoluyla elde edilmiş eksozomlara ne oranda yüklenebildiğinin belirlenebilmesi için yükleme sonrası ultrasantrifüj işlemi uygulanmış ve ultrasantrifüj sonucunda hem süpernatantta hem de pellette genetik materyal miktarı spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Çalışmada eksozomlara 10 µg siRNA yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar **Tablo 5.2** 'te verilmiştir. Ölçümlerde kör olarak siRNA'nın resüspande edildiği siRNA tamponu kullanılmıştır. Analiz sonuçlarında 2 saat inkübasyon ile % 2.3 oranında, 24 saatlik inkübasyonda ise % 15.3 siRNA enkapsüle edilebilirken 3 defalık sonikasyon ile % 53.7, 6 defalık sonikasyon ile % 38.6 oranında enkapsülasyon oranı gözlenmiştir. Bununla birlikte yöntemler sırasında süpernatantta da siRNA kaldığı, bunun dışında yine bütün yöntemlerde uygulamalar sonucunda yöntemle göre yaklaşık % 20 ve % 40 dolaylarında oranlarında bir kayıpta olduğu gözlenmiştir. Bu kaybın işlemler sırasında mı yoksa etanol ile çöktürme sırasında mı olduğu belirlenememiştir.

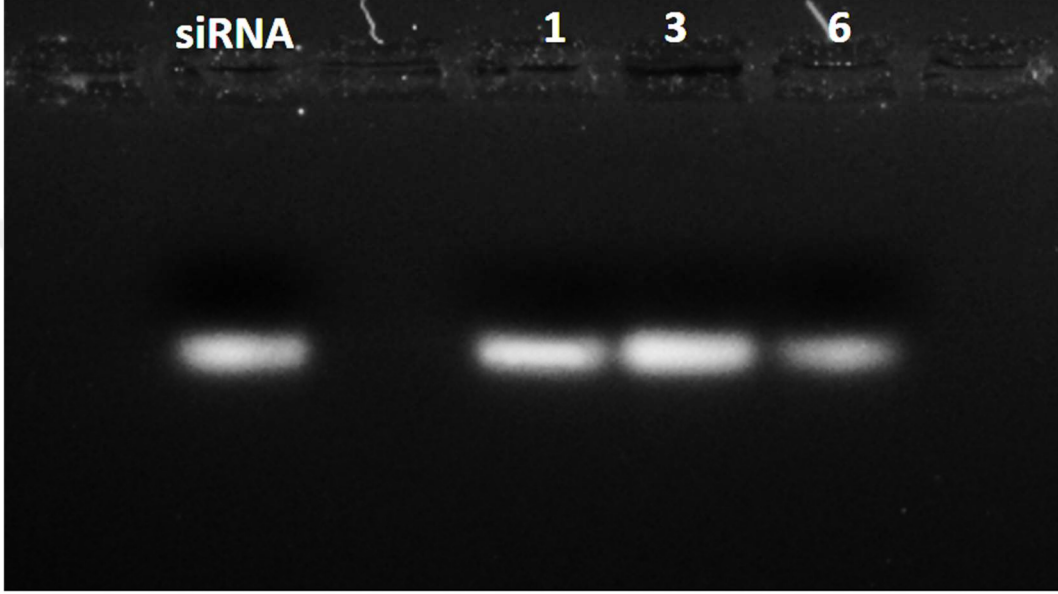
Tablo 5.2. Yükleme işlemleri sonucunda analiz edilen genetik materyal miktarları

	<i>Süpernatant (µg)</i>	<i>% oran</i>	<i>Pellet (µg)</i>	<i>% oran</i>	<i>% Kayıp oranı</i>
<i>İnkübasyon (2 sa)</i>	5.21	% 52.1	0.23	% 2.3	% 45.6
<i>İnkübasyon (24 sa)</i>	5.61	% 56.1	1.53	% 15.3	% 28.6
<i>Sonikasyon (3 defa)</i>	2.41	% 24.1	5.37	% 53.7	% 22.2
<i>Sonikasyon (6 defa)</i>	2.11	% 21.1	3.86	% 38.6	% 40.3

5.4.2 Sonikasyonun genetik materyal üzerindeki etkisinin analiz sonuçları

Çalışmamızda genetik materyal olarak kullanılan siRNA'nın eksozomlara yüklenmesi sırasında herhangi bir bozunmaya uğrayıp uğramadığının analizi için agaroz jel elektroforezi işlemi uygulanmıştır. Buna göre eksozomlara yüklenme aşamasında kullanılan sonikasyon işlemi sonunda genetik materyalin mevcut durumunun analiz edilmesi için, işlemler sonrası elde edilen genetik materyaller agaroz jele yüklenmiş, 50mV'da 1 saat yürütülmüş ve jel dökümantasyon sistemi

ile görüntü alınmıştır. Görüntü **Şekil 5.13** 'te verilmiştir. Görüntülerde kontrole göre 1 defa ve 3 defa sonikasyon uygulama da sinyal şiddetinde bir değişiklik görülmemekle birlikte 6 defa uygulamada bu sinyal şiddetinin azaldığı görülmektedir. Buda sonikasyon uygulamasının siRNA bütünlüğü üzerinde etkili olabildiği bunu içinde uygulanacak sonikasyon sayısına dikkat edilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

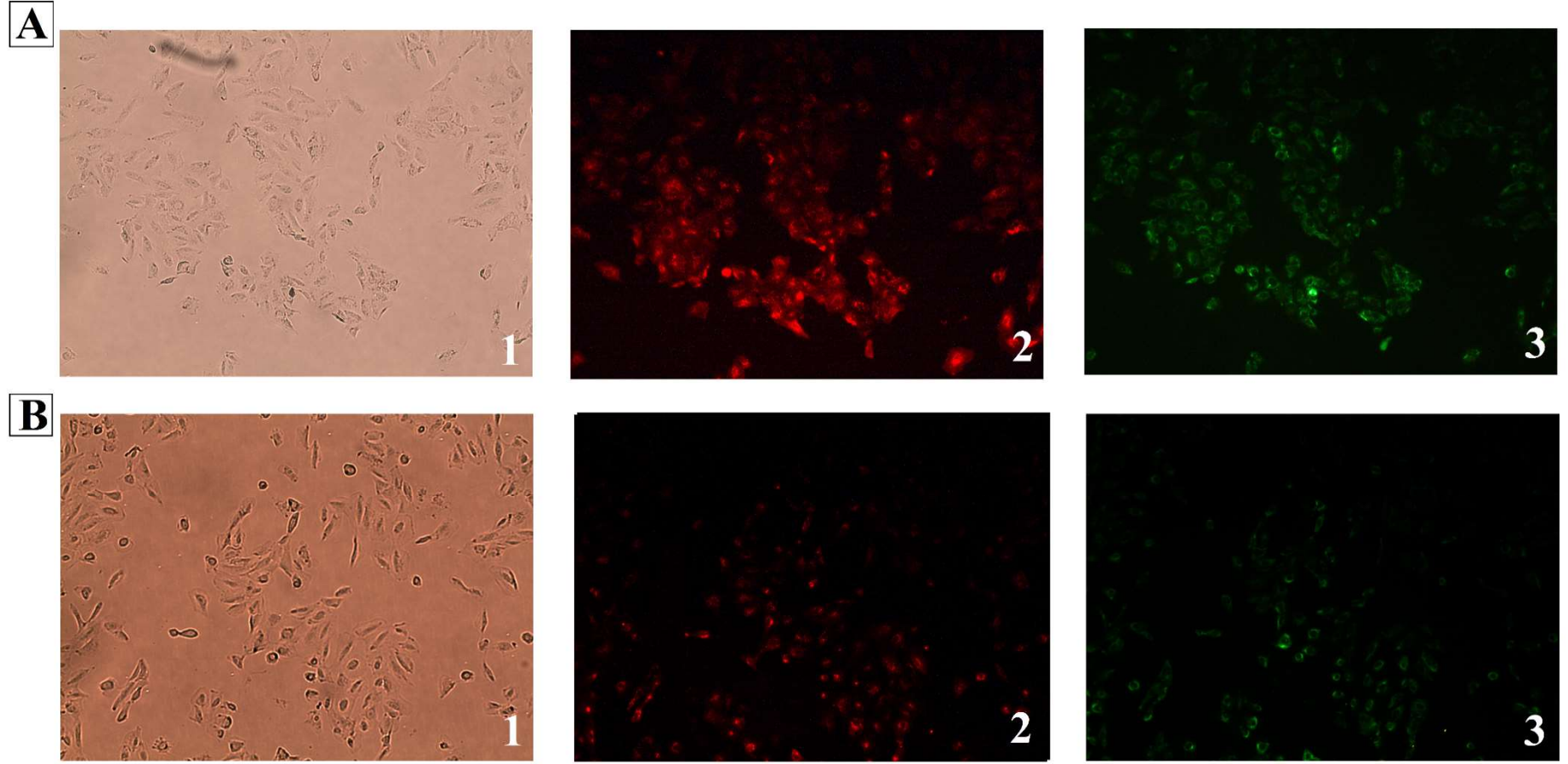


Şekil 2.13 3 dk ve 6 dk sonikasyon uygulamasının genetik materyal üzerindeki etkisinin jel elektroforezde görüntülenmesi

5.5 Transfeksiyon çalışmaları

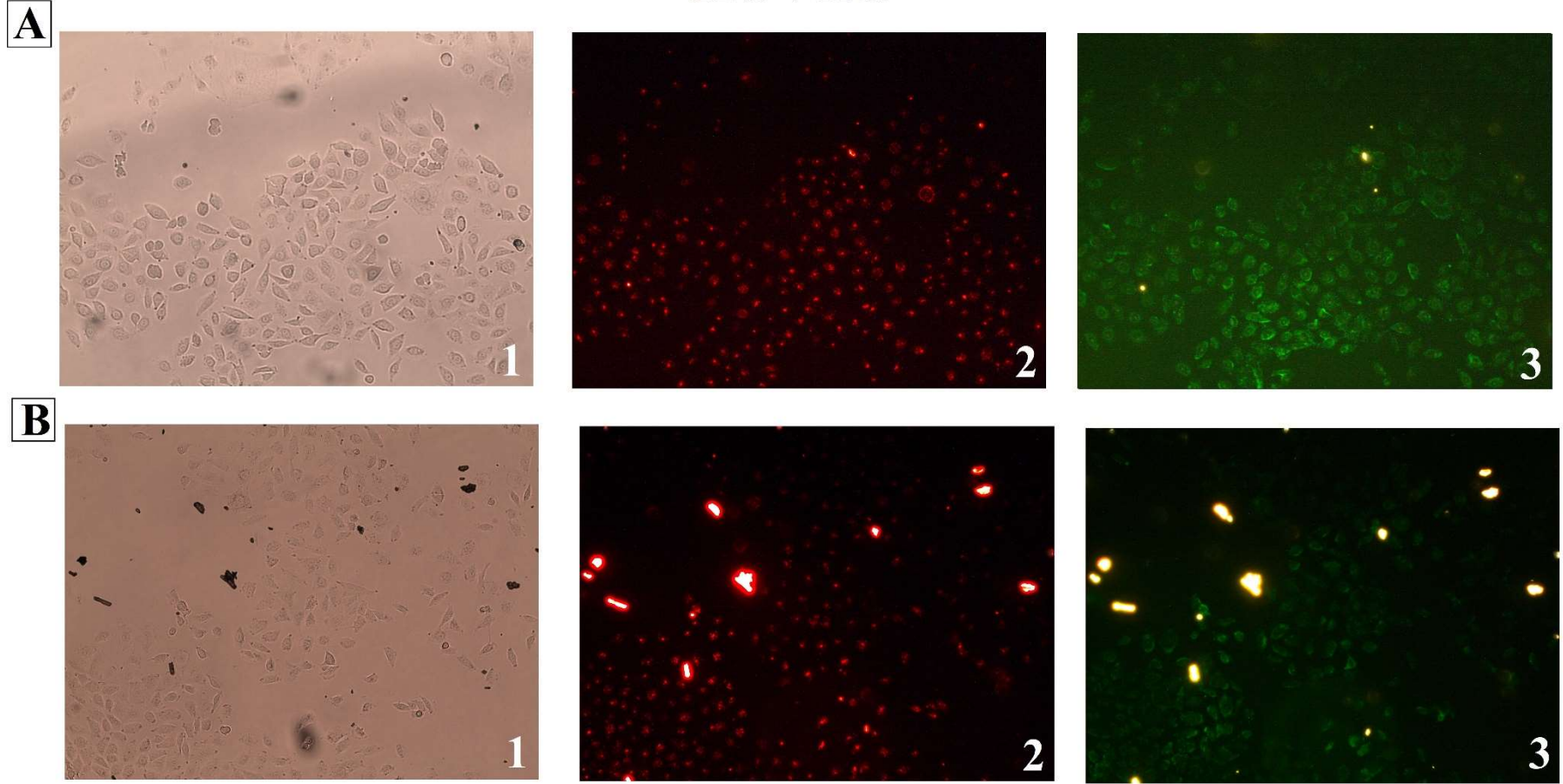
Transfeksiyon işleminde transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesinde eksozomlarda FITC konjugeli siRNA yükleme işlemi yapıldıktan ve eksozomları boyayan PKH26 boyası ile boyandıktan sonra floresan mikroskop altındaki görüntüleri alınmıştır. Hücrelere uygulamadan önce boyanmış eksozomlar ultrasantrifüj işlemine de tabi tutulmuş ve fazla siRNA ve boyanın atılması sağlanmıştır. Böylelikle 24 saatlik inkübasyon sonunda hem ultrasantrifüj sonunda hem de ultrasantrifüj yapmadan hücrelere uygulanan eksozomların transfeksiyonu sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri **Şekil 5.14** ve **5. 15** 'te verilmiştir.

A549



Şekil 5.14. *Ultrasantrifüj işlemi yapmadan (A) ve ultrasantrifüj işleminden sonra (B) A549 hücreleri üzerine uygulanan eksozomların ışık mikroskobu (1) ve Floresan Mikroskop altındaki görüntüleri. PKH26 ile boyama (1) kırmızı I3 floresan filtre ile FITCsiRNA (3) yeşil N21 filtre ile görüntüsü*

HUVEC



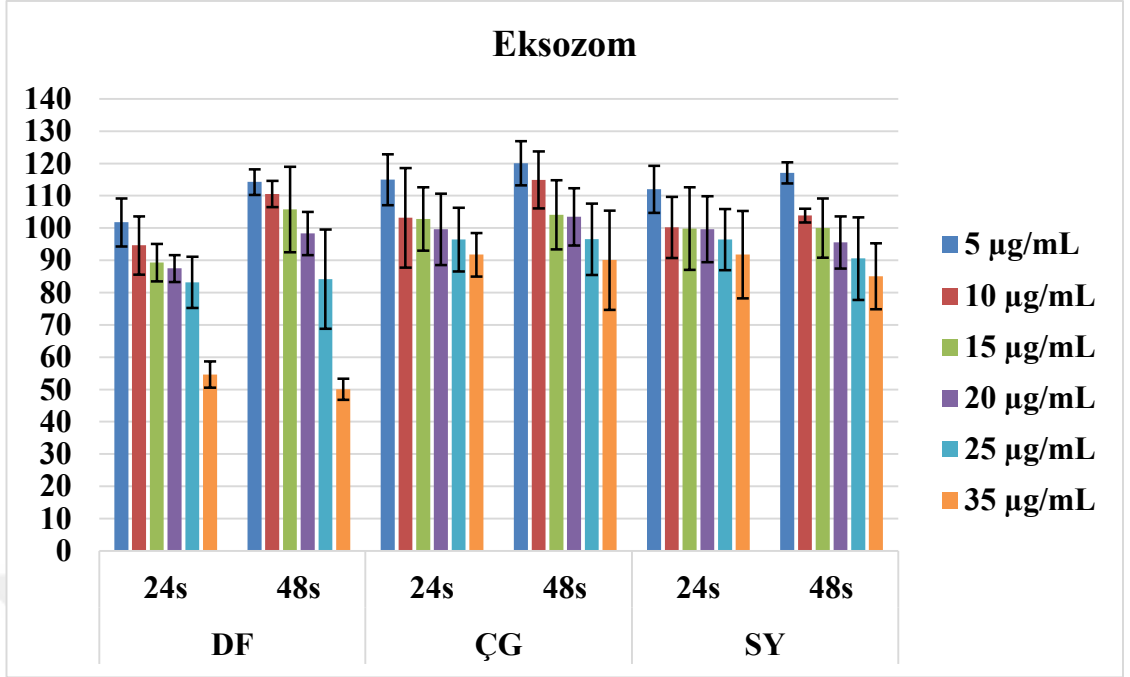
Şekil 5.15. *Ultrasantrifüj işlemi yapmadan (A) ve ultrasantrifüj işleminden sonra (B) HUVEC hücreleri üzerine uygulanan eksozomların ışık mikroskobu (1) ve Floresan Mikroskop altındaki görüntüleri. PKH26 ile boyama (1) kırmızı I3 floresan filtre ile FITCsiRNA (3) yeşil N21 filtre ile görüntüsü*

5.6 Hücre canlılık analiz sonuçları

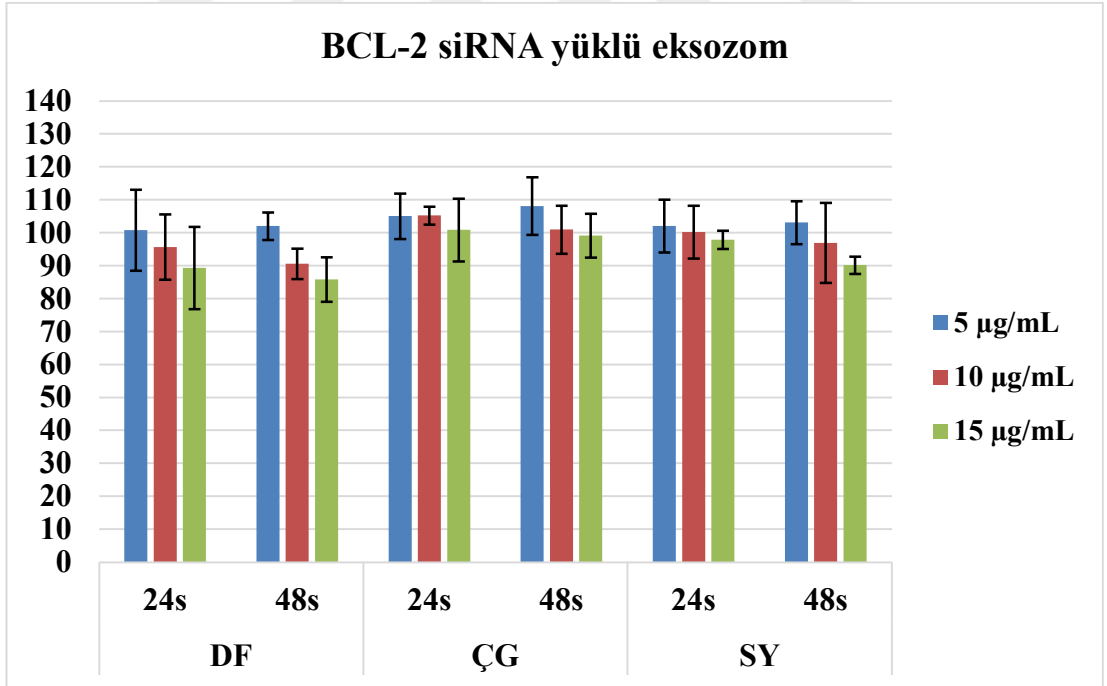
5.6.1. MTT analiz sonuçları

Hücre canlılık analizlerinden önce eksozomların hücre içerisine giriş yapabildiğinin ve genetik materyal yükleme uygulamalarından inkübasyon ve sonikasyon etkinliklerinin hangisinin daha etkili olduğunun belirlenme aşamaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için genetik materyalin en etkili şekilde yüklendiği yöntem bu çalışmalarda kullanılmıştır. Buna göre *Bölüm 5.4'te* verilen analiz sonuçlarına göre en etkili yöntem olan 6 defa sonikasyon uygulaması yapılarak genetik materyal yükleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple çalışmamızda kullanılan BCL-2 siRNA'nın eksozomlara 6 defa sonikasyon uygulama yolu ile yüklenme işlemi gerçekleştirilmiştir. BCL-2 siRNA yüklenen eksozomlar 96 plakaya ekilmiş ve % 70 hücre popülasyonuna ulaşmış HUVEC (insan umbilikal ven endotelyal hücresi), A549 (insan akciğer adenokarsinoma) ve MCF-7 (insan meme kanser hücresi) hücre hatlarına uygulanmıştır. Genetik materyal yüklü olmayan boş eksozomların ve BCL-2 siRNA yüklü eksozomların hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24-48 saat süre MTT deneyi ile analiz edilmiştir. BCL-2 siRNA yüklü olmayan eksozomların 5-35 µg/mL aralığında HUVEC ve A549 hücreleri üzerindeki hücre canlılığına etki grafikleri **Şekil 5.16, 5. 18 ve 5.20** 'de verilmiştir. BCL-2 siRNA çalışmaları yüklü olmayan eksozomlardan hücre canlılığı üzerinde fazla etkisi olmayan ilk 3 konsantrasyon (5 µg/mL,10 µg/mL,20µg/mL) denenerek ve her bir formülasyona kuyu başına 200ng siRNA olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Analiz sonuçları **Şekil 5.17, 5.19 ve 5.21** 'de grafik halinde verilmiştir. Kontrol olarak kullanılan ve sadece besiyeri ile muamele edilen hücrelerin bulunduğu kuyulardan elde edilen absorbanslar % 100 hücre canlılığı olarak kabul edilmiştir. Eksozom içeren kuyulardan 570 nm ölçülen elde edilen absorbanslar bu kontrole göre değerlendirilmiş hücre üzerindeki etkinlik % hücre canlılığı olarak hesaplanmıştır.

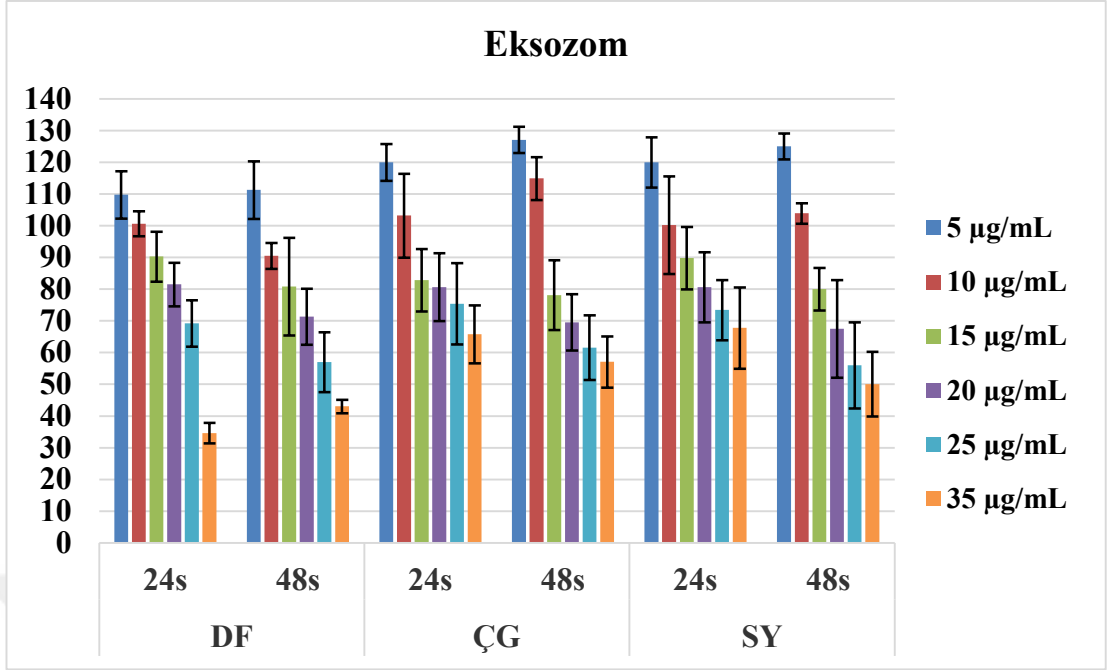
Ayrıca sonuçlarda ilk 3 konsantrasyon için yüklü olmayan eksozom ve siRNA yüklü eksozomların karşılaştırmalı grafiği **Şekil 5.22, 5.23 ve % .24** 'te verilmiştir.



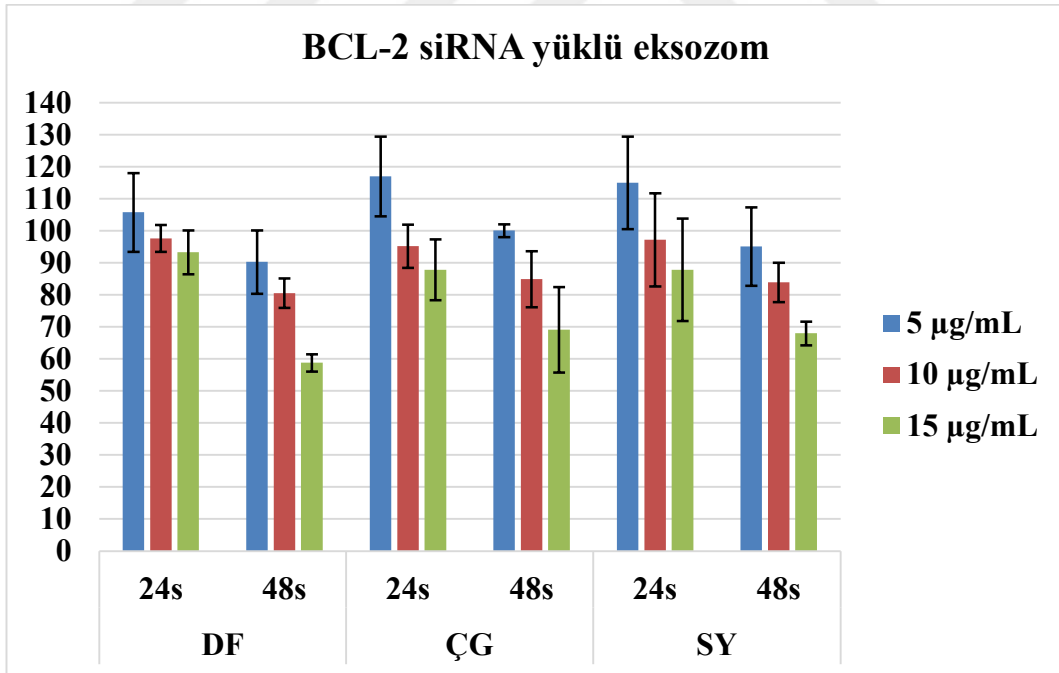
Şekil 5.16. Eksozomların HUVEC hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri



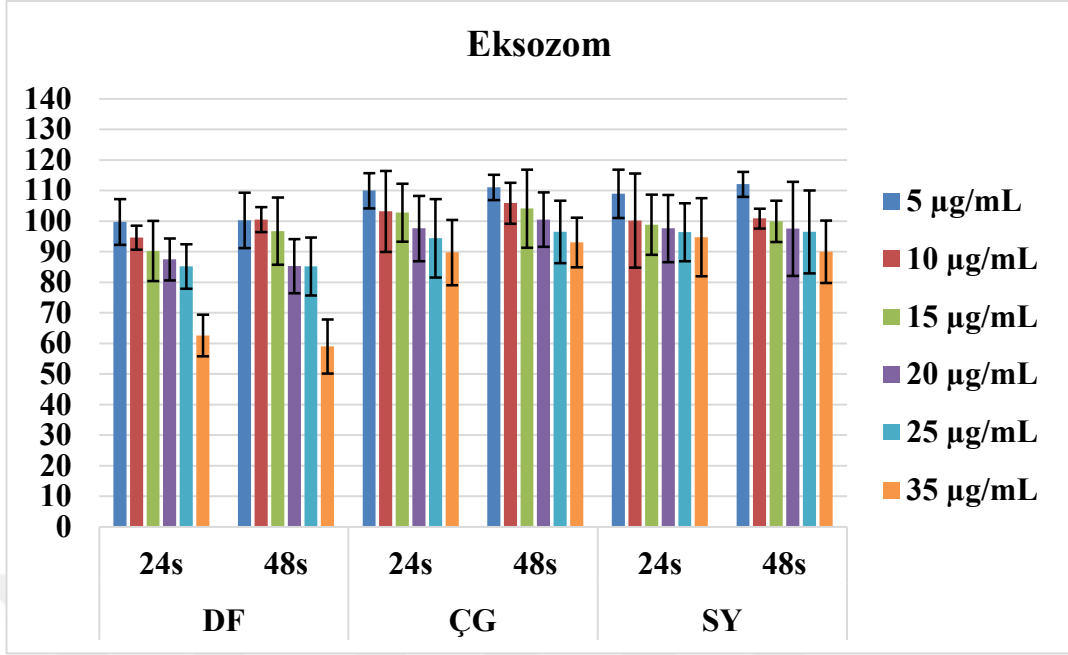
Şekil 5.17. BCL-2 siRNA yüklü eksozomların HUVEC hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri



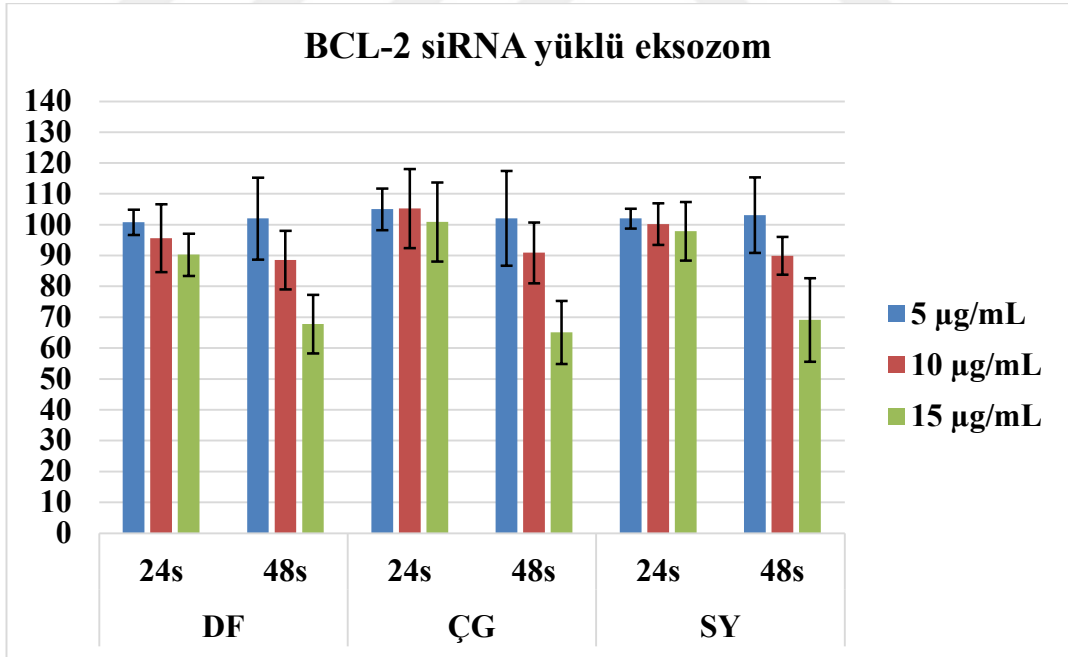
Şekil 5.18. Eksozomların A549 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri



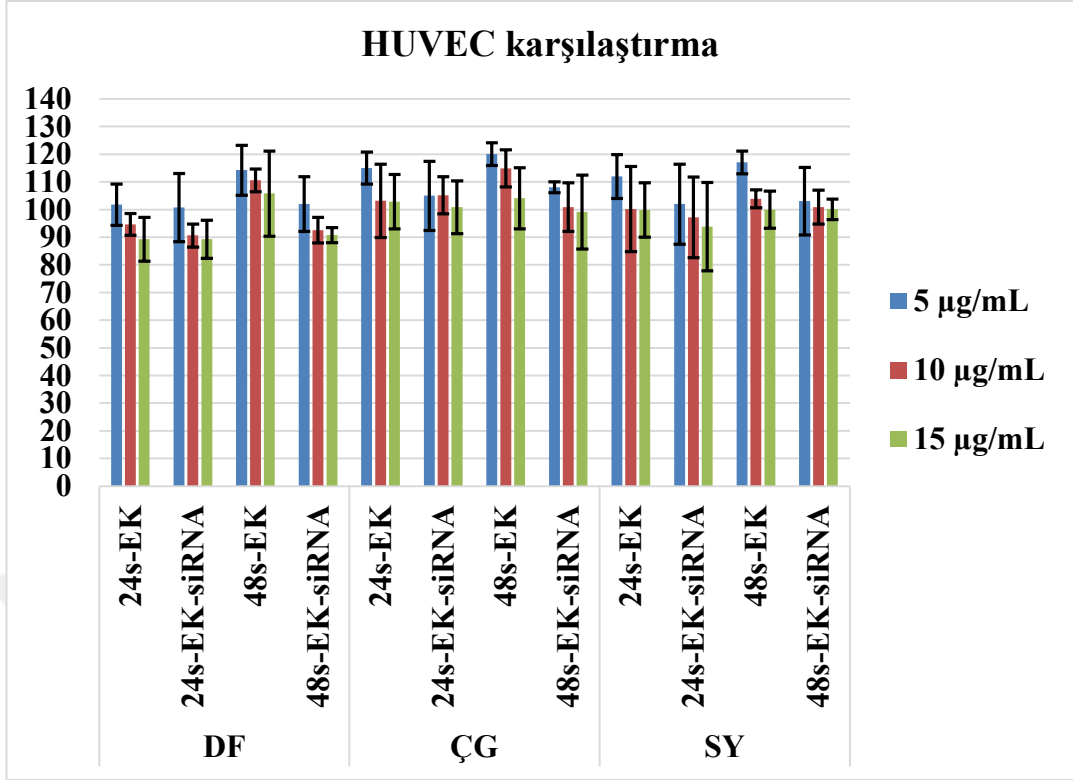
Şekil 5.19. BCL-2 siRNA yüklü eksozomların A549 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri



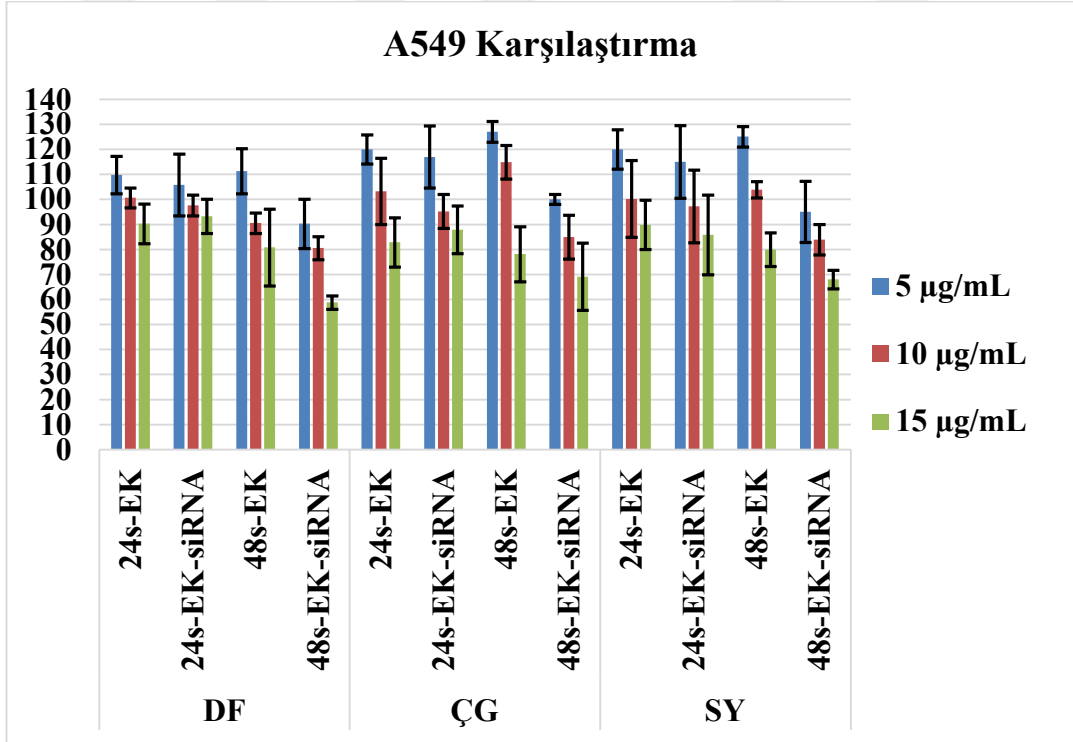
Şekil 5.20. Eksozomların MCF-7 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri



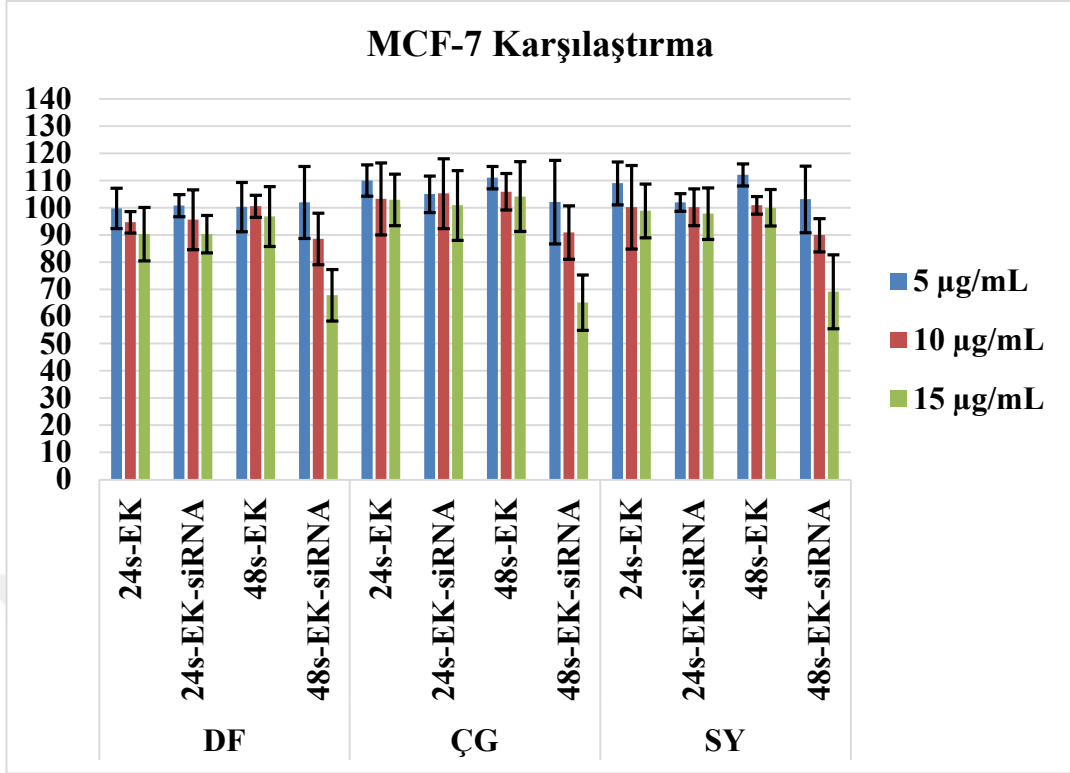
Şekil 5.21. BCL-2 siRNA yüklü eksozomların MCF-7 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri



Şekil 5.22. HUVEC hücrelerinde BCL-2 siRNA içermeyen ve içeren eksozomların karşılaştırmalı hücre canlılığı grafiği



Şekil 5.23. A549 hücrelerinde BCL-2 siRNA içermeyen ve içeren eksozomların karşılaştırmalı hücre canlılığı grafiği



Şekil 5.24. MCF-7 hücrelerinde BCL-2 siRNA içermeyen ve içeren eksozomların karşılaştırmalı hücre canlılığı grafiği

Analiz sonuçlarına göre HUVEC hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zaman bağlı bir sitotoksite göstermiştir. Özellikle DF ile elde edilen eksozomlarda en yüksek konsantrasyonda hücre canlılığının % 60'ın altına düştüğü görülmüştür. Diğer yöntemlerde ise en yüksek konsantrasyonda dahi % 80'nin altına düşmemiştir. Buna göre genetik materyal yükleyebilmek için hücre canlılığı üzerinde en az etkili olan ve hücre canlılığını kontrole yakın tutabilen 3 doz seçilmiş ve BCL-2 siRNA yüklenmesi yapılmıştır. Aynı şekilde siRNA yüklü bu üç dozda yapılan MTT analizlerinin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonuçlarında 5 µg'lık dozlarda bir fark gözlenmez iken 10 µg ve 15 µg'lık dozlarda hücre canlılığında azalmalar gözlenmiştir.

A549 hücrelerindeki hücre canlılığı etkilerine bakıldığında ise tek başına eksozomların HUVEC' lere göre daha fazla proliferasyonu azaltıcı etki gösterdiği saptanmıştır. Analizlerde 48 saatte 20 µg/mL'lik dozdan sonra hücre canlılığının % 70'in altına düştüğü saptanmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresinde ise 25

$\mu\text{g/mL}$ 'den sonra bu durum gözlenmiştir. A549 hücresi ile yapılan çalışmalarda elde edilen IC50 değerleri ise;

- DF ile elde edilen eksozomlarda 24 saatte 31.2 $\mu\text{g/mL}$, 48 saatte 26.7 31.2 $\mu\text{g/mL}$,
- SY elde edilen eksozomlarda 48 saatte 35.8 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır.

Bununla birlikte ÇG ve SY ile elde edilen eksozomların 24-48 saatlik çalışmalarında, çalışılan dozlarda IC50 değeri saptanamamakla birlikte hücre canlılıklarının çok düştüğü gözlenmektedir.

MCF-7 hücrelerine bakıldığında ise sadece eksozom uygulandığında HUVEC hücrelerine benzer bir grafik elde edilmiştir. Hafif düşmelerle birlikte hücre canlılığı sadece DF ile elde edilen eksozomlarda en yüksek konsantrasyonda % 60' a kadar düştüğü gözlenmiştir. Diğer konsantrasyonlarda ise hücre canlılığı % 85'in altına düşmediği saptanmıştır.

Yine ilk üç doz ile BCL-2 siRNA yüklü formülasyonlarda hücre canlılığına bakıldığında ilk 24 saatte % 80'nin altına düşmeyen canlılığın, 48 saatlik inkübasyon sonunda belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır.

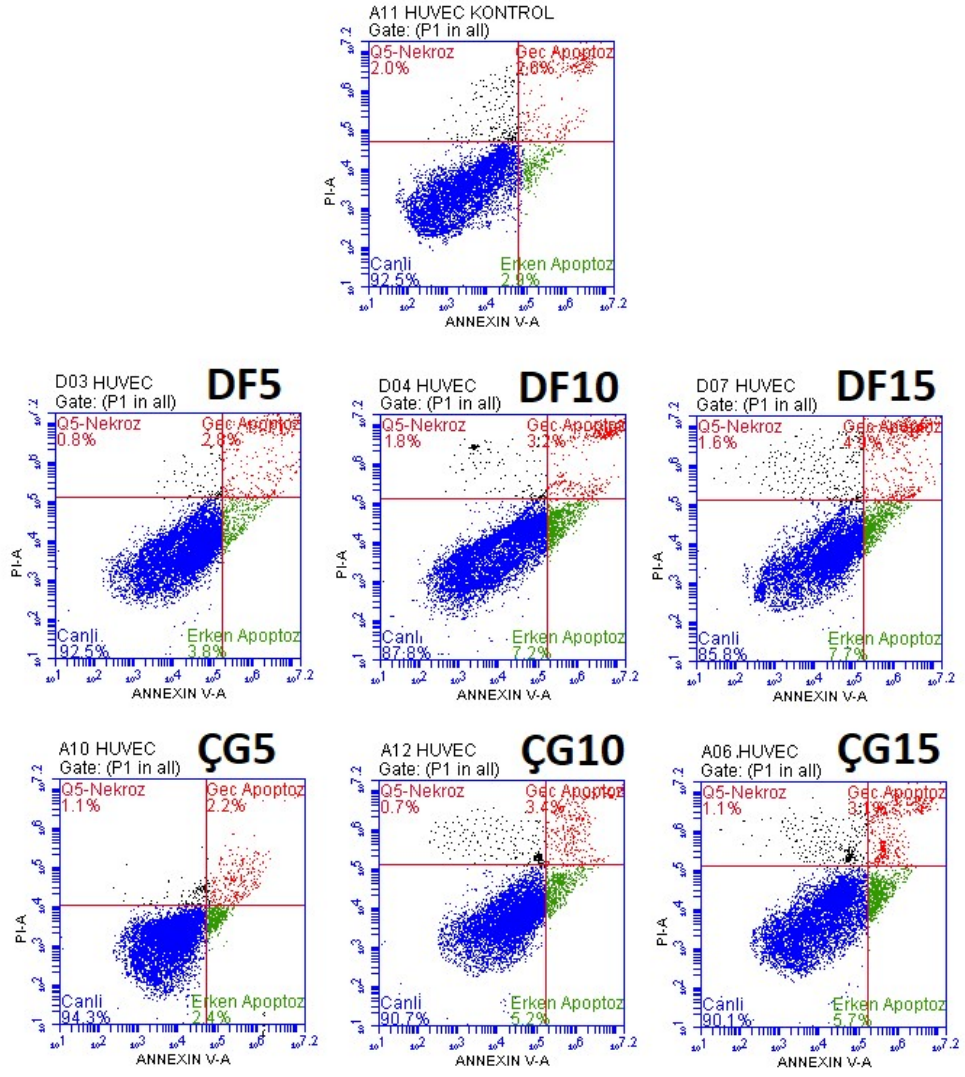
Analizlerde elde edilen bu sonuçlar **Şekil 5.22, Şekil 5.23 ve 5.24**'de verilen grafiklerde daha detaylı bir şekilde görüntülenebilmektedir. Bu grafiklerde HUVEC hücrelerinde 24-48 saatlik inkübasyonlarda tek başına ve siRNA yüklü eksozomlarda benzer ve yüksek hücre canlılıkları gözlenmiştir. A549 hücrelerinde ise yine 24 saatlik inkübasyon süresinde tek başına ve siRNA yüklü eksozomlarda benzer hücre canlılıkları gözlenirken, 48 saatlikteki canlılıktaki azalmalar göze çarpmaktadır. MCF-7 hücrelerinde ise 24 saatlik inkübasyon süresince siRNA yüklü olan ve olmayan eksozomların hücre canlılık oranları birbirine çok yakın yüksek olarak bulunurken, 48 saatlik inkübasyon sonucu hücre canlılıklarında azalmalar saptanmıştır. Bu inkübasyon süresinde hücre canlılığı % 70'in altına düştüğü gözlenmektedir. Bu sonuçlar eksozomların taşıdıkları kargoyu hücrelere ilettikleri ve siRNA'nın özellikle 48. saatte etkisini gösterdiğini düşündürmektedir.

5.6.2 Akım sitometri ile apoptotik etki değerlendirilmesi

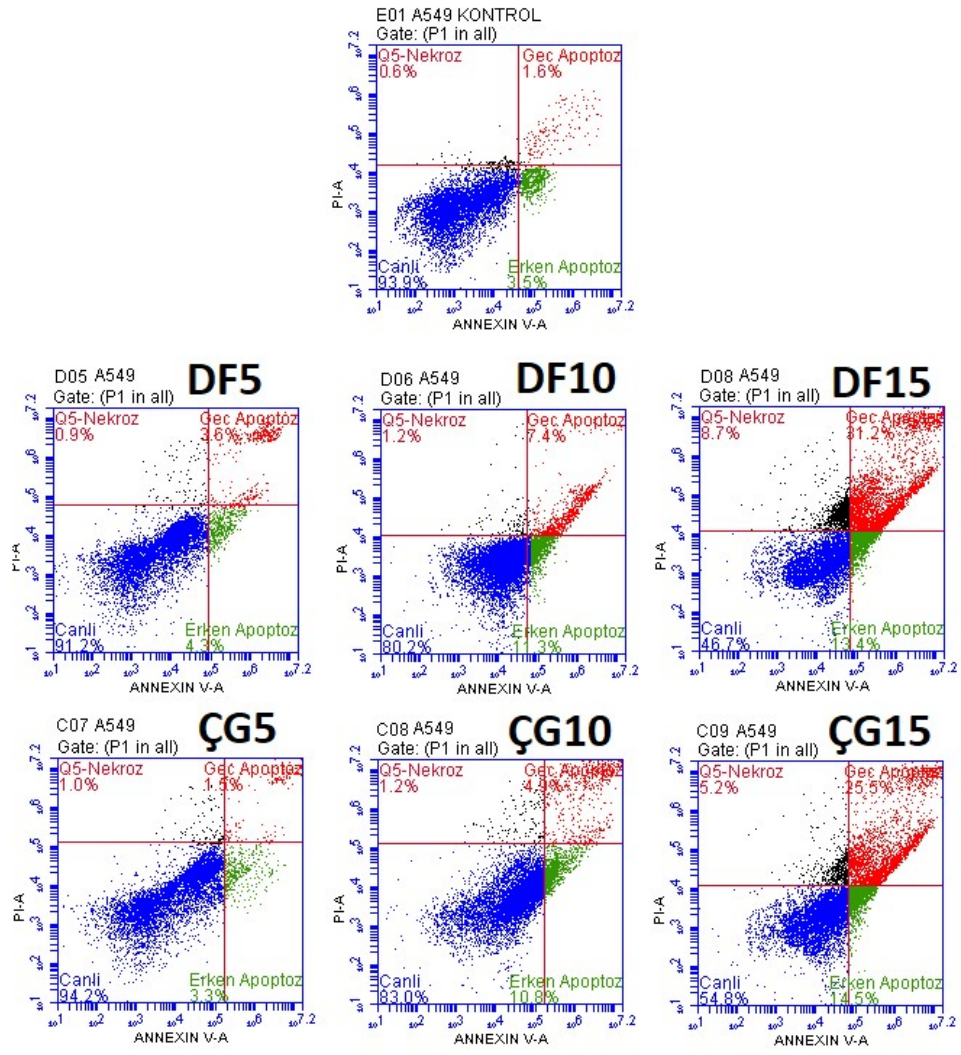
Tez çalışmalarımızda BCL-2 siRNA yüklü eksozomların A549 ve HUVEC, hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin incelenmesi için Annexin V-FITC/PI kiti kullanılmış olup analizler akım sitometri cihazı ile belirlenmiştir. MTT analizlerinde 24 saatlik sonuçlarda hücre canlılığında önemli bir düşme görülmemesi sebebi ile ilgili konsantrasyonlar için (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20µg/mL) 48 saatlik inkübasyon süresi çalışılmış ve apoptotik etkiler belirlenmiştir. Çalışılan örnekler arasında sadece BCL-2siRNA yüklenen, DF ve ÇG ile elde edilen eksozomlar çalışılmıştır. Sonuçlar **Şekil 5.22 ve 5.23** 'de verilmiştir. Bu analiz grafikleri ile birlikte **Tablo 5.3**' te çalışılan eksozom konsantrasyonlarının % canlı hücre, % nekrotik hücre, % erken apoptoz, % geç apoptoz şeklinde değerleri de verilmiştir.

Tablo 5.3. DF ve ÇG ile elde edilmiş ve BCL-2 siRNA yüklenmiş eksozomların HUVEC ve A549 hücre hatlarındaki apoptotik etkileri

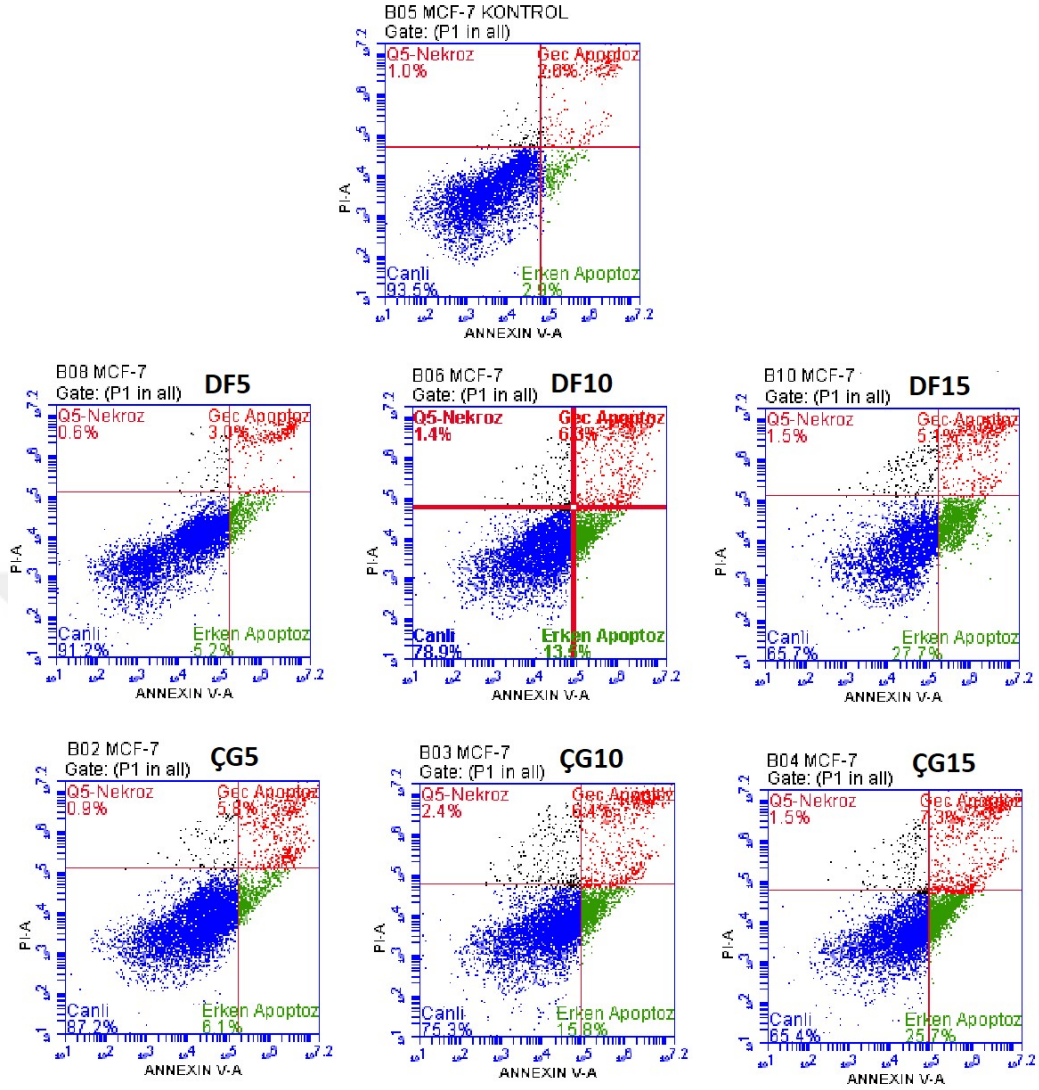
Hücreler		Canlı Hücre (%)	Nekroz Hücre (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)
HUVEC	Kontrol	92.5	2.0	2.9	2.6
	DF5	92.5	0.8	3.8	2.8
	DF10	87.8	1.8	7.2	3.2
	DF15	85.8	1.6	7.7	4.9
	ÇG5	94.3	1.1	2.4	2.2
	ÇG10	90.7	0.7	5.2	3.4
	ÇG15	90.1	1.1	5.7	3.1
A549	Kontrol	93.9	4.6	0.5	1.0
	DF5	91.2	0.9	4.3	3.6
	DF10	80.2	1.2	11.3	7.4
	DF15	46.7	8.7	13.4	31.2
	ÇG5	94.2	1.0	3.3	1.5
	ÇG10	83.0	1.2	10.8	4.0
	ÇG15	54.8	5.2	14.5	25.5
MCF-7	Kontrol	92.5	2.0	2.9	2.0
	DF5	91.2	0.6	5.2	3.0
	DF10	78.9	1.4	13.5	6.3
	DF15	65.7	1.5	27.7	5.1
	ÇG5	87.2	0.9	6.1	5.8
	ÇG10	75.3	2.4	15.8	6.4
	ÇG15	65.4	1.5	25.7	7.3



Şekil 5.25. HUVEC hücrelerinde siRNA'lı eksozomların hücreler üzerindeki apoptotik etkilerinin analiz sonuçları



Şekil 5.26. A549 hücrelerinde siRNA'lı eksozomların hücreler üzerindeki apoptotik etkilerinin analiz sonuçları



Şekil 5.27. MCF-7 hücrelerinde siRNA'lı eksozomların hücreler üzerindeki apoptotik etkilerinin analiz sonuçları

siRNA yüklü eksozomların hücreler üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için 48 saatlik inkübasyon ile analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde özellikle HUVEC hücrelerinde canlı hücre sayısı önemli düzeyde düşmediği MTT testinde de gözlenmiştir. Akım sitometrisi analizlerinde de çok düşük düzeyde erken ve geç apoptozu indüklediği belirlenmiştir. A549 hücrelerinde hem erken hem de geç apoptozu indüklerken, özellikle DF15 konsantrasyonunun % 8.7 oranında nekrozu da indüklediği saptanmıştır. MCF-7 hücrelerinde ise yüksek oranda erken ve geç apoptozu indüklediği saptanmıştır.

6. TARTIŞMA

Hücre dışı veziküller dendritik hücreler (DC), B hücreleri, T hücreleri, mast hücreleri, epitel hücreleri ve tümör hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipi tarafından üretilen nano boyutlu (30-120 nm boyutunda) veziküllerdir. Bu veziküller, geç endozomların içe doğru tomurcuklanmasıyla oluşur ve daha sonra plazma zarından füzyon ile hücre dışı ortama salınır (Vlassov ve ark., 2013; Shtam ve ark., 2013).

Prokaryotlar gibi organizmalardan daha yüksek ökaryotlara ve bitkilere kadar değişen hücreler tarafından evrimsel olarak korunmuş bir şekilde salınan ve zar içeren veziküller olan bu yapıların önemi, hücre içindeki bilgiyi diğer hücrelere aktarma ve böylece alıcı hücre fonksiyonunu etkileme kapasitelerinde yatmaktadır. Bu veziküler aracılı sinyaller, protein, lipidler, nükleik asitler ve şekerler gibi farklı biyomolekül kategorileri tarafından iletilebilir. Aynı zamanda iletilen bu bilginin hem koruma hem de salındıkları veziküler orijine uzak bölgelere bile birden fazla farklı habercinin aynı anda iletilebilmesi olanağını sağlamaktadır (Yáñez-Mó ve ark.,2015).

2011 yılında kurulan Uluslararası Hücre Dışı Veziküller Derneği (International Society for Extracellular Vesicles) bu hücre dışı veziküllerin isimlendirilmesini ve dünya çapındaki araştırmacıların bu yapılar üzerindeki çalışmaları ve metodolojilerini birleştirmek amacıyla kurulmuş ve bu alanda atılmış önemli bir adım olarak görülmektedir. Atılan bu adımlar ve yapılan çalışmalar sayesinde bugün hücre dışı veziküllerin apoptotik cisimler, hücreyel mikropartiküller/mikroveziküller/ektozomlar ve eksozomlar olarak en az 3 ana alt grubu tanımlanmıştır (Colombo ve akr., 2015; Yáñez-Mó ve ark.,2015; Wu ve ark., 2017).

Yaklaşık 20 yıldır özellikle tedavi amaçlı üzerinde çalışılan bu hücreyel veziküller tükürük, idrar, burun ve bronşiyal lavaj sıvısı, amniyotik sıvı, anne sütü, plazma, serum ve seminal sıvı gibi hemen hemen tüm vücut sıvılarından izole edilmektedir. Spesifik miRNA7mRNA, DNA, protein ve lipid profiline sahip bu veziküller köken aldıkları hücrenin bir "parmak izi" veya "imzası" olarak hücreyel kökeni ve fizyolojik durumunu yansıtabilmektedir. Bu nedenle bu veziküller ve

bunların hücreye veya duruma özgü kargoları, hücresel süreçleri daha iyi yansıtabilmekte ve çeşitli hastalıkların biyobelirteçleri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2019).

Son yıllarda veziküllerin çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni bir terapötik sınıfı olarak ilerletmişlerdir. Literatürdeki çok sayıdaki çalışmada özellikle memeli kaynaklı veziküllerin çeşitli kanserlerden nörolojik ve kas-iskelet sistemi ile ilgili bozukluklara kadar birçok patolojik durumun sonuçlarını doğrudan iyileştirebileceğini göstermiştir (Wiklander ve ark., 2019). Örneğin, murin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin (BMMSC'ler) dizlere eklem içi enjeksiyonu, fare osteoartrit modelinde eklem hasarından koruyabildiği saptanmıştır (Cosenza ve ark., 2017). Başka bir çalışmada nöral kök hücre eksozomlarının spinal kord yaralanmalarında fonksiyonel iyileşmeyi desteklerken nöronal apoptozu inhibe edebileceğini göstermişlerdir (Ma ve ark. 2019). Yine bir başka çalışmada MSC'den türetilen eksozomların intraserebral enjeksiyonu ile klinik öncesi bir Alzheimer hastalık modelinin erken evrelerinde hem korteks hem de hipokampusta amiloid (A β) plak yükünü ve sinir inflamasyonunu azalttığını göstermişlerdir (Elia ve ark., 2019).

Bu olumlu çalışmalar sayesinde özellikle 200 nm'den daha düşük nano boyuttaki hücre dışı veziküller, terapötik molekülleri kapsülleme ve biyoaktif moleküllerin hastalıklı bölgelere hedefli olarak verilmesi için yeni ilaç dağıtım sistemleri olarak (DDS'ler) kullanılması son dönemde hızla artmaktadır. Bu veziküllerin ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılması, zayıf biyoyararlanım ve hedef dışı etkiler gibi ilaçların bazı sınırlamalarının üstesinden gelebileceği düşünülmektedir (Lian ve ark., 2022). Fakat bunların ölçeklenebilirliği, immünojenisite ve memeli kaynaklı veziküllerden gelebilecek zoonotik veya insan patojenlerinin neden olduğu potansiyel enfeksiyon riski gibi zorluklar, bunların klinik kullanıma çevrilmesini sınırlamaktadır (Dad ve ark., 2021). Bu sınırlamaları aşmak için araştırmacılar biyometetik eksozomlar (Wang ve ark., 2022), biyohibritler (Ou ve ark., 2021) ya da bitkiler gibi alternatif hücre dışı vezikül kaynaklarına yönelmeye başlanmıştır.

Bitkiden elde edilen eksozom benzeri nanopartiküller (Plant-derived Exosome Nanoparticles; PEN'ler) şu anda çeşitli memeli hücrelerden elde edilen eksozomlara (Mammalian Derived Exosome; MDE) alternatif olarak kullanılabilirliği nedeniyle araştırılmaktadır ve MDE'lerin dezavantajlarını aşması beklenmektedir. Büyük ölçekli üretilebilirlikleri açısından, bitki kaynaklı eksozomlar hastalık tedavisinde ve fizyolojik, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin bir sonucu olarak çeşitli dozajları uygulayabilen nanotaşıyıcı olarak geliştirilmesinde büyük bir uygulama potansiyeline sahiptir. Örneğin, Wang ve ark. (2013) ilk olarak beyin tümörlerine terapötik ajanların taşınması için nanovektör bitki türevli eksozomları kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada 3 farklı bitkiden elde ettikleri eksozomların in vivo olarak belirli dokularda biriktiğini ve yüksek nanovektör stabilitesi nedeniyle periferik kanda uzun süreli dolaştığını gösterdiler. Ek olarak, araştırmacılar bitkilerdeki eksozom miktarını değerlendirmişler ve üzümde 1.76 mg/g, greyfurtta 2.21 mg/g ve domatesten 0.44 mg/g bulmuşlardır, bu da bazı bitkilerin büyük ölçekli PEN üretimine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Bitki kaynaklı eksozomların toksisitesini değerlendirmek için Zhang ve ark. (2016) tümörleri hedefleyebilen zencefil türevli veziküllerin (GDNV) organlarda gözle görülür doku hasarının meydana gelip gelmediğini incelemişlerdir. GDNV'lerin tümörleri hedefleme yeteneği nedeniyle, GDNV'lerin dalak ve karaciğerde birikmesinin azaldığı görülmüş, bunun da uygulanan ilaçların kan dolaşımını uzatırken ilaçların sağlıklı dokulara sistemik toksisitesinin azalmasına neden olabileceği düşünülmüştür. Kalp, karaciğer, dalak, akciğer veya böbreğin histolojik analizi, kontrol grubuna kıyasla önemli bir zarar verici etki göstermediği belirlenmiş, bunun da bitki kaynaklı eksozomların nano boyutlu bir ilaç dağıtım platformu olarak uygulanabileceğini, ilaç etkinliğini artırabileceğini ve potansiyel ilaç toksisitesini azaltabileceğini göstermiştir.

Diğer bir çalışmada ise zencefil kaynaklı eksozomlar kolona doksorubisin taşıma amaçlı kullanılmış ve organlarda gözle görülür doku hasarının meydana gelip gelmediğini incelenmiştir. Analizlerde tümörleri hedefleme yeteneği nedeniyle, zencefil türevli eksozomların dalak ve karaciğerde birikmesinin azalmış olduğu görülmüş, bunun da uygulanan ilaçların kan dolaşımını uzatırken ilaçların

sağlıklı dokulardaki sistemik toksisitesinin azalmasına neden olabileceği belirtilmiştir. Kalp, karaciğer, dalak, akciğer veya böbreğin histolojik analizi, kontrol grubuna kıyasla önemli bir zarar verici etki göstermemiş, bu da bitki türevli eksozomların bir ilaç dağıtım platformu olarak uygulanabileceğini, ilaç etkinliğini artırabileceğini, potansiyel ilaç toksisitesini azaltabileceğini ve güvenli nanotaşıyıcılar olabileceğini rapor etmişlerdir. (Zhang ve ark., 2016).

Turunçgillerden elde edilen meyve suyu dünyada en çok tüketilen meyve sularından biridir ve bu bağlamda daha önce yapılan bir çalışmada limon meyvesinden hazırlanan nanoveziküllerin insan tümör hücrelerine karşı anti-kanser aktiviteleri gösterdiği rapor edilmiştir (Raimondo ve ark., 2015).

Yapılan bir başka çalışmada ise limondan (*Citrus limon* L.) diferansiyel santrifüjleme ile 250 mL limon suyundan 920 ± 218.8 µg izole edilen veziküllerin içerdikleri küçük RNA'lar, C vitamini ve sitrat dolayısıyla mezenkimal stromal hücreler (MSC) üzerinde antioksidan görevi gördüğü gösterilmiştir (Baldini ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında eksozom kaynağı olarak limon seçilmiş ve ilk denemelerde limon kabuğu ve limon suyunda izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda limon kabukları kesilerek ayrılmış ve suyu da ya sıkılarak ya da direkt parçalayıcıya atarak limon suyu elde edilmeye çalışılmıştır. İlk yapılan çalışmalarda limon kabuğu PBS ile parçalayıcıda parçalandıktan sonra tülbent ile süzölmüş ve santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Fakat burada çok yoğun kıvamlı bir ürün elde edilmiş ve hem tülbentten süzme işleminde hem de santrifüjleme sonrasında çökelti oluşturmada zorluk yaşanmıştır. Oluşan süpernatant pelletin birbirinden ayırım işlemleri tam olarak yapılamamış her defasında pelletin tüpün dibinden havalandığı gözlenmiştir. Aynı şekilde sıkma işlemi yapılmadan kabuksız kısım parçalayıcıya atıldığında da hem süzme hem de santrifüj işlemlerinde zorluk yaşanmıştır. Her iki ürünün de 2 defa art arda 150.000 g'de 90dk ultrasantrifüj sonunda bile iyi bir ayırım yapılamamıştır. BCA ile analiz de de her seferinde farklı sonuçların saptanması, elde edilen üründe farklı proteinlerin varlığından kaynaklanan bir kontaminasyon olabileceği sebebiyle sadece eksozom taşımayacağı düşünülmüş ve bu yüzden de uygun özellikte

eksozom elde edilemeyeceğine karar verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda limonun suyunun sadece sıkılarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Eksozomların teranostik olarak uygulanmasındaki darboğaz, eksozom izolasyonunun verimsiz olmasıdır. Şu anda, tutarlı eksozom verimi sağlamak için standart bir protokol yoktur. Eksozom elde etmek için için çok fazla başlangıç materyaline ihtiyaç vardır, bu da klinik uygulamalar için uygun görünmemektedir. Genel olarak eksozomlar hayvansal ya da bitkisel kaynaklardan ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon, boyut dışlama kromatografisi, çökeltme, immünoaffinite tabanlı yakalama ve mikroakışkanlar dahil olmak üzere toplam altı strateji yoluyla izole edilebilir. Her yaklaşımın avantajları ve dezavantajları vardır ve örnek kaynağına ve eksozomların kullanım amacına göre belirlenebilir (Zhang ve ark., 2019).

Ultrasantrifüjleme, eksozomları yoğunluklarına, boyutlarına ve şekillerine göre tespit etme yeteneğine sahiptir ve avantajları arasında, büyük numune kapasitesi ile çalışma ve yüksek konsantrasyonlarda eksozomları izole etme yeteneği yer alırken dezavantajları, zaman alıcı süreç, yüksek hızlı santrifüjlemeden eksozomlara eksozom hasarı riski ve özel cihaz ihtiyacıdır. Ultrafiltrasyon, eksozomları diğer partiküllerden boyut farklılıklarına göre izole eder. Bu strateji hızlı ve taşınabilir ancak düşük saflık, kayma gerilimi, eksozom kaybı, filtre tıkanma ya da filtrasyon sırasındaki basınç sebebi ile büyük veziküllerin küçülebilmesi gibi dezavantajları vardır. Boyut dışlama kromatografisi eksozomları doğru bir şekilde ayırabilmesi ve onlara zarar vermeden izole edebilmesi avantajına sahiptir. Dezavantajı ise daha fazla ilerleme ve geliştirme gerektiren zaman alıcı süreçtir. Çökeltme yönteminde ise eksozomların çözünürlüğünden faydalanılır. Bu yöntemde çözünürlük değişimi gerçekleştirilir. Yöntemin avantajları arasında kolay ve büyük miktarlardaki eksozom numunesine uygulanabilirliği yanında eksozomlara daha az zarar verme bulunmaktadır. Bunun yanında işlemin uzun sürmesi ya da yöntem uygulama sırasında kullanılan maddelerinde çökmesi olasılığı dezavantajları arasındadır. İmmünoaffinite tabanlı yöntemde ise antikör antijen etkileşimi söz konusu olması dolayısıyla eksozom saflığını artırırken maliyeti de arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda yine düşük verim ve eksozom işlevselliğinin kaybının da söz konusu olduğu bildirilmiştir. Mikroakışkan stretejisinde ise ucuz olma, zaman kazandırma ve sadece az miktarda numune

gerektirme avantajı varken düşük duyarlılığa sahip olması dezavantajıdır (Paskeh ve ark., 2022)

Eksozomları izole etmenin geleneksel yöntemi ya da “altın standart” olarak adlandırılan yöntem ultrasantrifüjlemedir. Örneğin Webber ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada bir süktroz yatağı üzerinde bir ultrasantrifüj yönteminin kullanılmasının oldukça saf bir eksozomal fraksiyon elde edebildiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda da en yaygın kullanılan diferansiyel ve yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme yöntemleri denenmiştir. Bunlar arasında limon suyunun direkt diferansiyel ultrasantrifüjlenmesi (DF) ya da bir çoklu süktroz gradienti (ÇG) veya süktroz yatağı (SY) ile birlikte ultrasantrifüjlenmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir. Burada son iki yöntemde kullanılan süktroz yüzdeleri literatürlere bakılarak karar verilmiş ve Yöntem kısmında anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Burada kullandığımız tüm yöntemlerde eksozom eldesi sağlanabilmiştir. Sadece süktroz içeren iki yöntemde de direkt ultrasantrifüjlemeye göre daha az miktarda eksozom elde edilmiştir. Bu farklılığın sebebi de eksozom protein agregatlarının ve spesifik olarak bağlı olmayan proteinlerin olası birlikte sedimentasyonu olarak düşünülmektedir.

Eksozomların terapötik uygulamaları için çeşitli doğrulama analizlerinin ve karakterizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu amaç için kullanılan mevcut yöntemler esas olarak eksozomların boyutuna, morfolojisine ve içerik profiline yöneliktir. Eksozomların boyutlarını belirlemek için dinamik ışık saçılımı (DLS), ayarlanabilir dirençli darbe algılamayı (TRPS) ve nanopartikül izleme analizi (NTA) analizleri, morfolojilerini belirlemek için ise transmisyon elektron mikroskopunu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri uygulanmaktadır. Akım sitometrisi, western blotlama, PCR, ELISA ve kütle spektroskopisi dahil olmak üzere proteomik, lipidomik ve genomik analizleri ise eksozomların içerik profili oluşturmak için kullanılmaktadır. Yapılan bu analizlerin her birinin kendi içinde avantajları ve dezavantajları olduğundan, izole eksozomları tanımlamak için analizleri farklı yöntemlerle ama bir çok açıdan analiz etmek uygun görülmektedir (Li ve ark., 2019; Kluszczyńska ve ark., 2019) .

Bizde yaptığımız çalışmada her üç yöntemden elde edilen eksozomlarda öncelikle NTA analizleri ile boyut ve konsantrasyon, DLS analizleri ile boyut, boyut dağılımı ve zeta potansiyel analizleri gerçekleştirilmiştir. NTA, gerçek zamanlı bir görselleştirme yöntemidir ve eksozomların boyutunu, biyolojik protein biyobelirteçlerini ve konsantrasyonunu hızla belirleyebilmesini sağlar (Zhang ve ark., 2016).

Bu analizde seyreltme işleminden sonra eksozomlar bir lazer ışınıyla aydınlatılmış ve hareketleri Brown altında takip edilmiştir. NTA analizlerin de boyutlar DF'lerde 125.75 ± 2.7 nm, ÇG'lerde 116.0 ± 2.4 nm, SY'lerde 133.1 ± 3.6 nm olarak saptanmıştır. Literatür araştırmalarına göre genel olarak boyut dağılımı 30 ila 150 nm arasında değişebilen (Sidhom ve ark., 2020) eksozom boyutları görülürken, ISEV kılavuzlarına göre de 200 nm'nin altındaki veziküllerin eksozom olarak kabul edilmesi gerektiğini belirtmektedir. Tez analizlerinde örneklerin ortalama eksozom boyutu NTA tarafından elde edilen değer, eksozom boyutu sınırları dahilinde uygundur. Bununla birlikte, eksozomlar biyolojik sıvılardan ziyade bitkilerden kaynaklandığından, eksozom bileşimi için boyut eşitsizlikleri beklenmektedir. Parçacık sayısı NTA tarafından belirlenmiş olsa da, boyut dağılımındaki değişiklikler nedeniyle eksozomların protein içeriği daha ileri araştırmalara gereksinim gösterdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte DLS sonuçlarında da DF ile elde edilen eksozomların boyutu 117.7 ± 2.33 nm ve zeta potansiyel değerleri -4.59 ± 1.23 mV, ÇG ile elde edilen eksozomların boyutları 112 ± 3.51 nm ve zeta potansiyel değerleri -4.05 ± 1.22 mV, SY ile elde edilen eksozomların boyutları 115.3 ± 2.81 nm ve zeta potansiyelleri -4.24 ± 1.12 mV olarak ölçülmüştür. Buradaki sonuçlar NTA analizlerinden biraz daha küçük olarak saptanmış olmakla birlikte nispeten eksozom boyutlarının olması gerektiği büyüklükte saptanmıştır. Zeta potansiyel değerlerine bakıldığında ise bütün eksozomlarda 0'a yakın negatif değer saptanmıştır. Literatürde eksozom veziküllerinin hafif negatif zeta potansiyelinin daha uzun sistemik dolaşımda kalmasına yardımcı olduğuna dair bilgi bulunmaktadır (Luan ve ark., 2017). Bu sonuçlarda yine literatürle uyumlu olarak görülmüştür. Bununla birlikte yine literatürde zeta ölçüm için kullanılan PBS tampon konsantrasyonunun, eksozom elde edilen kaynağın ya da izolasyon yönteminin zeta değeri üzerinde etkili olduğu

belirtilmektedir. Örneğin PBS tampon içindeki iyon varlığının artışının iletkenliği değiştirebildiği bununda zeta potansiyel değerini yükselttiği bildirilmiştir. 1mM'lık bir PBS tamponu içinde eksozomların zeta potansiyel değeri -30mV düzeyinde bulunmuştur (Midekessa ve ark., 2020). Yapılan bir diğer çalışmada ginseng eksozomlarının ultrasantrifüjleme ve ExoQuick sistem (ExoQuick-TC™) ile izolasyon sonunda, sadece ultrasantrifüj sonunda -20.61 mV ve sadece ExoQuick sistem ile -28.88 mV bulunurken kombine halinde izolasyon sonucunda -29.54 mV bulunmuştur (Jang ve ark., 2023). Yapılan bir diğer çalışmada serum, plasma and CSF'ten elde edilen eksozomların zeta potansiyel değeri -6.3 ile -34.3 mV arasında değiştiği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda kullanılan 1 X PBS tamponun yaklaşık 10 mM konsantrasyonda olduğu düşünüldüğünde daha düşük negatiflikte bir zeta göstermesi olağan olarak görülmüştür. Boyut dağılımlarına bakıldığında düşük (0,400'ün altında) bir PDI değerine sahiptir ve literatür bilgilerine göre kabul edilebilir bir boyut homojenliği sergilediği gözlenmiştir.

Eksozomların karakterizasyonlarında kullanılan bir diğer analiz TEM ya da SEM ile mikroskop analizleridir. Literatürde farklı bitkilerden elde edilen eksozomların TEM analizlerinde de 30-200 nm arasında küresel yapıda oldukları saptanmıştır (Subha ve ark., 2023). Çalışmamızda TEM analizleri sonucunda her üç yöntem ile elde edilen eksozomların literatürdeki hücre dışı vezikül çalışmalarıyla tutarlı olarak 200 nm'den küçük oluğu ve yuvarlak bir morfolojiye sahip oldukları görüntülenmiştir.

İzole edilen eksozomlarda, eksozom içeriğini belirlemek için BCA testi de sıklıkla kullanılan bir diğer testtir. Bu testte numunedeki eksozomlara ait protein konsantrasyonunu analiz etmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. Testi uyguladığımızda elde ettiğimiz sonuçlar $R^2=0,9927$ ile birlikte DF'lerde 200,29 $\mu\text{g/mL}$, ÇG'de 130,4 $\mu\text{g/mL}$ ve SY'de 153,7 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları olarak saptanmıştır. Analizlerde sükröz içeren yöntemlerde daha az protein miktarı gözlemlenmiştir. Buda yine literatürle uyumlu bir sonuç olarak saptanmıştır ([http-11](http://11)). Çalışmada, nükleer, sitoplazmik ve membran proteinlerini etkili bir şekilde ekstrakte etmek için, hem yapışık olan hem de süspande haldeki memeli hücrelerinden, proteinin hızlı ve etkili çözündürülmesi için kullanılan bir lizis çözeltisi reaktif olan RIPA tamponu ile muamelesi sonrasında, liziz edilmiş toplam

proteinler BCA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlarda DF'lerde 211,15 µg/mL, ÇG'de 135,25 µg/mL, ve SY'de 160,71 µg/mL şeklinde konsantrasyonların biraz arttığı saptanmıştır. Eksozom izolasyonunda RIPA gibi lizis tamponlarının kullanımı hala tartışmalı bir konudur. Çünkü bu tamponlarında eksozomları parçalayabileceği düşünülmektedir. Fakat kullanılan tamponun miktarı ve süresi bu parçalanmada etkili olabileceği de yine bildirilen düşünceler arasındadır (Kowal ve ark., 2017). Bizde çalışmamızda bu etkinin var olup olmayacağını belirlemek istedik ve yaptığımız analiz sonucunda ölçülen protein miktarında hafif artışlar gözlemledik. Fakat bu artışların eksozomlardan mı yoksa ortamdaki eksozom harici proteinler sonucu mu ve gerçek protein miktarının bu mu olduğu belirlenememiştir. Fakat literatürde de bu hafif artışların olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Mosby ve ark., 2023). Sonuç olarak bu artışın eksozoma ait bir belirteç için miktar tayinin yapılması ile öğrenilebileceği düşünülmektedir.

Eksozomların içerikleri özellikle salgılandıkları hücreye bağlı olurken memeli hücre kaynaklı eksozomlarda genellikle tetraspaninler (CD9, CD63, CD81 ve CD82), majör histouyumluluk kompleksi (MHC) molekülleri ve spesifik stres proteinleri (ısı şoku proteinleri; HSP'ler), Tsg101 ve Taşıma için Gerekli Endozomal Sıralama Kompleksi (ESCRT-3) bağlayıcı protein ve Alix gibi seçici belirteçler bulunmaktadır. Bununla birlikte bitki kaynaklı eksozomlarda bu seçici belirteçlerde hala tartışmalı bir konudur. Örneğin literatürde buğdaydan elde edilen eksozomlarda HSP70, CD9 ve CD63 belirteçlerinin eksprese olduğu (Şahin ve ark., 2019), yine yapılan bir tezde CD63 ve CD81 biyobelirteçlerin pozitif olduğu saptanmıştır (Gürbüz, 2024). Yine literatürde çalışmalar, greylift da dahil olmak üzere çeşitli bitkilerde patellin-3, ısı şoku proteinleri (HSP), aquaporinler (AQP), klatriin ağır zinciri (Chc) ve gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) gibi oldukça bol miktarda protein keşfedilmekle birlikte son araştırmalar, sentetik protein PEN1, ABC taşıyıcı protein PEN3 ve Tetraspanin-8'in bitki kaynaklı eksozomlar için aday yüzey işaretleyici proteinler olabileceğini öne sürülmüştür. TET3, CD63'ün bir homologudur ve bitki kaynaklı eksozomlar açısından oldukça zengin olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, sınırlı deneysel veriler nedeniyle, bu bilgiler hala tartışmalıdır ve doğrulama için daha fazla araştırma beklenmektedir. Bizim çalışmalarımızda da CD9 ve CD81 için çok düşük

düzeylerde ekspresyon gözlenmiştir. Bu nedenle bu yüzey belirteçleri ile ilgili çalışmalarda tetraspaninlerin varlığının araştırılma aşamasında olduğu ve doğrulanmadığı belirtilmektedir. Bu sebeple de immünojenotipleme için daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Son yıllarda, yenilebilir bitkilerden elde edilen nanoveziküller, nanoteknoloji alanında, ilaç taşıma potansiyelleri nedeniyle pek çok bilimsel çalışmalarda yer almaktadır. Çünkü bu veziküllerin hastalıkla ilişkili hedef bölgelere, hidrofobik ve hidrofilik yapıdaki terapötik ajanlar doğal davranışları sayesinde rahatlıkla iletebilirler. Bugüne kadar bu bitkilerde üzüm, greyfurt, zencefil, limon ve havuç ile çalışmalar yapılmış ve etkinliklerini gösteren olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin üzümderden elde edilen eksozomlar, kemoterapi veya radyasyonun neden olduğu oral mukoziti tedavi etmek için ya da bağırsak dokusunu yenileyebileceğini ve patolojik hasardan sonra doku yeniden şekillenmesinde rol alabileceğini (Ju ve ark. 2013) ya da kanser, kardiyovasküler sağlık, yaşa bağlı bilişsel hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili risk faktörlerin azalmasında katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Vislocky ve ark., 2010). Zencefil veya aloe'den elde edilen eksozomların etkileri, polikistik over sendromu hastalarının tedavisi, kronik iltihabı ve insülin direncini azaltmak için bir başka çalışmada değerlendirilmiştir.

Eksozomlar, nükleik asitleri yıkıma karşı koruma konusundaki doğuştan gelen yetenekleri nedeniyle gen terapisi alanında da genetik materyallerin etkili taşıyıcıları olarak hizmet edebildiği saptanmıştır. Bu sebeple bu veziküllerin küçük interferans RNA (siRNA) ve kodlamayan RNA'lar veya miRNA'lar taşımak suretiyle genlerin ekspresyonunu değiştirmek, bozmak veya etkilemek için genetik tedavide kullanılması da popülerlik kazanmıştır (Ha ve ark., 2010). Eksozom dışında lipitler, miseller, dendrimerler, polimerik nanopartiküller ve inorganik nanopartiküller tabanlı stratejiler dahil olmak üzere geliştirilen çeşitli nanopartiküller ya da emülsiyon yapıdaki formülasyonlar gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır (Butreddy ve ark., 2021; Khalid ve ark., 2023) Yine de, bu yaklaşımların büyük çoğunluğu özünde doğada sentetiktir ve in vivo uygulamalarında immün veya inflamatuvar yanıtların indüksiyonu ve toksikolojik sınırlamalar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik engellerle karşı karşıyadır. Eksozomların doğal, hücre kaynaklı ilaç taşıyıcıları olarak kullanılması, bu

sınırlamaların çoğunu bertaraf etmekte ve bir bitkiden kolaylıkla elde edilebilecek bir taşıyıcı yardımıyla hastalıklarının tedavisi için ilaç taşıyıcıları oluşturmak için kullanılabilme potansiyeli oluşturabilmektedir (Sen ve ark.;2023).

Eksozom da genetik materyal yükleme yöntemleri arasında etkin maddelerin ve eksozomların birlikte inkübasyonu, elektroporasyon, ultrasonikasyon, ekstrüzyon, donma-çözülme yer almaktadır. Eksozomlara genetik materyal yükleme için kullanılan inkübasyon yöntemi aslında ideal bir yöntem olarak gözükmemektedir. Kullanımı kolaydır ve eksozom yapısına zarar vermez fakat yapılan literatür çalışmalarında yükleme etkinlikleri çok düşük bulunmuştur, bununla birlikte hidrofilik moleküller için uygun bir sistem değildir. Örneğin yapılan çalışmalarda 1sa-24 sa arasında yapılan inkübasyon işlemlerinde genellikle oda ısısı ya da 37 sıcaklık kullanılmış ve ortalama % 3 ile % 37 arasında değişen fakat genellikle % 12-15 oranlarında yükleme etkinlikleri saptanmıştır (Poinsot ve ark., 2024).

Elektroporasyon, hızlı ve yüksek yükleme (% 60'a kadar) verimine sahip bir tekniktir. Yöntemde elektrik darbeleri geçici olup, lipit çift membranında mikro gözenekler oluşturarak kimyasalların girişine izin verir. Dezavantajları ise membran bütünlüğünde önemli kayıplar ve olası protein yıkımıdır. Bir başka etkili ancak daha az test edilmiş yöntem, ilacın ve eksozomların 100 ila 400 nm'lik bir membrandan birlikte geçmek zorunda olduğu ekstrüzyondur. Bu işlem sırasında, proksimal ilaç molekülleri de dahil olmak üzere eksozom zarı yok edilir ve yeniden oluşturulur (Donoso-Quezada ve ark., 2016; Poinsot ve ark., 2024).

Terapötik EV'lerin oluşturulması için sonikasyon potansiyel bir yükleme yöntemi olarak tanımlanmıştır. Sonikasyon ile sağlanan elektromanyetik dalgaların eksozom-zar bütünlüğünü zayıflatılması böylelikle ilacın eksozom içine girişini kolaylaştırmasıdır. % 30'a yakın yükleme oranına izin verir (Poinsot ve ark., 2024). Hem hidrofobik hemde hidrofilik moleküllerin geçişine olanak sağlamaktadır (Haney ve ark., 2015). Sonikasyon yoluyla eksozomlar, elektroporasyondan daha az siRNA agregasyonuna sebep olduğu literatürde belirtilmiştir (Li ve ark., 2018). Bunun yanında, eksozomlar aracılığıyla alıcı hücrelere taşınan siRNA'ların miktarı hala sınırlıdır ve sonikasyonun ile gerçekleşen membran bozulması dezavantajları

arasındadır. Sonikasyon parametrelerinin optimize edilmesi, yükleme verimliliğini artırmak için gerekir. Yükleme yöntemlerinin optimizasyonu ve geliştirilmesi ile eksozomların kanser tedavisine uygulanabilir hale gelmesini mümkün kılacaktır. Elektroporasyon dışında sonikasyon gibi eksojen yükleme yöntemlerinin geliştirilmesi, kargonun eksozom içine aktarılmasında kolaylıkla kullanılmasında kritik öneme sahip olacaktır.

Tez çalışmamızda eksozomlara genetik materyal kullanımı için inkübasyon ve sonikasyon yöntemleri denenmiştir. Literatürde belirtildiği üzere eksozom yapısına zarar vermemesi için kullanılan inkübasyonda 2 saat ve 24 saat denemeleri yapılmış fakat yeterli genetik materyal yüklenemediği sonucuna varılmıştır. Yükleme oranlarının belirlenebilmesi için eksozom ile genetik materyal inkübasyon sonrasında ultrasantrifüj işlemi uygulanmış ve işlem sonucunda hem pellet hemde süpernatantta genetik materyal analizi yapılmıştır. Bu analizler için her kısma da % 99'luk soğuk alkol eklenip santrifüj yapılmış ve genetik materyalin dibe çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra tüp içindeki alkol uzaklaştırılıp tüp kurumaya bırakılmış ve siRNA dilüent tamponu ile resüspande edilip NanoDrop ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız çalışmada yükleme oranı pellet için 2 saatlik için % 2.3 ve 24 saat için % 15.3 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte ultrasantrifüj sonunda süpernatantta da genetik materyal kaldığı belirlenmiştir. Sonikasyon ile yükleme işleminde ise daha yüksek bir oran saptanmıştır. Sonikasyon işleminde de 3 defa sonikasyon sonucunda % 53.7 ve 6 defa sonucunda % 38.6 oranında yükleme oranı saptanmıştır. Bu işlemde de inkübasyon işleminde yapılan basamaklar uygulanmış ve yine süpernatantta inkübasyondakine göre daha az olmakla birlikte genetik materyal olduğu saptanmıştır. Bunun sebebinin genetik materyalin organik çözücülere göre sulu fazda (polar çözücü) daha çözünür (He ve ark., 2022) olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Çalışma sırasında pellet ve süpernatanttaki ölçümlerde çalışılan genetik materyalin tamamının geri elde edilememiş ya da hesaplanamamış olması çalışma sırasında özellikle alkol ile ekstraksiyon sırasında da kayıplar olabildiğini düşündürmektedir.

Yükleme oranları haricinde yaptığımız sonikasyonun genetik materyal üzerindeki etkisi de agaroz jel elektroforezi işlemi ile değerlendirilmiştir. Buna göre saf siRNA üzerinde 1 defa, 3 defa ve 6 defa sonikasyon işlemi uygulanmış ve

siRNA’larda 1 ve 3 defalık’ta belirgin bir değişim gözlenmez iken 6 defa uygulama sonucunda siRNA şiddetinde azalma görölmüştür. Jel üzerinde daha küçük fragment ya da smear şeklinde herhangi bir görüntü görölmemekle birlikte sinyal şiddetindeki azalma dolayısıyla 6 defa sonikasyon uygulamasının siRNA üzerinde kırııcı etki gösterdiği düşünölmektedir.

Tez çalışmamızın bir diğer basamağında hazırladığımız eksozomların hücre içine girişlerinin değerlendirilmesi idi. Bunun için transfeksiyon yönteminden yararlanılmıştır. Eksozomların lipoprotein membranlarını etiketlemek için Dil, DiD, PKH26 ve PKH67 gibi bazı lipofilik özellikteki floresan boyalar kullanılmaktadır. Çalışmamızda önce FITC konjugeli siRNA sonikasyon ile eksozomlara yüklenmiş ve daha sonra lipofilik boyalardan PKH26 kullanılarak eksozomlar işaretlenmiştir. Analiz sonucunda floresan mikroskopta yeşil ve kırmızı filtrelerde hücre içerisindeki ışımalar eksozomların hücre içine geçtiğini göstermiştir.

Tüm karakterizasyon işlemlerinden sonra hazırlanan eksozomların hücreler üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Geliştirilen yeni ilaç molekülleri, aday taşıyıcı sistemlerin klinik olarak değerlendirilmesinden önce laboratuvar koşullarında hücre dizileri üzerinde değerlendirmek farmasötik alanda önemli bir yer tutmaktadır. Bununla birlikte hücrelerin canlılığı üzerindeki araştırmalarda kullanılacak bu etkin maddelerin, hücre metabolizmasının ve/veya çoğalmasının inhibisyonu şeklinde sitostatik etki veya gerçek hücre ölümü şeklindeki sitotoksik etkili mi olduğunun anlaşılmasıyla değer kazanmaktadır. Bu nedenle her iki yönden araştırılması uygun olmaktadır. Bu araştırmalarda da MTT ile enzim aktivitelerinin, floresan boyalarla boyanan ölü hücre sayısının eş zamanlı analizleri ya da Western blotlama ile farklı hücre ölümü yöntemleriyle ilişkili sinyal yollarının düzenlenmesine katılan proteinlerdeki değişikliklerin araştırılması yöntemlerinin birlikte kullanılması önemlidir (Sazonova ve ark., 2022). Biz de çalışmamızda hazırlanan eksozomların hem tek başlarına hem de BCL-2 siRNA yüklü eksozomların etkinliklerini HUVEC, A549 ve MCF-7 hücreleri üzerinde araştırdık. Bu etkinlikler MTT ve Aneksin V ile sitotoksiste ve apoptotik durum özelliklerinin belirlenmesi şeklindedir.

Bizim çalışmamızda DF ile elde edilen eksozomların tek başına hücreler üzerinde uygulanmasında HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığına anlamlı bir etki görülmezken, özellikle A549 hücrelerinde doza ve zaman bağlı sitotoksikite saptanmıştır. Bununla birlikte sükröz içeren yöntemde çalışılan hücrelerde bu canlılık düşüşü gözlenmemiş ve 48 saat sonunda bile hücre canlılığı % 80'in altına düşmediği gözlenmiştir. Literatürde bitkisel kaynaklı eksozomların normal hücreler üzerinde sitotoksik etki yaratmadığı belirtilmiştir. Buda kanser hücrelerini öldürmede normal hücrelere zarar vermeden tedavi olanağı sağlanabileceğini düşündürmektedir (Kim ve ark., 2020). Bu açıdan sonuçlarınız uyumlu gözükmektedir. Literatür incelemelerinde sükrözün hücre canlılığını arttırıcı ya da koruyucu bir özelliği ile ilgili bir bilgiye rastlanmamış olmasına rağmen bir makalede hücreyi tehlikeye sokabilecek durumlarda, yaklaşık 0.25 M'lık konsantrasyonlardaki sükrözün osmotik koruyucu olarak kullanılabileceği buradan da hücre canlılığını koruyucu etkisi olabileceği rapor edilmiştir (Carvalho ve ark., 2018).

Bitki kaynaklı eksozomların uygulanmasıyla ilişkili, iltihaplanma veya toksisite kanıtı olmaması gibi avantajlara sahip olmakla birlikte yapılan araştırmalarda antienflamatuvar, antioksidan ve antikarsinojenik etki göstermeleri bu moleküllerin avantajları arasında yer almaktadır (Bai ve ark., 2024). Örneğin literatürde sınırlı sayıda çalışmalardan birisinde Citrus limonundan türetilen eksozomların, akciğer kanseri hücre hatları ve kronik miyeloid lösemi hücre hatlarında kanser hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği ve TRAIL aracılı hücre ölümünü indükleyerek kronik miyeloid lösemi ksenograft büyümesini baskıladığı kanıtlanmıştır (Raimondo ve diğerleri, 2015). Limon eksozomları ile yapılan bir başka çalışmada, mide kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü değiştirebildiği, hücre proliferasyonunu inhibe edebildiği ve apoptozu indükleyerek antikanser aktivitesi gösterebileceği belirtilmiştir (Yang ve ark., 2020).

Bir çay türü olan Kamelya sinensis'ten elde edilen eksozomların mitokondriyal hasara neden olduğu, hücre döngüsü durmasına ve apoptoza yol açtığı ve bunun da meme tümörü büyümesini ve akciğer metastazını engellediği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2022).

Diğer bir çalışmada mısırdan elde edilen eksozomların Balb/c farelerde tümör büyümesini önemli ölçüde baskılandığını ve herhangi bir toksisiteye neden olmadığını gösterdi (Sasaki ve ark.,2021)

Bitkisel kaynaklı eksozomlarda içlerinde kapsülledikleri biyolojik molekülleri hücrelere aktarabildikleri için antitümör ya da antikarsinojenik özellikleri yanında nanoboyutta doğal taşıyıcılar olarak kabul edilmektedir (Kim ve ark., 2020). Hidrofilik ve hidrofobik ilaçları vücuttaki bariyerler boyunca taşıyabilmeleri ve ilaçların terapötik etki göstermelerine olanak sağladıkları için yapay olarak sentezlenen ilaç taşıyıcıları ile karşılaştırıldığında, iyi stabiliteye, güvenliğe, türler arası biyouyumluluğa ve düşük duyarlılığa sahip olduğu belirtilmektedir. Bunun dışında sRNA, DNA ve proteinler gibi ekzojen biyomolekülleri kolay bir şekilde yükleyebilme, uzun bir yarı ömür ve lipit çift katmanlı olmaları ve aynı zamanda kapsüllenmiş içerikleri tamamen bozulmadan da koruma özellikleri sayesinde avantajlı yapılardır (Bai ve ark., 2024). Bu nedenle bitki kaynaklarından gelen eksozomların farklı biyoaktif maddeleri kapsülleyebileceği ve antitümör etkiler uygulamak için çeşitli kanser hücrelerini hedefleyebileceği düşünülmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalarda greyfurt (Wang ve ark., 2014) ve zencefil (Zhang ve ark., 2016) sularından elde edilen eksozomlara metotreksat ve doksurubisin yüklenmiş ve hem antitümör hem de antienflamatuar etkinliklerinin lipozomal nanopartiküllere göre daha iyi olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise kemoterapötik ilaçları, siRNA'ları, DNA ekspresyon vektörlerini ve proteinleri farklı hücre tiplerine taşıyan greyfurt türevi nanotaşıyıcıları hamile farelerin kuyruk damarına enjekte edildiğinde plasentaya geçmediğini bu sebeple hamile kadınlar için ilaç dağıtım taşıyıcıları olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Bai ve ark., 2024). Eksozomlar, hem biyolojik hem de patojenik süreçlerde hücreleri hedeflemek için doğal olarak DNA ve RNA gibi nükleik asitleri taşırlar. Bu nedenle, gen ekspresyonunu değiştiren ve genetik tedaviyi iyileştiren hastalıkları düzeltmek için özellikle ekzojen genetik materyalin eksozomlar tarafından başarılı bir şekilde taşınması üzerinde durulmuş ve çalışmalar yapılmıştır. Örneğin HeLa hücrelerinden ultrasantrifüj ile elde edilen eksozomlara RAD51 siRNA yüklenerek tekrar alıcı hücrelere uygulandığında, eksozomların

başarılı bir şekilde hücrelere geçerek RAD51 geninin aşağı regüle ettiğini saptamışlardır (Shtam ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada kolon kanserinde önemli etkileri görülen FGL1 ve immünosüpresif sitokin TGF- β 1'in siRNA'lar ile inhibe edilmesi eritrosit eksozomlar ile gerçekleştirilmiş ve sonuçta hem in vitro hem de in vivo olarak önemli bir anti-tümör etkisi bildirmişlerdir (Pei ve ark., 2021). Yine bir başka çalışmada kemik iliği kök hücrelerinden elde edilen eksozomlara elektroporasyon ile siRNA CTGF geni ile yüklenmiş ve bu yüklü eksozomlar, omurilik yaralanmalı sıçanların kuyruk damarına enjekte edilmiştir. Sonuçta CTGF geninin ekspresyonlarının inhibe edilmesinin yanında, aynı zamanda inflamasyonu ve nöronal apoptozun azalması ve reaktif skar oluşumu gibi olumlu etkilerde görülmüştür (Huang ve RK., 2021).

Yang ve ark.'nın 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada ise kolonik dokuya özgü bir RNA yükledikleri zencefil eksozomlarının antienflamatuvar etkiyi arttırdığını bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise miRNA yüklenen brokoli eksozomlarının etkili bir nanotaşıyıcı olarak hizmet edebileceği gösterilmiştir. Yine Zhang ve ark.'nın (2017) oral uygulama için zencefilden türetilmiş nano-lipid vektörlerinde kapsüllenen siRNA-CD98 ile kolon dokusunu etkili bir şekilde hedefleyebildikleri ve CD98 ekspresyonunu inhibe edebildiklerini, böylece özgüllüğü artırırken kolon hastalıkları için geleneksel sentetik nanopartiküllerin yan etkilerini azaltabileceklerini rapor etmişleridir.

Tezimizde yaptığımız çalışmada BCL-2 hedefli bir siRNA kullanarak kanser hücrelerini apoptoz yolına girmelerini teşvik etmeyi amaçladık. Bu amaçla limondan elde ettiğimiz eksozomlara önce kontrol siRNA'yı sonikasyon ve inkübasyon yoluyla yüklemeye çalıştık. Bu yükleme aşamalarında sonikasyonun daha başarılı olduğu saptandıktan sonra BCL-2siRNA sonikasyon yoluyla tüm eksozomlara yüklenmiş ve A549, MCF-7 ve HUVEC hücrelerine uygulanmıştır. Burada saf eksozomların canlılık üzerine herhangi bir etkisi gözlenmeyen konsantrasyonlar seçilerek siRNA'nın etkisi analiz edilmek istenmiştir. Yapılan MTT analizlerinde HUVEC hücrelerinde 24 ve 48 saatte hücre canlılığında elde edilen tüm eksozom çeşitlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken özellikle, A549 ve MCF-7 hücrelerinde 48. saatte anlamlı düşmelerin olduğu gözlenmiştir. Buda eksozomların hücre içine alındıktan sonra siRNA'nın inhibisyon etkisinin

48.saatte rahatlıkla gözlenebildiğini göstermektedir. Bu analizlerde literatürde karşılaştırılabilecek başka bir sonuç tarafımızdan bulunamadığı için çalışma sonuçlarımız literatürdeki ilk sonuçlar olarak bildirilmiştir. Aynı şekilde apoptotik etkileri değerlendirildiğinde HUVEC hücrelerinde canlı hücre oranının yüksek olduğu, fakat A549 hücrelerinde özellikle DF15 konsantrasyonunun geç apoptoza ve nekroza yol açtığı belirlenmiştir. Bunun dışında yine tüm eksozom çeşitlerinin hem erken hem de geç apoptozu indüklediği çalışmalarda görülmüştür. Yapılan analizlerde ÇG ve SY'nin birbirine benzer sonuçlar vermesi sebebiyle de apoptotik etki sadece ÇG'lerde çalışılmıştır.

Sonuç olarak apoptotik özelliklerin incelenmesi sonucunda da muhtemelen eksozomlar tarafından taşınan antikanser moleküllerinin lokalize salınımı yoluyla tetiklenen kanser hücrelerinde programlanmış ölümün geri kazanılmasında olumlu bir rol oynadığı düşünülmektedir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir vektörle hastanın hedef hücrelerine terapötik nükleik asitleri taşımak amacı güden gen terapisi kapsamında, doğal olarak hücreler arasında RNA taşıma özelliğine sahip olan eksozomların, yararlı bir taşıyıcı vektör olabileceği tahmin edilmektedir. Eksozomların genetik materyal iletimi ile ilgili çalışmalarının yapılması, eksozomların mevcut kanser terapötik yaklaşımlarına alternatif olarak genel potansiyeli nedeniyle çok önemlidir.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, ilk defa limon kaynaklı eksozomlara BCL-2 siRNA yüklenmiş ve hem karakterizasyon hem de etkinlik analizlerinin tarafımızdan yapıldığı belirlenmiştir. Verilerimiz limondan kolaylıkla eksozom elde edilebildiğini, genetik materyal taşıyabilme kabiliyetinde olduğu ve taşıdığı genetik materyali hücrelere taşıyabildiğini, bunun dışında kullanılan genetik materyal yükleme işleminin inkübasyon ve elektroporasyona alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

Eksozom lipid çift tabakasının doğası gereği kuşkusuz plazma zarıyla ve daha spesifik olarak hedef hücreler ile temas kurabilmelerinde çok büyük avantajlara sahiptir. Aynı zamanda protein ya da genetik materyal gibi içeriklerini doğrudan hücre teması olan veya olmayan hedef hücrelere aktararak hücreler arası etkileşimlere katılmaları onları ilaç taşıma sistemleri içinde avantajlı konuma getirmektedir. Ayrıca, eksozomlar, sinir sistemindeki motor ve sinirsel işleyişi iyileştirme özelliği, kan-beyin bariyerlerini geçebilmeleri, herhangi bir yan etki oluşturmadan birden fazla dozlanmış ilaç yüklü eksozomun intravenöz verilmesi imkanı sağlaması, immün cevap oluşturmaması özelliklerine sahiptirler. Bu özellikler eksozomların aşı, immünoterapi ya da gen terapisi gibi alanlarda kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bitkisel kaynaklı eksozomların klinikte kullanılmaları için hala çalışmalar devam etmektedir. Henüz onaylanmış bir klinik çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple hala çok uzun bir yol bulunmaktadır.

Sonuç olarak kontrol edilebilir koşullar altında, güvenli, etkili, ekonomik olan yeni bir stratejidir, ancak düşük saflıkta olması, kolay zarar görebilmesi, korunmasının zor olması gibi zorlukları vardır. Büyük ölçekli geliştirme, yüksek verimlilik, ekonomi ihtiyaçlarını karşılayabilecek ve klinikte uygulanabilecek ve

gelecekteki etkili uygulamaların temelini atabilecek yeni ayırma ve saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkisel kaynaklı eksozomların emilim ve alım mekanizması/oranı hala belirsizdir ve hedeflenen spesifik genlerin büyük ölçekli araştırmalarına ihtiyacı vardır. Aynı zamanda, farklı kullanılacak dozu yada terapötik etkili dozun bulunabilmesi içinde daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır. Yapılan analizlerde bitki kaynaklı eksozomların fenotiplemesi ile ilgili de daha çok çalışma yapılması, genetik materyal yükleme yönteminde çeşitli düzenlemeler yapılarak kaybolan miktarın önlenmesi ya da yükleme etkinliğinin daha da arttırılabilmesi ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



8.KAYNAKÇA

- Afrin, H., Geetha Bai, R., Kumar, R., Ahmad, S.S., Agarwal, S.K., Nurunnabi, M. (2023). Oral delivery of RNAi for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 42(3):699-724.
- Antimisiaris, S.G., Kallinteri, P., Fatouris, D.G. (2008). Chapter 13. Cox Gad S., (Ed.). Liposomes & Drug Delivery. *Pharmaceutical Manufacturing: Production and Processes.*(443–533) John Wiley & Sons, Inc.; New York, NY, USA.
- Antimisiaris, S. G., Mourtas, S., & Marazioti, A. (2018). Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 10(4), 218.
- Aryani, A., Denecke, B. (2016). Exosomes as a Nanodelivery System: a Key to the Future of Neuromedicine?. *Mol Neurobiol* 53, 818–834
- Bai, C., Liu, J., Zhang, X., Li, Y., Qin, Q., Song, H., Yuan, C., & Huang, Z. (2024). Research status and challenges of plant-derived exosome-like nanoparticles. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 174, 116543.
- Baldini, N., Torreggiani, E., Roncuzzi, L., Perut, F., Zini, N., & Avnet, S. (2018). Exosome-like Nanovesicles Isolated from Citrus limon L. Exert Antioxidative Effect. *Current pharmaceutical biotechnology*, 19(11), 877–885.
- Banizs, A., Huang, T., Dryden, K., Berr, S., Stone, J., Nakamoto, R., Shi, W., He, J. (2014). In vitro evaluation of endothelial exosomes as carriers for small interfering ribonucleic acid delivery. *Int J Nanomedicine*. 9(1), 4223-4230.
- Bazzan, E., Tinè, M., Casara, A., Biondini, D., Semenzato, U., Cocconcelli, E., Balestro, E., Damin, M., Radu, C. M., Turato, G., Baraldo, S., Simioni, P., Spagnolo, P., Saetta, M., & Cosio, M. G. (2021). Critical review of the evolution of extracellular vesicles' knowledge: From 1946 to today. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6417.

- Bobbin, M. L., and Rossi, J. J. (2016). RNA interference (RNAi)-Based therapeutics: delivering on the promise? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 103–122.
- Bottai, G., Truffi, M., Corsi, F., and Santarpia, L. (2017). Progress in nonviral gene therapy for breast cancer and what comes next? *Expert Opin. Biol. Ther.* 17, 595–611.
- Butreddy, A., Kommineni, N., Dudhipala, N.J.N. (2021). Exosomes as naturally occurring vehicles for delivery of biopharmaceuticals: insights from drug delivery to clinical perspectives. *Nanomaterials*. 11, 1481.
- Carnino, J.M., Lee, H., Jin, Y. (2019). Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: A review and comparison of different methods. *Respir. Res.* 20, 240.
- Carvalho, A. F., Gasperini, L., Ribeiro, R. S., Marques, A. P., & Reis, R. L. (2018). Control of osmotic pressure to improve cell viability in cell-laden tissue engineering constructs. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(2), e1063–e1067.
- Chaudhry, G. E., Md Akim, A., Sung, Y. Y., & Sifzizul, T. M. T. (2022) Cancer and apoptosis: The apoptotic activity of plant and marine natural products and their potential as targeted cancer therapeutics. *Front. Pharmacol.* 13, 842376.
- Chen, C.-C., Skog J., Hsu, C.-H., Lessard, R.T., Balaj, L., Wurdinger, T., Carter, B.S., Breakefield, X.O., Toner M., Irimia D. (2010) Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip*. 10, 505–511.
- Chen, Q., Li, Q., Liang, Y., Zu, M., Chen, N., Canup, B.S.B., Luo, L., Wang, C., Zeng, L., Xiao B. (2022). Natural exosome-like nanovesicles from edible tea flowers suppress metastatic breast cancer via ROS generation and microbiota modulation. *Acta Pharm. Sin. B.*, 12 (2), pp. 907-923
- Colombo, M., Raposo, G., Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 30, 255–89.

- Cosenza, S., Ruiz, M., Toupet, K., Jorgensen, C., & Noël, D. (2017). Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Scientific Reports*, 7(1), 16214–16214
- Cui, Y., Gao, J., He, Y., & Jiang, L. (2020). Plant extracellular vesicles. *Protoplasma*, 257(1), 3–12.
- Dad, H. A. , Gu, T.-W. , Zhu, A.-Q. , Huang, L.-Q. , & Peng, L.-H. (2021). Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatforms. *Molecular Therapy*, 29(1), 13–31
- Donoso-Quezada, J.; Ayala-Mar, S.; González-Valdez, J. (2020). State-of-the-art exosome loading and functionalization techniques for enhanced therapeutics: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 4
- Egbuonu, A.C.C. and Amadi, C.C. (2016). Some Nutritive and Antifungal Properties of Citrus sinensis (Sweet Orange) Peels and Seeds. *American Chemical Science Journal*. 14(2), 1-7.
- Ehiobu, J.M., M.E. Idamokoro, A.J. Afolayan. (2021). Phytochemical content and antioxidant potential of leaf extracts of Citrus limon (L.) Osbeck collected in the Eastern Cape Province, South Africa, South African Journal of Botany. 141, 480-486.
- Elia, C. A., Tamborini, M., Rasile, M., Desiato, G., Marchetti, S., Swuec, P., Mazzitelli, S., Clemente, F., Anselmo, A., Matteoli, M., Malosio, M. L., & Coco, S. (2019). Intracerebral Injection of Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells Exerts Reduced A β Plaque Burden in Early Stages of a Preclinical Model of Alzheimer's Disease. *Cells*, 8(9), 1059.
- Faruqu, F.N., Xu, L., Al-Jamal, K.T. (2018). Preparation of Exosomes for siRNA Delivery to Cancer Cells. *J. Vis. Exp.* 142, e58814.
- Ferguson, C. M., Echeverria, D., Hassler, M., Ly, S., and Khvorova, A. (2020). Cell type impacts accessibility of mRNA to silencing by RNA interference. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 21, 384–393.

- Gao, J., Li, A., Hu, J., Feng, L., Liu, L., Shen, Z. (2023). Recent developments in isolating methods for exosomes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 10, 1100892.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.
- Ginini, L., Billan, S., Fridman, E., & Gil, Z. (2022). Insight into Extracellular Vesicle-Cell Communication: From Cell Recognition to Intracellular Fate. *Cells*, 11(9), 1375.
- Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P., and Rizzuto, R. (2008). Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.* 8 (2), 119–130.
- Gonda, A., Kabagwira, J., Senthil, N. G., Wall, R. N. (2019). Internalization of Exosomes through Receptor-Mediated Endocytosis. *Mol Cancer Res*, 17 (2), 337–347.
- González-Molina, E., Domínguez-Perle,s R., Moreno, D. A., García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51(2), 327-345.
- Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav P. K., Nayak, B., Mohanty, S. (2018). An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell. Res. Ther.* 9, 180.
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* 19, 47.
- Gürbüz, Ş., (2024). Kimyon Tohumundan Eksozomların İzolasyonu, Karakterizasyonu Ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Ha, D., Yang, N., Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges, *Acta Pharm Sin B*. 6, 287-296,
- Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 207, 18–30
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int*. 2014, 150845.
- He, S., Cao, B., Yi, Y., Huang, S., Chen, X., Luo, S., Mou, X., Guo, T., Wang, Y., Wang, Y., & Yang, G. (2022). DNA precipitation revisited: A quantitative analysis. *Nano Select*, 3(3), 617–626.
- Heinemann, M.L., Ilmer, M., Silva, L.P., Hawke, D.H., Recio, A., Vorontsova, M.A., Vykoukal, J. (2014). Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *J. Chromatogr. A*. 1371, 125–135.
- Huang, W., Qu, M., Li, L., Liu, T., Lin, M., Yu, X.(2021). siRNA in MSC derived exosomes silences CTGF gene for locomotor recovery in spinal cord injury rats. *Stem Cell Res. Ther.*, 12, 334.
- Jang, J, Jeong, H, Jang, E, Kim, E, Yoon, Y, Jang, S, Jeong, H-S and Jang, G. (2023) Isolation of high-purity and high-stability exosomes from ginseng. *Front. Plant Sci*. 13,1064412.
- Jinhee, K., Jayaprakasha, G. K., Uckoo, R. M., Patil, B. S. (2012). Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effect of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells, *Food and Chemical Toxicology*. 50(2), 423-430.
- Johnsen, K.B., Gudbergsson, J.M., Skov, M.N., Pilgaard, L., Moos, T., Duroux, M. (2014). A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles—Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1846, 75–87.

- Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Xiang, X., Deng, Z. B., Wang, B., Zhang, L., Roth, M., Welti, R., Mobley, J., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H. G. (2013). Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Mol Ther.* 21(7), 1345–1357.
- Kang, H., Kim, J., Park, J. (2017). Methods to isolate extracellular vesicles for diagnosis. *Micro Nano Syst. Lett.* 5, 15.
- Khalid, A. D., Ur-Rehman, N., Tariq, G. H., Ullah, S., Buzdar, S. A., Iqbal, S. S., Sher, E. K., Alsaiani, N. S., Hickman, G. J., Sher, F. (2013). Functional bioinspired nanocomposites for anticancer activity with generation of reactive oxygen species. *Chemosphere.* 310, 136885.
- Khatun, Z., Bhat, A., Sharma, S., Sharma, A. (2016). Elucidating diversity of exosomes: Biophysical and molecular characterization methods. *Nanomedicine.* 11,2359–2377.
- Kluszczyńska, K., Czernek, L., Cypriak, W., Pęczek, Ł., & Döchler, M. (2019). Methods for the Determination of the Purity of Exosomes. *Current pharmaceutical design*, 25(42), 4464–4485.
- Kim, K., Yoo, H. J., Jung, J. H., Lee, R., Hyun, J. K., Park, J. H., Na, D., & Yeon, J. H. (2020). Cytotoxic Effects of Plant Sap-Derived Extracellular Vesicles on Various Tumor Cell Types. *Journal of functional biomaterials*, 11(2), 22.
- Kowal, E.J., Ter-Ovanesyan, D., Regev, A., & Church, G.M. (2017). Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. *Methods in molecular biology*, 1660, 143-152 .
- Kumar, S., Sharma, A. K., Lalhlenmawia, H., Kumar, D. (2021). Natural Compounds Targeting Major Signaling Pathways in Lung Cancer. *Targeting Cellular Signalling Pathways in Lung Diseases.* 821–846.
- Li, P., Kaslan, M., Le,e S.H., Yao, J., Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics.* 7, 789–804.

- Li, S.P., Lin Z.X., Jiang X.Y., Yu, X. Y (2018). Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools. *Acta Pharmacol Sin.* 39, 542–551.
- Li, X., Corbett, A. L., Taatizadeh, E., Tasnim, N., Little, J. P., Garnis, C., Daugaard, M., Guns, E., Hoorfar, M., & Li, I. T. S. (2019). Challenges and opportunities in exosome research-Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. *APL bioengineering*, 3(1), 011503.
- Lian, M. Q., Chng, W. H., Liang, J., Yeo, H. Q., Lee, C. K., Belaid, M., Tollemeto, M., Wacker, M. G., Czarny, B., & Pastorin, G. (2022). Plant-derived extracellular vesicles: Recent advancements and current challenges on their use for biomedical applications. *Journal of extracellular vesicles*, 11(12), e12283.
- Lu, B., Natarajan, E., Balaji Raghavendran, H.R., Markandan, U.D. (2023). Molecular Classification, Treatment, and Genetic Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Review. *Technol. Cancer Res. Treat.* 22.
- Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., Sun, D. (2017). Engineering exosomes as refined biological nanoplateforms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin.* 38, 754–763.
- Ma, K., Xu, H., Zhang, J., Zhao, F., Liang, H., Sun, H., Li, P., Zhang, S., Wang, R., & Chen, X. (2019). Insulin-like growth factor-1 enhances neuroprotective effects of neural stem cell exosomes after spinal cord injury via an miR-219a-2-3p/YY1 mechanism. *Aging*, 11(24), 12278–12294.
- Midekessa G., Godakumara K., Ord J., Viil J., Lättekivi F., Dissanayake K., Kopanchuk S., Rinken A., Andronowska A., Bhattacharjee S., Rinken T., ve Fazeli A. (2020). Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. *ACS Omega*. 5 (27), 16701-16710
- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L., Karlsson, J.M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O. A., Divito, S. J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S. C.,

- Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 119, 756–66.
- Mosby, C. A., Devia, N. P., Jones, M. K. (2023). Comparison of Methods for Quantifying Extracellular Vesicles of Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(20), 15096.
- Nakanishi, K. (2016). Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 7(5):637-60.
- Neophytou, C.M., Trougakos, I.P., Erin, N., Papageorgis, P.(2021). Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers* . 13, 4363.
- Otang, W.M., Afolayan, A. J. (2016). Antimicrobial and antioxidant efficacy of Citrus limon L. peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District, Eastern Cape, South Africa. *South African Journal of Botany*. 102, 46-49
- Ou, Y.-H., Liang, J., Czarny, B., Wacker, M. G., Yu, V., Wang, J.-W. ve Pastorin, G. (2021). Extracellular Vesicle (EV) biohybrid systems for cancer therapy: Recent advances and future perspectives. *Seminars in Cancer Biology*, 74, 45–61
- Padda, I. S., Mahtani, A. U., Patel, P., & Parmar, M. (2024). Small Interfering RNA (siRNA) Therapy. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Pagliara, V., Nasso, R., Di Donato, P., Finore, I., Poli, A., Masullo, M., Arcone, R. (2019). Lemon Peel Polyphenol Extract Reduces Interleukin-6-Induced Cell Migration, Invasiveness, and Matrix Metalloproteinase-9/2 Expression in Human Gastric Adenocarcinoma MKN-28 and AGS Cell Lines. *Biomolecules*. 9(12), 833
- Paskeh, M. D. A., Entezari, M., Mirzaei, S., Zabolian, A., Saleki, H., Naghdi, M. J., Sabet, S., Khoshbakht, M. A., Hashemi, M., Hushmandi, K., Sethi, G., Zarrabi, A., Kumar, A. P., Tan, S. C., Papadakis, M., Alexiou, A., Islam, M. A.,

- Mostafavi, E., Ashrafizadeh, M. (2022). Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *J Hematol Oncol.* 15, 83.
- Pei, X., Zhang, X., Zhang, L., Yuan, M., Sun, L., Yu, F., Wang, B., Zhao, J., He, H., Yang, V.C. (2021). Targeted exosomes for co-delivery of siFGL1 and siTGF- β 1 trigger combined cancer immunotherapy by remodeling immunosuppressive tumor microenvironment. *Chem. Eng. J.*, 421, 129774
- Pfeffer, C. M., ve Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- Plati, J., Bucur, O., Khosravi-Far, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr. Biol.* 3, 279–296.
- Pluchino, S., Smith, J.A. (2019). Explicating Exosomes: Reclassifying the Rising Stars of Intercellular Communication. *Cell.* 177(2), 225.
- Poinsot, V., Pizzinat, N., Ong-Meang, V. (2024). Engineered and Mimicked Extracellular Nanovesicles for Therapeutic Delivery. *Nanomaterials.* 14, 639.
- Pucci, M. ve Raimondo, S. Plant extracellular vesicles: the safe for bioactive compounds. *Adv. Biomembr. Lipid Self-Assembly.* 33, 155-174.
- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M. A., De Leo, G., & Alessandro, R. (2015). Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, 6(23), 19514–19527.
- Raspo, M. A., Vignola, M. B., Andreatta, A. E., Juliani, H. R. (2020). Antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils from Argentina and the United States, *Food Bioscience.* 36, 100651.
- Rong, Y., Wang, Z., Tang, P., Wang, J., Ji, C., Chang, J., Zhu, Y., Ye, W., Bai, J., Liu, W., Yin, G., Yu, L., Zhou, X., ve Cai, W. (2022). Engineered extracellular vesicles for delivery of siRNA promoting targeted repair of traumatic spinal cord injury. *Bioactive materials*, 23, 328–342.

- Sarkar, S., Boynuz, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., Longacre, M. (2013). Kanser Gelişimi, İlerlemesi ve Tedavisi: Epigenetik Bir Bakış. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 21087-21113.
- Sasaki, D., Kusamori, K., Takayama, Y., Itakura, S., Todo, H., Nishikawa, M. (2021). Development of nanoparticles derived from corn as mass producible bionanoparticles with anticancer activity. *Sci. Rep.*, 11 (1), Article 22818
- Sazonova, E. V., Chesnokov, M. S., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2022). Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. *Cell death discovery*, 8(1), 417.
- Sen, S., Xavier, J., Kumar, N., Ahmad, M. Z., & Ranjan, O. P. (2023). Exosomes as natural nanocarrier-based drug delivery system: recent insights and future perspectives. *3 Biotech*, 13(3), 101.
- Sharma, A., Shambhwani, D., Pandey, S., Singh, J., Lahlhenmawia, H., Kumarasamy, M., Singh, S. K., Chellappan, D. K., Gupta, G., Prasher, P., Dua, K., & Kumar, D. (2022). Advances in Lung Cancer Treatment Using Nanomedicines. *ACS omega*, 8(1), 10–41.
- Shtam, T.A., Kovalev, R.A., Varfolomeeva, E.Y. (2013). *et al.* Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun Signal*. 11, 88.
- Sidhom, K., Obi, P. O., ve Saleem, A. (2020). A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option?. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6466.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A.(2020). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* 70, 7–30.
- Singh, B., Singh, J.P., Kaur, A., Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Res Int.*, 132, 109114.

- Srivastava, A., Rathore, S., Munshi, A., ve Ramesh, R. (2022). Organically derived exosomes as carriers of anticancer drugs and imaging agents for cancer treatment. *Seminars in cancer biology*, 86(1), 80–100.
- Stremersch, S., Vandenbroucke, R. E. , Van Wonterghem, E. , Hendrix, An. , De Smedt, S. C. ve Raemdonck, K. (2016). Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs. *Journal of Controlled Release*, 232, 51–61.
- Subha, D., Harshnii, K., Madhikiruba, K.G., Nandhini, M., Tamilselvi, K.S., (2023). Plant derived exosome-like nanovesicles: an updated overview, *Plant Nano Biology*, 3.
- Şahin, F., Koçak, P., Güneş, M.Y. Özkan, İ., Yıldırım, E., Kala, E.Y., (2019). In Vitro Wound Healing Activity of Wheat-Derived Nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 188, 381–394.
- Ter-Ovanesyan, D., Norman, M., Lazarovits, R., Trieu, W., Lee, J. H., Church, G. M., & Walt, D. R. (2021). Framework for rapid comparison of extracellular vesicle isolation methods. *eLife*. 10, e70725.
- Tian, Z., Liang, G., Cui, K., Liang, Y., Wang, Q., Lv, S., Cheng, X. and Zhang, L. (2021) Insight Into the Prospects for RNAi Therapy of Cancer. *Front. Pharmacol.* 12,644718.
- Uchida, M., Wei Li, X., Mertens, P., Alpar, H.O. (2009). Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim Biophys Acta*, 1790(8), 754–764.
- Vashisth, T., Kadyampakeni, D. (2020). Chapter 49 - Diagnosis and management of nutrient constraints in citrus, Srivastava A.K., Hu C. (Ed.) *Fruit Crops Diagnosis and Management of Nutrient Constraints*. 723-737. Elsevier
- Vislocky, L. M., and Fernandez, M. L. (2010). Biomedical effects of grape products. *Nutr. Rev.* 68 (11), 656–670

- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 1820, 940-948.
- Wang, P., Wang, H., Huang, Q., Peng, C., Yao, L., Chen, H., Qiu, Z., Wu, Y., Wang, L., Chen, W. (2019). Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophages-mediated inflammation. *Theranostics*. 9,1714–1727
- Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z. B., Jiang, H., Zhang, L., Xiang, X., Wang, B., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2013). Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nat Commun*. 4 , 1867
- Wang, B., Zhuang, X., Deng, Z. B., Jiang, H., Mu, J., Wang, Q., Xiang, X., Guo, H., Zhang, L., Dryden, G., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014). Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(3), 522–534.
- Wang, J., Wu, S. G. (2023). Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast cancer (Dove Medical Press)*. 15, 721–730.
- Wang, X., Zhao, X., Zhong, Y., Shen, J., & An, W. (2022). Biomimetic Exosomes: A New Generation of Drug Delivery System. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 865682.
- Webber, J, Steadman, R, Mason, MD, Tabi, Z, Clayton, A. (2010). Kanser eksozomları fibroblasttan miyofibroblast farklılaşmasını tetikler. *Can Arş*. 70(23), 9621–30.
- Wiklander, O. P. B. , Brennan, M. Å. , Lötvall, J. , Breakefield, X. O. , El Andaloussi, S. (2019). Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Science translational medicine*, 11(492), eaav8521
- Wu, M., Ouyang, Y., Wang, Z., Zhang, R., Huang, P., Chen, C., Li, H., Li, P., Quinn, D., Huang, T. J. (2017). Isolation of exosomes from whole blood by

- integrating acoustics and microfluidics. *Proceedings of The National Academy of Sciences*. 14(40), 10584-10589.
- Wu, M., Ouyang, Y., Wang, Z., Zhang, R., Huang, P. H., Chen, C., Li, H., Li, P., Quinn, D., Dao, M., Suresh, S., Sadovsky, Y., & Huang, T. J. (2017). Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40), 10584–10589.
- Xu, W., Jiang, X., Huang, L. (2019). RNA Interference Technology. *Comprehensive Biotechnology*, 560–75.
- Yadav, R., Das, J., Lalhlemawia, H., Tonk, R. K., Singh, L., Kumar, D.(2021). Targeting cancer using phytoconstituents-based drug delivery. *Advanced Drug Delivery Systems in the Management of Cancer*; Academic Press, 1(38), 499–508.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J.M., Ghobrial, I.M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N.H.H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E.-M., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötvall, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-‘t Hoen, E.N.M., Nyman, T.A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, É., del Portillo, H.A., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Stampe Ostenfeld, M., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S.G., Helena Vasconcelos, M., Wauben, M.H.M. ve De Wever, O. (2015), Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066.
- Yang, C., Zhang, M., & Merlin, D. (2018). Advances in Plant-derived Edible Nanoparticle-based lipid Nano-drug Delivery Systems as Therapeutic Nanomedicines. *Journal of materials chemistry. B*, 6(9), 1312–1321.

- Yang, M., Liu, X. Luo, Q., Xu, L. ve Chen, F. (2020) . An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy, *Nanobiotechnol.* 18,100.
- Yılmaz H. (2022). The Effects Of Triticum Aestivum Lın (Wheatgrass) And Mentha Piperita (Peppermint) Derived Exosomes On Adipogenic Differentiation Of Human Adipose Stem Cells. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul.
- Yuan C., Chen G., Jing C., Liu M., Liang B., Gong G., YuEriocitrin M.(2022). a dietary flavonoid suppressed cell proliferation, induced apoptosis through modulation of JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPKs signaling pathway in MCF-7 cells *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 36 (1), e22943
- Zahr, S., Zahr, R., Hajj, R. E., Khalil, M. (2023). Phytochemistry and biological activities of Citrus sinensis and Citrus limon: an update. *Journal of Herbal Medicine*, 41, 100737
- Zarà, M., Amadio, P., Campodonico, J. Sandrini, L., Barbieri S.S. (2020). Exosomes in Cardiovascular Diseases. *Diagnostics*. 10, 943.
- Zhang, M., Xiao, B., Wang, H., Han, M. K., Zhang, Z., Viennois, E., Xu, C., Merlin, D. (2016). Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy, *Mol Ther*, 24 (10), 1783-1796.
- Zhang, M. , Viennois, E. , Prasad, M. , Zhang, Y. , Wang, L. , Zhang, Z. , Han, M. K. , Xiao, B. , Xu, C. , Srinivasan, S. , & Merlin, D. (2016). Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials*, 101, 321–340.
- Zhang, W., Peng, P., Kuang, Y., Yang, J., Cao, D., You, Y., and Shen, K. (2016). Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis. *Tumor Biology* 37(3), 4213-4221.

Zhang, M.Z., Wang, X.Y., Han, M.K., Collins, J.F., Merlin D. (2017). Oral administration of ginger-derived nanolipids loaded with siRNA as a novel approach for efficient siRNA drug delivery to treat ulcerative colitis. *Nanomedicine*. **12**(16):1927–1943.

Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. (2019). *et al.* Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* 9, 19.

Zhou, W., Zhou, Y., Chen, X., Ning, T., Chen, H., Guo, Q., Zhang, Y., Liu, P., Zhang, Y., Li, C., Chu, Y., Sun, T., Jiang, C. (2021). Pancreatic cancer-targeting exosomes for enhancing immunotherapy and reprogramming tumor microenvironment. *Biomaterials*. 268, 120546

İnternet Kaynakları

http-1

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

http-2

<https://www.wcrf.org/cancer-trends/lung-cancer-statistics/>

http-3

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128187326000496?via%3Dihub>

http-4

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221080332300115X#bib80>

http-5

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708509004816?via%3Dihub>

http-6

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025462992100209X?via%3Dihb>

http-7

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429219312015?via%3Dihub>

http-8

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629915003610?via%3Dihub>

http-9

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511005643?via%3Dihub>

http-10

<https://www.mdpi.com/2218-273X/9/12/833> http-10

http-11

<https://lcms.cz/labrulez-bucket-strap>

[h3hsga3/po_72734_qe_plus_serum_exosome_isolation_asms2018_po72734_en_5a7c915fc2/po-72734-qe-plus-serum-exosome-isolation-asms2018-po72734-en.pdf](https://lcms.cz/labrulez-bucket-strap/h3hsga3/po_72734_qe_plus_serum_exosome_isolation_asms2018_po72734_en_5a7c915fc2/po-72734-qe-plus-serum-exosome-isolation-asms2018-po72734-en.pdf)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı : Burak ÖZCAN

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum yeri ve tarihi

E-mail

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

2021-2024, Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Farmasötik Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

2016-2021, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Bölümü

2021-2024 Eczacı, Bilecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi

2024- halen Eczacı, Antalya Şehir Hastanesi

Mesleki Birlik/Dernek/Kuruluş Üyelikleri:

2021, Eskişehir Eczacı Odası, Eskişehir