

EKSOZOMLARIN HASTALIKLARDAKİ ROLÜ, TANI VE TEDAVİ AMAÇLI KULLANIMI

Burak AYGAN*, Mustafa KAYA*,**, Esra CANSEVER MUTLU*, İsrail KÜÇÜK**

ÖZ

Eksozomlar hücreler arası protein, lipid ve nükleik asitleri kargo olarak taşıyan hücreler arası pek çok görevi olan organeller ve doğal nanopartiküllerdir. Bu çalışmada kanser tipleri, enfeksiyonlu hastalıkları ve sinir sistemi hastalıklarını da içeren eksozomların tanı ve tedavi süreçlerindeki işlevleri ele alınmaktadır. Eksozomların, hücre dışı reseptör sinyallerini aktive etme rollerinden, tümör mikro-çevresindeki etkin rollerine kadar, enfeksiyon önlenmesine ve bağışıklık sisteminin indüklenmesini içeren iletim özellikleri incelenmektedir. Eksozomların izolasyon ve karakterizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları incelenerek hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanımı analiz edilmektedir. Bu derleme çalışmasında, öncelikle eksozom kavramı tanımlandı ve daha sonrasında eksozomun kanserde, enfeksiyonel hastalıklarda ve sinir hastalıklarında patogenezi incelendi. Eksozomların saflaştırma yöntemleri, üretimi ve karakterizasyonu ele alındı. Son olarak eksozomların tanı ve tedavide terapötik amaçlı kullanımı birkaç örnek ile izah edildi. Sahip olduğu avantajlar göz önüne alındığında tedavi amacıyla kullanımı açısından ümit verici olmasının yanı sıra eksozomların, hızlı ve etkili bir şekilde tanı konulmasını sağlayabileceği yapılan çalışmalarla gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Hücre dışı vezikül, biyobelirteç, hücreler arası iletişim, prognoz, tanı, tedavi

*Makalenin Gönderim Tarihi:04.02.2021 , Makalenin Kabul Tarihi:16.08.2021 Makale Türü: Derleme
DOI: 10.20854/bujse.874609

*Beykent Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Ayazağa, Sarıyer/İstanbul,
**Gebze Teknik Üniversitesi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı, Nanoteknoloji Enstitüsü, Cumhuriyet,
2254. Sk. No:2, 41400 Gebze, Kocaeli

Sorumlu yazar: İsrail KÜÇÜK, i.kucuk@gtu.edu.tr

THE ROLE OF EXOSOMES IN DISEASES AND THEIR USE FOR DIAGNOSIS AND THERAPEUTIC PURPOSE

Burak AYGAN*, Mustafa KAYA*,**, Esra CANSEVER MUTLU*, İsrail KÜÇÜK**

ABSTRACT

Exosomes are organelles and natural nanoparticles that carry intercellular proteins, lipids and nucleic acids as carrier. In this study, the functions of exosomes, including cancer types, infectious diseases and nervous system diseases, in both diagnosis and treatment processes are discussed. From their role in activating extracellular receptor signals to the tumor microenvironment, their transmission properties including infection prevention and induction of the immune system are studied. The advantages and disadvantages of isolation and characterization methods of exosomes are examined and their use as a biomarker in diseases is analyzed. The advantages and disadvantages of the isolation and characterization methods of exosomes are examined and their use as a biomarker in diseases is analyzed. In this review, firstly, the concept of exosome was defined and then the pathogenesis of exosome in cancer, infectious diseases and nervous diseases was examined. Purification methods, production and characterization of exosomes were discussed. Finally, the therapeutic use of exosomes in diagnosis and treatment is explained with a few examples. Considering the advantages it has, it has been shown by the studies that it is promising in terms of use for therapeutic purposes, as well as providing a fast and effective diagnosis.

Keywords: *Extracellular vesicle, biomarker, intercellular communication, prognosis, diagnosis, treatment*

*Makale Gönderim Tarihi: 16.01.2020 ; Makale Kabul Tarihi : 30.05.2020 Makale Türü: Araştırma

DOI: 10.20854/bujse.666813

*Sorumlu yazar: İstanbul Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü (hakan.gencoglu@izu.edu.tr) (ORCID ID: 0000-0003-2968-1615)

**Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü (tarikyer@trakya.edu.tr) (ORCID ID: 0000-0002-9888-0151)

1. EKSOZOMLARIN HASTALIKLARDAKI ROLÜ, TANIVETEDAVİAMAÇLIKULLANIMI

Eksozom Gelişen Tanımı

Eksozomların hücreler arası iletişimde rol aldığı ve hücrenin homeostazisi için öneme sahip olduğu bilinmektedir (Desdín-Micó & Mittelbrunn, 2017). Eksozomlar, vücut hücrelerinin çoğunda salgılanan, hücre zarından köken almış yaklaşık 1-120 nm dış çap boyutu dağılımına sahip nano boyutta, biyolojik kökenli diğer bir değişle doğal veziküllerdir (Vlassov, Magdaleno, Setterquist, & Conrad, 2012). Eksozomların ilk keşfiyle ilgili yapılan araştırmalarda eksozomların hücrelerden salgılandıkları tespit edildikten sonra, bu doğal nanopartiküllerin hücre hasarı sonrası oluşmuş atık parçacıklar veya hücre homeostazının yan ürünleri olduğu öne sürüldü. Ancak sonrasındaki araştırmalar, bu hücre dışı veziküllerin protein, lipid ve nükleik asitleri bünyesinde kargo olarak taşıdıkları ve bu kargoların hedef hücelere gönderildiği ve hedef-alıcı hücreleri uzaktan programlayabildiği gösterildi. Aslında bu vesiküller biyolojik homeostazın düzenlenmesinde kod taşıyan ve decod edilmesi önem arz eden biyolojik malzemelerdir. Bu sebeple, içeriğindeki kargonun köken aldığı hücreden alıcı hücreye taşınması ile hücreler arası iletişimde önemli rol aldıkları gösterildi (Desdín-Micó & Mittelbrunn, 2017) (Tkach & Théry, 2016).

Hücrelerarası etkileşiminin yanı sıra immünit modülasyonda da önemli role sahip olduğu keşfedilmiş olan eksozomlar, endozomun olgunlaşması esnasında endozom zarının içe kıvrılarak çoklu kesecik yapıları (MVB: Multi-Vesicular-Bodies) oluşturmaktadır. Daha sonra, oluşan MVB keseciklerinin hücre zarıyla birleşmesi sonucu çift zarla çevrili kargonun (eksozomun) hücrelerarası boşluğa bırakılması gerçekleşmekte olup, biyogenez akışını takip etmektedir (Barile & Vassalli, 2017).

Eksozomlar lipid çift katman yapılarıdır ve endozomal bir orjinden geldikleri için tetraspaninler, geçiş membranı proteinleri, Annexin ve Rab proteinleri gibi çok çeşitli zar proteinlerine sahiptirler. Bu nedenle hücre zarının yapısında yer alan lipid raftlar içindeki kolesterol, fosfatidilkolin, fosfatidilserin ve digliseritler bütün eksozomlarda bulunan ortak lipidomic molekülleridir. Köken almış olduğu hücre tipine bağlı olarak eksozomların içerisinde farklılık gösterse de genel hatlarıyla CD63, CD9, Rab5, Alix ve Lamp-1 en sık kullanılan eksozomal zar belirteçleridir. Eksozomların zarı köken aldığı hücrenin zarından oluştuğu için köken aldığı hücrenin zar kompozisyonun ihtiva etmektedir (H Rashed et al., 2017).

Eksozomlar, hedeflenen hücelere membran reseptörleriyle bağlanabilmekte, içerik salınımı yapmak için endositoz yolunu kullanabilmekte; diğer bir değişle plazma membranı ile birleşebilmektedir (H Rashed et al., 2017). Eksozomların, içeriğinde proteinleri ve lipitleri bulundurdıkları gibi aynı zamanda birtakım kodlanmayan RNA'ları, ve diğer düzenleyici nükleik asitleri de kargo olarak taşıdıkları bilinmektedir. Bünyesindeki kargoyu hücrelerarası iletişimini sağlamak için organizma içinde bir hücreden diğerine taşır. Genellikle siRNA, miRNA, snoRNA, snRNA taşıdıkları raporlanmış olup bu sayede gen ifadesinin düzenlenmesine katkıda bulunur. miRNA'ları eksozomlar vesilesiyle herhangi bir degradesyona (kompleks bir bileşimin komponentlerine ayrılması) uğramadan, stabil bir halde taşıdıkları ve alıcı hücrelerde de aktif rol oynayarak fonksiyonlarını yerlerine getirdikleri gösterildi (Valadi et al., 2007).

Hücreler arası iletişimi sağlarken hücre dışı sıvıda bulunan eksozomların, hücre dışı taşıma mekanizmasına sahip oldukları kesinleşmiştir. İçeriğinde eksojen siRNA bulunan eksozomların kullanıldığı bir çalışmada bu eksozomların kan-beyin bariyerini geçilebildiği kanıtlanmıştır (Jiang et al., 2019).

150 nm altında olan bu doğal partüküllerin, kan-beyin bariyeri de dahil birçok biyolojik bariyerleri kolayca aşabilme yetisi ve yapısındaki çeşitli lipid monomerlerden kaynaklanan yüksek stabilite özellikleri eksozomları, kendine has özelliklerini ihtiva eder. Bundan dolayı kanser, enfeksiyon ve sinir (nörolojik) hastalıklar da dahil olmak üzere birçok hastalık için biyobelirteç ve gen tedavisine yönelik olarak kullanımı mümkündür (Urbanelli et al., 2015).

Eksozom Patogenezi

Eksozomların Kanserdeki Rolü

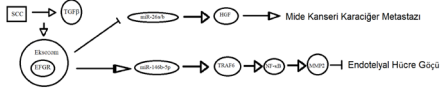
İnsan vücudundaki birçok hücreden salınıp gerçekleşen eksozomların tümör hücrelerinden de salınımları gerçekleşir. Çok sayıda çalışma, eksozomların kanserde birçok işleve sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Tümör hücrelerinde aktif olarak üretilmekte olan eksozomlar, bağışıklık sistemine saklanarak, tümör büyümesine sebep olmak yollarıyla hücrelerin metastaz süreçlerinde etkili olmaktadır (Ersöz, Can, & Uzunoğlu, 2016).

Tümörlerin korunmasının ve genişlemesi kabiliyetlerinin tümör mikroçevresi ile doğrudan ilgisi olduğu bilinmektedir. Tümör mikroçevresi oluşumunda, endotelial hücreler, fibroblastlar ve infiltrate bağışıklık hücreleri tümör hücreleri ile etkileşime girmektedir (Kahveci, 2020). Bu etkileşimlerin düzeyi eksozomların içerikleri tarafından belirlenir (Kohlhapp, Mitra, Lengyel, & Peter, 2015).

Ayrıca ekzozomlar, tümör mikroçevresini ve ekstrasellüler matrisi modüle etmek için, hücre dışı reseptör sinyallerini aktive eder ve hücre yapışmasını düzenler (Song et al., 2021). Sonuçta kanser hücrelerinde bulunan ekzozomlar aracılığıyla otokrin, parakrin ve endokrin etkileşime olanak sağlayan yoğun bir iletişim ağı kurulmakta ve bu ağda endotel hücrelerinden immün sistem hücrelerine uzanan çok sayıda aktör yer almaktadır (Tavukçuoğlu, 2018).

Bilinen örnekleriyle hematopoetik (lösemi ve miyelom), epitel (meme kanseri) ve mezenkimal (yumuşak doku sarkomu ve osteosarkom) kanserlerinde tümör dokulardan salınımı gerçekleşen ekzozomların oluşturduğu iletişim ağı, tümörün proliferasyonuna, invazyonuna ve metastazına neden olduğu bildirilmiştir (Kok & Yu, 2020). Kanser hücrelerini, immün sistemden kaçırabilmenin rolünü ekzozomlar üstlenmekte, immün hücreleri inhibe edebilmekte, tümör mikro çevresinde anjiyogenezi artırmakta, ilaç direnci kazanmaktadır. Ayrıca ekzozomlar, yüzeylerinde ya da vezikül içinde taşıdıkları onkojenik sinyal proteinleri, ligandlar, enzimler ve miRNA'lar sayesinde tümörün progresyonuna ve metastazına neden olur (Tavukçuoğlu, 2018). Örneğin Ekzozomal miR-105, sıkı bağlantı proteini ZO-1 seviyesini azaltabilmekte ayrıca endotelial tek tabakaların bariyer işlevini yok edebilir. Bu yüzden Ekzozomal miR-105, vasküler geçirgenliğe ve uzak organlarda metastaza sebep olur (W. Zhou et al., 2014). Ekzozomal miR-23a ise prolif hidrokstilaz 1/2 (PHD 1/2) Çhipoksi ile indüklenebilir faktör 1- α (HIF-1 α) ve ZO-1 kaskadındaki yolu düzenleyerek anjiyogenezi ve geçirgenliği artırdığı bildirilmiştir (Hu et al., 2018). Ekzozomlar, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor β), and bFGF (basic fibroblast growth factor) gibi çeşitli anjiyogenik uyarıcı kargolara sahip olabilmektedir (Ludwig, Yerneni, Razzo, & Whiteside, 2018). Ekzozomlar endotel hücrelerinin yeniden programlanmasına ve modülasyonun indüklenmesine neden olarak anjiyogenezi tetikler (Song et al., 2021). Endotelial büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sağlayan ekzozomlar, endotel hücrelerinin sinyal yollarının düzenlenmesine önemli bir rol oynar. EGFR, miRNA'sının (miR-26a/b) ifadesizliğini baskılamak suretiyle hepatosit büyüme faktörünü (HGF) etkin bir şekilde aktive eder. Karaciğer HGF'sinin yukarı regülasyonu, mide kanserinden karaciğer metastazını teşvik ederken, karaciğer HGF'sinin aşağı regülasyonu metastazı bastırmaktadır. TGF β tip II reseptörü (TBR1), skuamöz hücreli karsinom (SCC) tümör hücrelerinden ekzozomlarda yaygın bir bileşendir. Tümör mikroçevresinde TGF β sinyalini uyarabilir. Yumurtalık kanserinden tümörle ilişkili makrofaj (TAM) türevli ekzozomlar, endotel hücre göçünü

baskılamak için miR-146b-5p/TRAF6/NF- κ B/MMP2 yolunu hedefleyebilmektedir (Şekil 1) (Hu et al., 2018).



Şekil 1:

Ekzozomların endotel hücrelerinin sinyal yolundaki rolü (Hu ve arkadaşlarının makalesinden dönüştürülüp Türkçeye kazandırılmıştır) (Hu et al., 2018).

Ekzozomların kanser yayılımı ve gelişimi aşamalarında kanser mikroçevresi ile etkileşimi:

- Salınan ekzozomların epitelyal mezenkimal geçişi etkileyerek matris bozulmasına neden olması,
- Tümör kökenli ekzozomların makrofajları aktive etmesi sonucu endotelial hücreleri zarar vermesi,
- Kan dolaşımındaki tümör hücreleri ve tümör aktif trombositlerden serbestlenen ekzozomların bağışıklık sistemi hücrelerini etkilemesi,
- Endotelial hücrelerin yüzeyindeki adezyon proteinleri bağlanmak suretiyle yukarı yönlü düzenlemeler gerçekleştirilmesi ve
- Ekzozomların uygun bir niş içerisinde tümör hücrelerinin çoğalmasını sağlayarak mikro metastaza sebep olması olarak sıralanabilir (Hu et al., 2018).

Fibroblastlar, makrofajlar, inflamatuvar faktörler, büyüme faktörleri ve inflamatuvar hücrelerden oluşan tümör mikro çevresi tümörün hayatta kalmasını sağlayan karmaşık bir iç ortamdır. Bir kanserin teşhisi ve tedavisi bu ortamın iyi anlaşılmasından geçmektedir. Ekzozomlar, tümör mikroçevresindeki etkin rolünden dolayı tümör mikroçevresinde taşıyıcılar ve klinik tanımlarda biyobelirteçler olarak işlev görebilme potansiyeline sahiptir (Hu et al., 2018).

Eksomların Enfeksiyonel Hastalıklarındaki Rolü

İnsan vücut hücrelerinin yanı sıra mantar, bakteri, protoza ve virüsler de ekzozom salımı yapar (Schwab et al., 2015). Ekzozomlar ökaryotik hücre arasında iletişimden sorumlu olduğu gibi prokaryotik canlılarla da iletişime ve adaptasyona katkı sağlar (Hasegawa, Futamata, & Tashiro, 2015). Ekzozomlar, bir enfeksiyon durumunda enfeksiyonun yayılmasına yardımcı veya enfeksiyonun önlenmesine yönelik bağışıklık tepkisinin oluşmasına yönelik karşıt rol oynar. Ekzozomun içeriğindeki lipid, protein, karbonhidrat ve mikrobiyal antijenin konakçı bağışıklık sistemine eklenmesiyle enfeksiyona karşı koruma sağlanabilirken, yine içeriğindeki kargoların (lipit, protein, karbonhidrat, enfeksiyonu kolaylaştıran genler) enfekte edici içeriği sayesinde enfeksiyonu yayması, sitotoksite oluşumunu, bakteriyel invazyona neden olması ve konakçı immün yanıtı modüle etmesi söz konusu olmaktadır (Jones et al., 2018) (Ohno, Ishikawa, & Kuroda, 2013).

Viral enfeksiyonlar, eksozom oluşumuna ve konaççı hücrelerden serbestleşmesine neden olmaktadır. Örneğin HIV-1 ile enfekte olmuş konaç hücreden negatif faktör proteini (Nef) içeren eksozomlar salınmaktadır. Nef proteini alıcı konaç hücrede sinyal transdüksiyon dinamiklerini değiştirmek suretiyle viral enfeksiyona sebep olur. Hepatit C ve hepatit A ile enfekte hücrelerden salınan eksozomlar viral RNA ve protein kargosu sayesinde yeni hücreleri enfekte etmektedir. Hepatit A gibi bazı zarfsız virüsler konaççı hücrenin endozomlarını kaplama meteryali olarak kullandığı bildirilmiştir (Schwab et al., 2015).

Eksozomların Sinir Hastalıklarındaki Rolü

Eksozomlar, hücreler arası iletişim ve yük taşıma özelliklerinden dolayı birçok sinir hastalığında da rol oynar. Bazı proteinler eksozomlarla bağlantılı şekilde hücrede salgılanabilir ve hücre dışı sıvılarıyla salınabilir. Protein bozukluğundan kaynaklanan bazı hastalıklar incelendiğinde eksozomların etkileri gözler önüne serilmektedir.

“Kuru ve Creutzfeldt-Jakob” hastalığına ve sığırlarda “Deli Dana” olarak adlandırığımız “Spongiform Ensefalopati” hastalığına neden olur. Yanlış katlanan prion protein scrapie (PPS), normal bir prion proteininin (PP) merkezi sinir sisteminde yoğunlaşarak PPS’ye dönüşümünü katalize eder ve hastalığa neden olmaktadır. Gastrointestinal sistemden immün hücrelerle beyne transferi sağlanan PPS’nin, transferi gerçekleştiren sistemdeki mekanizması hala ortaya çıkarılmamıştır. Fevrier, PPS ile ilişkili eksozomların prion yayılımında katkısının olabileceğini ve bu eksozomların enfekte hücrelerden salgılandığını tayin etmektedir (Ohno et al., 2013). Parkinson hastalığının ilerleme mekanizması açıklanamasa da nedeni α -syn’ nin prion benzeri bir süreçte yayıldığı tahmin edilmektedir. Eksozomların parkinson hastalığının ilerlemesinde önemli bir rolü vardır. α -syn proteinlerini içeren eksozomların varlığı ve doğrudan hücre dışına salındığı rapor edildi. Hem monomerik olup hem de oligomerik özelliğe sahip α -syn proteinlerinin, hem ortamda serbest şekilde buldukları hem de eksozomlarda kalsiyum bağımlı şekilde salındıkları belirlendi. İleri çalışmalarla da bu bulgu kanıtlanmıştır (Chung, Chan, Chen, Hung, & Hong, 2021). Örneğin, α -syn Proteinlerinin eksozomal salımının ve alınımının lizozom organelinin inhibe edilmiş durumda arttığı gözlemlenmiştir. Serbest α -syn oligomerleriyle eksozom ile ilişkili α -syn oligomerleri karşılaştırılması sonucu alıcı hücreler tarafından alınması ve toksisiteye neden olma durumu serbest α -syn oligomerlerinde daha yüksek değer vermektedir (Yu et al., 2020) (Chung et al., 2021).

Alzheimer hastalığının önemli nedenleri arasında amiloid beta proteininin ($A\beta$) birikimi verilebilir. Prec- ve protein sekretaz bölünmesi sonucu oluşan amiloid beta, sekretaz beta ile endozomlarda yerleşmiş durumda bulunmakta ve eksozom özelliği taşıyan alix proteini, insan amiloid plaklarında güçlendirir. Bundan yola çıkacak olursak amiloid beta ilişkili eksozomlar topluluğunda bulunduğu söylenebilir (Ohno et al., 2013). Hafif / şiddetli evrede olan alzheimer hastalarındaki beyin omurilik sıvılarında oluşan anormal tau proteini konsantrasyonunun, erken evredeki hastalara nazaran ciddi anlamda yüksek sonuçlar vermiştir. Bu fenomen, tau proteinin eksozom aracılı sekresyonunun anormal tau işlenmesinde ve erken alzheimer hastalığı sırasında beyin omuriliği sıvısı tau artışında önemli bir rol oynayabileceğini gösterdi. Aynı zamanda alzheimer hastalarının beyin omurilik sıvısından ekstrakte edilen hipo-fosforile tau proteini içeren eksozomlar, nöronlarda ve mikroglia da tau proteini toplanmasını sağlar (Jiang et al., 2019).

İnme hastalığı çalışmalarında insan amiloid proteini eksprese edilen bir transgenik farelerin beyininde bulunan eksozomlarla çalışmalar sağlanmıştır. Alzheimer hastalarından alınan eksozomlarda da rastlandığı üzere transgenik farelerden elde edilen eksozomlarda da tam uzunlukta ve C-terminal amiloid öncü protein (AÖP) parçaları tespit edildi. P-sekretaz, endozomlar içerisinde AÖP kelivaji gerçekleştirilerek AP peptidi farklı gövdelere ayrılır ve eksozomlarla beraber salınır (Zhang & Chopp, 2016).

Böylelikle eksozomal kargo proteinlerinin insan-fare transgeniği sağlanmasıyla ve C-terminal APP ile zenginleştirilen eksozomların, AP peptitlerinin beyne salınmasına katkı sağlamıştır. Farklı bir çalışmada ise mezenkimal stroma hücrelerinden (MSH) elde edilen ekstraselüler veziküller (EV) kullanılmıştır (Wang et al., 2020). Bu EV’ler, inflamasyon durumunu düzenleyen ve fare inme modelinin geri kazanımını destekleyebilen lipide bağlı nano ölçekli veziküllerdir. MSH’den elde edilen EV’ler, beyinde korteks bölgede oluşan nöroinflamasyonu azaltarak bir tedavi durumu sağlamıştır. İntravenöz yoluyla MSH uygulanması durumunda MSH kaynaklı EV’ler tarafından tekrar üretim sağlanabilmektedir. EV’ler, beyinin belirli yerlerinde oluşan hasarlar sonucu gerçekleşen nöronal inflamasyonu EV’lerin arter içine enjekte edilmesiyle baskı sağlayabilmektedir. Bu durum EV’lerin MSH kaynaklı olmasıyla ilgili şüpheleri ortadan kaldırmaktadır ve tedavide umut verici özellik sağlamaktadır (Zhang & Chopp, 2016) (Wang et al., 2020).

Eksozomların Saflaştırılması, Üretimi ve Karakterizasyonu

Eksozomlar kan, tükürük, idrar, anne sütü, amniyotik sıvı, bronkoalveolar sıvı, beyin omurilik sıvısı da dahil olmak üzere hemen hemen tüm vücut sıvılarında mevcuttur (Brinton, Sloane, Kester, & Kelly, 2015). Vücut sıvılarından ve hücrelerden saflaştırılmaya olanak tanyan eksozomlar tanı ve tedavi amaçlı kullanılabilir. Burada önemli noktalardan biri heterojen ve saf olmayan eksozomların elde edilmemesine dikkat edilmesidir. Eksozomların saflaştırılması tanyaya yönelik spesifik eksozom eldesi ve tedavi amaçlı üretimi açısından önemli bir basamaktır. Ayrıca terapötik eksozomların geniş ölçekte üretimi, yüksek saflık ve fazla miktarda üretimi için saflaştırma ve üretim prosedürleri geliştirilmesini gerektirmektedir (Rai et al., 2021).

Eksozomların vücut sıvılarından veya hücrelerden saflaştırılmasına yönelik olarak EV'lerin izolasyonu için çok sayıda farklı protokolün özeti. a: Diferansiyel santrifüj, b: Yoğunluk gradyan santrifüjü, c: Boyut dışlama kromatografisi, d: Polimer çökelme için ticari kitler, e: Kimyasallarla yağış, f: İmmünopresipitasyon, g: Ultrafiltrasyon ve h: Mikroakışkan teknolojileri yöntemleri kullanılmaktadır (Camino, Lee, & Jin, 2019). Ultra santrifüj ve yoğunluk gradyan santrifüj yöntemleri yoğunlukla kullanılmasına rağmen araştırmanın amacına ve üretimin hedefine göre yöntem seçimi yapılmaktadır. Her bir yöntemin uygulamaya bağlı olarak avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Farklı yöntemlerin kombinasyonu kullanılmak suretiyle avantajlar en üst düzeye çıkartılabilmektedir (Song et al., 2021).

Tablo 1. Dezavantaj ve Avantajları ile Birlikte Eksozom İzolasyon Yöntemleri (Proteomic profiling : methods and protocols kitabında ilgili bölümde yer alan tablodan Türkçeye kazandırılmıştır (Rai et al., 2021).

İzolasyon yöntemi	Mekanizma	Avantajlar	Dezavantajlar
Diferansiyel ultrasantrifüj (DC)	Sedimentasyon hızı (boyut, hacim, yoğunluk). Genellikle, yıkama adımları ve DGC ile saflaştırma potansiyeline sahip, koşullandırılmış ortamlardan ve çeşitli biyolojik sıvılardan ham EV'leri izole etmek için kullanılır. Aşamalı DC yaklaşımı sunular içerir: ilk 500 g / 2000 g santrifüj (hücreleri, membran kalıntılarını, apoptotik cisimcikleri çıkarır), rotor tipi ve G-0,1 µm veya 0,22 µm membran filtrasyonu dahil membran filtrasyonu, ham sMV'leri izole etmek için 10-14,000 g, ham eksozomları izole etmek için 100,000 g	- Düşük / orta geri kazanım verimi - Ölçeklenebilirlik	- Yüksek heterojenlik / - Düşük saflık - EV olmayan bileşenlerle birlikte saflaştırma - Verim, numune viskozitesine ve konsantrasyonuna bağlıdır - Tekrar üretilebilirlik, rotor tipi ve G- kuvvetinden etkilenebilir - Ek yıkama adımları ve kullanım verimi düşürebilir

Yoğunluk gradyan Santrifüj (DGC)	Yüzdürme yoğunluğu (yoğunluk, boyut) EV popülasyonlarının kesintili bir süzme gradyanı (veya daha az viskoz iyodisanol, OptiPrep™) ile daha fazla saflaştırılması için kullanılır iyodisanol gradyanları, aşağı akış fonksiyonel hücre analizlerinde süzme daha az toksik olan karlıma indisi ile kolayca ölçülür, tüm yoğunluklarda izo-osmotik solüsyonlar oluşturur (konsantrasyon) vezikül boyutu) ve vezikül olmayan bileşenlerin farklı şekilde fraksiyonlanmasına izin verir. Tipik olarak, gradyan oluşturmak için 100.000 g'de DC (uzrasantrifüj) kullanılır DGC'nin farklı varyasyonları, aşağı süzme için. Düşük (1.12-1.19 g / mL), yüksek yoğunluklu (1.26-1.29 g / mL), düşük sMV'ler (1.09 g / mL) ve yüksek yoğunluklu (1.12 g / mL) eksozomlar dahil EV alt popülasyonlarını ayırmak için kullanılır.	- Yüksek saflık - EV alt tip izolasyonu - Potansiyel klinik ortamlara uygulanabilir	- Zaman tüketiyor - Farklı EV'ler yoğunluğa göre ayrılmıyor - Düşük geri kazanım (ek işleme nedeniyle numune kaybı) - Farklı yoğunlukta lipoproteinlerle birlikte saflaştırılabilir
Yoğunluk yastıklı ultrasantrifüj (DCGC)	Sedimentasyon hızı ve kaldırma yoğunluğu CM'nin altında 40 iyodisanol tabakası, EV'ler ve agregatlar, ultrasantrifüj sırasında bu yastıklı yoğunlaşır. Artırma için DGC tarafından takip edilebilir	- Fiziksel bütünlüğün ve biyolojik aktivite için korunması - Toplamalardan kaçınır	- Konsantrasyon CM gerektirir
Afinite izolasyonu	Yüzey işaretleme seçiciliği (protein veya peptid epitop hedefi) Etiket, bir EV yüzey antijenini (ör. Melanin hücrelerinde bezensiz bir şekilde ifade edilen mAb 763.74'e bağlı CSPG4 epitopu), biyospesifik peptidi (ör. HSP'ler için yüksek afinite) veya proteoglikan afinite reaktif (örn., heparin) kullanır. Başarıya kullanılan mAb'ler arasında A33, EpCAM, MHC-II antijenleri, CD45, CD63, CD81, CD9 / CD1b / CD1a / CD14, CD9, HER2 ve L1CAM'ye yönelik olanlar yer alır. Heparin afinitesine dayalı afinite yakalama, spesifik EV yüzey antijenlerine yönelik uygun mAb'lerin mevcudiyetiyle ilgili sınırlamaların üstesinden geldiği göre önüne alındığında, genellikle hücre kültürü ortamından ve biyo sıvılardan EV izolasyonu için geçerlidir.	- Yüksek saflık - Farklı EV (alt) popülasyonlarını saflaştırma potansiyeli - Diğer karakterizasyon yöntemleriyle birleştirme yeteneği (yani, akış sitometrisi, western blot ve rt-PCR)	- Pahalı (eğer antikör essansiyel) - EV elüzyonu yüzey proteinlerine ve işlevsellik zarar verebilir - Tipik olarak, belirli EV-yüzey antijenlerine yönelik uygun mAb'lerin mevcudiyetine bağlıdır - Düşük ölçeklenebilirlik - Düşük verim (çiltilme kapasitesi)
Boyut dışlama ve jel geçirgenlik kromatografisi	Boyut, moleküller ağırlığı Bu yaklaşım, EV'leri plazma örneklerinden izole etmek için yaygın olarak uygulanmıştır ve yüksek verimli klinik örnekler için uyarlanmıştır (ticari olarak temin edilebilen sütunlar kullanılarak). Jel geçirgenlik kromatografisi, ilgili büyük problemin üstesinden gelir. DC / DGC kullanılarak plazma / serumdan EV izolasyonu ile -örneğin, EV'lerin büyük-Mr protein kimileri ve lipoproteinlerle birlikte izolasyonu sağlanabilir.	- Yüksek ölçeklenebilirlik	- Elüzyon tamponunda seyreltme

Cökeltme	<p>Polietlen glikol / tuz çözültüsü kullanılan tuzlama</p> <p>Bu yaklaşım, hızlı ancak saf olmayan EV preparatları sağlar ve bu nedenle ayrıntılı biyofiziksel / fonksiyonel test amaçları için uygun değildir. Bununla birlikte, yöntem, bilinen EV ile ilişkili biyobelirteçlerin tansal deneyleri için ham EV hazırlığı için bir izolasyon / konsantrasyon adımı görevi görür.</p> <p>Ardışık polietlen glikol cökeltme ve hareketsizleştirilmiş lektin konkanavalin A'ya adsorpsiyon kullanılan son gelişmeler, hem eksozomların hem de sMV'lerin seçici olarak zenginleştirilebileceğini göstermiştir.</p>	<p>- Büyük hacimler için uygulanabilir</p> <p>- Ardışık yağış / adsorpsiyondaki son gelişmeler, seçili EV türlerinin farklı şekilde izole edilebileceğini göstermiştir.</p>	<p>- Düşük saflık</p> <p>- PEG zinciri EV'leri kaplayabilir ve muhtemelen işlevselliğine müdahale edebilir</p>
Sıralı filtreleme	<p>Proteinlerin ve diğer makromoleküllerin membran filtrasyonu (boyut, moleküler ağırlık) düşük protein bağlayıcı membranlarla (örneğin polietilen sülfon veya hidrofilik poliviniliden diflorür (PVDF)) donatılmış nanomembran ultrafiltrasyon spin cihazları EV izolasyonu için kullanılabilir. İçinde DC ve DGC ile birlikte nanomembran ultrafiltrasyonu, EV alt popülasyonlarının fraksiyonlanmasını sağlamıştır; Aynı kanser hücreleri kaynaklı sMV'ler ve eksozomlar gibidir.</p>	<p>- Orta ölçeklenebilirlik</p> <p>- Ayrılma zamanı (verimlilik)</p> <p>- Ultrasantrifüj için doğrudan gereksinim yoktur (yani, eksozomların bütünlüğünü korur)</p>	<p>- EV, membran filtrasyonu tkayabilir</p> <p>- Örmek kaybı (verim)</p> <p>- Boyutları benzer olan belirli EV alt türleri arasında ayırım yapmaz.</p>

Eksozomların biyofiziksel ve biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmek için Nanoparçacık İzleme Analizi-Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), Dinamik Işık Saçılımı-Dynamic Light Scattering (DLS), Dirençli Darbe Algılama-Resistive Pulse Sensing (RPS), Atomik Kuvvet Mikroskobu-Atomic Force Microscopy (AFM), Geçirimli Elektron Mikroskobu-Transmission Electron Microscopy (TEM) ve akış sitometrisi yöntemleri kullanılmaktadır.

Nanoparçacık İzleme Analizi (NTA)

Biyofiziksel yöntemlerden ilki olup optik partikül izleme yöntemi olan NTA, 1 nm ile 2 µm aralığında eksozomların konsantrasyonunu ve boyut dağılımını ölçebilmektedir. Bu yöntem bize parçacıkların boyutu, boyut dağılımı, konsantrasyon ve fenotipinin eş zamanlı analizini yapmada yardımcı olmaktadır. NTA'nın önemli avantajları, eksozomlarla birlikte EV'lerin tespitinde ve 30 nm'ye kadar küçük çaplardaki nanoparçacıkları ölçebilmesidir. Bu yöntem sayesinde örnek hazırlamada kolaylık ve hız kazanılmaktadır. Ölçüm yapmak sadece birkaç dakika sürmekte ve ölçümler yapıldıktan sonra numuneler doğal formlarında geri kazanılabilmektedir (Gurunathan, Kang, Jeyaraj, Qasim, & Kim, 2019).

Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Eksozomların yine boyutunu ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin avantajı boyutları 1 nm ile 6 µm arasında değişiklik gösteren parçacıkları stabiliteyi yani yüzey yükleri ile beraber ölçebilmektedir. Tek dağılımlı bir süspansiyondaki bir partikül türünü kolaylıkla ölçebilmektedir. EV'lerin boyut ve yüzey yükü dağılımını değerlendirmede kullanılmaktadır (Gurunathan et al., 2019).

Dirençli Darbe Algılama (RPS)

Eksozomların boyut dağılımını ve konsantrasyonunu ölçmede kullanılan bir yöntemdir. Çapı yaklaşık olarak 50 nm'den hücre boyutuna kadar değişen koloidal partikülleri karakterize ederken kolaylık sağlamaktadır. Hücresel işlev ve alım durumlarında önem taşımaktadır. Bu yöntemin en önemli özelliklerinden biri, eksozomların yerinde tek partikül karakterizasyonu ve konsantrasyon ölçümü yapmasıdır. Parçacık bazında öznel olmayan karakterizasyon yeteneğine sahip olmakla birlikte manyetik boncuklar ve çeşitli biyomoleküller dahil olmak üzere çeşitli nanopartikül süspansiyonlarını doğru bir şekilde ölçmek için kullanılmaktadır (Gurunathan et al., 2019).

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Eksozomları incelemede optik ve elektron kırınım fiziksel prensiplerinin sağladığı avantajdan dolayı, en uygun yöntem denilebilmektedir. Cantilever (sensör) ucu ile numune yüzeyi arasındaki etkileşimleri algılayarak onları kaydetmektedir. Yöntemin en önemli özelliklerinden biri numuneleri doğal koşullarda, minimum numune hazırlama işlemi ile ve herhangi bir tahrip edici çalışma durumu olmadan ölçme yeteneğine sahip olmasıdır. AFM, eksozomların bolluğunu, morfolojisini, biyomekaniğini ve biyomoleküller yapısını karakterize etmek için nano ölçekli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, tek vezikül ve alt veziküller seviyelerdeki eksozomların farkına varmamıza katkıda bulunmaktadır (Gurunathan et al., 2019).

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Nano boyutlu eksozomlar ve numune hazırlamada kullanılmaması yanı sıra eksozom morfolojisini incelemede kullanılan bir yöntemdir. TEM eksozomları görselleştirir ve bu görseller daha sonra eksozom çap ölçümleri için kullanılmaktadır. TEM kullanılması genel olarak 3 temel amacı vardır. 1) Çözelti içinde eksozom varlığını kontrol etmek, 2) Eksozomların izolasyon kalitesini değerlendirmek, 3) Eksozomların iç ve dış yapı morfolojisinin detaylı bir şekilde incelemek (M. Zhou, Weber, Zhao, Chen, & Sundstrom, 2020).

Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi, moleküler bir yöntem olup eksozomal yüzey proteinlerini karakterize etmek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda eksozomların boyutunun ve yapısının ölçülmesinde de yardımcı olmaktadır. Akış sitometrisi, tekli EV'lerin hücreSEL kökenini belirleme yeteneğine sahip olduğu için EV analizinde en sık kullanılan yöntemlerden biri olmaktadır. İlk numune hacmi, bu yöntem kullanılarak eksozomların izolasyonunda ve karakterizasyonunda büyük katkı sağlamaktadır (Gurunathan et al., 2019).

Eksozomların Tanı ve Terapötik Kullanımı

Eksozomlar, hedef hücreyi programlama ve hücreSEL nişi düzenleme suretiyle birçok hastalıkta rol aldığı kanıtlanmıştır. Dolaşımında yer alan eksozomlar teşhis potansiyeline sahiptir. Eksozomların biyolojik özellikleri sadece tanıyla sınırlı kalmamakta ayrıca tedaviye yönelik araçlar geliştirilmesine olanak vermektedir (Tickner, Urquhart, Stephenson, Richard, & O'Byrne, 2014). Eksozomlar hızlı parçalanabilecek molekülleri zar yapısı sayesinde koruması sonucunda uzak bölgelere dahi taşınımını gerçekleştirebilmektedir. Eksozomlar; tümör hücreleri, stromal doku ve immün hücrelerle etkileşim sağlayarak bazı fonmları almakta ve tümörjenez veya metastazın önlenmesinde hedeflemeli olarak modüle edilmektedir. Ayrıca, hastalarda ekstrakorporael saflaştırmanın kullanılmasıyla viral enfeksiyonları azaltılmaktadır. Bu olay eksozomları dolaşım sisteminden uzaklaştırmayı sağlamaktadır. Eksozomların çıkarılmasına dayanan tedaviler teknik ve maddi açıdan zorluklar ortaya çıkarmasına rağmen klinik olarak uygulanmaları gerekmektedir. Eksozomların dolaşım sisteminden uzaklaştırılmaları, metastatik etkisinin indirgenmesinde sık kullanılan bir seçenek olmaktadır. Eksozom üretiminin engellenmesi tümör hücrelerinin gelişimini durdurabilmektedir ve mikrotübül düzeni, kararlılığının amaçlanması endozomal dizilim yolları ve proton pompası inhibitörlerinin kullanılması da dahil birçok yöntem önerilmektedir (Tickner et al., 2014). İmmün sistemden kaçabilme özelliğine sahip bazı eksozomlar bulunmaktadırlar. Adriamisin yüklü eksozomlar, immün sistemden kaçabilen eksozomlar arasında yer almakta olup düşük immünojenite ve toksisite özelliği taşımaktadır. Lipozomlara nazaran eksozomlar, tümör hücrelerine daha çok nüfuz etmekte ve katkakat daha fazla içselleşmektedir (Aheget et al., 2021). Eksozomların immün sistemi uyarıcı gücü 15 yıl önce keşfedilmiştir.

Bu keşifle dendritik hücrelerden salgılanan eksozomların, tümör antijenini T hücrelerine sunabilen ve farelerde anti-tümör immün yanıtlarını indükleyebilen fonksiyonel majör histo-uyumluluk

kompleksleri içerdiği ortaya çıkmıştır. Daha sonrasında dendritik hücre kaynaklı eksozomlar kullanılarak anti-tümör immün yanıtların indüklenilebileceğini gösteren Faz I klinik denemelerine olanak sağlamıştır. Bu, bir kanser aşısı olarak peptid yüklü eksozomlar (dendritik hücreden türetilmiş eksozomlar) kullanılarak daha da genişletilmiştir (Tickner et al., 2014). Nöral hücreleri hedefleyen ve kan beyin bariyerini geçebilme yetisine sahip eksozomların geliştirilmesi sayesinde toksisite oranı da azaltılmaktadır. Bu sayede eksozomların, tümör türevli antijen uygulamalarında etkili olabileceği öngörülmüştür (Tickner et al., 2014).

İlaç iletimi sağlayan eksozomlar, kemoterapötik ilaçlarda da çoğu kanser hastalıkları ve tümör için iyileştirici özellik taşımaktadır (Jia,Chen et el.2017). Kanser hücrelerinde de hedefleme sağlayan eksozomlar, boyut olarak lipozomlara oranla küçük olmaları nedeniyle taşıma işlemlerinde daha uygun olmaktadır. İlaç dağıtımı sırasında kan beyin bariyerini (KBB) geçmesinde boyutları avantaj sağlamaktadır (Song liu et al.2021). Örnekle olarak doksorubisin ilacı meme kanser tedavisinde tümör büyümesini engelleyerek terapötik durum sergilemektedir. Meme kanserinde başka bir tedavi yöntemi olarak miRNA taşımacılığı da verilebilmektedir. Sunulan çalışmalarda doksorubisinin farklı kanser hücrelerine hedefleme ve transferini gerçekleştirerek salınım yapabileceği üzerinde durulmaktadır. Meme ve yumurtalık kanseri kobay farelerinde doksorubisinin terapötik etkisi oldukça fazla olmuştur ve miyokardiyal endotelial hücrelerden geçişi kısıtlayarak diğer organlara etki etmeden kalpte ilaç birikimini engellemektedir (Jia,Chen et el.2017). Başka bir çalışmada saflaştırılmış fare olgunlaşmamış dendritik hücrelerden türetilmiş eksozomlar ile elektroporasyon ortamında doksorubisin kanştırılmaktadır.

Transmisyon elektron mikroskobu ile plazma membranlarının geri kazanımı izlenmiştir. Yükleme işlemi onaylandıktan sonra hedef hücrenin çekirdeğine iletilen doksorubisin, tümörün büyümesini toksisite sağlanmadan engellediği gösterilmiştir (Tian et al., 2014). Ayrıca boyut avantajı açısından biyolojik engelleri geçebilme yetisine sahip eksozomlar, zebra balığı deneyinde kan beyin bariyerini aşarak doksorubisin yüklü eksozom geçişi sağlanmakta ve bu şekilde zebra balığının beyin kanseri tedavisi gerçekleştirilmektedir (Liang et al., 2020)

Kan beyin bariyerine aşabilen eksozom aracı terapötik yöntem sayesinde tümör oluşumunu ve yayılımını tedavi edebilmek amacıyla hücrelere ilaç, mikroRNA ve antijenler gibi bileşenlerin eksozoma yüklenmesiyle hedef bölgeye iletilmesi gerçekleştirilmektedir.

Eksozomlar, doku hedefli siRNA ve mikroRNA'lar ile hücrede gen ekspresyonu sağlayabilmektedir bu da hem tanı hem tedavi açısından bu nanopartikülleri önemli kılmaktadır (Tickner et al., 2014). Alvarez-Erviti ve grubu, elektroporasyon tekniğini kullanarak eksozomlar aracılığıyla fare beynine genetik materyal olarak siRNA'yı iletmıştır (Alvarez-Erviti et al., 2011). Farklı olarak Wahlgren ve grubu, plazma eksozomlarını kullanarak insan kan hücrelerine eksojen siRNA'yı iletmıştır. Eksozomlar siRNA'ları sorunsuz bir şekilde ileterek mitojenle aktive olan protein kinaz 1'in güçlü gen susturulmasına yol açtığı ortaya koymakta ve gen tedavisinde ilaç iletiminde eksozomların kullanılmasını benimsemektedir (Butreddy, Kommineni, & Dudhipala, 2021). Kamerkar ve grubu, siRNA ile elektroprosyonlu MSH türevli eksozomlar kullanarak tümörlerde onkojenik KRAS'ın doğrudan ve spesifik hedeflenmesi için bir teknik göstermektedir. Bu teknik yöntemi, pankreas kanserini çoklu kobay fare modellerinde hayatta kalma süresini arttırarak kanseri durdurmaktadır. Yine bu yöntem, göğüs kanseri hücrelerine eksprese edilen epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EBFR) miRNA ve eksozomlar yüklenerek kullanılmaktadır. Bu çalışma eksozomların nükleik asit ilaçlarıyla EBFR eksprese eden kanserli dokuların tedavisinde ve hedeflemesinde önemli rol oynadığı görülmektedir. Endotel hücreler kemoterapik ajanlarla tedavi edildiğinde miRNA-503 içeren eksozomlar salma oranı artmaktadır. miRNA-503'ün, tümöral koşullar altında kültürlenmiş endotel hücrelerinden salınan eksozomlarda aşağı regüle edildiği göz önüne alındığında, miRNA-503'ün meme kanseri hücrelerine dâhil edilmesi hem CCND2'yi hem de CCND3'ü inhibe ederek bunların proliferatif ve metastatik kapasitelerini değiştirdiği gösterilmiştir (Aheget, Mazini et al.2021). RNA türleri kanser hastalıklarında da terapötik bir biyobelirteç adaydır. Taylor ve grubu, iyi huylu ve kötü huylu yumurtalık kanserini eksozomal miRNA seviyeleriyle ayırt edilebileceğini göstermektedir. Bazı kanser türlerinde eksozomal miRNA'lar: prostat kanserinde idrardan türetilen eksozomal miR-107 ve miR-574-3p, göğüs kanserinde plazmadan türetilen eksozomal miR-141 ve miR-195 ve serumdan türetilmiş miR-195'i içermektedir. Glioblastomda miR-21 ve özofagus skuamöz hücreli karsinomda bulunmaktadır. Bu miRNA'lar normal koşullara nazaran kanser hastalıklarında yüksek seviyelerde bulunmaktadır (Brinton et al., 2015).

teşhisinde kullanım kolaylığı sağlanmasının yanı sıra iyi biyo-dağılım, biyoyoumluluk ve düşük immünojeniteye sahip olmalarında dolayı ilaç taşıyıcı olarak tedavi aşamasında da kullanıma olanak sağlamaktadır.

Sonuç olarak biyolojik yapıları gereği ve hastalık prognos ve patagonezindeki rolünden dolayı eksozomlar biyobelirteç olarak tanı ve tedavi edici belirteç olarak kullanıma olanak sağlamaktadır. Hemen hemen her hastalıkta etkin rol almalarından dolayı hastalıkların

KAYNAKLAR

- Aheget, H., Mazini, L., Martin, F., Belqat, B., Marchal, J. A., & Benabdellah, K. (2021). Exosomes: Their Role in Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Diseases. *Cancers*, 13(1), 84.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341-345.
- Barile, L., & Vassalli, G. (2017). Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 174, 63-78.
- Brinton, L. T., Sloane, H. S., Kester, M., & Kelly, K. A. (2015). Formation and role of exosomes in cancer. *Cellular and molecular life sciences*, 72(4), 659-671.
- Butreddy, A., Kommineni, N., & Dudhipala, N. (2021). Exosomes as Naturally Occurring Vehicles for Delivery of Biopharmaceuticals: Insights from Drug Delivery to Clinical Perspectives. *Nanomaterials*, 11(6), 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. *Respiratory research*, 20(1), 1-11.
- Chung, C.-C., Chan, L., Chen, J.-H., Hung, Y.-C., & Hong, C.-T. (2021). Plasma extracellular vesicle α -synuclein level in patients with parkinson's disease. *Biomolecules*, 11(5), 744.
- Desdín-Micó, G., & Mittelbrunn, M. (2017). Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. *Cell adhesion & migration*, 11(2), 127-134.
- Ersöz, E., Can, O. B., & Uzunoğlu, S. (2016). Eksozomların kanserdeki rolü. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(1), 144-152.
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J.-H. (2019). Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, 8(4), 307.
- H Rashed, M., Bayraktar, E., K Helal, G., Abd-Ellah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A., & Rodriguez-Aguayo, C. (2017). Exosomes: from garbage bins to promising therapeutic targets. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 538.
- Hasegawa, Y., Futamata, H., & Tashiro, Y. (2015). Complexities of cell-to-cell communication through membrane vesicles: implications for selective interaction of membrane vesicles with microbial cells. *Frontiers in microbiology*, 6, 633.
- Hu, C., Chen, M., Jiang, R., Guo, Y., Wu, M., & Zhang, X. (2018). Exosome-related tumor microenvironment. *Journal of cancer*, 9(17), 3084.
- Jiang, L., Dong, H., Cao, H., Ji, X., Luan, S., & Liu, J. (2019). Exosomes in pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 3329.
- Jones, L. B., Bell, C. R., Bibb, K. E., Gu, L., Coats, M. T., & Matthews, Q. L. (2018). Pathogens and their effect on exosome biogenesis and composition. *Biomedicines*, 6(3), 79.

- Kahveci, K., & Türkođlu, M. (2020). İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri Ctl4 ve Pd-1/Pd-11'in İmmünoterapideki Yeri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(2), 210-218.
- Kohlhapp, F. J., Mitra, A. K., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2015). MicroRNAs as mediators and communicators between cancer cells and the tumor microenvironment. *Oncogene*, 34(48), 5857-5868.
- Kok, V. C., & Yu, C.-C. (2020). Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. *International Journal of nanomedicine*, 15, 8019.
- Liang, G., Zhu, Y., Ali, D. J., Tian, T., Xu, H., Si, K., Sun, B., Chen, B., Xiao, Z. (2020). Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer. *Journal of nanobiotechnology*, 18(1), 1-15.
- Ludwig, N., Yerneni, S. S., Razzo, B. M., & Whiteside, T. L. (2018). Exosomes from HNSCC promote angiogenesis through reprogramming of endothelial cells. *Molecular Cancer Research*, 16(11), 1798-1808.
- Ohno, S.-i., Ishikawa, A., & Kuroda, M. (2013). Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Advanced drug delivery reviews*, 65(3), 398-401.
- Rai, A., Fang, H., Fatmou, M., Claridge, B., Poh, Q. H., Simpson, R. J., & Greening, D. W. (2021). A Protocol for Isolation, Purification, Characterization, and Functional Dissection of Exosomes. In *Proteomic Profiling* (pp. 105-149): Springer.
- Schwab, A., Meyering, S. S., Lepene, B., Iordanskiy, S., van Hoek, M. L., Hakami, R. M., & Kashanchi, F. (2015). Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Frontiers in microbiology*, 6, 1132.
- Song, H., Liu, B., Dong, B., Xu, J., Zhou, H., Na, S., Liu, Y., Pan, Y., Li, L., Wang, J. (2021). Exosome-Based Delivery of Natural Products in Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 366.
- Tavukçuoğlu, Z. (2018). Enfeksiyon Hastalıklarında, Tanı ve Tedavi Yaklaşımları Açısından Eksozomlar.
- Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., Wei, J., Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383-2390.
- Tickner, J. A., Urquhart, A. J., Stephenson, S.-A., Richard, D. J. Ftavuk & O'Byrne, K. J. (2014). Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Frontiers in oncology*, 4, 127.
- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 164(6), 1226-1232.
- Urbanelli, L., Buratta, S., Sagini, K., Ferrara, G., Lanni, M., & Emiliani, C. (2015). Exosome-based strategies for diagnosis and therapy. *Recent Patents on CNS Drug Discovery (Discontinued)*, 10(1), 10-27.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654-659.

Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(7), 940-948.

Wang, M.-M., Feng, Y.-S., Tan, Z.-X., Xing, Y., Dong, F., & Zhang, F. (2020). The role of exosomes in stroke. *Molecular Biology Reports*, 1-12.

Yu, H., Sun, T., An, J., Wen, L., Liu, F., Bu, Z., Cui, Y. Feng, J. (2020). Potential roles of exosomes in Parkinson's disease: From pathogenesis, diagnosis, and treatment to prognosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.

Zhang, Z. G., & Chopp, M. (2016). Exosomes in stroke pathogenesis and therapy. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1190-1197.

Zhou, M., Weber, S. R., Zhao, Y., Chen, H., & Sundstrom, J. M. (2020). Methods for exosome isolation and characterization. *Exosomes*, 23-38.

Zhou, W., Fong, M. Y., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M. R., Yu, Y., Chow, A., O'Connor, S. T. F., Chin, A. R., Yen, Y., Wang, Y., Marcusson, E. G., Chu, P., Wu, J., Wu, X., Li, A. X., Li, Z., Gao, H., Ren, X., Boldin, M. P., Lin, P. C., Wang, S. E. (2014). Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer cell*, 25(4), 501-515.