

Atıf İçin: Kaan, D., (2023). Adipoz Doku Kaynaklı Ekstrasellüler Veziküllerin Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkisi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(2), 914-924.

To Cite: Kaan, D., (2023). Apoptotic Effect of Adipose Tissue-Derived Extracellular Vesicles on Breast Cancer Cells. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(2), 914-924.

Adipoz Doku Kaynaklı Ekstrasellüler Veziküllerin Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkisi

Dilek KAAAN^{1,2}

Öne Çıkanlar:

- Mezenkimal kök hücre
- Eksozom
- Apoptozis

Anahtar Kelimeler:

- Meme kanseri
- Adipoz doku kaynaklı eksozom
- Presipitasyon metodu
- Apoptozis

ÖZET:

Meme kanseri, en yaygın küresel malignitedir ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Meme kanserinin erken teşhis edilmesi, farklı tedavi yöntemleri ile tedavi başarı oranını yükseltmektedir. Ancak ilerleyen evrelerde ise hem tedavi başarı oranı düşmektedir hem de güncel tedavi yöntemlerinden kemoterapi veya radyoterapinin uygulanmasının hastaya yan etkileri de olabilmektedir. Bu nedenle kişiye özel, yan etkinin olmadığı tedavi modellerini bulmak gerekir. Eksozomlar doğal nanopartiküller olup, aynı zamanda hücreler arası iletişimde önemli roller oynayan, çok çeşitli lipidler, proteinler, metabolitler, RNA'lar ve DNA'lar içeren küçük hücre dışı veziküller olarak bilinirler. Bu çalışmanın amacı, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden presipitasyon yöntemi ile elde edilen eksozomların (AD-Ekso) insan meme kanseri hücre hattı, MCF-7, ve meme epitel hücre hattı, MCF10A, üzerinde farklı konsantrasyonlarda Annexin V/PI metodu kullanılarak apoptotik etkilerinin araştırılmasıdır. Erken apoptotik, geç apoptotik, canlı ve ölü hücreler, her iki hücre hattında 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı 40×10^{10} , 20×10^{10} ve 10×10^{10} AD-Ekso/mL konsantrasyonları ile muamele edilerek MCF-7 gruplarında toplam yüzde total apoptotik etkileri 24 saat için 40×10^{10} /AD-Ekso/mL'de 58.817 ± 4.2 , 48 saat için 20×10^{10} /AD-Ekso/mL 'de 56.37 ± 9 ve 72 saat için 20×10^{10} AD- Ekso/mL'de 70.9 ± 4.1 'dir. AD-Ekso verilen MCF-7 hücre grupları hem kendi aralarında hem de AD-Ekso uygulanmayan MCF-7 hücre grupları ve MCF10A hücre grupları ile karşılaştırıldığında zaman ve doza bağlı olarak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). MCF10A ve MCF-7 kontrol grupları değerlendirilmiş ve anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Sonuç olarak, eksozomlar kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek kanser tedavisinde potansiyel kapasiteye sahip olabilir.

Apoptotic Effect of Adipose Tissue-Derived Extracellular Vesicles on Breast Cancer Cells

Highlights:

- Mesenchymal stem cell
- Exosome
- Apoptosis

Keywords:

- Breast cancer
- Adipose tissue derived exosomes
- Precipitation methods
- Apoptosis

ABSTRACT:

Breast cancer is the most common global malignancy and the second leading cause of cancer death. Early diagnosis of breast cancer increases the success rate of treatment with different treatment methods. However, in the advancing stages, both the treatment success rate decreases, and the application of chemotherapy or radiotherapy, which is one of the current treatment methods, may also have side effects on the patient. Therefore, it is necessary to find that personalized treatment models do not have side effects. Exosomes are natural nanoparticles and are also known as small extracellular vesicles which play important roles in intercellular communication, containing a wide variety of lipids, proteins, metabolites, RNAs and DNAs. This study aimed to investigate the apoptotic effects of exosomes obtained from an adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (AT-Exo) by precipitation method on human breast cancer MCF-7 and breast epithelial MCF10A at different concentrations by using Annexin V & Dead Cell method. Early apoptotic, late apoptotic, live and dead cells have been evaluated by Annexin V-FITC/PI staining in both cell lines and have found that the percentage of total apoptotic $58.817 \pm 4.2\%$, $56.37 \pm 9\%$, $70.9 \pm 4.1\%$ in the 40×10^{10} , 20×10^{10} ve 10×10^{10} AT-Exo mL^{-1} groups for 24h, 48h and 72h respectively. When MCF-7 cell groups given AT-Exo have been compared both among themselves and with MCF-7 and MCF10A cell groups not given AT-Exo, the difference has been statically significant depending on time and dose ($p < 0.05$). MCF10A and MCF-7 control groups have been evaluated, and no significant difference has been observed ($p > 0.05$). In conclusion, exosomes may have the potential capacity in cancer therapy by inducing apoptosis in cancer cells.

^{1,2} Dilek KAAAN ([Orcid ID: 0000-0003-3622-2249](https://orcid.org/0000-0003-3622-2249)), ¹Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri, Türkiye ²Erciyes Üniversitesi, Halil Bayraktar Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Kayseri, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Dilek KAAAN, e-mail: drdlkkaan@gmail.com

Makale 23-25 Kasım 2022 tarihinde online düzenlenen "5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022) kongresi 'nde" sözlü olarak sunulmuştur.

Etik Kurul Onayı / Ethics Committee Approval: Bu çalışmanın in vitro çalışma yöntemi olup, hazır ticari hücre hatlarının kullanılması nedeniyle çalışmanın doğası gereği herhangi bir etik kurul onayı uygulanamaz.

GİRİŞ

Kök hücreler, insan vücudunun özelleşmemiş hücreleridir. Bir organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilir ve kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Kök hücreler hem embriyolarda hem de yetişkin hücrelerde bulunur. Kök hücre çeşitleri basit izolasyon prosedürleri ve kültürde yüksek proliferatif yetenekleri (Wankhade ve ark., 2016), düşük immünojenisite ve immünosupresif özellikleri, uzun süreli kültürde daha stabil olmaları, diğerlerine göre daha düşük yaşlanma ve daha fazla çoğalma yetenekleri nedeniyle rejenerasyon tedavileri için uygun bir araçtır (Barone ve ark., 2016). İnsan adipoz dokudan türetilen kök hücreler (iADKH'ler), şartlandırılmış bir ortam kullanılarak uyarılma üzerine farklı hücre soylarına farklılaşabilir. Özellikle, mikro çevreden gelen küçük moleküller veya fiziksel enerjiler, kök hücrenin; kendini yenileme, farklılaşmayı indüklemeye ve hücre yeniden programlama gibi farklı yolları modüle ederek ve değiştirerek hareket edebilir. (Basoli ve ark., 2017, Santaniello ve ark., 2018). Bu tür bir davranış, yalnızca farklılaşmamış bir kök hücrenin korunmasıyla ilgili değil, aynı zamanda hem hücre çoğalması hem de farklılaşmamış kök hücrelerde yer alan ve ifade edilen oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (OCT4), SRY-ilişkili HMG-box (SOX) ailesinin bir üyesi olan SOX2 ve Nanog proteinleri (Nanog homeobox) (Chambers ve Tomlinson 2009) dahil olmak üzere kök genlerine bağlıdır (Shi ve Jin 2010). OCT4, SOX2 ile birlikte somatik hücrelerin in vitro olarak soy spesifikasyonunda ve yeniden programlanmasında rol oynayan önemli bir belirteçdir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Nanog, insan gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan bir kök hücre transkripsiyon faktörüdür; hücre çoğalma ve apoptozda yer alır. iADKH'ler, rejeneratif ve estetik/plastik rekonstrüksiyon tıbbında, düzensizliği önceden var olan malignitelere bağlı olmayan, daha çok hipoksik/iskemik, travmatik ve inflamatuvar koşullardan kaynaklanan, alıcının yaralanmış dokularına farklı yöntemlerle nakledilerek yaygın olarak kullanılmaktadır. Adipoz dokudan elde edilmiş mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), kök hücrelerin önemli bir dalıdır ve rejeneratif tıp, hücre tedavisi ve doku mühendisliği araştırmalarında umut verici tohum hücreler olarak kabul edilmiştir. Buna göre, MKH'lerden türetilen eksozomlara (MKH-Ekso) dayalı araştırma büyük değere sahiptir. Eksozomlar, multiveziküler hücre zarlarının füzyonu ile oluşan 30-150 nm çapında hücre dışı veziküller (EV)'dir (Gurunathan ve ark., 2019). EV'ler, boyutlarına, biyolojik özelliklerine ve oluşum süreçlerine göre temel olarak eksozomlara, mikro-parçacıklara ve apoptotik cisimlere ayrılır. Hemen hemen tüm hücreler tarafından salınabilirler, hücreden hücreye iletişim yoluyla hedef hücrelere aktarılabilirler ve çeşitli biyolojik işlevleri yerine getirebilirler (Li ve ark., 2019). Biyolojik olarak aktif veziküller olan eksozomlar, biyofarmasötikler ve nanotıp (nano-ilaçlar) özelliklerine sahiptir. Bu nedenle, eksozomlar doğal "biyo-nanotıp" olarak adlandırılabilir (Wei ve ark., 2020). Bu açıdan, MKH-eksozomları potansiyel nano-terapötik ajanlar olarak kabul edilebilir.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir. Bu kanser moleküler düzeyde heterojen bir hastalıktır ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (ERBB2 tarafından kodlanan HER2) aktivasyonunu, hormon reseptörlerinin (östrojen ve progesteron reseptörü) aktivasyonunu ve/veya BRCA (Breast Cancer, Meme Kanseri) mutasyonlarını içerir. Uzak organ metastazları olan ilerlemiş meme kanseri, şu anda mevcut tedavilerle tedavi edilemez olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda, bu hastalığın tedavi konseptleri, bu moleküler heterojenliği dikkate alarak gelişmiş ve daha çok biyolojik olarak yönlendirilen terapilere ve tedavinin olumsuz etkilerini azaltmak için kimyasal ajanlar ile tedaviyi azaltmaya gidilmiştir (Cardoso ve ark., 2017). Bu çalışmanın amacı, sağlıklı adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinden salınan eksozomların (AD-Ekso), HER2 ekspresyon eden meme

kanseri hücre hattı MCF-7 ve meme epitel hücre hattı MCF10A üzerine apoptotik etkilerinin araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan hücre hatları (MCF-7 ve MCF10A) Prof. Dr. Servet Özcan tarafından bağışlanmıştır. MCF-7 hücreleri %5 fetal sığır serum (Fetal bovine serum, FBS) (Biochrom S0113), %1 pen-strep (Lonza DE17-602E), DMEM-High (Dulbecco Minimum Essential Medium) (Lonza BE12-614F) hücre besiyeri (kompleks besiyeri) ortamına yani kütür koşullarına alınarak, 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Her 3 günde bir kompleks besiyeri değiştirilmiştir. Hücre yetiştirme kabının (flask) tabanında hücre yoğunluğu %80-90'a geldiğinde hücreler %0,05 tripsin (Lonza BE17-161F) ile 37°C'de 5 dakika inkübe edilerek hücreler kaldırılmış ve apoptoz testi için hazırlanmıştır. İnsan meme epitel hücre hattı olan MCF10A ise 100 ng/mL kolera toksin (Sigma C8052), 20 ng/mL epidermal büyüme faktörü (EGF) (Sigma E4127), 0,01 mg/mL insülin (PAA F005-045), 500 ng/mL hidrokortizon (Sigma H0888) ve %20 FBS ile takviye edilmiş DMEM/Ham's F-12 (Lonza BE04-687F/U1) kompleks besiyeri 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Her 3 günde bir kompleks besiyeri değiştirilmiştir. Flask tabanında hücre yoğunluğu %90'a geldiğinde hücreler %0,05 tripsin-EDTA ile 37°C'de 5 dakika inkübe edilerek hücreler kaldırılmış ve apoptoz testi için hazırlanmıştır.

Her iki hücre hattı da 6 kuyucuklu flasklara 1x10⁶ hücre olacak şekilde FBS içermeyen kompleks besiyeri ile ekim yapılarak 24 saat boyunca %5 CO₂, 37 °C'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda MCF10A ve MCF-7 hücrelerine karakterizasyon testleri yapılmış 40x10¹⁰, 20x10¹⁰ ve 10x10¹⁰ AD-Ekso/mL olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır.

Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Çalışmada kullanılan insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (American Type Culture Collection, ATCC, PCS-500-011), Prof. Dr. Servet Özcan tarafından bağışlanmış ve hazır hücre hattı olması nedeniyle etik onay gerekmemiştir. AD-MKH %5 FBS), %1 pen-strep ve DMEM-Low (Lonza BE12-708F) içeren kompleks besiyeri ortamına yani kütür koşullarına alınarak %5 CO₂, 37 °C'de inkübe edilmiştir. Flask tabanında hücre yoğunluğu %70-80'e geldiğinde kompleks besiyeri atılarak FBS içermeyen kompleks besiyeri ile 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. Bu zaman sonunda kompleks besiyeri alınarak eksozom izolasyon aşamasına geçilmiştir.

Mezenkimal Kök Hücrelerden Eksozom İzolasyonu

Adipoz doku kaynaklı MKH'lerden salınan eksozomu izole etmek için çökeltme (presipitasyon) yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem için System BioSciences firmasına ait eksozom izolasyon kiti EXOTC50A-1-ExoQuick-TC kullanılarak, 48 saat sonra FBS içermeyen kompleks besiyerinden 5 mL alınarak 3000 x g de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı alınmıştır. Süpernatant kısmı steril bir falkona alınarak kompleks besiyerinin beşte biri olacak şekilde kit içeriğinde bulunan eksozom izolasyonunda kullanılan en yaygın polimer olan polietilen glikol (PEG) içerikli eksozom solüsyonu (1 mL) ile çalkalanmış ve +4 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yine aynı koşullarda santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve pellet kısmı 600 µL fosfat tamponu (dPBS) (Lonza BE17-513F) ilave edilmiştir ve eksozom karakterizasyonu testlerin yapılacağı zamana kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Eksozom Karakterizasyonu

Eksozomların görüntülenmesi

Eksozomların membran bütünlüğünün kontrol edilmesi ve Image J programı kullanılarak boyutlarının ölçülmesi için 1/1000 dilüsyon oranında fosfat tamponu (PBS) ile seyreltilerek altın kaplama yapılarak kurutulmuş ve optimize edilerek Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) (Zeiss GEMINI 500, Almanya) cihazı kullanılarak görüntüleme yapılmıştır. (Brydson ve ark., 2015).

Eksozomların zeta potansiyeli analizi

Eksozomların yüzey yüküne bağlı olan zeta potansiyeli, süspansiyondaki nanopartiküllerin stabilitesi ve ayrıca nanopartiküllerin hücre zarına ilk adsorpsiyonunda ana faktördür. İzole edilen eksozomlar 1/1000 dilüsyon oranı ile fosfat tamponu (PBS) ile seyreltilerek ayrılma ve dağılma stabilitesini belirlemek, elektriksel ve izoelektrik nokta arasında potansiyel farkı için zeta boyutlandırıcı analizörü ile zeta potansiyeli optimize edilerek belirlenmiştir (Rasmussen ve ark., 2020).

Eksozomların nanopartikül izleme analizi

Parçacık boyutu ve konsantrasyonu, lazer ışını aydınlatması altında rastgele dağılan parçacıklardan saçılan ışığın videosu analiz edilerek eksozomların hem boyutları hem de ml'deki sayısı optimize edilerek belirlenmiştir. Boyut dağılım diyagramları, ortalama/mod boyut değerleri ve standart sapmalar nanopartikül izleme analizi (NTA) 3.4 yazılımında hesaplanmıştır (Dragovic ve ark., 2011).

Apoptoz Annexin V/PI boyama

Apoptoz tahlili, üreticinin talimatları izlenerek Anneksin V/ PI yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Annexin V-FITC/Dead Cell kiti, Lumines). Kontrol hücreleri ve eksozom uygulanan hücreler tripsin ile toplanarak PBS içerisinde yıkanmıştır, 100 µl PBS tamponunda yeniden süspansiyon edilerek karanlıkta, oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 100 µl FITC-konjuge Anneksin V/PI ile 20 dk boyunca inkübe edilmiştir. Sonuçlar Muse Cell Analyzer cihazı ile analiz edilmiştir. Bu testten elde edilen veriler dört kategoriye ayrılarak değerlendirilmiştir. Kadran 4, Anneksin V ve PI boyaması tespit edilemediği için çift negatif olup canlı hücreler, kadran 3, Anneksin V pozitif ve membran sağlam kaldığı için PI negatif erken apoptotik hücreler, kadran 2, Anneksin V ve PI boyaması çift pozitif, ikincil nekrotik ve geç apoptotik, kadran 1, pozitif PI ve negatif Anneksin'li nekrotik hücreler, plazma zarı olmayan ölü çekirdek hücreler olarak değerlendirilmiştir.

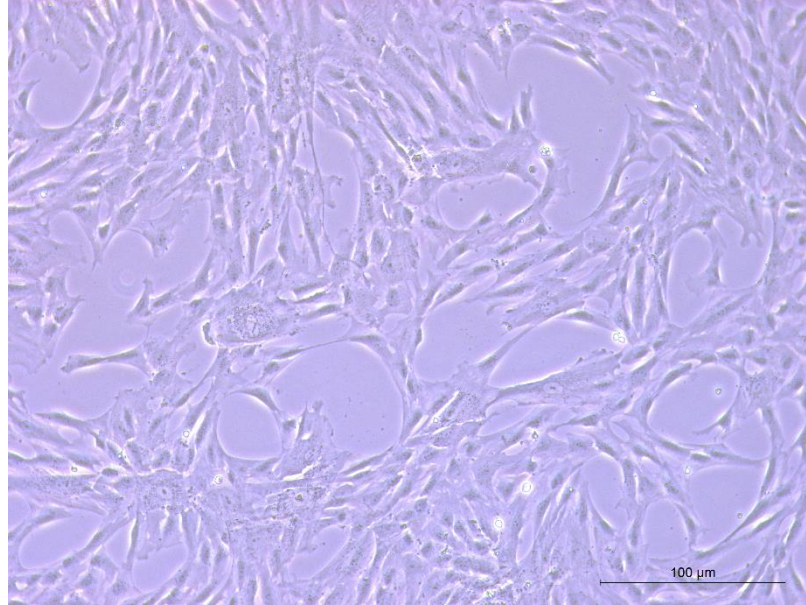
İstatistiksel Analiz

Apoptoz testi sonucu verileri, GraphPad Prism 6 programı kullanılarak grup analizi altında, 3 ayrı bağımsız set halinde, 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan her farklı konsantrasyonun gruplar arası ve gruplar içi değerlendirilmesi için Two way ANNOVA, Tukey multiple comparisons testi ile anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. AD-Ekso uygulanan her konsantrasyon ve zamana bağlı 3 ayrı bağımsız set halinde yapılarak ortalama değerleri, yapısal eşitlik değerleri (SEM) ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Görüntülenmesi

AD-MKH morfolojik olarak değerlendirildiği uzun iğsi yapılar halinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görülmüştür (Şekil 1).

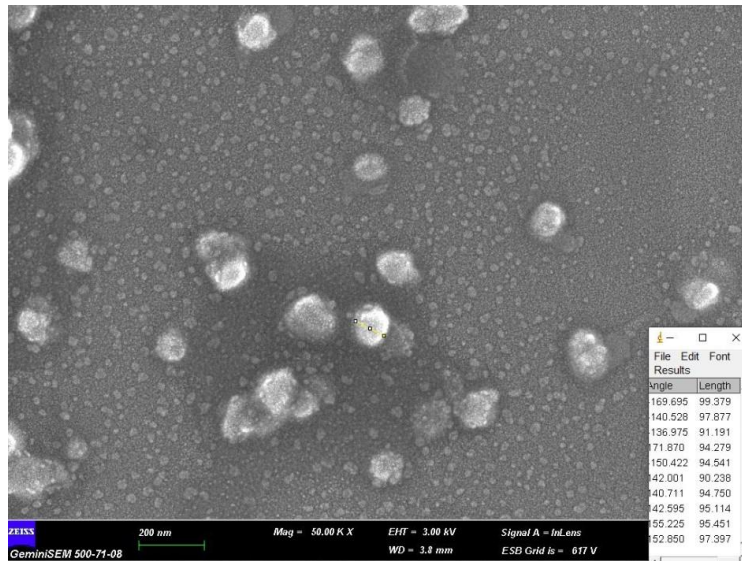


Şekil 1. AD-MKH'lerin 8. gündeki mikroskopik görünümü

Eksozom Karakterizasyonu

Eksozomların SEM analizi bulguları

Presipitasyon metodu sonucunda izolasyonu tamamlanmış olan eksozomların yapısal bütünlüklerini koruduğu izlenmiştir. Image J programı ile yaklaşık 7 eksozomun boyutları ölçülerek boyut ölçümlerinin $95.6 \text{ nm} \pm 2.8$ olduğu hesaplanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Eksozomların SEM görüntüsü ve Image J ile boyut ölçümü

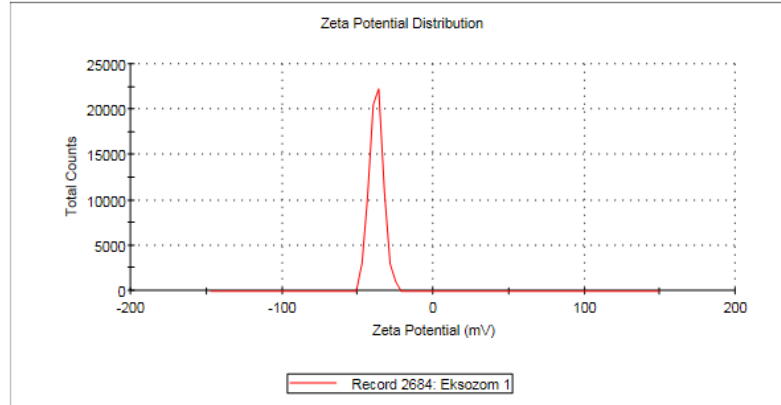
Eksozomların zeta potansiyeli analiz bulguları

İzole edilen eksozomların zeta potansiyeli ölçümü -37.6 olarak bulunmuş ve cihaz tarafından sonuç iyi olarak değerlendirilmiştir. Cihaza bağlı olarak zeta potansiyelinin -30 'a yakın olması izole edilen eksozomlarının elektriksel ve izoelektrik nokta arasında potansiyel farkının kararlı olduğunu göstermektedir (Rasmussen ve ark., 2020). (Şekil 3).

Results

| | Mean (mV) | Area (%) | Width (mV) |
|------------------------------------|---------------|----------|------------|
| Zeta Potential (mV): -37,6 | Peak 1: -37,6 | 100,0 | 4,61 |
| Zeta Deviation (mV): 4,61 | Peak 2: 0,00 | 0,0 | 0,00 |
| Conductivity (mS/cm): 0,997 | Peak 3: 0,00 | 0,0 | 0,00 |

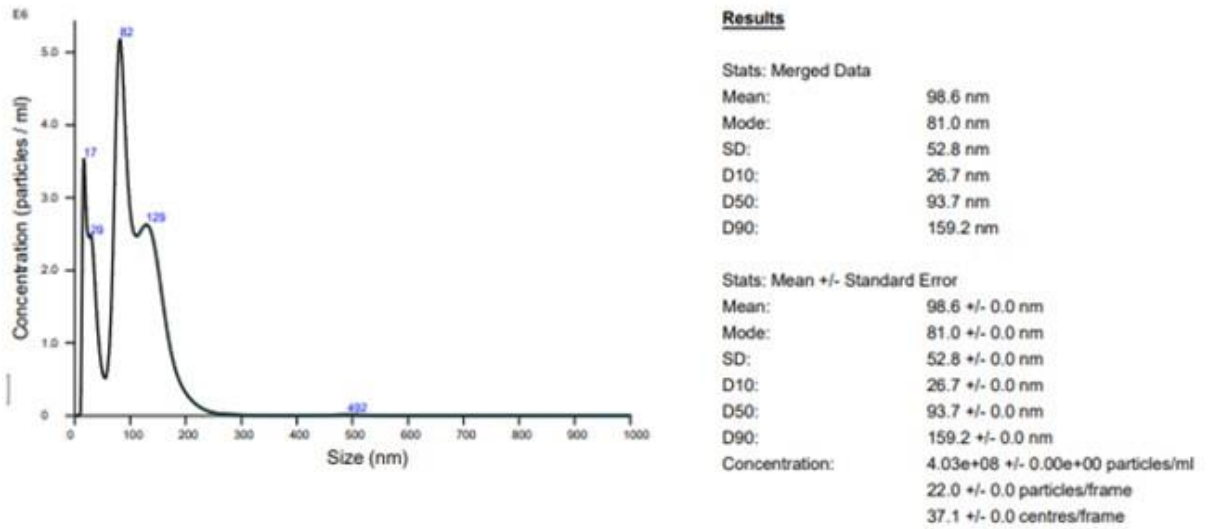
Result quality Good



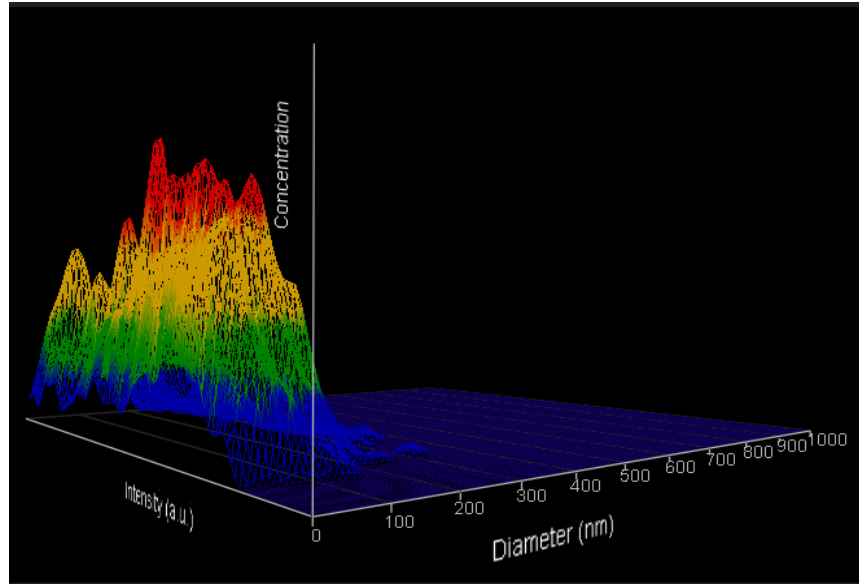
Şekil 3. Eksozomların zeta potansiyeli ölçüm sonucu

Eksozomların nanopartikül izleme analizi bulguları

Eksozomların, NTA sonuçlarına göre ortalama boyutları 98.6 nm olduğu ve ml'de 4.03×10^8 eksozom olduğu NTA cihazı ile ölçülmüş ve hesaplanmıştır (Şekil 4). Ayrıca izole edilen eksozomların boyutlarına göre konsantrasyonları da belirlenmiştir (Şekil 5). NTA sonuçlarının SEM görüntü sonuçları ile karşılaştırıldığında birbirine yakın olduğu ve sonuçların birbirini desteklediği görülmüştür



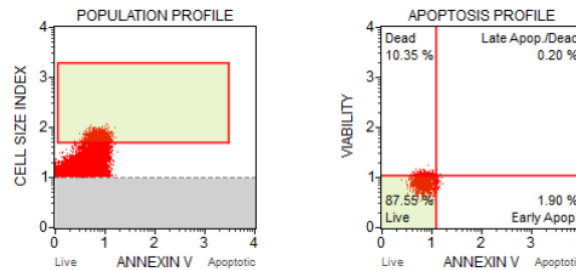
Şekil 4. AD-Eksozomların konsantrasyon ve ortalama boyutları (nm)



Şekil 5. AD-Eksozomların 3 boyutlu boyut-konsantrasyon dağılım grafiği

Anneksin V/PI Boyama ile Apoptoz Bulguları

AD-Ekso, MCF10A hücrelerine uygulandıktan sonra, konsantrasyonlarına bağlı olarak 24 ve 48 saat sonucunda apoptoza uğramamıştır. 72 saat sonucunda ise hücrelerin sadece % 0.2 'sinin geç apoptoz, %1,90 kadarının ise erken apoptotik olduğu ve total de %2.1 değerinde apoptoza uğradığı görülmüştür. Ancak bu sonuç, hücrelerin 72 saat boyunca FBS içermeyen aynı kültür besiyerinde inkübe edilmeleri nedeniyle stres kaynaklı olabileceği de düşünülmektedir (Şekil 6.) MCF10A kontrol ve AD-Ekso uygulanan MCF10A grupları kendi aralarında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).



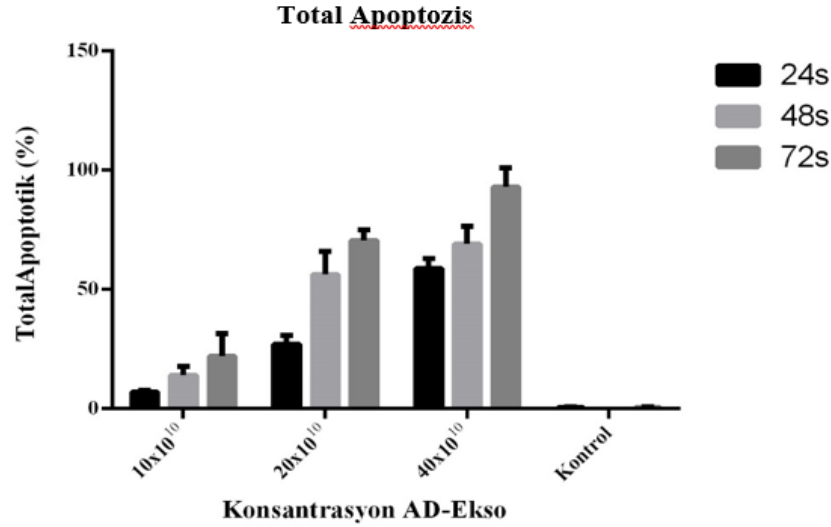
Cell Conc. % Gated
(Cells / mL)

| | | |
|-------------------------|----------|---------|
| Live (LL) : | 1.89E+05 | 87.55 % |
| Early Apoptotic (LR) : | 4.11E+03 | 1.90 % |
| Late Apop./ Dead (UR) : | 4.33E+02 | 0.20 % |
| Debris (UL) : | 2.24E+04 | 10.35 % |
| Total Apoptotic : | 4.54E+03 | 2.10 % |

Şekil 6. 40×10^{10} AD-Ekso/mL uygulanan MCF10A hücrelerinde 72 saat sonucunda yüzde total apoptotik değeri (%)

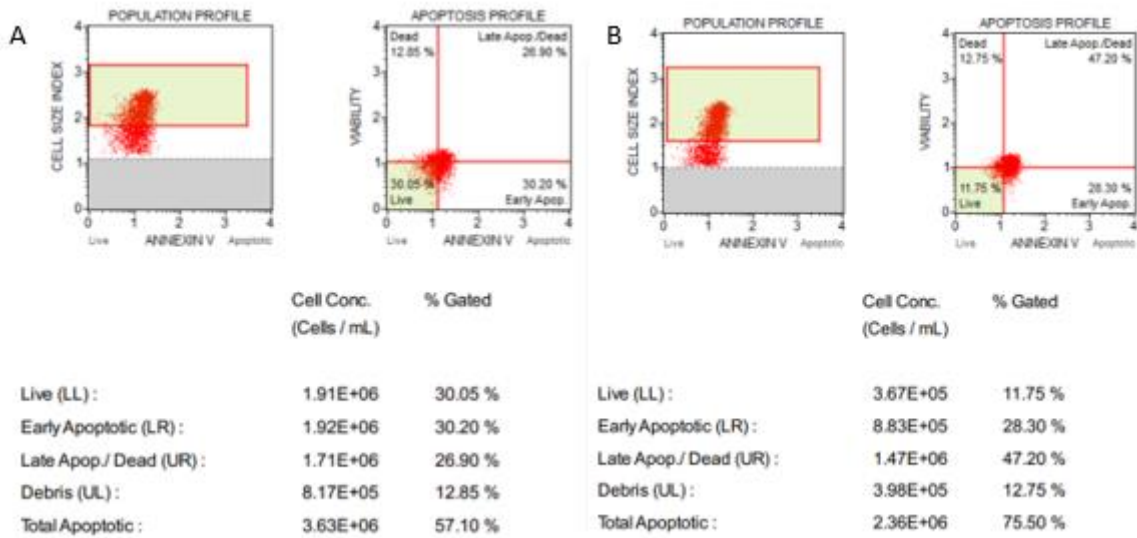
AD-Ekso, MCF-7 hücrelerine uygulandıktan sonra her konsantrasyon ve zamana bağlı olarak 3 ayrı setin yüzde total apoptoz değerlerinin ortalaması ile yine SEM değerleri hesaplanmıştır. Her gruba ait 3 ayrı bağımsız veri setinin ortalamalarının yüzde total apoptotik sonuçları, zaman ve konsantrasyon açısından ve standart sapmaları (\pm) ile değerlendirildiğinde, 24 saat sonunda MCF-7/ 40×10^{10} AD-Ekso/mL ortalama $\%58.817 \pm 4.2$, 48 saat sonucunda MCF-7/ 20×10^{10} AD-Ekso/mL

grubunda ortalama 56.3 ± 9 ve 72 saat sonucunda $MCF-7/20 \times 10^{10}$ AD-Ekso/mL ortalama $70.9 \pm 4,1$ 'dir. Bu sonuçlar doğrultusunda AD-Ekso artan doz ve zamana bağlı olarak, MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği % total apoptotik değerleri ile görülmüştür (Şekil 7).



Şekil 7. MCF-7 gruplarında AD-Ekso uygulanan her konsantrasyon ve zamana bağlı olarak 3 ayrı setin yüzde total apoptotik değerleri ortalamaları (%)

İstatistiksel olarak % total apoptotik değerleri karşılaştırıldığında 24 ve 48 saat boyunca uygulanan AD-Ekso grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). AD-Ekso verilen MCF-7 hücre grupları hem kendi aralarında hem de AD-Ekso verilmeyen MCF-7 hücre grupları ve MCF10A hücre grupları ile karşılaştırıldığında zaman ve doza bağlı olarak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). MCF10A ve MCF-7 kontrol grupları değerlendirilmiş ve anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Zaman ve doza bağlı olarak AD-Ekso uygulanmış MCF-7 hücrelerinde değişen apoptoz indüksiyonu erken evre apoptotik, geç evre apoptotik ve total apoptotik olmak üzere Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. 48 saat sonunda tek veri değerlendirmesi sonucu ile yüzde total apoptotik değerleri. A) MCF-7/20x10¹⁰AD-Ekso/mL B) MCF-7/40x10¹⁰AD-Ekso/mL

Bu bulgular, eksozomların, tümörleri veya diğer hastalıkları hedefleyen değişken tedaviyi mümkün kılmak için büyük ölçekli tekrarlanabilir kalitede üretim için sınırsız bir kaynak olduğunu

göstermektedir. AD-MKH-Eksozomlarının MCF-7 hücrelerinin apoptozunu indüklemek için güçlü bir aday olduğunu göstermektedir. Eksozomların kullanımında donör hücre seçimi, ilaç yükleme yöntemi, taşıyıcı güvenliğin yönleri ve eksozom yüzeyinde hedefleme peptitlerine, her çalışmada dikkat edilmelidir. Eksozom kaynaklarının farklı olması, eksozomlar tarafından taşınan biyolojik bileşen içeriği yönünden de farklılaşacaktır. Eksozomların kararlılığı, boyutları ve konsantrasyonlarının da yine doku kaynağına göre değiştiği bundan dolayı etki mekanizmasının ve her hastalıktaki terapötik etkinliğinin değiştiği de görülmektedir. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerden salınan eksozomların proteinler açısından çok daha yüksek oranda bulunduğu, lökosit aktivasyonu ile hücre adezyon moleküllerinin bağlanması görev aldığı bildirilmiştir. Bu nedenle AD-MKH'lerin hastalıkların modüle edilmesinde etkili olduğu bilinmektedir (Eirin ve ark., 2016). Eksozomlar, MKH sekresyonundaki terapötik bir bileşen, karmaşık bir protein ve RNA yüküne sahip bir lipid veziküldür. Bu, çeşitli hastalık endikasyonlarında MKH'lerin terapötik etkinliği için bir gerekçe sağlayabilir. Ayrıca, MKH eksozomlarının, birçok patolojik durumda doku hasarını hafifletmek ve hücre onarımını geliştirmek için yardımcı tedavi sağlayabileceğini öne sürüyor. Umbilikal kord kaynaklı MKH'ler (UK-MKH) ise diğer MKH'ler ile karşılaştırıldığında çok farklı dokulara ve hücrelere farklılaşma yeteneği gösterirler ve bu durumda UK-MKH'lerinden salınan eksozomların yeni kan damar büyümesini destekleyebileceği ifade edilmiştir (Zhao ve ark., 2015). Ayrıca UK-MKH'ler spiral ganglion nöronların sayısını artırarak nörodejeneratif hastalıklarda daha etkindir (Choi ve ark., 2012). Şu anda kanser tedavisi için kemoterapi, birinci basamak terapötik stratejidir. Platin ilaçlar, adriamisin (ADR) ve 5-fluorourasil (5-FU) gibi ileri kanserli hastaların klinik sonuçlarını iyileştirmek için farklı özelliklere ve hedeflere sahip çoklu kemoterapötik ajanlar etkin bir şekilde uygulanmıştır (Weaver ve Cleveland, 2005). Bununla birlikte, çoklu ilaç direncinin (MDR) gelişimi, kemoterapinin başarısı için en büyük zorluk olmaya devam etmektedir (Guerra ve ark., 2017). Çok sayıda çalışma, MKH'den türetilen eksozomların, fonksiyonel proteinleri ve RNA'ları doğrudan ilettikleri için kanser kemoterapi direncine derinden dahil olduğunu göstermiştir. Apoptozdan kaçınma, kemorezistansın ana nedenlerinden biri olarak tanımlanmıştır ve MKH'den türetilen eksozomlar, kemorezistansa aracılık etmek için apoptozla ilişkili proteinleri modüle edebilir. MKH'den türetilen eksozomların mide kanserinde hem in vitro hem de in vivo olarak 5-Fluorourasil (FU)'ya karşı direnci arttırdığı bulunmuştur. Mekanik olarak, MKH'den türetilen eksozomlar, fonksiyonel proteinleri aktararak Calmodulin- gecikmeli doğrultucu K⁺'nin yavaş bileşeni akım (Ks'ler)/ Ras/Raf/mitojenle aktive olan protein kinaz (MEK)/ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolu (CaM-Ks/Raf/MEK/ERK) sinyal kaskadını ve çoklu ilaç direnci (multipl drug resistance, MDR) ile ilişkili proteinleri aktive ederek 5-FU'nun neden olduğu apoptozu önlediği bildirilmiştir (Phan ve Croucher, 2020). İnsan AD-MKH'den salınan eksozomların, Wnt sinyal yolunun yukarı regülasyonu yoluyla meme kanseri MCF-7 hücrelerinin göçünü arttırdığını ve hücrelerin eksozom tüketilmiş orijinal AD-MKH şartlandırılmış ortamla tedavisinin, önemli ölçüde azalmış göç kapasitesiyle sonuçlandığını gösterdi (Lin ve ark., 2013). Wu ve ark. meme kanseri MCF-7 hücrelerine insan AD-MKH 'den türetilmiş eksozomları uyguladığında bu mikro ortamın tümör hücrelerinin göçünü ve istilasını artırdığını ve transforme edici büyüme faktör-beta/Smad proteinleri (TGF- β /Smad) ve fosfatidilinositol 3-kinaz(PI3K)/serin/treyonin protein kinaz enzimi (AKT) sinyal yolları arasındaki çapraz karışma yoluyla epitelyal mezenkimal geçiş (EMT)'i arttırdığını göstermişlerdir (Wu ve ark., 2018) Hücre apoptozu, hasarlı veya gerekli olmayan hücrelerin temizlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Birden fazla çalışma, apoptotik sinyallerin, mitokondriyal disfonksiyonu tetiklediğini ve bunun sonucunda reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde artışa ve oksidatif stres ortamının oluşmasına neden olduğunu göstermiştir (Hu ve

ark., 2019, Chen ve ark., 2018). Ek olarak, yağ kök hücrelerinden gelen eksozomlar, doku onarımını ve yenilenmesini desteklemek için makrofajlardaki oksidatif stresi hafifletmiştir (Shen ve ark., 2021).

Eksozomlar, prelinik verilere ve iyi üretim uygulama süreçlerinin doğrulanmasına dayalı olarak kanser tedavisinde, örneğin terapötik kanser aşılarda cazip sonuçlar vermiştir. Spesifik olarak, biyomühendislik eksozomları, kanser hücrelerine güçlü antitümör yükleri iletmek için heyecan verici yaklaşımlar geliştirmede kullanım için büyük umut vaat ediyor. Eksozomların kimyasal veya biyolojik modifikasyonu, kanserdeki terapötik güçlerini artırabilir veya genişletebilir (Santos ve ark., 2021).

SONUÇ

Güncel çalışmalar sonucunda eksozomlar ile biyofarmasötikler veya nano ilaçlar arasında hala büyük bir boşluk var ve bu yüzden henüz net bir şekilde tanımlanmamışlardır. Eksozomların fonksiyonel proteinleri ve nükleik asitleri aracılığıyla terapötik, teşhis ve diğer roller oynadığını göstermektedir. Biyolojik ajanların üretiminin ve uygulamasının karmaşıklığı göz önüne alındığında, eksozomların klinik dönüşüme ulaşması için kat edilmesi gereken daha çok yol vardır. Nanotıp ve teknoloji entegrasyonundaki hızlı ilerlemeyle, biyoteknoloji ve nanoteknoloji ile birleştirilmiş eksozomlar/EV'ler yeni uygulamalara sahiptir. Şu anda, EV'lerin incelenmesi için ana yönler, hücreler arası iletişim yoluyla hücre davranışına aracılık etmek, biyobelirteçlerin taranması ve ilaç taşıyıcılarının araştırılması ve geliştirilmesine yoğunlaşmıştır. Hastalıkların teşhis ve tedavisinde eksozomlar üzerindeki mevcut ilerleme, tıpta gelecekteki uygulamaları için önemli bir temel oluşturmaktadır. Bu çalışma da ise çeşitli sınırlılıklar bulunmaktadır. İlk olarak, deneyleri in vitro olarak gerçekleştirildiği için sonuçlar in vivo ortamda meydana gelenlerin göstergesi olmayabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında; laboratuvar olanak ve elverişli çalışma ortamı sunan, Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Çıkar Çatışması

Yazar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

KAYNAKLAR

- Basoli, V., Santaniello, S., Cruciani, S., Ginesu, G., Cossu, M., Delitala, A., Maioli, M. (2017). Melatonin and vitamin D interfere with the adipogenic fate of adipose-derived stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 981. <https://doi.org/10.3390/ijms18050981>
- Brydson, R., Brown, A., Hodges, C., Abellan, P., & Hondow, N. (2015). Microscopy of nanoparticulate dispersions. *Journal of Microscopy*, 260(3), 238–247. <https://doi.org/10.1111/jmi.12290>
- Cardoso, F., Cataliotti, L., Costa, A., Knox, S., Marotti, L., Rutgers, E., & Beishon, M. (2017). European Breast Cancer Conference manifesto on breast centres/units. *European Journal of Cancer*, 72(2017), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.023>
- Chambers, I., & Tomlinson, S. R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*, 136(14), 2311–2322. <https://doi.org/10.1242/dev.024398>
- Chen, S., Lv, X., Hu, B., Zhao, L., Li, S., Li, Z., Shao, Z. (2018). Critical contribution of RIPK1 mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress to compression-induced rat nucleus pulposus cells necroptosis and apoptosis. *Apoptosis*, 23(5–6), 299–313. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1455-x>
- Choi, M. Y., Yeo, S. W., & Park, K. H. (2012). Hearing restoration in a deaf animal model with intravenous transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(3), 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.111>

- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., ... Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
- Eirin, A., Zhu, X.-Y., Puranik, A. S., Woollard, J. R., Tang, H., Dasari, S., Lerman, L. O. (2016). Comparative proteomic analysis of extracellular vesicles isolated from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep36120>
- Guerra, F., Arbini, A. A., & Moro, L. (2017). Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1858(8), 686–699. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.012>
- 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. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Hu, Y., Huang, L., Shen, M., Liu, Y., Liu, G., Wu, Y., Xiong, L. (2019). Pioglitazone protects compression-mediated apoptosis in nucleus pulposus mesenchymal stem cells by suppressing oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/4764071>
- Li, Wang, Peng, Huyan, & Cacalano. (2019). Exosomes: Versatile nano mediators of immune regulation. *Cancers*, 11(10), 1557. <https://doi.org/10.3390/cancers11101557>
- Lin, R., Wang, S., & Zhao, R. C. (2013). Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 383(1–2), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1746-z>
- Phan, T. G., & Croucher, P. I. (2020). The dormant cancer cell life cycle. *Nature Reviews Cancer*, 20(7), 398–411. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0263-0>
- Rasmussen, M. K., Pedersen, J. N., & Marie, R. (2020). Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15889-3>
- Santaniello, S., Cruciani, S., Basoli, V., Balzano, F., Bellu, E., Garroni, G., Maioli, M. (2018). Melatonin and vitamin D orchestrate adipose derived stem cell fate by modulating epigenetic regulatory genes. *International Journal of Medical Sciences*, 15(14), 1631–1639. <https://doi.org/10.7150/ijms.27669>
- Santos, P., & Almeida, F. (2021). Exosome-Based vaccines: History, current state, and clinical trials. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711565>
- Shen, K., Jia, Y., Wang, X., Zhang, J., Liu, K., Wang, J., ... Hu, D. (2021). Exosomes from adipose-derived stem cells alleviate the inflammation and oxidative stress via regulating Nrf2/HO-1 axis in macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 165, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.023>
- Shi, G., & Jin, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(5). <https://doi.org/10.1186/scrt39>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Wankhade, U. D., Shen, M., Kolhe, R., & Fulzele, S. (2016). Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. *Stem Cells International*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/3206807>
- Weaver, B. A. A., & Cleveland, D. W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell*, 8(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.06.011>
- Wei, W., Ao, Q., Wang, X., Cao, Y., Liu, Y., Zheng, S. G., & Tian, X. (2021). Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A promising biological tool in nanomedicine. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.590470>
- Wu, S., Wang, Y., Yuan, Z., Wang, S., Du, H., Liu, X., Zhu, X. (2018). Human adipose-derived mesenchymal stem cells promote breast cancer MCF7 cell epithelial-mesenchymal transition by cross interacting with the TGF- β /Smad and PI3K/AKT signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9664>
- Zhao, Y., Sun, X., Cao, W., Ma, J., Sun, L., Qian, H., Xu, W. (2015). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve acute myocardial ischemic injury. *Stem Cells International*, 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/761643>