



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP MİKROBİYOLOJİ-İMMÜNOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**ERİTROSİT SÜSPANSİYONLARININ DEPOLANMA SÜRECİNDE  
EKSOZOM/MİKROPARTİKÜL PROFİLİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN  
İNCELENMESİ**

**MEHRDAD PASHAZADEH**

**(DOKTORA TEZİ)**

**BURSA-2019**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ-İMMÜNOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**ERİTROSİT SÜSPANSİYONLARININ DEPOLANMA SÜRECİNDE  
EKSOZOM/MİKROPARTİKÜL PROFİLİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN  
İNCELENMESİ**

**Mehrdad PASHAZADEH**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. H. Barbaros ORAL**

**DDP(T)- 2017/9 - UÜ BAP**

**BURSA-2019**

**T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**


**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum

**“Eritrosit Süspansiyonlarının Depolanma Sürecinde Eksozom/Mikropartikül Profilineki Değişikliklerin İncelenmesi”** adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.






**Mehrdad PASHAZADEH**

Tarih ve İmza

 16.12.2019

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

MİKROBİOLOJİ-İMMÜNOLOJİ Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Mehrdad PASHAZADEH tarafından hazırlanan Eritrosit Süspansiyonlarının Depolanma Sürecinde Eksozom/Mikropartikül Profilineki Değişikliklerin İncelenmesi konulu Doktora tezi 13/12/2019 günü 10-00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Barbaros ORAL	
Üye	Prof. Dr. Ferah BUDAK	
Üye	Doç Dr. Arzu Yılmaztepe ORAL	
Üye	Doç. Dr. Umut KÜÇÜKSEZER	
Üye	Doç. Dr. İshak Özel TEKİN	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER  
Enstitü Müdürü

**TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU**

13/12/2019

**Adı Soyadı:** Mehrdad PASHAZADEH**Anabilim Dalı:** MİKROBİYOLOJİ-İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**Tez Konusu:** Eritrosit Süspansiyonlarının Depolanma Sürecinde Eksozom/Mikropartikül Profilineki Değişikliklerin İncelenmesi

<b><u>ÖZELLİKLER</u></b>	<b><u>UYGUNDUR</u></b>	<b><u>UYGUN DEĞİLDİR</u></b>	<b><u>ACIKLAMA</u></b>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**DANIŞMAN ONAYI****Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. H. Barbaros ORAL**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

Dış kapak	
İç kapak	
ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VI
İNGİLİZÇE ÖZET .....	VII
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kan Transfüzyonu ve Transfüzyonla İlişkili İmmünmodülasyon.....	3
2.2. Myeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler (MKBH).....	8
2.3. Eksozomlar .....	11
2.3.1. Eksozomların Kan Tranfüzyonuyla İlişkili İmmün Modülasyonu.....	25
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
3.1. Kanların Alınması ve Örneklerin Hazırlanması.....	27
3.1.1. Lökosit Azaltılmamış Örneklerinin Elde Edilmesi.....	27
3.1.2. Lökosit Azaltılmış Eritrosit Süspansiyon Örneklerinin Elde Edilmesi.....	29
3.1.3. Eksozom izolasyonu.....	30
3.1.4.Monoklonal CD9 antikoruna ile boncuk konjugasyonu.....	31
3.1.5. Bicinchoninic Acid Assay.....	32
3.1.6. Eksozom-Boncuk Konjugasyonu.....	34
3.2. Filtre Edilmemiş Eritrosit Süspansiyon Örneklerinde Akan Hücre Ölçer Ölçümlerinin Yapılması.....	34
3.2.1. Eksozomların Köken Aldıkları Hücrelere Göre Değerlendirilmesi.....	35
3.3. Lökosit Azaltılmamış Eritrosit Süspansiyonlarda Lökosit Düzeylerinin Ölçülmesi.....	36

<b>3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....</b>	<b>36</b>
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. T, B, NK, NK-T Hücresler İçin Bulgular.....</b>	<b>37</b>
<b>5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>50</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>59</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>72</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>74</b>
<b>9.TEŞEKKÜR.....</b>	<b>86</b>
<b>10.ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>87</b>



## TÜRKÇE ÖZET

Eksozomlar, çeşitli hücre tipleri tarafından salınan hücre dışı veziküllerdir. Bu veziküller membran hücreleri ile sitozolik proteinler, lipitler ve RNA arasında transfer için araç olarak görev yaparak önemli bir hücre içi iletişim modelini temsil eder. Bu çalışmada, eksozomların eritrosit süspansiyonlarının (ES) içinde depolanma süreci boyunca gösterdikleri değişimleri belirlemek amaçlanmıştır.

Sağlıklı bağışçılardan (10) alınan tam kanlar eritrosit süspansiyonuna (ES) eşit miktarda iki ayrı kan torbasına aktarıldı. Torbalardan biri lökosit filtresinden geçirilerek lökosit azaltılmış (LA-ES) ve azaltılmamış ES'ler (NL-ES) elde edildi ve eşit miktarda dört kan torbasına ayrıldı. 0, 14, 28 ve 42. günlerde incelenmek üzere 4°C de saklandı. Eksozomlar önce karboksilateks boncuklar ile anti-CD9 antikolarla kaplandı ve eksozom içeren örneklerin boncuklarla bağlanması gereken miktarı belirlemek için BCA Protein Assay yapılarak eksozom hacimleri belirlendi ve akan hücre ölçer ile araştırıldı.

T ve T sitotoksik lenfosit kökenli eksozom seviyelerinde her iki grupta (lökosit azaltılmamış ve azaltılmış) azalma görülmüştür. T hücre kökenliler lökosit azaltılmış grupta 42.gün örneklerinde 0. güne göre anlamlı şekilde azalırken, T sitotoksik lenfosit kökenliler lökosit azaltılmamış grupta 14 ve 42. gün örneklerinde 0. güne göre anlamlı şekilde azalma göstermiştir ( $p<0,05$ ). B lenfosit kökenli eksozom seviyelerinde de her iki grupta azalma görülmüştür. G-MDSC kökenli eksozomlar her iki grupta 0, 14 ve 28. günlerde anlamlı şekilde azalmıştır ( $p<0,05$ ). 42. gün örneklerinde bu eksozomların düzeyleri belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca lökosit azaltılmış ve azaltılmamış gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

Çalışmadan elde edilen sonuçlar immün baskılayıcı özellikteki MDSC ve G-MDSC kökenli eksozomların immünmodülasyonda rol oynadığı düşündürmektedir. Çalışma sonuçları eksozomların lökoredüksiyondan etkilenmediklerini göstermiştir. İmmünmodülasyonun lökoredüksiyonla engellenememesinin nedenlerinden birisi de filtrelerden geçebilen eksozomlar olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** TRIM, İmmünmodülasyon, Transfüzyon, Eksozom



## İNGİLİZCE ÖZET

### INVESTIGATION OF CHANGES IN PROFILE OF EXOSOME/ MICROPARTICLES DURING THE STORAGE OF ERYTHROCYTE SUSPENSIONS

Exosomes are EVs (Extracellular Vesicles) released by various cell types and play roles in cell-cell communication. These extracellular vesicles (EVs) represent an important mode of intercellular communication by serving as vehicles for transfer between cells of membrane and cytosolic proteins, lipids, and RNA.

Whole blood from healthy donors (10) were transferred to two separate blood bags by an equal amount converted into erythrocyte suspension (ES). One of the bags was passed through the leukocyte filter to obtain reduced leukocyte (LA-ES) and non-reduced ESs (NL-ES) and divided into four equal blood bags. Flow cytometry was used to identify and quantify exosomes in the samples on the 0th, 14th, 28th and 42nd days at 4°C. The exosomes were first coated with anti-CD9 antibodies with carboxylates beads and exosome volumes were determined by BCA Protein Assay to determine the amount of exosome-containing samples to be bound by beads and investigated by flow cytometry.

T and T cytotoxic lymphocyte-derived exosome levels in both groups (leukocyte reduced and non leukocyte reduced) decreased in the group of leukocytes in the cell-derived group on the 42th day decreased significantly less than the 0th day, Tc lymphocyte origin in the group of the day 14th and 42th in the leukocyte unreduced samples 0 ( $p < 0.05$ ). The exosomal levels of B lymphocytes were decreased in both groups. The leukocyte group was significantly reduced on the 28th and 42nd-day samples compared to day 0 ( $p < 0.05$ ). MDSC and G-MDSC exosomes decreased significantly in both groups ( $p < 0.05$ ).

The results obtained from the study suggest that immunosuppressive MDSC and G-MDSC exosomes may play a role in immunomodulation. The effects of transplanted exosomes on the transfusion receptor are not yet known. The results of the study showed that exosomes are not affected by leukoreduction. One of the reasons why immunomodulation cannot be prevented by leukoreduction may be exosomes which can pass through filters.

**Keywords:** TRIM, Immunomodulation, Transfusion, Leukoreduction, Exosome

## 1. GİRİŞ

Allojenik kan transfüzyonunun (AKT) olumlu etkilerinin yanı sıra çeşitli olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Bu etkilerden transfüzyonla ilişkili immün modülasyon (TRIM) henüz nedeni ve oluş mekanizması tam olarak çözülemeyen bir fenomen durumundadır. Daha önce TRIM konusunda Anabilim Dalımızda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bir tanesi yayım (Bal ve ark., 2018) diğerleri yazım aşamasında olan bu çalışmalarda elde edilen sonuçların eksozomlarla ilgili bir çalışma ile desteklenmesinin değer yaratacağı düşüncesiyle bu konu tercih edilmiştir. Allojeneik organ transplantasyonu alan hastalarda donör lökositlerinden ziyade eksozomlarının alıcıdaki transplante edilen organa spesifik T hücre yanıtını indüklediğinin gösterilmiş olması da bu tercihimizde önemli rol oynamıştır (Marino ve ark., 2016).

Çalışmamızda hücreler arası iletişimde, sinyal iletiminde, genetik materyal transferinde ve immün cevabın düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülen küçük boyutlu hücreyel yapılar olan eksozomların hem lökosit azaltılmış (LA), hem de lökosit azaltılmamış (NL) eritrosit süspansiyonlarının (ES) içinde depolanma süreci boyunca gösterdikleri değişimleri belirlemek ve TRIM ile ilişkilendirmek amaçlanmıştır. İlişkinin eksozomların AKT ile alıcıya geçtiklerinde alıcı immün sistem hücreleriyle etkileşmesiyle ortaya çıkacağı var sayılmaktadır. Ancak eksozomlara yanıt olarak immün sistem hücrelerinin fonksiyonları tartışmalıdır ve immün sistemi uyarma yada baskılama özelliği gösterebildikleri bildirilmiştir (Ren ve ark., 2011). Makrofajların trombositlerden köken alan ektozomlarla uyarıldıktan sonra antienflamatuvar profile yönlendirilmesi (Sadallah ve ark., 2008), monositlerin apoptotik trombosit eksozomlarıyla uyarıldıktan sonra proinflamatuvar sitokin üreten yerleşik M2 makrofajlarına farklılaşması (Vasina ve ark., 2011), lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan monositlerden veya dendritik hücrelerden elde edilen eksozomların CD4<sup>+</sup> T hücrelerini aktive etmesi (Vasina ve ark., 2011; Kolowos ve ark., 2005) bu duruma örnek olarak verilebilir. Eksozomlar, doğal ve edinsel immünyetede rol alabilen moleküllerdir (Schiller ve ark., 2012). Onları diğer ekstrasellüler veziküllerden ayıran en önemli özellikleri, kendilerine özgü biyogenez yolları, lipid kompozisyonları ve

taşıdıkları kargo içerikleridir. Kargo içeriklerinin hücreler arası haberleşme, sinyal iletimleri gibi önemli rollerde kullanılmak üzere, nükleik asitler, proteinler, miRNA, mRNA, nükleoproteinler ve çeşitli enzimlerden meydana geldiği gösterilmiştir (Van der Pol ve ark., 2012; Akers ve ark., 2013). Yani etkileştikleri hücreleri içerikleri ve yüzey molekülleri ile farklı fonksiyonlara yönlendirebilme potansiyelleri de vardır. ES'ler içindeki eksozomlar da aynı şekilde AKT sonrası alıcı immün sisteminin etkin hücreleriyle etkileşerek onları farklı fonksiyonlara yönlendiriyor olabilirler. Burada göz önünde tutulması gereken diğer nokta, lökosit filtrelerinden geçebilecek kadar küçük moleküller olmaları nedeniyle lökoredüksiyon (LR) işleminin etkinliğini de ortadan kaldırabilme potansiyelleridir. Bu potansiyelleri nedeniyle çalışmamızda hedef yapılar olarak ES'lerinin içindeki eksozomlar seçilmiş, çalışmamız eksozomları tanımlayabilmek üzerine planlanmıştır.

Transfüzyonun olumsuz etkileri kliniklerde tanınmadığı ve transfüzyonla ilişkilendirilemediği için çoğu zaman atlanmaktadır. Hastaların yaşadığı bu olumsuzluklara ek olarak, meydana gelen zararı önlemek için önemli ekonomik ve işgücü bedelleri harcanmaktadır. Çalışmamız ile hastalara, çalışanlara ve kurumlara yüklenen bu yükün en azından bir bölümüne katkı sağlayacak sonuçlara ulaşılması beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Genel bilgiler bölümünde çalışmayı planlamamıza neden olan TRIM fenomeninden, LA-ES ve NL-ES'ler içinde depolanma sürecinde gösterdiği değişimlerle TRIM'i ilişkilendirmeyi planladığımız eksozomlardan ve bulgularımızdaki en anlamlı sonucu oluşturan miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerden (MDSC) köken alan eksozomlardan dolayı MDSC'lerden bahsedilecektir. Bölüm içerisindeki konu sıralaması TRIM, MDSC'ler ve eksozomlar şeklinde olacaktır.

### 2.1. Kan Transfüzyonu ve Transfüzyonla İlişkili İmmünmodülasyon (TRIM)

Transfüzyon hayat kurtarıcı olmasının yanı sıra ciddi ve hayatı tehdit edici komplikasyonlara sebep olabilen bir uygulamadır. Bu komplikasyonlardan biri ise, immünolojik bir komplikasyon olan TRIM olup AKT sonrasında alıcıda gelişen immün değişiklikleri ve bunların alıcıdaki etkilerini tanımlamaktadır.

TRIM ilk kez 1973 yılında, böbrek nakli bekleyen hastalara yapılan transfüzyonların greft ömrü üzerindeki olumlu etkilerinin gözlemlenmesiyle tanımlanmıştır (Opelz ve ark., 1973). Hayvan deneyleri, klinik çalışmalar ve deneyimlerle desteklenen bu tablo, AKT'nin -AIDS pandemisi ortaya çıkana kadarki dönemde, böbrek nakli öncesi standart bir yaklaşım halini almasına neden olmuştur. Ancak sözü edilen bu olumlu etki randomize kontrollü çalışmalarla henüz desteklenememiştir. Küratif cerrahi yapılacak hastalardan cerrahi öncesi AKT alanlarda tümör büyümesinin ve metastaz gelişiminin hızlandığının bildirilmesi ve AKT ile kanser nüksü arasında bir ilişki olduğunun öne sürülmesi sonucunda TRIM'in diğer etkileri de belirlenmeye başlamıştır (Gantt ve ark., 1981). Allojeneik kan transfüzyonunun kanser nüksü üzerine bu olumsuz etkisinin ortaya atılmasından sonra transfüzyonun alıcı immün sistemi üzerindeki etkileri ilgi çekici bir alan olmuş ve bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda AKT'nin kanser nüksleri, ameliyat sonrası bakteriyel enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar ve latent

enfeksiyonların reaktivasyonu gibi çok sayıda klinik tablo ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Mowbray ve ark. (1985) spontan abortusları olan kadınlara gebelik öncesi eşlerinden alınmış lenfositlerin verilmesi ile abortus olasılığının azaldığını saptamıştır. Peters ve ark. (1989) Crohn hastalığı nedeni ile ameliyat edilen ve ameliyat sırasında AKT alan hastalarda nüks sıklığının almayanlara kıyasla çok daha az olduğunu belirlemişlerdir. Allojeneik kan transfüzyonunun ameliyat sonrası bakteriyel enfeksiyonlar açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalar ile desteklenmiş; sitomegalovirüs (CMV), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gibi latent bazı enfeksiyonların reaktivasyon olasılığını artırdığı ve AKT sonrası tüm nedenlere bağlı mortalite artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Blumberg ve ark., 1994).

Yapılan çok sayıda çalışma ile AKT sonrası alıcılarda görülen bu klinik tablolara neden olabilecek bazı immünolojik değişiklikler tanımlanmıştır. Azalmış T yardımcı sayısı (Blajchman ve ark., 1994), azalmış T hücre yanıtı (Brunson ve ark., 1990), azalmış doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücre fonksiyonu (Jensen ve ark., 1992), CD4/CD8 [Th/sitotoksik T hücre (Tc)] oranında azalma (Kaplan ve ark., 1984), geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında azalma (Nielsen HJ ve ark., 1991), antijen sunumunda yetersizlik (Brunson ve ark., 1990), lenfosit blastogenezinde baskılanma (Blajchman ve ark., 1994), azalmış sitokin [İnterlökin-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- $\gamma$ )] üretimi (Wood ve ark., 1988), azalmış monosit/makrofaj fagositik fonksiyonu (Waymack ve ark., 1986) ve artmış antiidiyotipik-Ab ve antiklonotipik-Ab üretimi bu değişikliklere örnek olarak verilebilir.

Başka bir grup araştırmacı grubu da AKT alıcısında görülen immünolojik değişikliklere ve TRIM fenomenine neden olabilecek etkenleri belirlemeyi hedeflemiştir. Bu amaçla sınıf II HLA molekülü taşıyan allojeneik lökositleri (Bordin ve ark., 1994); allojeneik dendritik hücreleri (Clark ve ark., 2008), mikrokimerizmi (Beko ve ark., 1991; Dzik, 1994); histamin, eozinofil katyonik protein, eozinofil protein X, myeloperoksidaz, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 gibi biyolojik yanıt düzenleyicilerini (Nielsen ve ark., 1996); sitokinleri (Ghio ark., 2011 ); biyoaktif lipidleri (Silliman ve ark., 2011); ES süpernatantını (Baumgartner ve ark., 2009; Grimshaw ve ark., 2011); kan bileşenlerinin stok süresini (Mynster ve ark., 1998; Adamson, 2008); çözünür Fas ligandı (çFasL) (Puppo ve ark., 2000); çözünür HLA

sınıf I (çHLA-I) moleküllerini (Magee ve Sayegh, 1997) ve benzeri birçok olası etkeni konu alan araştırmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar sayesinde TRIM'in olası etkenleri sınıflandırılabilmiştir (Vamvakas ve Blajchman, 2007). Buna göre TRIM etkisinin;

1. Kan bileşeni içerisinde bulunan mononükleer hücreler (MNH),
2. Depolanma sürecinde bileşen içerisinde biriken biyolojik yanıt düzenleyiciler ve İmmünolojik mediyatörler (BYD-İM),
3. Allojeneik plazmada bulunan çözümlü insan lökosit Ag (human leukocyte antigen; HLA) sınıf I peptitler aracılığıyla oluşabileceği ifade edilmiştir.

Bu etkenleri ayrı ayrı değerlendirmek yararlı olacaktır. Allojeneik MNH'ler kan bileşeni içinde doğal olarak bulunan bağışçı kaynaklı hücrelerdir. Özel yöntemler kullanılarak kan bileşeni içinden uzaklaştırılmadıkları zaman transfüzyon ile alıcıya geçerek TRIM etkisinin oluşumuna katıldıkları gösterilmiştir (Bordin ve ark., 1994). Blajchman ve ark. (1993) AKT yapılan hayvanlardan (fare ve tavşan) toplanan dalak hücrelerinin infüzyonu ile AKT'nin tümör büyütücü etkisini edinsel (pasif) olarak aktarılabildikleri. Bu çalışmada AKT yapılan hayvanlardan elde edilen dalak hücrelerinin infüze edildiği hayvanlarda, sinjeneik veya LA-AKT alan hayvanlardan elde edilen dalak hücrelerinin infüze edildiği hayvanlara göre pulmoner nodül sayısı belirgin biçimde yüksek bulunmuştur. Bu çalışma allojeneik MNH'lerin AKT ile ilişkili immünsüpresyonda rolü olabileceğini göstermektedir.

Depolanma sürecinde biriken BYD-İM ise çok çeşitlidir. Bunlar genellikle beklemekle MNH'lerden salınsa da (sitokinler, histamin, eozinofil katyonik protein gibi), diğer kan hücreleri tarafından açığa çıkarılanları da (serbest Hb, çözümlü CD40L, lipit mediyatörler gibi) vardır. Kabaca sitokinler, eikosanoidler, büyüme faktörleri, çözümlü FasL, çözümlü HLA sınıf-I, ubikutin, doku plazminojen aktivatörü gibi özetlenebilecek bu BYD-İM'in depolanma süresine bağlı olarak süpernatant içerisinde birikerek AKT sonrası alıcıda TRIM etkisinin oluşumuna katıldıkları gösterilmiştir (Nielsen ve ark., 1996). Baumgartner ve ark. (2009) kan bileşeni süpernatantlarının sağlıklı kişilerin MNH'leri ile karşılaşması halinde düzenleyici T hücre (düzenleyici T hücre; Treg) artışına neden olduğunu saptamıştır. Bu çalışma da AKT sonrası ürün süpernatantının alıcı immün sisteminde Treg artışına, dolayısıyla immünsüpresyona yol açabileceğini düşündürmektedir. Ghio ve ark. 30 günlük ES süpernatantında çHLA-I ve çFasL konsantrasyonunu belirgin şekilde yüksek bulmuş, bu yoğunluğun

bileşen içinde kalan rezidüel lökositlerle ve depolanma süresiyle ilişkili olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada çHLA-I moleküllerinin Tc hücre aktivitesini engellediği, hem çHLA-I hem de çFasL moleküllerinin allojeneik MLR'u (mixed lymphocyte reaction) baskıladı ve çFasL molekülünün apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Ghio ve ark., 1999). Bu çalışma immün düzenleyici etkinin allojeneik kan bileşenleri süpernatantları ile oluşabileceğini göstermenin yanı sıra, belirli bir süre depolanan otolog kan bileşeni süpernatantında biriken çözünür moleküller aracılığıyla da gerçekleşebileceğini düşündürmektedir.

Bugüne kadar yapılan tüm çalışmalardan elde edilen sonuçlar TRIM fenomeninin gerçek etkenine ve oluş mekanizmasına yönelik net bir açıklama getirmekten uzak kalsa da, TRIM fizyopatolojisine yönelik bazı hipotezlerin ortaya atılmasına neden olmuştur. Bu hipotezlerden bazıları şu şekilde özetlenebilir.

- Klonal delesyon hipotezi (Naji, 1996; Terasaki, 1984),
- İmmünsüpresyon hipotezi (Ashkenazi ve Dixit, 1998; Baumgartner ve ark., 2009; Clark ve ark., 2008; Ghio ve ark., 1999; Ghio ve ark., 2011; Singal ve ark., 1991),
- Anergji hipotezi (Kirkley, 1999; Mincheff ve ark., 1993),
- Mikrokimerizm (Gafer ve ark., 1996; Hu ve ark., 2012),
- İmmün yanıtın Th1'den Th2'ye dönüşümü hipotezi (Babcock ve ark., 1996; Betz ve ark., 1991; Blumberg ve ark., 1996; Gafer ve ark., 1996; Guo ve ark., 2014; Kirkley, 1999; Lannan ve ark., 2013; Mincheff ve ark., 1993; Pandey ve ark., 2010; Perez ve ark., 1997; Wood ve ark., 1988; Zhu ve ark., 2012),
- Apoptoz hipotezi (Cheng ve ark., 2009; Dzik, 2003; Feng ve ark., 2013).

TRIM nedeni olarak allojeneik MNH'ler baskın etkenler olarak düşünüldüğünde kan bileşenlerinin içindeki lökositleri azaltmanın (veya lökoredüksiyon) TRIM etkilerinin engellenmesinde en mantıklı yaklaşım olduğu açıktır. Ancak, kan bileşenlerinin tamamını lökosit azaltılmış ürünler (üniversal lökoredüksiyon) olarak kullanan Fransa, İngiltere, Kanada gibi gelişmiş ülkelerden yapılan bildirimler durumun bu kadar basit olmadığını göstermektedir. Çünkü, bu ülkelerde yapılan üniversal lökoredüksiyon uygulamasından önceki ve sonraki döneme ait postoperatif enfeksiyon ve mortalite sıklıklarını değerlendiren *before and after* çalışmalarının sonuçları değişkendir. Bu çalışmalardan sadece bir tanesinde mortalite sıklığının

üniversal lökoredüksiyon uygulaması sonrası azaldığı saptanmış (Hebert ve ark., 2003), diğerlerinde mortalite ve postoperatif enfeksiyon sıklığı üzerine olumlu bir etki belirlenmemiştir (Vamvakas ve Blajchman, 2007). Bu ve benzeri retrospektif çalışmaların yanında gözlemsel çalışmaların sonuçları da değişkendir. Örneğin travma hastalarında lökoredüksiyonun pnömoni sıklığını %45 oranında azalttığı (Frieze ve ark., 2008) ama mortalite üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Phelan ve ark., 2007). Bazı meta-analizlerde lökoredüksiyonun enfeksiyöz komplikasyonlar ve mortalite üzerine etkisinin olmadığı hesaplanırken (Vamvakas ve ark., 2001; Vamvakas ve Blajchman, 2007) bazılarında da özellikle kolorektal ve kardiyak cerrahi sırasında LA-AKT alan hastalarda postoperatif enfeksiyon riskinin %10 daha az olduğu hesaplanmıştır (Blumberg ve ark., 2007). Kardiyak cerrahi sırasında LA-AKT alan hastalarda mortalitenin ve postoperatif enfeksiyon sıklığının anlamlı şekilde düştüğünü gösteren randomize kontrollü çalışmalar (Bilgin ve ark., 2004; van de Watering ve ark., 1998) lökosit azaltmanın olumlu etkilerini ortaya çıkaran gözlemsel çalışmaları desteklemektedir. Daha çok gözlemsel çalışmalarda ortaya atılan lökosit azaltmanın TRIM gelişimini engelleme konusundaki olumlu etkisi randomize kontrollü çalışmalarla net olarak desteklenememektedir. Yukarıda da paylaşıldığı gibi olumlu sonuçlar bildiren randomize kontrollü çalışmalar olduğu gibi olumsuz sonuçlar bildirenler de vardır.

Öte yandan bu güne değin tanımlanmış olan TRIM etkenlerine ek olarak kan bileşenlerinin depolanma sürelerinin ve transfüze edilen ürün miktarının da immünmodülatuar değişikliklere neden olduğu da öne sürülmektedir. ES'lerin depolanma süresiyle TRIM ilişkisini değerlendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. 14 günden uzun süre depolanan ES'lerin bir yıllık mortaliteyi (Koch ve ark., 2008) ve enfeksiyöz komplikasyonları (Offner ve ark., 2002) artırdığının, ortalama 6 gün daha uzun süreyle depolanmış ES'lerin multiorgan yetmezliğine (Zallen ve ark., 1999) ve ortalama 8 gün uzun depolananların sepsise bağlı ölümlere yol açtığına (Purdy ve ark., 1997) gösterilmesi bu çalışmalara örnek olarak verilebilir. Bu etkilerin transfüzyon sayısı arttıkça daha fazla artış göstereceğini öngörmek yanıltıcı olmayacaktır. Zaten 3 üniteden fazla ES transfüzyonunun mortaliteyi artırdığını gösteren çalışmalar (Bilgin ve ark., 2004; vande ve ark., 1998) da bu öngörüğü desteklemektedir.



## 2.2. Myeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler (MKBH)

MDSC'ler ilk olarak seksenli yılların sonunda kronik graft versus host hastalığı (GVHD) ve tümörlü farelerde kemik iliği ve dalakta artan sayılarda granüllü hücrelere rastlanması, bu hücrelerin farklı lenfoid cevapları baskıladıklarının belirlenmesiyle fark edilmiştir (Fridlender ve ark., 2009). O zaman doğal baskılayıcı hücreler (Natural suppressor; NS) olarak tanımlanan MDSC'ler, kronik enfeksiyon, inflamasyon veya kanserler gibi durumların tetiklediği ılımlı ama sürekli bir miyelopoezis sırasında oluşurlar. Akut patojenik uyarım sonucu ortaya çıkan kısa süreli ama güçlü miyelopoezis sonucu aktive olan olgun nötrofil ve monositlerin aksine, ılımlı ama süregelen miyelopoezis sonucu yeterince olgunlaşamayan myeloid seri hücreleri olarak ortaya çıkan MDSC'ler immün sistemi değişik yollardan baskılama özelliğine sahiptir. Bu hücrelerin gelişimi, kontrol edilemeyen immün yanıtlardan dokuları korumak amacıyla ortaya çıkan evrimsel bir koruma mekanizması olarak kabul edilmektedir (Gabrilovich, 2017). İnsanda kanda, kemik iliğinde ve çeşitli organların kanserli dokularında bulunabilirler ve genel olarak iki büyük hücre grubundan oluşurlar (Gabrilovich, 2017). Bunlardan granulositik olanlar (G-MDSC) fenotipik ve morfolojik olarak nötrofillere benzerken, monositik olanlar (M-MDSC) monositlere benzemektedir. Her iki grup MDSC de olgun formlarının eksprese ettiği özgül birçok belirteci eksprese etmektен yoksundurlar. İnsanlarda diğer MNH'lerden M-MDSC'ler  $CD11b^+ CD14^+ CD15^- HLA-DR^{-/lo}$  veya  $CD33^+ Lin^- HLA-DR^-$ ; G-MDSC'ler  $CD11b^+ CD14^- CD15^+$ ,  $CD66^+ Lin^- HLA-DR^-$  veya  $CD11b^+ CD14^- CD66b^+$  ekspresyonlarıyla ayrılırlar (Gabrilovich ve ark., 2009; Gabrilovich, 2017).

Pek çok tümör modelinde ve insan kanserlerinde artış göstermeleri; ortadan kaldırılması halinde hastalık ilerlemesinde dramatik bir iyileşmenin görülmesi ve bunun bazen direkt anti-tümör etki ile sonuçlanması aslında bu hücrelerin fonksiyonları hakkında fikir vermektedir. Ana özellikleri immün baskılama olan bu hücreler, immün sistemin farklı hücrelerini etkileşeler de ana hedefleri T hücrelerdir (Gabrilovich, 2017). Salgıladıkları faktörlerle düzenleyici T hücreleri (Treg) uyardıklarının ve anti-tümör immüniteyi yardımcı T hücre 2 (Th2) yanıtlarına yönlendirdiklerinin gösterilmesi de bu görüşü desteklemektedir (Angulo ve ark., 1995).

MDSC'lerin kullandıkları başlıca iki farklı immün baskılayıcı mekanizma vardır. Bunlardan biri antijene özgü diğeri antijene özgü olmayan baskılamadır. M-MDSC'ler her iki yolu da kullanırken, G-MDSC'ler antijene özgü yolla immün baskılama yaparlar (Gabrilovich, 2017).

Antijene özgü baskılamada ana rolü oynayan moleküllerden başlıcası hidrojen peroksittir ( $H_2O_2$ ). MDSC'lerin çok miktarlarda hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ürettikleri, bu sayede T hücre cevaplarını baskılamada rol oynadıkları bilinmektedir (Kusmartsev ve Gabrilovich, 2003; Kusmartsev ve ark., 2004). MDSC'leri yüksek miktarlarda nitrik oksit de (NO) üretirler.  $H_2O_2$  ile NO etkileşiminden peroksinitrit (PNT) sentezlenir ve immün baskılamada PNT'in başrol oyuncusu olduğu, PNT üretimindeki kritik faktörün ise MDSC'lerde artan ROS üretimi olduğu ifade edilmiştir (Nagaraj ve ark., 2007). MDSC'ler tarafından üretilen bu oksidatif ajanlar antijen sunumu sırasında T hücre reseptör (T cell receptor; TCR) kompleksinin bütünlüğünün bozulmasına yol açarak MHC ile bağlantı kurmasına engel oluşturur ve T hücre toleransına neden olurlar (Nagaraj ve ark., 2007). Bu tolerans yeni bir TCR molekülünün sentezlenerek eskisinin yerini almasına kadar yaklaşık 3 gün devam edebilir (Nagaraj ve ark., 2010). MDSC'lerin genellikle MHC sınıf II moleküllerini eksprese etmedikleri ve bu nedenle sadece  $CD8^+$  T hücreleri baskıladıkları düşünülse de, MHC II ekspresyonu olan MDSC'lerin ilk olarak  $CD4^+$  T hücreleri ile antijen bağımlı bir temas kurdukları ve  $CD4^+$  T hücre cevaplarını baskıladıkları gösterilmiştir (Kodumudi ve ark., 2010; Nagaraj ve ark., 2012). Bu baskılanmanın daha sonra antijen olmaksızın da devam ettiği gösterilmiştir (Nagaraj ve ark., 2012).

MDSC'ler antijenden bağımsız baskılama fonksiyonlarını öncelikle prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) sentezleyerek gerçekleştirirler.  $PGE_2$ , T hücre proliferasyonunu doğrudan baskılar. T hücrelerin IL-2 sentezini ve cevabını engelleyerek diğeri doğal immünite elamanlarını da IL-10 molekül sentezleyecek şekilde yönlendirir (Kalinski, 2012). Ek olarak MDSC'ler membran bağı TGF- $\beta$ 'ları ile NK hücrelerinin sitotoksitesini, NKG2D ekspresyonunu ve IFN- $\gamma$  üretimlerini baskılamaktadırlar (Li ve ark., 2009). MDSC'lerin antijene özgü olmayan baskılamalarında bir diğeri özelliği de immün yanıtları kontrol altına alma özelliğindeki düzenleyici T hücrelerin (Treg) gelişimine neden olmalarıdır. MDSC'ler tarafından Treg hücrelerinin gelişiminin uyarılması

halen tartışmalı bir konudur. Bu konuda yöndeş (Huang ve ark., 2006) ve zıt görüşler (Dugast ve ark., 2008; Movahedi ve ark., 2008) bulunmaktadır.

MDSC'lerin antijenden bağımsız baskılayıcılığı ayrıca ortamdaki besin maddelerinin tüketilmesi ile de meydana gelir. MDSC'ler yüksek Arjinaz 1 aktivitesine sahiptirler ve bu sayede aşırı L-arjinin katabolizmasına yol açarak ortamda bu amino asitin tüketilmesine neden olurlar (Bronte ve Zanovello, 2005). L-arjinin eksikliğinin T hücre proliferasyon baskılanmasına neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca L-arjinin iNOS tarafından da katabolize edilmektedir (Bronte ve Zanovello, 2005) ve ek olarak iNOS ekspresyonları yüksek olan MDSC'ler bu enzimin ürünü olan NO aracılığıyla JAK3 ve STAT5 tirozin fosforilasyonunu azaltarak fonksiyonlarının baskılanmasına yol açmaktadır (Bingisser ve ark., 1998; Gabrilovich ve Nagaraj, 2009; Harari ve Liao, 2004). Ayrıca, NO duyarlı bir transkripsiyon faktörü olan AP-1'in bağlanmasını engelleyerek MHC II ekspresyonunu azaltmaktadır (Harari ve Liao, 2004). Bu da MDSC'lerde MHC II ekspresyonunun olmamasının nedenlerinden biri olabilir. Ostrand-Rosenberg ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sağlıklı fare  $Gr1^+CD11b^+$  hücreleri, tümörlü hayvandan izole edilenler kadar baskılayıcı bulunmuştur. Ayrıca başka bir çalışmada bu baskılama sadece  $CD8^+$  T hücreleri değil,  $CD4^+$  T hücreleri de kapsamaktadır ve arjinaz blokajı ile ortadan kalkmaktadır (Sinha ve ark., 2005).

Pek çok memeli hücresi sistatinyonaz enzimi aracılığı ile methionin aminoasitinden sistein üretebilir ya da ortamdaki sistini hücre içindeki indirgeyici ortamın etkisiyle sisteine çevirebilirler. Ancak, naif T hücreler bu enzimi barındırmadıklarından sadece alanin-serin-sistein (ASC) taşıyıcıları ile ortamdaki sisteini alabilirler. Bu nedenle T hücrelerin proliferasyonları için ortamdaki sistini alıp, sisteine çevirip, kendi ASC taşıyıcıları ile tekrar dışarı veren antijen sunan hücrelere (ASH) ihtiyacı vardır. Bu durum ASH'lerin T hücre yanıtlarını kontrol altında tuttukları bir mekanizma olarak gösterilmiştir (Edinger ve Thompson, 2002). MDSC'ler ASC taşıyıcısı barındırmadıkları için hücre içinde oluşan sisteini T hücrelerin kullanımı için dışarıya veremezler ve böylece ortamdaki sistini tüketerek T hücre proliferasyonunu engellerler (Srivastava ve ark., 2010). Bu immün mekanizmalardan hangisinin kullanılacağı çoğalan MDSC hücre tipine, hastalığın evresine, baskılamanın yapıldığı bölge ile ilişkili olarak değişebilmektedir. Belirli bir zamanda baskın olan baskılayıcı mekanizma, hastalığın progresyonu boyunca değişerek başka bir mekanizmaya yerini

bırakabilir (Gabrilovich ve ark., 2017). Baskılanmanın meydana geldiği bölgeye göre farklı baskılayıcı mekanizma kullanılmasına aşağıdaki örnekleri vermek mümkündür. Dalaktaki MDSC'ler yüksek seviyelerde ROS içerirken makul düzeylerde NO ve ARG1 sentezlemektedirler ve böylece üretebildikleri PNT ile kontak bağımlı şekilde aktive T hücreleri baskırlar. Tümörde bulunan MDSC'ler ise daha yüksek NO ve ARG1 ekspresyonlarına sahiptirler ve ROS seviyeleri düşüktür böylece hem ortamdaki antijen özgül T hücreleri baskırlar hem de non-özgül baskılama yapabilirler (Solito ve ark., 2011).

MDSC'ler immün süpresif mekanizmalarına ek olarak tümör mikroçevresinin yeniden yapılandırılmasını etkileyerek tümör progresyonunun hızlanmasına, VEGF, bFGF, Bv8 ve MMP9 üretimi aracılığıyla tümör anjiogenezinde artışa yol açarlar (Casella ve ark., 2003; Shojaei ve ark., 2009 ve Tartour ve ark., 2011). Ayrıca, premetastatik niş oluşumunu ve primer tümörün metastaza yönlendirilmesini etkilerler (Deng ve ark., 2012; Erler ve ark., 2009; Hiratsuka ve ark., 2006 ve Yan ve ark., 2010). Böylelikle, tümör hücresi invazyonu ve metastazlarda artışlara da katkıda bulunurlar.

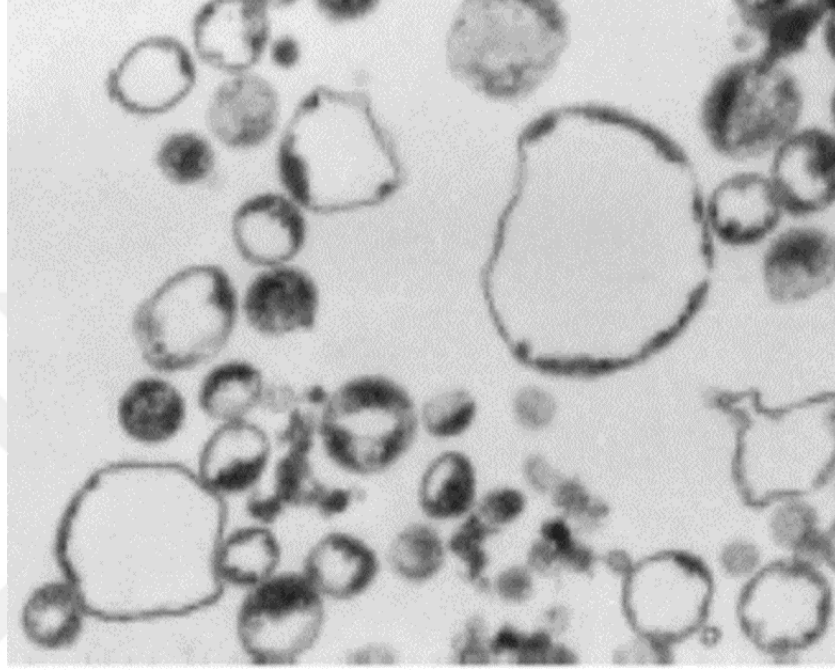
### **2.3. Eksozomlar**

Ekstrasellüler veziküller (EV), ökaryot ve prokaryot hücrelerde fosfolipid çift-tabakalı, plazma membranından doğrudan ya da dolaylı yollarla meydana gelen sferoid biçiminde yapılardır. Kargo içeriklerine, boyutlarına, plazma membranından oluşum ve salgılanma biçimlerine göre üç temel grup altında toplanırlar.

- Apoptotik kesecikler
- Mikroveziküller
- Eksozomlar

Bu keseciklerden ilk grup olan apoptotik kesecikler hücrelerin çevrelerinden aldıkları sinyaller sonucunda apoptoza girmesi ile ortaya çıkmaktadırlar. Çalışmalar göstermiştir ki bu kesecikler 500-2000nm arasında değişen boyutlara sahiptirler (Thery ve ark., 2009) (Şekil 1). Yüzeylerinde bulunan fosfatidilserin (PS) molekülleri en sık bulunan marker tiplerinden birisidir. Apoptotik keseciklerin farklı yöntemler ile tanımlanabilmesini sağlamakla birlikte bu PS moleküllerinin hücre ve sistem biyolojisi için çok önemli sayılabilecek bir görevi bulunmaktadır. Yani PS molekülleri apoptoz

sonucunda ortaya çıkan heterojen boyuttaki bu keseciklerin immün sistem, hücreleri üzerlerinde ifade edilen CD36 molekülüyle (PS algacı) tanınıp özellikle de makrofajlar tarafından fagositoz yoluyla uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Birge ve ark., 2008). Bir başka deyişle, PS molekülü immün hücreler için fagositoz sinyali anlamına gelmektedir.



**Şekil 1.** Nano/mikro-parçacıkların (200-700 nm) elektron mikroskopi altındaki görüntüsü. (Distler ve ark., 2005 ile They ve ark., 2009, Nat. Rev. Immunol) .

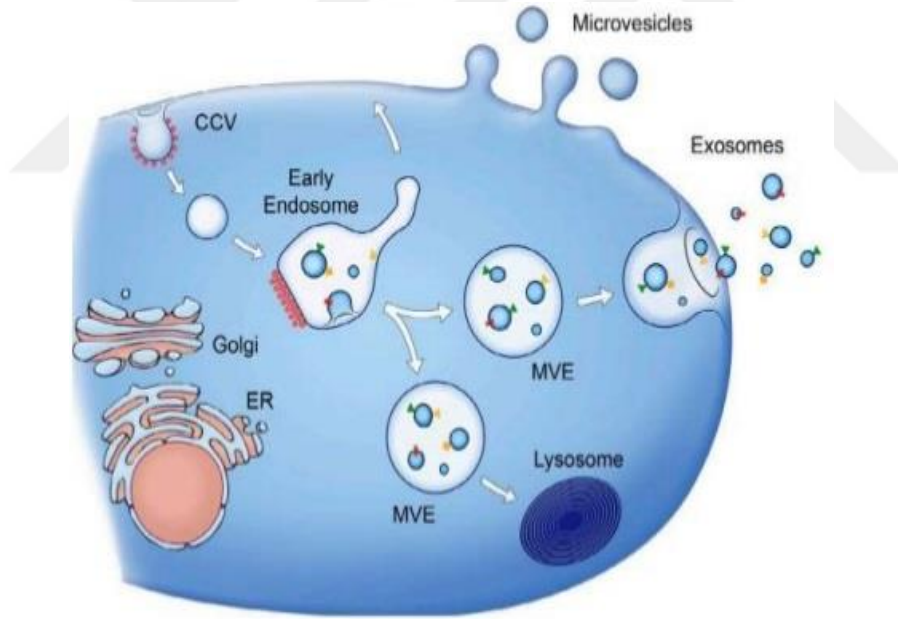
İkinci grup ise mikroveziküller olarak adlandırılan düzensiz ya da biçimsiz bir şekle sahip, 200-1000nm boyutları arasında değişebilen keseciklerdir. Plasma membranından köken alan bu mikrokesecikler temel olarak integrin sınıfı proteinleri, selektin grubu proteinleri ve CD40L proteinini içermektedirler (They ve ark., 2009). Mikrokeseciklerde, apoptotik kesecikler gibi yüzeylerinde ters dönmüş PS molekülleri içermektedir. Mikrokeseciklerin birçok hücre tipi tarafından salındığı bildirilmiştir. Bunlardan en önemlileri trombositler ve endotel hücreleridir. Mikrokeseciklerin birçok önemli hastalıkta ve vücut homeostazında rol aldıkları gösterilmiştir. Yapılan birçok çalışmada mikrokeseciklerin (özellikle trombositlerden köken alan mikrokeseciklerin), prokoagulan aktivitesinin bulunduğu dolayısıyla kan pıhtılaşmasında rol aldıkları gösterilmiştir (Piccin ve ark., 2007). Ayrıca mikrokeseciklerin birçok klinik durumda ve sistemik hastalıklarda rol aldığı da

gösterilmiştir. Sepsis ve orak hücreli anemide önemli rol oynamalarının yanı sıra, kardiovasküler hastalıklar gibi sistemik hastalıklarda da periferik kanda konsantrasyonlarının arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Piccin ve ark., 2007). Mikrokeseciklerin nasıl oluştuğu ve fizyolojik önemleri Piccin ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yayınlanan derlemede özetlenmiştir.

Üçüncü grup ise eksozomlardır. Eksozomlar; hücre membranından dolayı olarak köken alan, EV'lerin bilinen en küçük alt grubunu meydana getiren biyoaktif keseciklerdir. Transferrin reseptörü taşıyan bu keseciklerin çapları 30-100nm arasında değişmektedir. Eksozom terimi ilk defa 1981 yılında 5'nukleosidaz aktivitesi içeren ve neoplastik hücre kültürleri tarafından salınan mikrokesecikler için kullanılmıştır (Trams ve ark., 1981). Eksozomların bu boyutları ve farklı biyokimyasal yapıları onları hücreler tarafından salınan diğer keseciklerden ayırmakta ve onlara biyolojik "nanoparçacık" denmesine de neden olmaktadır (Ristorcelli ve ark., 2008). Çeşitli araştırmalarda eksozomlardan farklı isimlerle bahsedilmiştir. Doğal lipozom, geç endozom, mikropartikül, nanopartikül ve köken aldıkları hücre tipine göre onkozom, prostazom, epididimozom, argozom bu isimlerden bazılarıdır. Raposo ve ark. 1996'da Epstein-Barr virüsü ile transforme edilmiş B hücrelerinin antijen sunabilen nano-kesecikleri ortama saldığını gösteren bir çalışma yayınlanmıştır. Bu hücreler tarafından salınan eksozomların, hücre içindeki multiveziküler endozomlardan köken aldığı ve ayrıca peptid-MHC sınıf II komplekslerini taşıdığı ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışma ile eksozomlar ilgi odağı haline gelmiş ve ayrıntılı olarak yeniden derinlemesine çalışılmaya başlanmıştır. Gerçekten de B hücrelerinden köken alan eksozomların peptid-MHC sınıf II kompleksi bulundurması bilinen antijenlerin T hücrelerine sunulması dogmasını sarsmıştır. Bunun nedeni ise T hücrelerinin modülasyonunda antijen sunan hücre (ASH) ihtiyacının ortadan kalkma ihtimalinin belirmesidir. Daha sonra B hücreleri için geçerli olan bu durumun dentritik hücreler için de geçerli olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Zitvogel ve ark., 1998).

Eksozomları diğer EV'lerden ayıran en önemli özellikleri oluşum ve salınım yolları, kargo içerikleri ve lipit kompozisyonlarıdır. Bu küçük biyoaktif moleküller hedefledikleri hücrelere ulaştıklarında çeşitli yollarla taşıdıkları kargoları hedef hücreye aktararak fonksiyonlarını gösterir, hedef hücreyi yönlendirirler.

Eksozomların oluşum ve salımı için öncelikle erken endozomun oluşması, bunların içlerinde küçük keseciklerin meydana gelmesi ve daha sonra bu küçük kesecikleri içeren endozomun (multivesicular bodies-MVB) plazma membranı ile birleşimi gerekmektedir. İlk olarak plazma membranı içe doğru tomurcuklanarak erken endozomu oluşturur. Erken endozomlar farklılaşması ve kendi içlerine doğru tomurcuklanmasıyla çok sayıda intralüminal vezikülleri (İLV) meydana getirir. CD9 ve CD63 gibi tetraspaninler, İLV'in oluşmasında rol oynarlar. Bu İLV içeren erken endozomlar, multiveziküler bodies (MVB), multiveziküler endozom (MVE), multiveziküler cisimcik (MVC) veya geç endozom olarak adlandırılır. MVB'ler içeriklerine ve hedeflerine göre farklı son ürünlere dönüşen, internalize ettikleri biyomoleküllerin yıkımında rol oynayan ve trans-golgi ağında görev yapan ara birimlerdir. Meydana gelen MVB'ler trans-golgi ağı üzerinden ya lizozoma gidip ortadan kaldırılırlar ya da plazma membranı üzerinden ekzositoz ile içeriklerini hücre dışına bırakırlar ve eksozom ekspresyonunu sağlamış olurlar (Şekil 2).



Şekil 2. Eksozom oluşumu. Kaynak: <https://www.slideshare.net/pinarbinicierasal/exosomlar>

Daha önceleri MVB'lerin sadece lizozomlarla birleşerek yıkıma gittikleri düşünülürken; Harding ve ark. (1983) yaptıkları çalışmada plazma membranı ile birleştikleri ve izledikleri bu farklı yolak sayesinde yıkım yolağından kurtulduklarını gösterilmiştir. MVB'leri yıkım yolağından kurtararak eksozom olarak eksprese

edilmelerini sağlayan bu ikinci yolağın seşilmesinde hangi hücree içi organelin veya molekülün rol aldığı tam olarak bilinmemektedir. Ama Rab (Ras ilişkili bağlayıcı protein grubu) ailesinin çeşitli üyelerinin etkileri olabileceği düşünölmektedir (Kahlert ve ark.,2013). Rab protein ailesi, MVB'lerin aktin ve mikrotüböller aracılığıyla plazma membranı boyunca hareket etmesini ve plazma membranı ile füzyonunu sağlar. Ayrıca MVB ve İLV'lerin endosomal ayırma kompleks proteinleri (ESCRT) gibi bazı membran proteinlerinin de eksozomların salgılanmasında rolleri olduğu düşünölmektedir (Villarroya-Beltri ve ark., 2014). Oligodendrositler üzerinde yapılan bir ęalıřmada ise eksozom salımında ESCRT molekülünden ęok sfingolipid seramid molekülünün rol aldığı gösterilmiştir (Trajkovic ve ark., 2008). Bu ęalıřmada elde edilen eksozomların seramid açısından zengin olduğu görölmüştür. Ayrıca, hücredeki sfingolipid seramid üretimi engellendiğinde eksozom eksositozunun azaldığı gözlemlenmiştir.

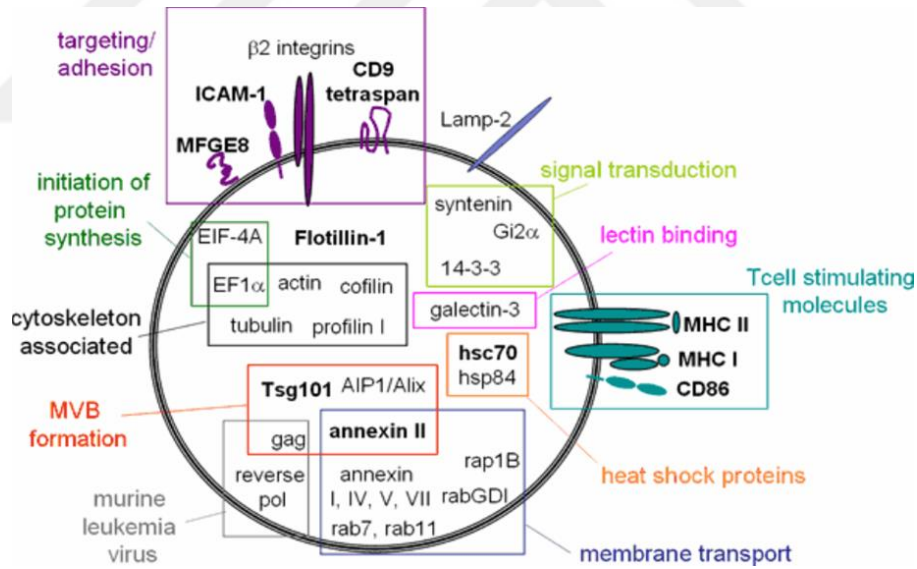
Eksozomlar, hücreler tarafından sürekli ortama bırakılabildikleri gibi indöklenebilir bir salınım mekanizmaları da bulunmaktadır. Salınımı hücre tipleri arasında farklılık göstermektedir. Bazı hücreler eksozomları sürekli ortama salıyorken bazı hücreler dışarıdan bir uyarana ihtiyaç duymaktadır. Retikölositler, T hücreleri ve aktifleşmemiş B hücreleri eksozom salımına çevresel ortamdan gelen uyarılar sonucunda başlamaktadırlar. Bunun tam tersi bir durumda ise Epstein-Barr virüsü ile transforme olmuş B hücreleri (Raposo ve ark., 1996), dendritik hücreler (Zitvogel ve ark., 1998), makrofajlar (Bhatnagar ve ark., 2007) ve tümör hücreleri herhangi bir uyarılmaya gerek duymadan hücre dışı ortama sürekli eksozom salımı yapmaktadırlar. Her ne kadar dendritik hücreler için sürekli eksozom salıyor deniyor olsa da bu hücrelerin aktivasyon durumlarına göre eksozom salımları değişmektedir.

Eksozomların önemli bir özelliği, taşıdıkları kargo içerikleridir. Kargoları köken aldıkları hücrelere ve eksprese edilme amağlarına göre değişiklik göstermektedir. İlk araştırmalar, eksozomların sadece hücreden atık uzaklaştırmada görev aldıkları yönündeyken, sonraki ęalıřmalarda kargo içeriklerinin bunun aksine hücreler arası haberleşme, sinyal iletimleri gibi önemli rollerde kullanılmak üzere, nükleik asitler, proteinler, miRNA, mRNA, nükleoproteinler ve çeşitli enzimler taşıdıkları ortaya ęıkarılmıřtır (Akers ve ark., 2013; Van der Pol ve ark., 2012). Taşıdıkları miRNA, mRNA kargoları ile eksozomlar diğer EV'lerden ayrılmaktadır. Bu içerikleri



sayesinde eksozomlar alıcı hücreye transfer olduklarında alıcı hücrenin fonksiyonunu değiştirebilirler (Minciacchi ve ark., 2015; Van der Pol ve ark., 2012).

Eksozomların kargolarını ayrıca protein ve lipid kargoları olarak ikiye ayırmak mümkündür. Protein kargolarını ESCRT, lipid-bağımlı mekanizmalar ve tetraspanin mekanizmaları ile vezikülün içerisine alan (Ersöz ve ark., 2016) eksozomların protein içerikleri membran trafiğinde rol alan proteinlerden, MVB oluşumunda görev alan proteinlere kadar farklılık göstermektedir. İntegrinler, immüoglobulinler, hücre iskeleti proteinleri, adezyon proteinleri taşınım için gerekli ESCRT, eksozom biyogenezine katılan ve aynı zamanda belirteç olarak iş gören proteinler, ısı-şok proteinleri, endozomal vesikül trafiğinde görevli proteinler gibi çok ve değişik sayıda proteinleri içerirler (Schorey ve ark., 2008; They ve ark., 2001; They ve ark., 2009). Lipid kargo olarak da kolesterol, lizofosfatidilkolin, sfingomiyelin, fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin ve digliserid gibi fonksiyonel lipidler taşırlar (Villarroya-Beltri ve ark., 2014) (Şekil 3).



Şekil 3. Dendritik hücrelerden izole edilen eksozomlarda bulunan fonksiyonlarına göre gruplandırılmış proteinler (Lakkaraju ve ark., 2008; They ve ark. 2009, Nat. Rev. Immunol).

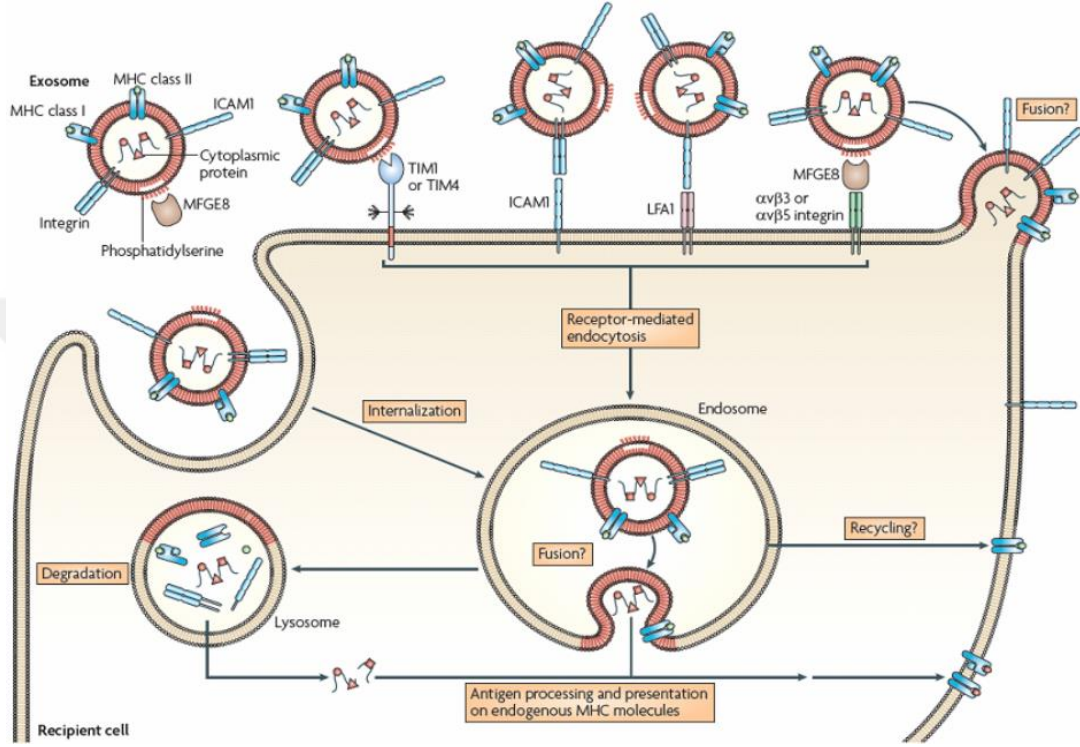
Eksozomların taşıdıkları kargo sayesinde diğer hücreler tarafından tanınmaları ve hücre içine alınmaları kolaylaşır (Azmi ve ark., 2013). Böylelikle hedef hücrelere ulaşabilir ve fonksiyonlarını gösterebilirler. Örneğin, Segura ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada etkinleşmiş dendritik hücrelerden köken alan ICAM-1 içeren

eksozomların CD8<sup>+</sup> Dendritik hücreler ve aktifleşmiş T hücreleri tarafından üzerlerinde bulunan LFA-1 (ICAM-1'in ligandı) molekülü sayesinde internalize edildiği gösterilmiştir. Bu bulgu eksozomların çevre hücreler tarafından yakalanmasında ligand-reseptör etkileşiminin önemi vurgulamaktadır. Benzer bir başka yol ise  $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2 integrin içeren eksozomların ICAM-1 ifade eden hücreler ya da fibronektin tarafından yakalanmasıdır. Eksozomlar çevre hücreler tarafından ayrıca üzerlerinde bulunan fosfotidilserin (PS) reseptörleri tarafından da yakalanmaktadırlar. Bunlardan bir tanesi makrofaj hücreleri yüzeyinde ifade edilen CD36 molekülüdür (Birge ve ark., 2016). CD36, PS molekülüne bağlanarak eksozomların bu hücreler tarafından içlerine alınmasını (fagosite) sağlamaktadır. Diğer bir PS reseptörü ise lenfositler ve fagositler üzerinde ifade edildiği bilinen TIM-1 ve fagositler üzerinde ifade edildiği bilinen TIM-4 proteinleridir. Bu proteinler aracılığıyla lenfositler ve fagositler eksozom ve daha büyük kesecikleri (üzerlerinde bulunan PS aracılığı ile) yakalanmaktadırlar (Miyanishi ve ark., 2007). Ayrıca, başka bir adezyon molekülü olan MFGE8 (Milk Fatty Globule 8) de karboksi-terminal faktör V/VIII-benzeri bölgesi aracılığı ile PS molekülüne bağlanabilmektedir. Yani PS içeren eksozomların yakalanmasının bir başka yolu da MFGE8 molekülünün PS molekülüne bağlanması ve MFGE8'ninde çevre hücrelerin yüzeylerinde ifade edilen  $\alpha$ v $\beta$ 3 ve  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrinlerine bağlanmasıdır (Veron ve ark., 2005).

Eksozomların hücreler arası birçok ilişkide en az hücrelerin bire bir etkileşmesi kadar önemli olduğunun ortaya konulması ile eksozomların fizyolojik rolleri de araştırılmaya başlanmıştır. Birçok farklı hücre kültüründen izole edilip analizleri yapılsa da, bunların *in vivo* varlıklarını ispatlamak kolay bir uğraş olmamıştır. Bunun en önemli nedeni ise *ex vivo* izole edilmiş eksozomların, izolasyon sırasında dokuyu ayırmak için uygulanan mekanik kuvvetlerden dolayı hücrelerden kopabilecek parçalar ile karıştırılabilecek olmasıdır. Bu nedenle mekanik ayrışım sonucu elde edilen eksozomların saflığı tartışma konusu olup, dikkatli bir yaklaşım gerekmektedir. Ayrıca, eksozomların çevre hücreler ile etkileşiminin *in vivo* ya da *in vitro* boyutlarının görüntülenmesi boyutlarından dolayı çok zordur. Ancak dolaylı *in vitro* kanıtlar eksozomların çevre hücreler ile nasıl etkileştiklerini ortaya koyabilmektedir. Bu kanıtlar eksozomların alıcı hücreye üç değişik yolla bağlanıp internalize edilebildiğini

düşündürmektedir (Şekil 4). Bu üç yol aşağıdaki gibi özetlenebilir (Ersöz ve ark., 2016):

- Reseptör-ligand etkileşimi (Gupta ve Pulliam, 2014)
- Hedef hücre membranı ile doğrudan füzyon (van den Boorn ve ark., 2011)
- Fagositoz (Kahlert ve ark., 2013)



Şekil 4. Salınan eksozomların etraftaki hücreler tarafından olası alınma yolları (They ve ark. 2009, Nat. Rev. Immunol.).

Kargosu hedef hücre sitoplazmasına ulaştıktan sonra kargo içeriğine göre farklı mekanizmalarla eksozomun hedef hücre üzerindeki etkileri ortaya çıkar. Yani hedef hücre üzerindeki etkiyi kargonun yapısı belirler. Hedef hücre eksozom birleşmesi sonrasında eksozomda bulunan RNA'nın alıcı hücre tarafından ifade edildiğinin gösterilmesi bu duruma güzel bir örnektir (Schageman ve ark., 2013).

Eksozomlar vücutta bulunan bütün hücrelerden salgılanabilir ve bütün vücut sıvılarında bulunurlar (Ersöz ve ark., 2016). Yapılan analizlerin sonucunda sanılandan daha fazla tip hücrenin eksozom salgı kapasitesinin olduğu ortaya çıkmıştır (They ve ark., 2009). Örneğin hematopoietik hücreler, epitel ve endotel kökenli hücreler, tümör hücreleri, trofoblastlar, nöronlar, oligodendrositler gibi çok sayıda hücrenin eksozom salgı yapabildikleri gösterilmiştir (Gupta ve Pulliam, 2014; Iero ve ark., 2008;

Lakkaraju ve ark., 2008; Licarete ve ark., 2012; Pang ve ark., 2012; Pisitkun ve ark., 2004; They ve ark., 2009).

Eksozomların hem antijeni, hem de peptid-MHC kompleksini üzerlerinde barındırdığı bulgusu immünologları eksozomların immün modülasyondaki rollerini anlamak için çalışmaya yönlendirmiştir. Bu çalışmalar sayesinde eksozomların immün modülatuar etkilerini MHC class I ve II, FasL, TRAIL, membrana bağlı TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CD73, CD39, miRNA, mRNA'lar, ve NKG2D gibi molekülleri aracılığıyla hem antijene bağlı, hem de bağımsız olarak gösterdiklerini öğrenilmiştir.

Antijene bağlı immün modülasyona, eksozomların MHC sınıf II molekülü ifade etmeyen foliküler dendritik hücelere bu özelliği kazandırarak CD4<sup>+</sup> T hücrelerini aktive edebilme yeteneği kazandırmaları örnek olarak verilebilir (Segura ve ark., 2005). Bu örnekten de anlaşılacağı gibi eksozomlar ASH'lerin eksojenik antijenleri elde etme yollarından biridir. Yani etrafta bulunan diğer hücelerden salınan eksozomların yakalanarak internalize edilmesi, ASH'lerin eksojenik antijenleri eksprese etmesine aracılık etmektedir. Örneğin tümör kültürlerinden elde edilen ve tümör antijenlerini barındıran eksozomların, antijen ile karşılaşma ihtimali olmayan alıcı dendritik hücelere antijeni aktararak antijene-özgü T hücrelerinin etkinleşmesini indükleyebildiği gösterilmiştir (Wolfers ve ark., 2001). Ayrıca, *Mycobacterium tuberculosis* ya da *Mycobacterium bovis* (hücrede endositik kompartmanlara yerleşen bakterilerdendir) ile enfekte olmuş makrofajlardan köken alan eksozomlar (Giri ve ark., 2008) ve sitomegalovirus ile transforme olmuş epitel hücrelerinden salınan eksozomlar (Walker ve ark., 2009) patojen kökenli antijenleri dendritik hücelere transfer ederek, dendritik hücelere yardımıyla patojen kökenli antijenlere özgü CD4<sup>+</sup> T hücrelerini etkinleştirebilmektedir. MHC grup I molekülü birçok hücrede bulunmasından dolayı, neredeyse her hücreden köken alan eksozomlar ASH'lere gerek duymadan direkt kendi başlarına antijen spesifik CD8<sup>+</sup> T hücre aktivasyonunu gerçekleştirebilmektedirler. Dendritik hücre kökenli eksozomların antijen spesifik CD8<sup>+</sup> T hücreleri indükleyebildiğinin gösterilmesi üzerlerinde bulunan peptid-MHC sınıf I kompleksinin fonksiyonel olduğunu göstermektedir. ASH'lerden köken alan eksozomlarda, eksozomların geç endositik organellerden köken almasından dolayı, MHC sınıf I molekülünün yanında yüksek miktarda MHC sınıf II molekülü de bulunmaktadır. Bu nedenden dolayı antijen sunucu hücelerden köken alan

eksozomlar, T hücre hatlarını ve aynı kökenden gelen T hücre klonlarını kendi başlarına aktive edebilmektedirler. Ancak naif CD4<sup>+</sup> T hücrelerini aktive edebilmek için dendritik hücrelere ihtiyaç duymaktadırlar. Sadece antijeni barındıran eksozomlar (genelde non-hematopoetik kökenli) antijen spesifik T hücrelerini aktive edebilmek için antijen sunum hücrelerinin varlığına ihtiyaç duymaktadırlar. Bunun nedeni ise peptid-MHC kompleksinin tek başına efektör T hücre etkinleşmesini sağlayamaması ve ko-stimülör moleküllere ihtiyaç duymasındır. Ancak T hücrelerini, dendritik hücreler ile birlikte inkübe edildikleri zaman aktive edebilen bu eksozomların yanı sıra, herhangi bir yardıma ihtiyaç duymadan antijen spesifik T hücresi aktivasyonunu sağlayabilen eksozomlar da bulunmaktadır. Bu tür eksozomlar antijenin tamamını ya da belli bir epitopunu taşımakla beraber peptid-MHC kompleksini de üzerlerinde barındırmaktadır. Etkinleşmiş dendritik hücrelerden izole edilen eksozomların T hücrelerini aktive etme kapasiteleri inaktif dendritik hücrelerden salınan eksozomlara göre daha fazla olduğunun gösterilmesi bu durumu aydınlatmaktadır (Admyre ve ark., 2006). Etkinleşmiş dendritik hücrelerden köken alan eksozomlar peptid-MHC kompleksi ile birlikte ko-stimülör moleküllerden olan CD80 (B7.1) ya da CD86'dan (B7.2) birini barındırmaktadırlar. Bu sayede peptid-MHC kompleksi ile TCR yolağını hem de CD80 ya da CD86 aracılığıyla CD28 yolağını etkinleştirip efektör T-hücre etkinleşmesini sağlayabilmektedir.

Eksozomlar antijen aracılı immün modülatör özelliklerinin yanı sıra bunu antijenden bağımsız yapabilmelerine sebep olan farklı moleküllerde içermektedirler. Bu sayede eksozomların immün modülasyon kapasiteleri sadece allojeneik antijen içermelerine bağlı değildir ayrıca farklı moleküller aracılığı ile de immün aktivasyonuna ya da baskılanmasına katkı sağlamaktadırlar (They ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar tümörlerden salınan eksozomların CD95 ligandı (CD95L yada FasL) yada galectin 9 moleküllerini içerdiğini dolayısıyla da T hücrelerinin apoptoza girmesine neden olduklarını göstermiştir (Huber ve ark., 2005). Bunun yanı sıra bu tip eksozomlar, Treg hücrelerin fonksiyonlarını arttırarak CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerin çoğalmasını da engellemektedir (Clayton ve ark., 2005). Bunların yanı sıra tümör kökenli eksozomlar CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin ve NK hücrelerinin sitotoksitelerinin azalmasına ve miyeloid öncü hücrelerden dendritik hücre oluşmasının engellenmesine neden olurken, miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin oluşmasını da

tetiklemektedirler (They ve ark., 2013). Sonuç olarak tümör kökenli eksozomlar pleitropik etki göstermektedirler ve anti-tümör immün tepkilerin düzenlenmesini sağlamaktadırlar. Tümör hücreleri gibi immün sistem hücrelerinden, özellikle aktive olmuş T hücrelerinden salınan eksozomların da CD95L içerdikleri ve böylece aktivasyonun indüklediği hücre ölümünde (Activation-Induced Cell Death: AICD) rol oynadıkları bilinmektedir (Stenqvist ve ark., 2013). Sütten elde edilen eksozomların *in vitro* çalışmalarda T hücrelerinin aktifleşmesini engellemenin yanı sıra, Treg hücrelerinin etkinliklerini arttırdığı gösterilmiştir (Admyre ve ark., 2006). Buna benzer bir şekilde hamile kadınların kanlarından elde edilen eksozomların CD95L içerdiği ve T hücrelerinde CD3 $\zeta$  ve JAK3 moleküllerinin sentezlenmesini azaltarak yanıt verme yeteneklerinin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (Taylor ve ark., 2006).

Eksozomlar immün düzenleyici etkilerini yukarıda bazı örnekleri verilen immün baskılayıcı özelliklerinin yanı sıra immün aktivasyon şeklinde de oluşturabilmektedir. Örneğin, trombin tarafından etkinleştirilen trombositlerin ortama saldırdığı eksozomlar hematopoietik hücrelerin proliferasyonunda, yaşama sürelerinin uzatılmasında ve kemotaksislerinde, monositlerin pro-enflamatuvar sitokinleri salmaları için etkinleşmelerinde ve CD40L/CD40 yolağı aracılığı ile B hücrelerinin etkinleştirmesinde görev almaktadırlar (They ve ark., 2009). Bu sayede B hücrelerinin CD4<sup>+</sup> T hücrelere olan gereksinimleri ortadan kalmaktadır. Hücre içi patojenler tarafından enfekte olmuş makrofaj hücreleri tarafından salınan eksozomlar patojene ait pro-enflamatuvar moleküller içerdiklerinden dolayı bu eksozomları internalize eden makrofajları pro-enflamatuvar sitokin salımı için uyarmaktadır. Özellikle, *Mycoplasma arginini* yada *Mycoplasma orale* tarafından enfekte olan makrofajlar tarafından salınan pro-enflamatuvar eksozomlar, B ve T hücrelerinin poliklonal etkinleşmelerine neden olmaktadır (Quah ve ark., 2007). Yapılan çalışmalarda inaktif dendritik hücreler tarafından salınan eksozomların üzerinde bulunan moleküllerin NK hücrelerinin aktivasyonunu sağlayan reseptör grubunun ligandları olduğu gösterilmiştir (Viaud ve ark., 2009). Eksozomların NK hücrelerini etkinleştirme özelliği farklı tiplerinde bulunan farklı moleküller aracılığı ile yapılmaktadır. Isı şoku ile etkinleşmiş dendritik hücrelerden salınan eksozomların üzerinde bulunan BAT3 bu moleküllerden biridir. Ayrıca melanomalı hastaların dendritik hücrelerinden salınan eksozomlarda bulunan MICA ve MICB molekülleri de (NKG2D ligandları) NK

aktivasyonunu desteklemektedir (Viaud ve ark., 2009). Son olarak, romatoid artritli (RA) hastaların sinoviyal sıvılarından elde edilen fibroblast hücrelerinin ortama saldıkları eksozomlarda TNF molekülünün membrana bağlı formu bulunmaktadır. Bu eksozomların T hücrelerine bağlanması AICD'e karşı bu hücrelerin direnç kazanmasını sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2013). Ayrıca RA'lı hastaların T hücreleri ve monositleri tarafından salınan eksozomlar ise fibroblastlarda MMP1, MMP3, MMP9 ve MMP13 gibi matrix metaloproteinazların transkripsiyonunu uyarmaktadır. Bunun yanı sıra bu eksozomlar IL-6, IL-8, MCP-1 ve MCP-2 gibi pro-enflamatuvar mediyatörlerin salınımını da tetiklemektedir (Distler ve ark., 2005). Dolayısıyla eksozomların romatoid artrit gibi önemli kronik enflamatuvar bir hastalığın patolojisinde rol aldığı gösterilmiştir. Yani RA'lı hastalarda ister fibroblastlardan salınsın, isterse T hücreleri ve monositlerden salınsın, eksozomlar hastalığın daha da şiddetlenmesine ve ileri düzeyde kıkırdak hasarına neden olmaktadır.

Şu ana kadar eksozomların immün sistem hücreleri üzerinde olan *in vitro* pleiotropik etkilerinden bahsedildi. Ancak eksozomların immün hücreler üzerindeki etkileri ister etkinleştirme/uyarma olsun ister baskılama olsun *in vivo* koşullarda da bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar dendritik hücrelerden köken alan eksozomların immünojenik oldukları iddiasını güçlendirmektedir. Dendritik hücreden köken alan ve tümör peptid-MHC kompleksi barındıran eksozomların enjeksiyonu tümör rejeksiyonuna yol açmaktadır (Zitvogel ve ark., 1998). Daha önce *in vitro* çalışmalarda gösterildiği gibi bu etki eksozomların olgunlaşmış dendritik hücreler ya da dendritik hücre olgunlaşmasını tetikleyen kimyasallar ile birlikte enjeksiyonu sonucu daha da dramatik hale gelmektedir. Deri graftlarının rejeksiyonunda da eksozomlar etkili olmaktadır. Antijen ile olgunlaştırılmış dendritik hücrelerden köken alan eksozomların erkek fareden alınıp dişi fareye enjeksiyonu hızlı graft rejeksiyonuna yol açmaktadır (Segura ve ark., 2005). Bu olgu da eksozomların *in vivo* naif CD4<sup>+</sup> T hücrelerini etkileyerek efektör CD4<sup>+</sup> T hücrelerine dönüşebildiklerini göstermektedir.

Eksozomların *in vivo* etkileri sadece hücrel immünite ile sınırlı kalmamaktadır. Ayrıca humoral immünitinin etkinleşmesi ve olgunlaşmasında da rolleri bulunmaktadır. Dendritik hücreler tarafından salınan antijen içeren eksozomlar B hücrelerini etkinleştirerek aynı antijene karşı humoral immünite gelişmesinde de rol almaktadırlar. Bu etki eksozomlar üzerindeki antijenlerin tayin edilebilenin altındaki

düzeylerinde de görülmektedir. Buna en iyi örnek olarak, *T. gondii* antijenlerine maruz kalmış dendritik hücrelerden salınan eksozomların humoral immünite ve Th1 hücre immünitesini etkinleştirerek organizmayı akut enfeksiyonlara karşı koruma sağlaması gösterilebilir (Długońska ve ark., 2016).

Yakın geçmişte eksozomların antijenden bağımsız *in vivo* immünolojik etkilerini de vurgulayan bulgular ortaya konulmaya başlanmıştır. Farelerde yapılan çalışmalarda dendritik hücrelerden köken alan eksozomların lenf düğümlerinde NK hücrelerinin toplanması ve proliferasyonunda rol aldıkları gösterilmiştir (Viaud ve ark., 2009). *In vivo* immün aktivasyon özelliklerinin yanında eksozomların *in vivo* tolerojenik özellikleri de vurgulanmaktadır. Daha önce belirtildiği üzere olgunlaşmış dendritik hücrelerden köken alan eksozomlar immün aktivasyonda rol alırken etkinleşmemiş dendritik hücrelerden köken alan eksozomlar ise daha çok immün baskılamada rol almaktadır. Bu tip baskılayıcı eksozomların graft reddini engellediği (Ben ve ark., 2016) ve septik şok modelinde enflamasyonu da önlediği bildirilmiştir. Ayrıca CD95L<sup>+</sup> ve IL10<sup>+</sup> dendritik hücrelerden köken alan eksozomların artrit modelinde özellikle eklem bölgelerindeki enflamasyonu bir şekilde engellediği bilinmektedir (Kim ve ark., 2005). Epitel kökenli eksozomların da tolerojenik etkileri bulunmaktadır. Alerjene maruz bırakılmış farelerin akciğer epitelinden salınan ve bronkoalveolar lavaj sıvısından izole edilen eksozomların allojeneik transferi, alıcı farede de aynı alerjene karşı tolerans gelişmesini sağlamaktadır (Prado ve ark., 2008). Bu eksozomların neden tolerojenik özellik yerine efektör etki gösterdikleri ise şu an için bilinmemektedir. Sonuç olarak *in vitro* çalışmalarda gösterildiği gibi *in vivo* çalışmalar da eksozomların pleiotropik etkilerinin olduğunu göstermektedir. Yani eksozomlar immün hücreleri bir yandan etkinleştiriyorken diğer yandan ise baskılayabilmektedirler (Ren ve ark., 2011). Eksozomların baskılayıcı etki mi yoksa etkinleştirici etki mi göstereceği donör hücresinin o anki durumuna, dolayısıyla değişen eksozom kompozisyonuna bağlıdır. Buna en iyi örnek daha önce bahsedildiği üzere dendritik hücrelerden gelmektedir. Özellikle CD95L ya da TGF- $\beta$  içeren eksozomlar immün baskılayıcı etki gösterirken, ko-stimülatör molekülleri, adjuvantları ve strese maruz kalmış hücrelerden gelen HSP (Heat Shock Proteins) molekülleri barındıran eksozomlar tam tersi immün uyarıcı (stimülatör) etki göstermektedir.



### 2.3.1. Eksozomların Kan Tranfüzyonuyla İlişkili İmmün Modülasyonu

DNA, RNA ve protein içerebilen eksozomlar, köken aldıkları hücelere bağlı olarak yüzeylerinde farklı belirteçler eksprese ederler (Strasser ve ark., 2013). Eksozomların hücrel kaynağı ve insan eritrositlerinin depolanma süresince üretilen eksozomların immünomodülatör rolü tam anlaşılammıştır (Morel ve ark., 2011). Bu konuda yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birinde eritrosit süspansiyonu içerisindeki eksozomların T hücre immün yanıtını baskıladığı öne sürülmektedir (Danesh ve ark., 2014). Depolanmış eritrosit ünitelerinde bulunan eksozomların, lökosit belirteçlerinden yoksun olduğu, ancak bu eksozomların, endotel, eritrosit ve trombosit belirteçleri ile immünreaktif olduğu öne sürülmektedir (Danesh ve ark., 2014). Eksozom fraksiyonu, insan periferel kanı mononükleer hücrelerini (PKMNH) *in vitro* olarak uyabilir ve proinflamatuvar sitokin tepkisini tetikleyebilir. Eksozomların, PKMNH kültürlerinde, antijen sunan hücreleri ve mitojene dayalı T hücre çoğalmasını güçlendirdiği gösterilmiştir (Danesh ve ark., 2014).

Çalışmamız eksozomların NL-ES ve LA-ES içinde depolanma süreci boyunca gösterdikleri değişimleri belirlemek ve TRIM ile ilişkilendirmek için planlanmıştır. Allojeneik MNH'lerin kan bileşeni içinden uzaklaştırılmalarına rağmen TRIM'e yol açabilme potansiyellerinin değerlendirilmesi hedefimiz olmuştur. Bu hedefe ek olarak çalışmamızın lökoredüksiyon-TRIM ilişkisine yönelik bilgilere katkı sağlayacağı da düşünülmektedir. Daha önce bizim çalışmamız kadar geniş kapsamlı ve kan bileşeni içindeki MDCS'lerden köken alan eksozomları değerlendiren başka bir çalışmanın yapılmamış olması da araştırmamızın özgün değerini oluşturmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma;

3.1. Kanların alınması ve örneklerin hazırlanması

3.2. Lökositler: azaltılmış ve azaltılmamış ES örneklerinde akan hücre ölçer ölçümlerinin yapılması

3.3. İstatistiksel değerlendirilmenin yapılması aşamalarından oluşmaktadır.

Çalışmamızda ES'lerden izole edilen eksozomların akan hücre ölçer ölçümleri ile tanımlanması amaçlanmıştır. Bunun için önce günleri gelen NL-ES ve LA-ES örneklerinden eksozomlar izole edilmiş ve -80°C derin dondurucu (Sanyo, MDF-US386S, Japonya) saklanmıştır. Tüm eksozomlar izole edildikten sonra akan hücre ölçer ölçüm aşamasına geçilmiş, ancak kullanılmakta olan akan hücre ölçer cihazı (Navios, Beckman Coulter) eksozomları saptama özelliğinde olmadığı için öncelikle eksozomlar bu cihazla okunabilir boyuta getirilmiştir. Bunun için karboksilateks beadler (Life Technology, ABD) kullanılmıştır. Önce karboksi lateks beadler pürifiye anti-CD9 monoklonal antikorlar ile kaplanmış ve eksozomlarla konjuge edilecekleri güne kadar +2-8°C dolaplarda (Arçelik, Türkiye) saklanmıştır. Daha sonra eksozomlar bu kaplanmış beadler ile konjuge edilmiştir. Ancak bu konjugasyonun (1 ug ekzosom + 1 ul monoklonal CD9 konjuge Bead) şeklinde bir formülü bulunduğu için ilk olarak örneklerdeki eksozom miktarlarını belirlemek gerekmiştir. Eksozom miktarları Bicinchoninic Protein Assay (Thermo, ABD) yöntemi ile belirlendikten sonra her örnek için konjugasyon miktarı hesaplanabilmiş ve konjugasyon bu miktar ile yapılmıştır. Ardından da akan hücre ölçerde (Navios, Beckman Coulter, ABD) değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Hem lateks beadleri kaplamak, hem de eksozomları akan hücre ölçerde boyamak için eksozomlara özgü yüzey belirteci olan CD9'lara spesifik anti-CD9 monoklonal antikorlar kullanılmıştır. Bu amaçla anti-CD63 veya anti-CD81'lerin kullanılmama nedeni ön çalışma sırasında anti-CD9'lar ile daha iyi sonuçlar elde edilmiş olmasıdır.

### 3.1. Kanların Alınması ve Örneklerin Hazırlanması

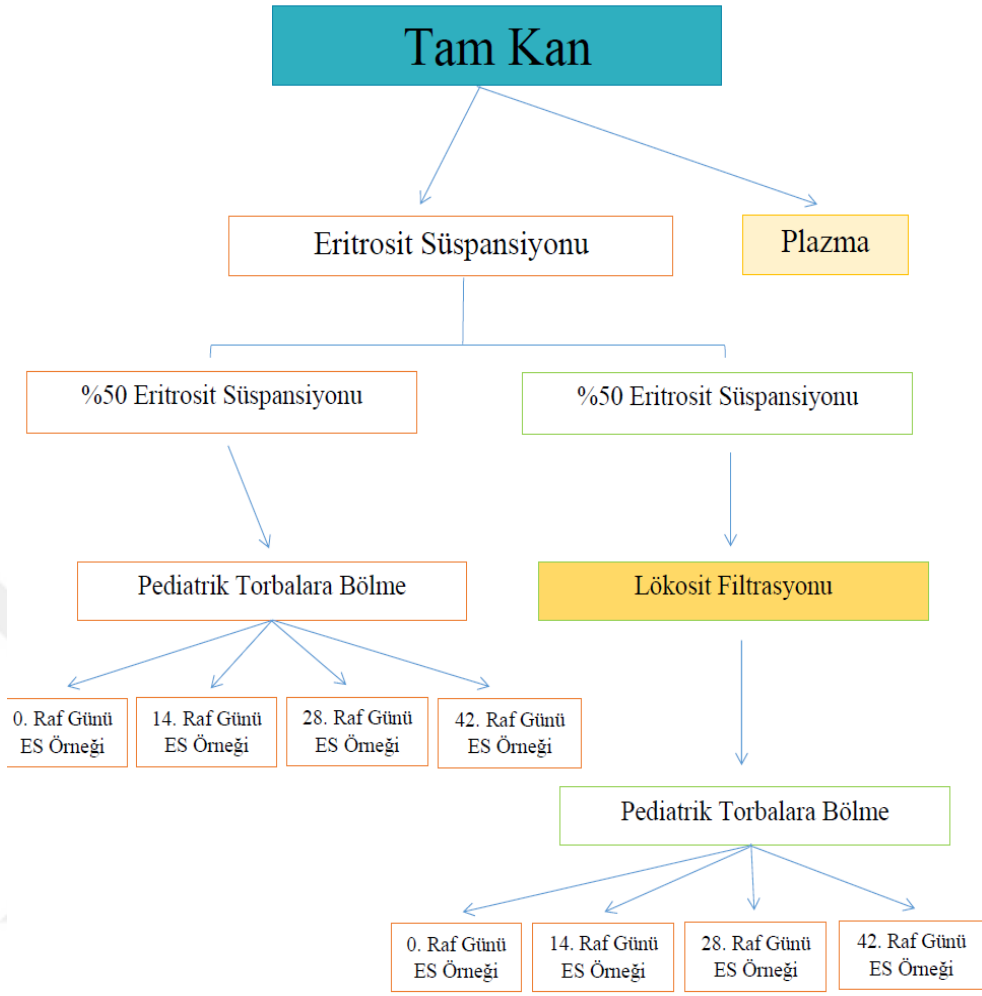
Çalışma için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alındı (Onay No: 2017-1/47). Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezine başvuran ve “Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi 2016” bağışçı seçim ölçütlerine uygun 10 gönüllü bağışçıdan Reveos üç bileşenli kan torbalarına (Terumo BCT, ABD) (Şekil 5) alınan 10 ünite tam kandan Şekil 6 daki algoritma uyarınca NL-ES ve LA-ES örnekleri elde edildi.



Şekil 5. Reveos üç bileşenli kan torbası ve hazırlanmış ürünler

#### 3.1.1. NL-ES Örneklerinin Elde Edilmesi

Oda sıcaklığında 2-6 saat bekletilen tam kanlardan, Reveos tam otomatik kan işleme sistemi ile (Terumo BCT, ABD) ES, trombosit süspansiyonu (TS) ve taze plazma (TP) elde edildi. TS ve TP çalışma dışı bırakıldı. ES'nin üzerine ek solüsyon (SAG-M) eklendi. Elde edilen ek solüsyonlu ES'nin yarısı TSCD-T model “Steril Tüp Birleştirme Sistemi” (Terumo BCT, ABD) yardımıyla eşit olarak Teruflex marka transfer torbalar kullanılarak dört torbaya (Terumo BCT, ABD) eşit şekilde paylaştırıldı (Şekil-7). NL-ES'lerin 0, 14, 28 ve 42 stok günü örnekleri ana torbadan T-Seal II marka hortum kapatma cihazı (Terumo BCT, ABD) yardımıyla ayrıldı.



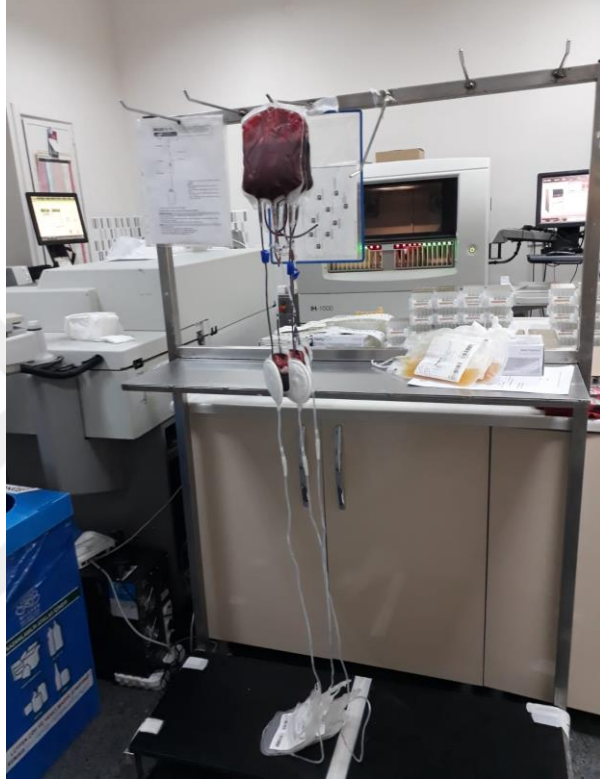
Şekil 6. Tam Kandan Örneklerin Hazırlanma Algoritması



Şekil 7. N-ES örneklerinin oluşturulması NL-ES ve ES örnekleri

### 3.1.2. LA-ES Örneklerinin Elde Edilmesi

Pediyatrik torbalara bölünmeden ana torbada bırakılan ES, LA-ES örneklerini oluşturmak amacıyla, torba sisteminde bulunan ve ürün içerisindeki lökositleri %99,99 (4log) azaltma kapasitesi olan Teruflex marka lökosit filtresinden (Terumo BCT, ABD) geçirilerek transfer torbasına aktarıldı (Şekil 8).



Şekil 8. LA-ES örneklerinin oluşturulması ES'nin filtrasyonu

Transfer torbasına aktarılan ES, Steril Tüp Birleştirme Sistemi yardımıyla dört pediyatrik torbaya eşit olarak dağıtıldı. LA-ES'lerin 0, 14, 28 ve 42 stok günü örnekleri şekil 7'dekine benzer şekilde ana torbadan hortum kapatma cihazı yardımıyla ayrılarak oluşturuldu.

Oluşturulan NL-ES ve LA-ES örneklerininin 14, 28 ve 42. raf gününü temsil edecek olanları ALS marka kan saklama dolaplarında (Angelantoni, Perugia, Italy) saklanırken, 0. gün örnekleri çalışmanın geri kalan aşamaları için işleminden geçirildi ve hazırlandı. Bu hazırlık işlemleri 14, 28 ve 42. raf günleri geldiğinde ilgili örneklere de 0. gün örneklerine benzer şekilde uygulandı.

### 3.1.3. Eksozom izolasyonu

- Ekosomların elde edilmesi için ticari eksozom izolasyon kiti (NORGEN mini kit, Canada) (Şekil 9) kullanılmıştır. Her bir plazma örneğinden 15 ml'lik falkon tüpüne 1000 µl (1ml) alındı ve isimlendirildi. Bunun üzerine 3 ml Nükleaz içermeyen steril distile su eklenildi. Buffer solüsyonu olmadan oluşan bu test örneği karışımının hacmi 4000 µl'ydü.
- 4ml test örneklerinin üzerine 100µl ExoC Buffer solüsyonu eklendi ve vortekslendi.
- Üzerlerine 200µl SlurryE solüsyondan eklenir ve 10 saniye vortekslendi ve 5-10 dakika kadar oda ısısında bekletildi.
- Tekrar 10 saniye boyunca vortekslendi. Sonra 2000-4000 RPM' de 2 dakika santrifüj ve supernatant kısmı atıldı.
- Tüpün dip kısmında kalan Slurry pelletinin üzerine 200µl ExoR tampondan eklenir ve 10 saniye vortekslendi.
- ExoR tamponunda yeniden süspanse edilmiş Sulurry pelleti 5-10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra, 10 saniye vortekslendi ve 500-2000 RPM' de 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant, filtrelili mini spin kolon olan elüsyon tüpüne aktarıldı ve 6000 RPM' de 1 dakika santrifüj edildi.
- Örnekler 15-30 dakika rotatöre yerleştirildi ve 16000 RCF'de 5 dakika döndürüldü.

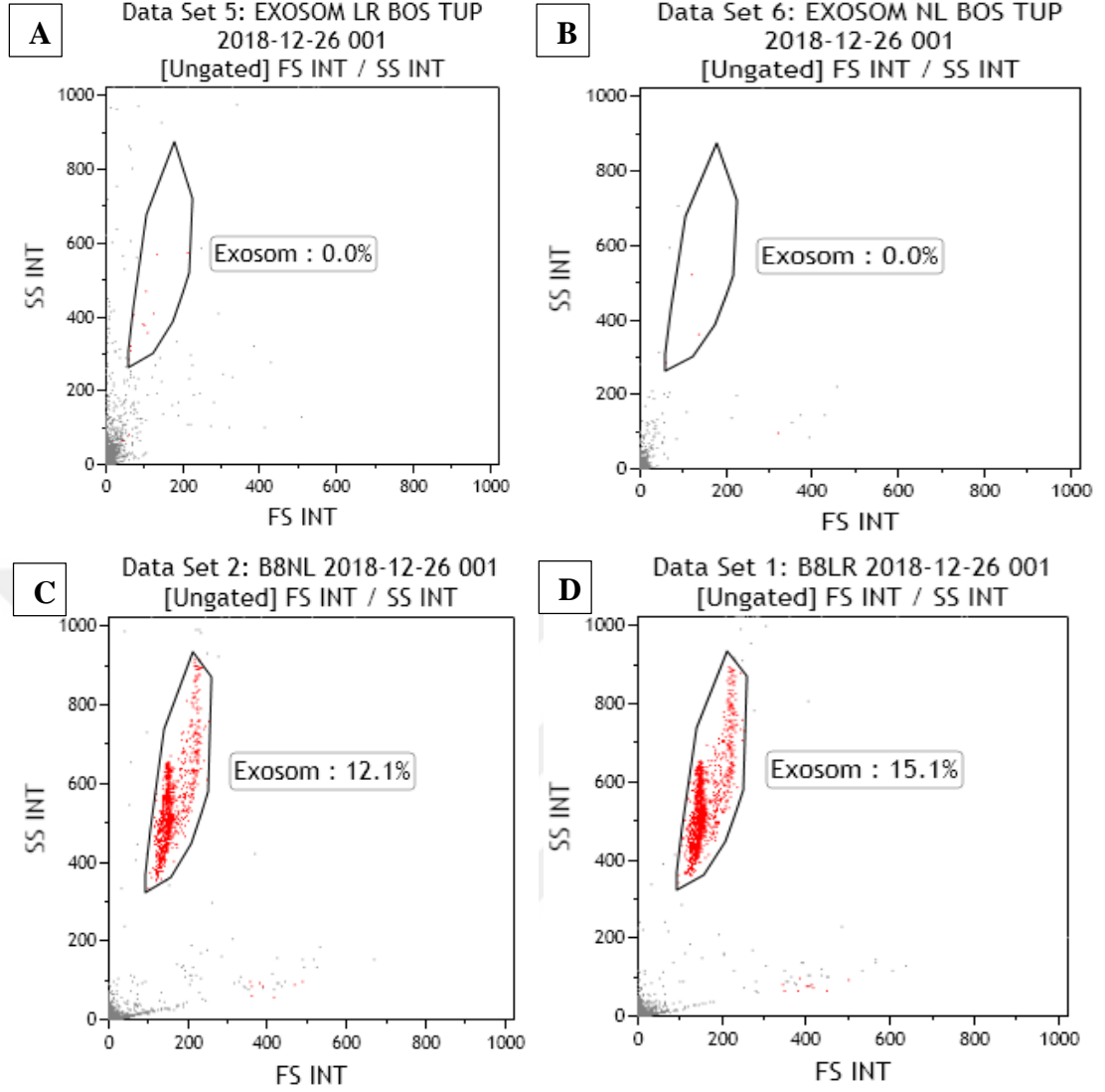


Şekil 9. Eksozom izolasyon kiti (NORGEN mini kit Cat. 58300).

### 3.1.4. Monoklonal CD9 antikoruna ile boncuk konjugasyonu

- 1,5 mL ependorf tüpüne 20 µl boncuk (Carboxyl Latex, % 4 W/V 3.5 µm, Life Technology) 80 ul 1X PBS eklendi.
- On (10) dakika boyunca maksimum RCF (16100 Rcf) 'de santrifüjlemeden sonra süpernatantı atıldı.
- 20 µg CD9 antikoruna (Biolegend-Mouse, ABD) (flororokrom içermez), 50 ul'lik hacim içindi resüspanse edildi.
- Oda sıcaklığında 30 dakika boyunca tüpler inkübe edildi, sonra 500 µl 1xPBS'ye kadar tüpü tamamlayın ve 10 saniye vorteksle karıştırıldı.
- Tüpleri bir rotatörde inkübe (oda sıcaklığı, orta hız ve gecelik) ve konjuge boncukların bloke edilmesi için 12.000 RCF'de 10 dakika boyunca 1.5 ml tüpler mikrosantrifüj edildikten sonra süpernatantı alındı ve tüplere 1 ml% 5 BSA eklendi ve tekrar süspansiyon haline getirilip tüpleri döndürüldü (oda sıcaklığı, orta hız) ve 4 saat Oda Sıcaklığı beklenirdi, süpernatantı uzaklaştırıldı.
- 200 µl % 1 BSA tüplere eklenip tekrar süspansiyon haline getirildi.

Boncuk-anti-CD9 konjugasyonu akan hücre ölçer ile değerlendirildi. Bu değerlendirmede daha önce izole ettiğimiz eksozomlar ya doğrudan ya da boncuk-anti-CD9 kompleksi ile inkübe edildikten sonra akan hücre ölçerde analiz edildi. Boncuk-anti-CD9 kompleksine bağlanmış eksozomlar akan hücre ölçerle saptanabilirken, bağlı olmayanlar saptanamadı (Şekil 10). Bu sonuç boncuk-anti-CD9 kompleksinin eksozom ölçümleri için hazır olduğunu gösterdi.



Şekil 10. Boncuk-anti-CD9 kompleksi ile bağlanmayan eksozomlar (A,B) ve bağlanan eksozomlar (C,D).

### 3.1.5. Bicinchoninic Acid Assay

Yüksek hassasiyet, doğruluk ve hız ile protein konsantrasyonunu belirlemek için en sık kullanılan tekniklerden biri BCA testidir. Biz tez çalışmamızda SoluLink markasına ait BCA kitini kullandık (Şekil 11). Sonrasında da mikroplaktaki örnekleri okutmak için marka spektrofotometre cihazını kullandık. Çalışma SoluLink markasına ait BCA kitinin protokolü takip edilerek şu şekilde yapılmıştır. 1.5 ml'lik mikrofüj tüpüne 1x PBS den 1 ml alındı.





Şekil 11. BCA Protein Assay kiti ve BCA Protein Plağı

Ayrı bir yerde 15 ml'lik falkon tüpünün içerisinde 5 ml BCA Reaktif A, ardından 100  $\mu$ L BCA Reaktif B eklendi ve bu solüsyon yeşil renk alana kadar karıştırıldı. Sonrasında da örnekler protokolda bulunan tabloya göre hazırlandı. Kullanacağımız örneklerin protein konsantrasyonları 1-10 mg/mL arasında olduğu için total hacmimiz 20  $\mu$ L olacak şekilde PBS kullanılarak 10 kat seyreltildi. Yani Örnek hacmimiz (2  $\mu$ L) üzerine 18 $\mu$ L PBS eklendi.

Kuyu 1- 50ul 1X PBS ve 50 ul 2mg/ml BSA standardını bir kuyuya eklendi (1mg/ml)

Kuyu 2- 50 ul 1X PBS ve 1. kuyucuktan 2. Kuyucuğa 50 ul ilave edildi (0.5mg/ml)

Kuyu 3- 50 ul 1X PBS ve 50 ul'u 2. kuyucuktan 3. Kuyucuğa eklendi (0.25mg/ml)

Kuyu 4- 50 ul 1X PBS ve 3. kuyucuktan 4. kuyucuğa 50 ul ilave edildi (0.125mg/ml)

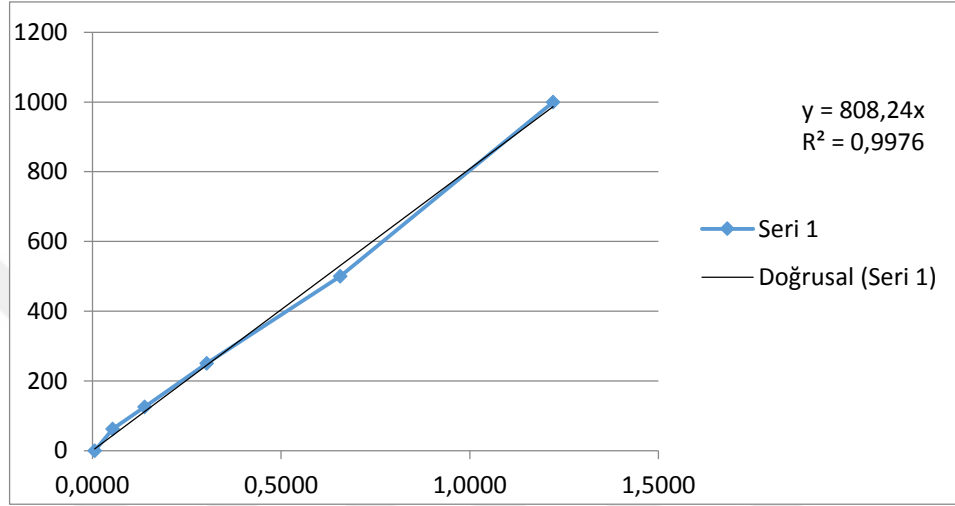
Kuyu 5- 50 ul 1X PBS ve 4. kuyudan bir 5. kuyuya 50 ul ilave edildi (0.0625mg/ml)

Kuyu 6 – 50 ul 1X PBS ilave edildi (Buffer blank).

Örnekler hazırlandıktan sonra çalışmada kullanılacak olan standartlarda kitin içerisinde bulunan 2 mg/ml konsantrasyonundaki albümin kullanılarak tablodaki gibi hazırlandı.

Sırasıyla farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bu albüminlerin her birinden 20  $\mu$ L alınıp, mikrolağın 1. kuyusundan 6. kuyusuna kadar yukarıdaki sırayla konuldu. Standartlar konulduktan sonra da total hacmi 20  $\mu$ L olan örnekler sırayla kuyucuklara

konuldu. Ardından örneklerin ve standartların bulunduğu her kuyuya, en başta hazırlanmış olduğumuz, reagent A ve B'nin karışımından oluşan yeşil renkteki karışımdan 150µL konulup pipet yardımıyla karıştırıldı. Tüm kuyulara bu karışımdan konulduktan sonra mikroplak şeffaf yapışkan bir film ile kapatıldı ve 15-20 dakika boyunca bir su banyosunda 37-40°C'de inkübe edildi. Bu inkubasyonun ardından plak spektrofotometrede 562 nm de okutuldu (Şekil 12).



Şekil 12. BCA çalışması standart

### 3.1.6. Ekzozom-Boncuk Konjugasyonu

Konjugat ekosomlarını hazırlanmış boncuk ile (Boncuk stoku içeren% 1 BSA) (1 µg ekzozom + 1 µl CD9 Konjuge Bead), 30 dakika oda sıcaklığı ve 500 µl 1x PBS ve 10 saniye vorteks tüpleri eklendi.

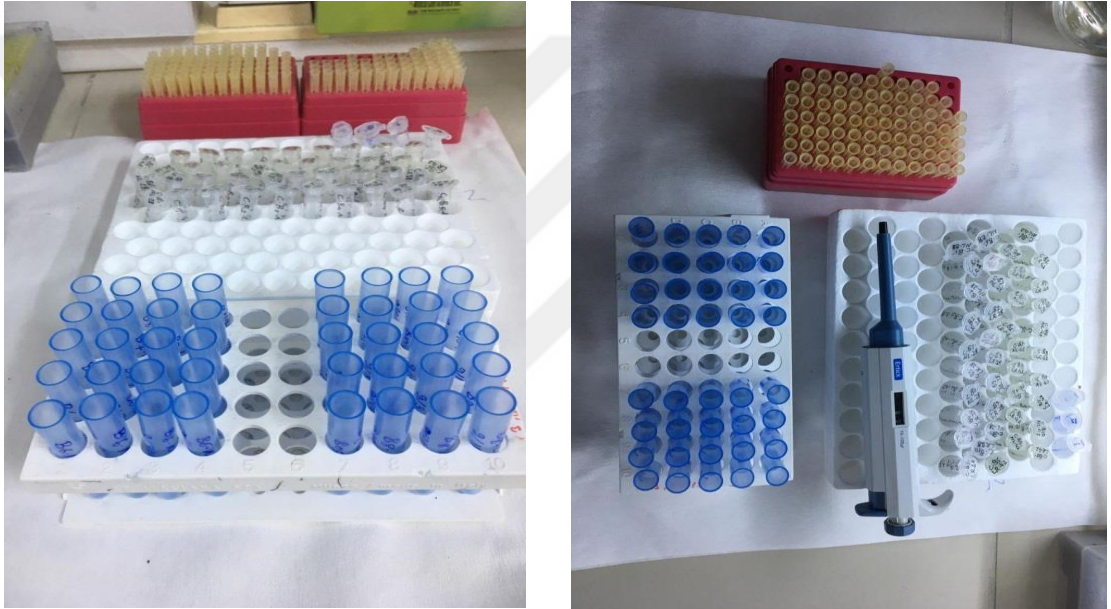
- Tüpleri bir döndürücüde (Oda sıcaklığı, orta hız ve gece) inkübe edildi ve 10 dakika boyunca 12.000 RCF'de 1,5 ml tüpler mikrosantrifüj ve süpernatantı atıldı ve 100 µl 1xPBS ekleyi tekrar süspanse edildi (Bead-ekzozom konjugasyon kompleksi).

### 3.2. ES Örneklerinde Akan Hücre Ölçer Ölçümlerin Yapılması

NL-ES ve LA-ES'lere ait örnekler, akan hücre ölçer yöntemi ile yüzey belirteçlerin ekspresyonlarına göre araştırılmasında kullanıldı.

### 3.2.1. Eksozomların Köken Aldıkları Hücrelere Göre Değerlendirilmesi

Çalışmada her örnek için 320 adet akan hücre ölçer tüpü (12x75 mm) kullanıldı (Şekil 13). İnsan MNH yüzey belirteçlerine karşı sıçan ve farelerden elde edilmiş fluorescein isothiocyanate (FITC) (Beckman/Coulter, ABD), phycoerythrin (PE) (Beckman/Coulter, ABD), allophycocyanin (APC) (Beckman Coulter, ABD), phycoerythrin-cyanin5.1 (PE-Cy5) (Beckman Coulter, ABD), R-Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD) (Beckman/Coulter, ABD) ile işaretli monoklonal antikorlardan yararlandı. Kullanılan antikorların prospektüs bilgileri doğrultusunda uygulandı. Çalışmamızda kullanılan monoklonal antikorlar tablo-1’te özetlenmiştir.



Şekil 13: Akan Hücre Ölçer için Eksozomların Tüplerde Hazırlanması

Tablo-1. MNH yüzey belirteçleri için monoklonal antikorlar					
Tüp 1	BOŞ				
Tüp 2	CD9FITC (6µl)	CD8 PE (6µl)	CD3 ECD (3µl)	CD4 APC (3µl)	-
Tüp 3	CD9 FITC (6µl)	CD3 PE (6 µl)	CD19 ECD (3µl)	CD56 APC (3µl)	-
Tüp 4	CD9 FITC (6µl)	CD11b PE (6 µl)	HLA-DR ECD (3µl)	CD14 APC (3µl)	CD15 PC5 (3µl)

### 3.3. NL-ES'lerde Lökosit Düzeylerinin Ölçülmesi

Depolanma süreci boyunca ürün içerisindeki lökosit sayısının değerlendirilmesi için eksozom izolasyonu öncesi NL-ES'lerde kan merkezinde kullanılmakta olan hemogram cihazında lökosit sayımı yapıldı (CELL-DYN, Abbott, ABD) LA-RE'lerde lökosit sayısı Log4 filtreler yardımıyla %99,99 oranında azaltıldığından ve rezidüel hücre sayısının hemogram cihazında okunamayacak kadar düşük olduğu daha önce yapılan kalite kontrol çalışmaları sırasında belirlendirilenden LR-ES'lerin içindeki lökosit sayısı ihmal edildi.

### 3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda sürekli değişkenler medyan (minimum-maksimum) değerleriyle ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar Mann Whitney testi, grup içi karşılaştırmalar ise *Wilcoxon* işaretli sıra testi kullanılarak yapıldı. Bağımlı zaman dilimlerinde ölçümü yapılan değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları için yüzde değişim değerleri hesaplandı ve bu değerlerin karşılaştırmaları yine Mann Whitney testi kullanılarak yapıldı.

$$\text{Yüzde değişim (YD)} = \frac{\text{Son ölçüm} - \text{İlk ölçüm}}{\text{İlk ölçüm}}$$

İstatistiksel analizler SPSS v.21 programında yapılmış olup,  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

10 adet kan bağışısından tam kanlar alınıp, 0, 14, 28 ve 42. depolanma günleri için LA-ES ve NL-ES örnekleri oluşturulduktan sonra ilgili testler çalışıldı. Bu testler sonucunda elde edilen tüm bulgular ve boxplot grafikler aşağıda belirtilmiştir. bulgular bölümünde sadece bu bulgulara yönelik çizgi grafiklere ve istatistiksel değerlendirme sonuçlarına yer verilmiştir.

### 4.1. T, B, NK, NKT Hücreler İçin Bulgular

T lenfositler, yardımcı T lenfositler (Th) ve sitotoksik T lenfositleri (Tc), B lenfositler, NK hücreleri, NKT hücreleri ve Miyeloid kökenli supresör hücreleri (MDSC) değerlendirmek için monoklonal antikolar aracılığıyla boyanan hücre yüzey molekülleri aşağıdaki gibidir:

- T için; CD9<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>
- Th için; CD9<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>
- Tc için; CD9<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>
- B için; CD9<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>
- NK için; CD9<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>
- NK-T için; CD9<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>
- Monositler için; CD9<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>
- Granülositler için; CD9<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>
- HLA-DR eksprese eden eksozomlar için; CD9<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>
- MDSC'ler için; CD9<sup>+</sup>CD11B<sup>+</sup>
- Monosit kökenli MDSC'ler için; CD9<sup>+</sup>CD11B<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD15<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>
- Granülosit kökenli MDSC'ler için; CD9<sup>+</sup>CD11B<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>

akan hücre ölçer, ölçümler sonucunda Th, NK, NK-T ve monosit kökenli MDSC'lerden köken alan eksozom saptanamamıştır.

T ve Tc lenfosit kökenli eksozom seviyelerinde her iki grupta (lökositi azaltılmamış ve azaltılmış) raf ömrü boyunca azalma görülmüştür. T hücre kökenliler lökositi azaltılmış grupta 0. güne göre 42. gün örneklerinde anlamlı şekilde azalırken ( $p<0,05$ ), Tc lenfosit kökenli olanlar bu kez lökositi azaltılmamış grupta 0. güne göre 14 ve 42. gün örneklerinde anlamlı şekilde azalma göstermiştir ( $p<0,05$ ).

B lenfosit kökenli eksozom seviyelerinde her iki grupta raf ömrü boyunca azalma görülmüştür. Lökositi azaltılmamış grupta 0. güne göre 28 ve 42. gün örneklerinde anlamlı şekilde azalma göstermiştir ( $p<0,05$ ).

MDSC ve G-MDSC'lerden köken alan eksozomlar her iki grupta da raf ömrü boyunca anlamlı şekilde azalma göstermiştir ( $p<0,05$ ). Buna rağmen 42. gün örneklerinde bile bu eksozomları düzeyleri belirgin şekilde yüksek bulunmuştur.

Bunların dışındaki örneklerde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Ayrıca lökositi azaltılmış ve azaltılmamış gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

Depolanma süreci boyunca NL-ES'lerdeki ölçülen lökosit düzeyleri anlamlı şekilde azalmıştır ( $p<0,05$ ).

Elde edilen sonuçların minimum, medyan ve maksimum değerlere göre genel istatistiksel bir özeti Tablo-2-5'te ve grafik 1-9'da verilmektedir.

Çalışmamızda aynı zamanda NL-ES'lerde lökosit sayıları da araştırılmış sonuçlar tablo-5'da özetlenmiştir. Bulgulara göre NL-ES'lerde lökosit düzeyleri 0. güne göre 14, 21 ve 42. gün örneklerinde anlamlı şekilde azalma göstermiştir ( $p<0,05$ ).

**Tablo-2.** Eksozomların (%) değerleri özeti

		LÖKOSİT AZALTILMAMIŞ				LÖKOSİT AZALTILMIŞ			
		0. gün	14. gün	28. gün	42. gün	0. gün	14. gün	28. gün	42. gün
CD9 <sup>+</sup>	Medyan	81,50	82,00	80,00	79,50	80,50	81,50	81,00	80,50
	Minimum	72,00	79,00	75,00	70,00	73,00	71,00	73,00	74,00
	Maksimum	94,00	86,00	90,00	86,00	85,00	88,00	85,00	85,00
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	Medyan	2,00	2,00	1,50	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00
	Minimum	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Maksimum	3,00	2,00	2,00	2,00	3,00	2,00	3,00	2,00
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	Medyan	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Medyan	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maksimum	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
CD9 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	medyan	2,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,50	2,00	1,00
	minimum	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00
	maksimum	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	medyan	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	maksimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	medyan	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	maksimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD9 <sup>+</sup> CD11B <sup>+</sup>	medyan	26,50	23,50	21,50	19,00	26,50	23,00	21,00	20,00
	minimum	23,00	21,00	20,00	18,00	23,00	19,00	17,00	16,00
	maksimum	48,00	28,00	24,00	20,00	36,00	25,00	24,00	21,00
CD9 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	medyan	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,50	1,00
	minimum	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00
	maksimum	2,00	2,00	3,00	2,00	1,00	2,00	3,00	3,00
CD9 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup>	medyan	99,00	98,50	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00
	minimum	90,00	96,00	95,00	98,00	92,00	88,00	96,00	98,00
	maksimum	100,00	100,00	100,00	99,00	99,00	99,00	100,00	100,00
CD9 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	medyan	11,00	11,00	11,00	10,00	12,00	11,00	11,50	11,00
	minimum	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	9,00
	maksimum	12,00	13,00	12,00	12,00	13,00	12,00	13,00	14,00
CD9 <sup>+</sup> CD11B <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	medyan	21,50	20,00	18,00	16,00	20,50	19,00	18,00	16,50
	minimum	18,00	17,00	17,00	15,00	16,00	16,00	14,00	13,00
	maksimum	42,00	22,00	20,00	18,00	31,00	21,00	20,00	18,00

**Tablo-3.** Sonuçların istatistiksel Özeti

<i>P</i>	LÖKOSİT AZALTILMAMIŞ			LÖKOSİT AZALTILMIŞ		
	0-14 gün	0-28 gün	0-42 gün	0-14 gün	0-28 gün	0-42 gün
CD9 <sup>+</sup>	0,506	0,919	0,766	0,373	0,439	0,573
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	0,564	0,317	0,059	0,317	0,083	<b>0,014</b>
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	<b>0,025</b>	1,000	<b>0,025</b>	0,317	1,000	0,317
CD9 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	<b>0,083</b>	0,025	<b>0,008</b>	0,564	0,705	0,480
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CD9 <sup>+</sup> CD11B <sup>+</sup>	<b>0,005</b>	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>	<b>0,005</b>	<b>0,005</b>	<b>0,005</b>
CD9 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	0,414	0,705	0,102	0,317	0,206	0,206
CD9 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup>	0,809	0,480	0,861	0,680	0,680	0,257
CD9 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	0,518	0,739	0,470	0,196	0,608	0,327
CD9 <sup>+</sup> CD11B <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	<b>0,005</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,008</b>	<b>0,005</b>	<b>0,005</b>

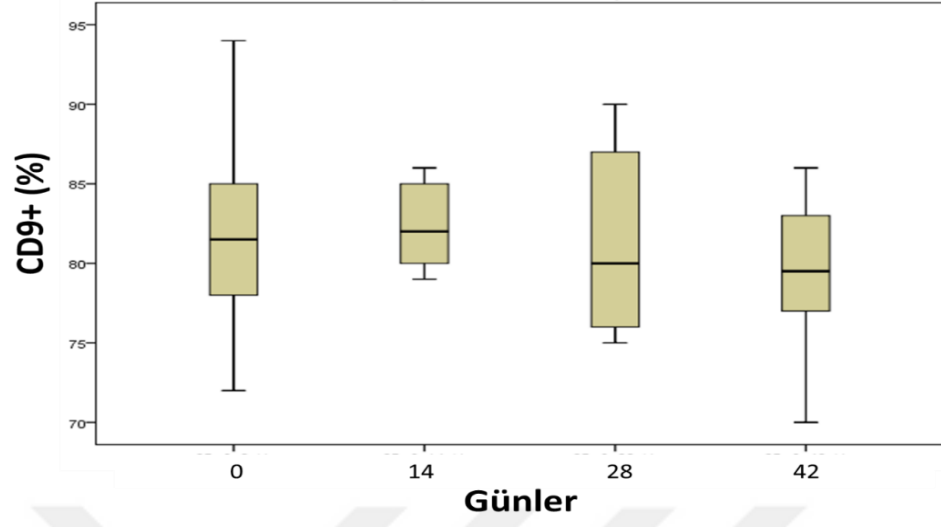
**Tablo-4.** LA-ES ve LR-ES gruplarının Karşılaştırılması (Yüzde Değişim)

YD	0. gün	14. gün	28. gün	42. gün
CD9 <sup>+</sup>	0,361	0,91	0,762	0,52
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	0,702	0,23	0,654	0,645
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,1	-	-	-
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,189	0,48	0,371	0,48
CD9 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	0,029	0,423	0,141	-
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,1	-	-	-
CD9 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,1	-	-	-
CD9 <sup>+</sup> CD11B <sup>+</sup>	0,466	0,94	0,82	0,271
CD9 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	0,24	0,231	0,215	0,968
CD9 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup>	0,79	0,939	0,871	0,474
CD9 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	0,065	0,154	0,299	0,909
CD9 <sup>+</sup> CD11B <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup> CD15 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	0,232	0,063	0,183	0,363

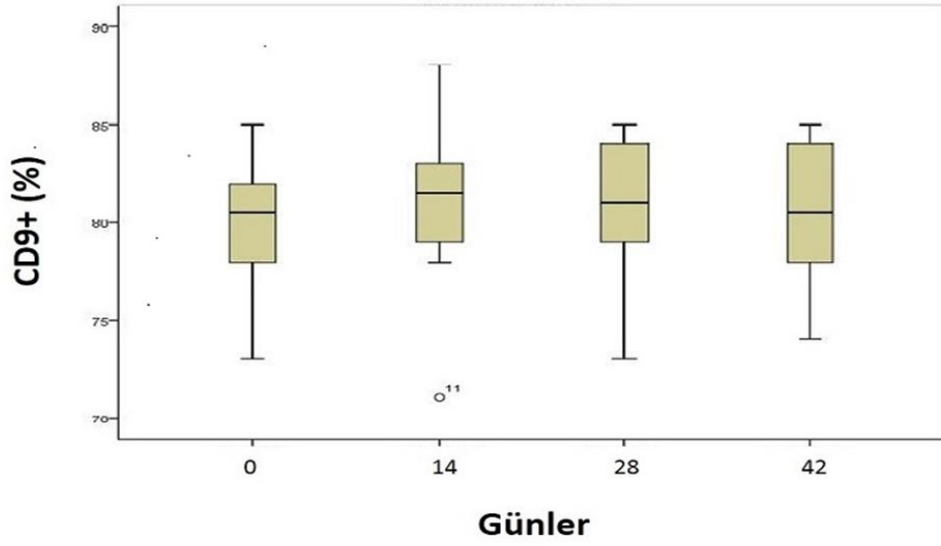
**Tablo-5.** Lökosit Azaltılmamış Grupta Lökosit Düzeyleri

(x1000)	Medyan	Minimum	Maksimum
<b>0. gün</b>	6,45	5,00	8,00
<b>14. gün</b>	3,40	1,30	4,60
<b>28. gün</b>	2,65	1,00	4,30
<b>42. gün</b>	1,70	0,80	3,50
<i>P</i>	<b>0-14 gün</b>	<b>0-28 gün</b>	<b>0-42 gün</b>
	0,005	0,005	0,005



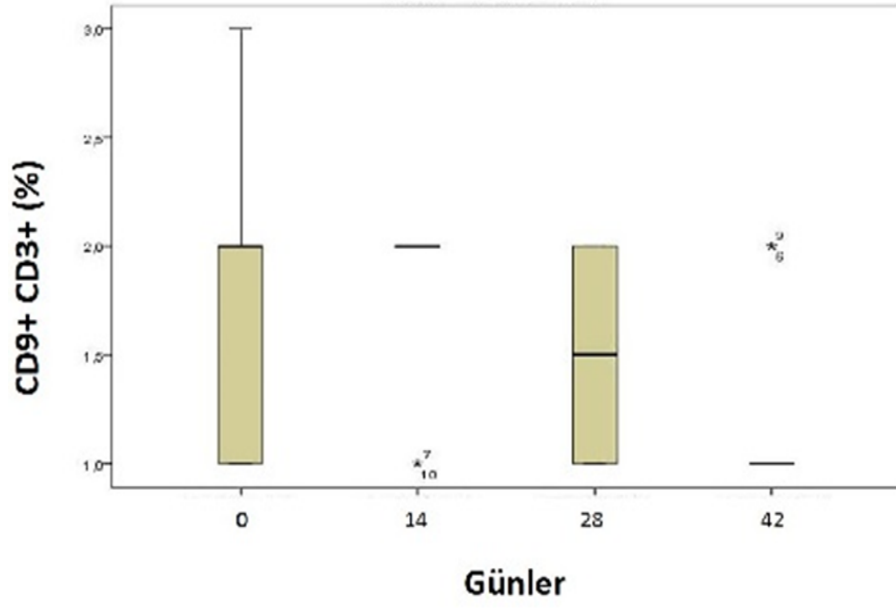


a) NL-ES'lerde CD9 ekspresyonları

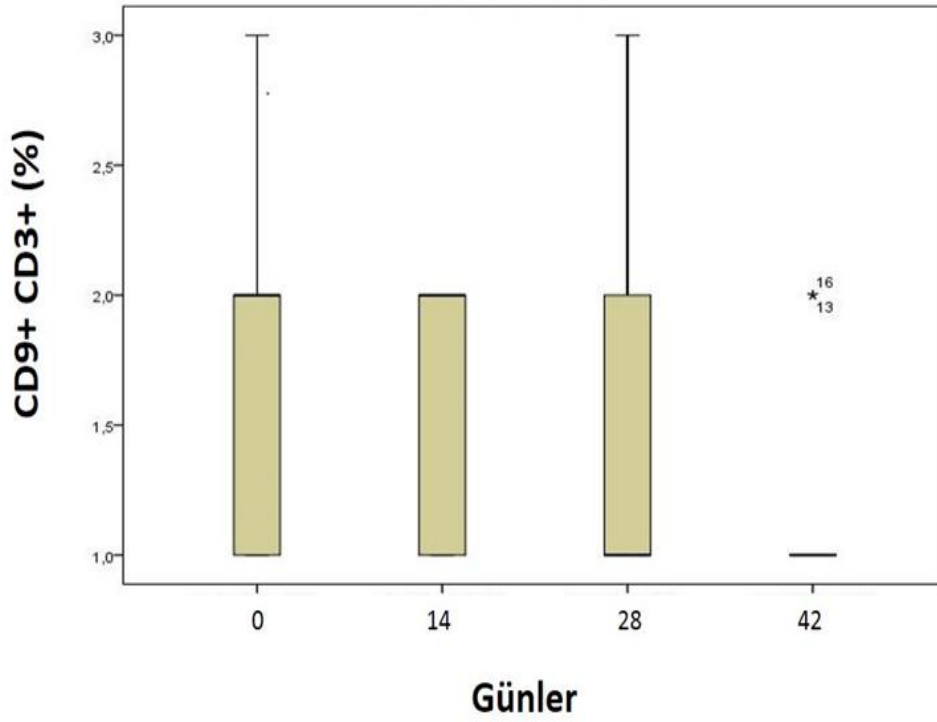


b) LR-ES'lerde CD9 ekspresyonları

Grafik-1-: Depolanma sürecinde CD9 ekspresyon düzeyleri

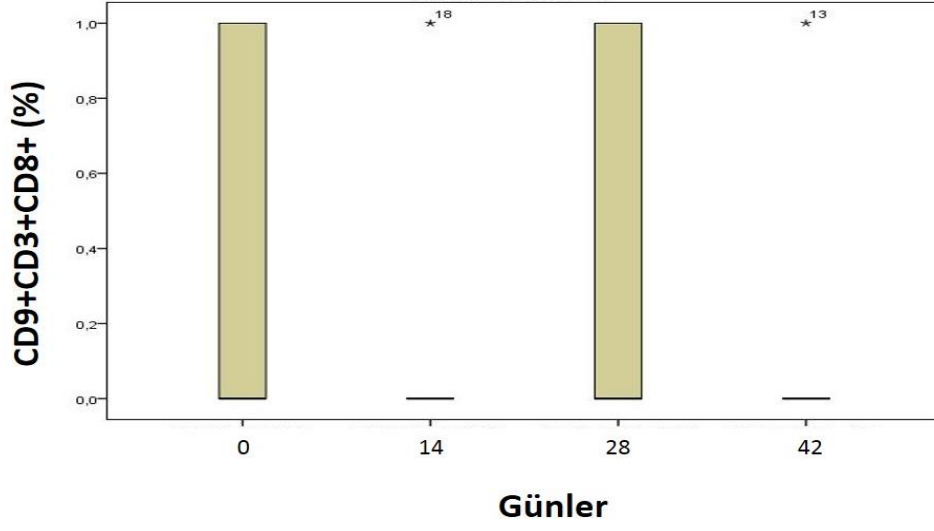


a) NL-ES'lerde CD9 ekspresyonları

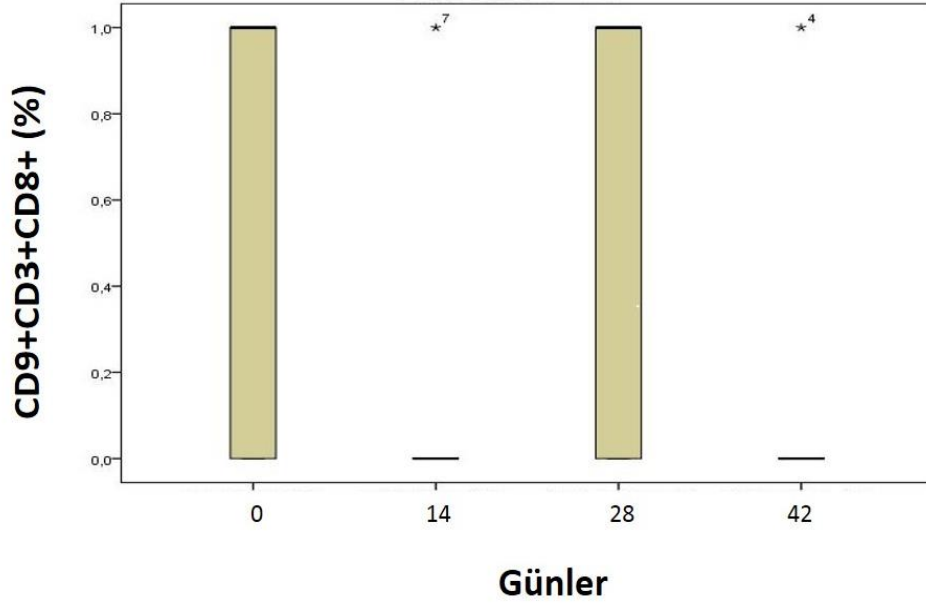


b) LR-ES'lerde CD9<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup> ekspresyonları

Grafik-2: Depolanma sürecinde CD9 ve CD3 ekspresyon düzeyleri

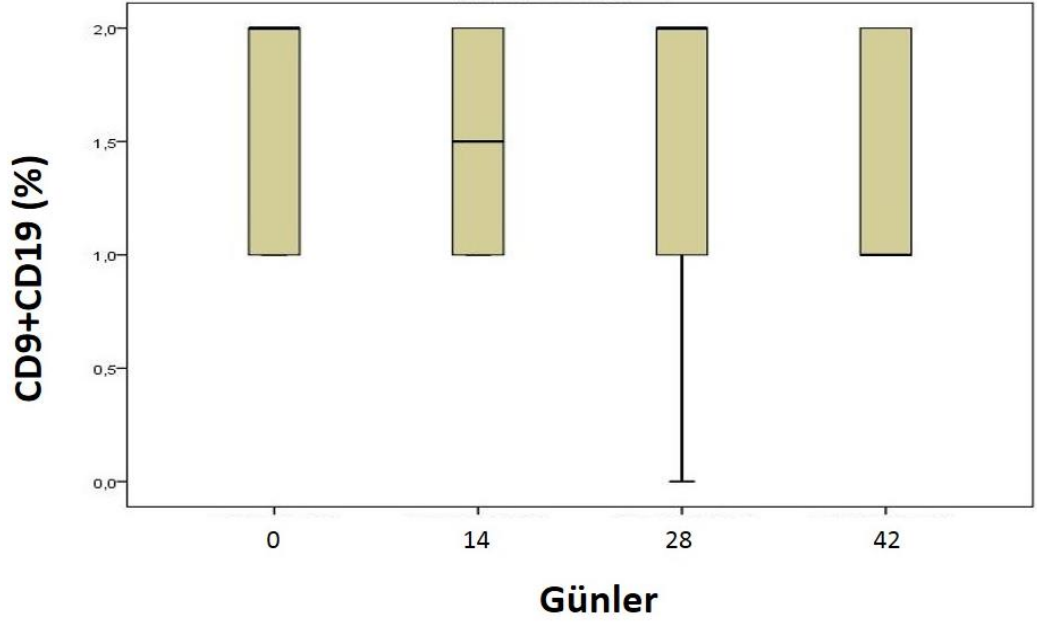


a) NL-ES'lerde CD9,CD3 ve CD8 ekspresyonları

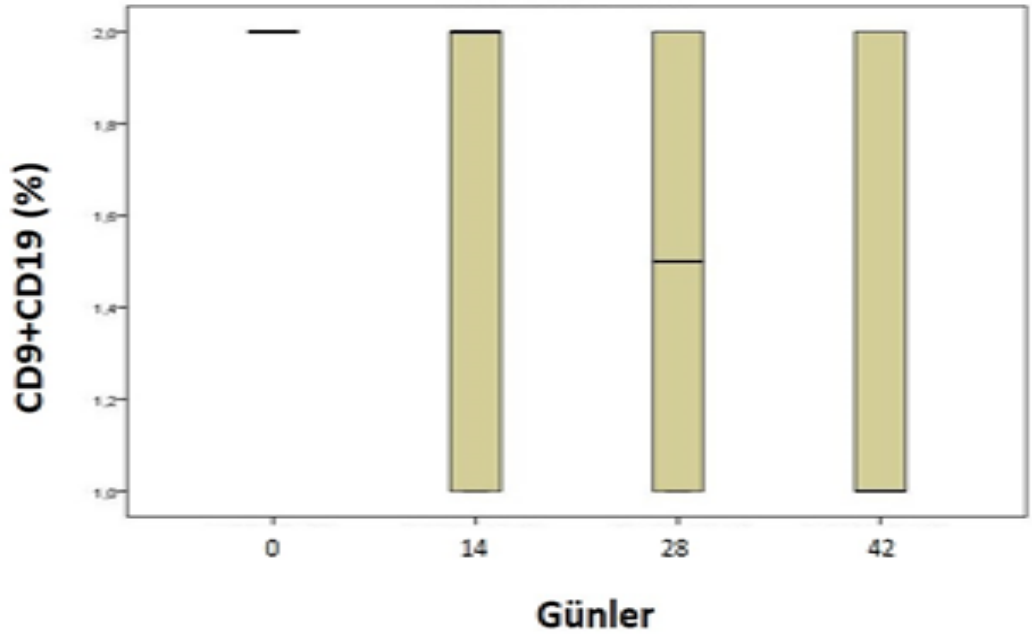


b) LR-ES'lerde CD9,CD3 ve CD8 ekspresyonları

Grafik-3: Depolanma sürecinde CD9,CD3 ve CD8 ekspresyon düzeyleri

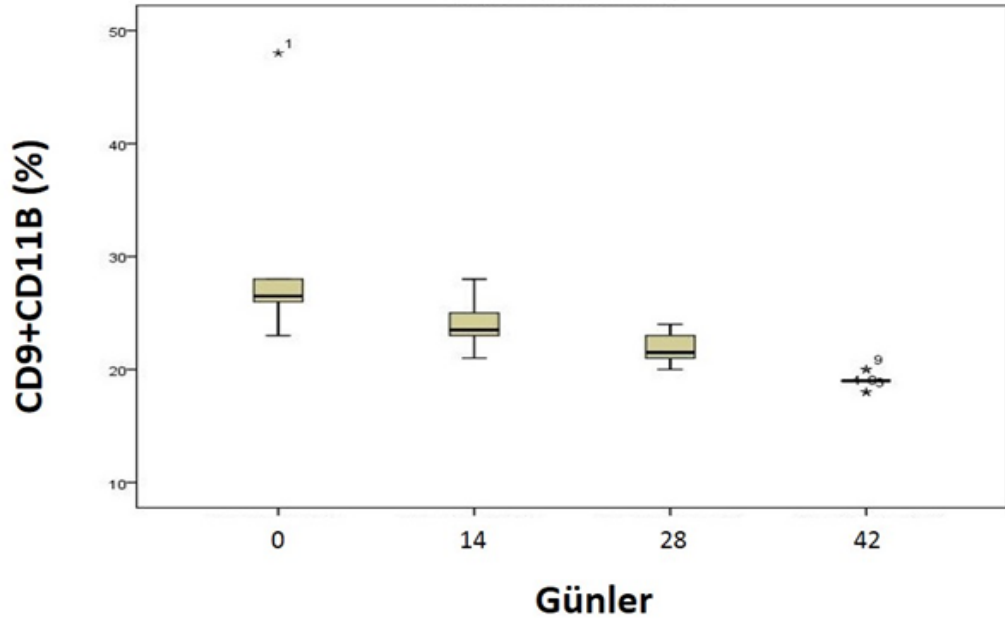


a) NL-ES'lerde CD9 ve CD19 ekspresyonları

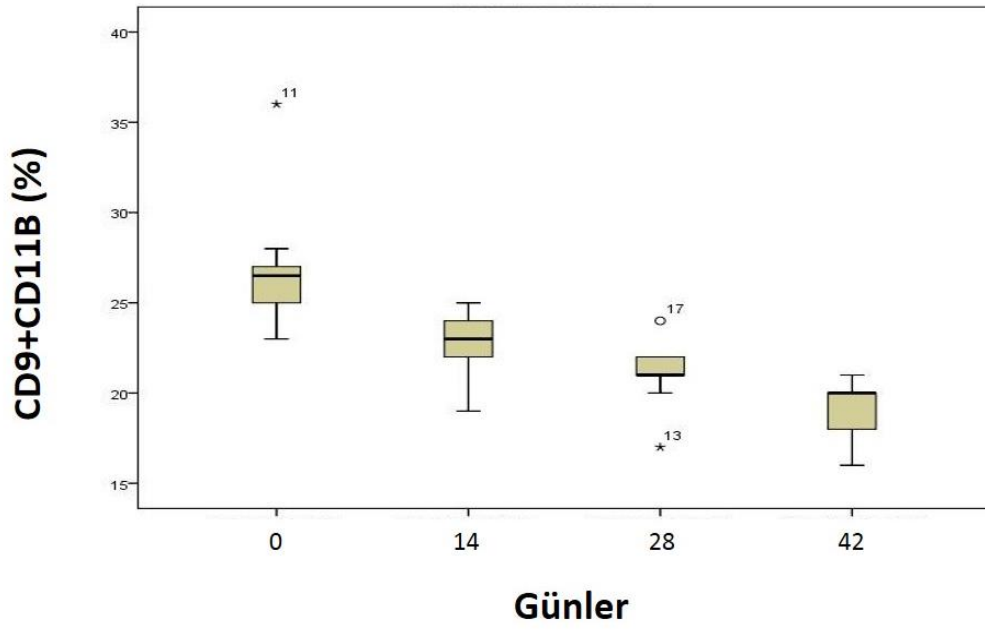


b) LR-ES'lerde CD9, CD19 ekspresyonları

Grafik-4: Depolanma sürecinde CD9 ve CD19 ekspresyon düzeyleri

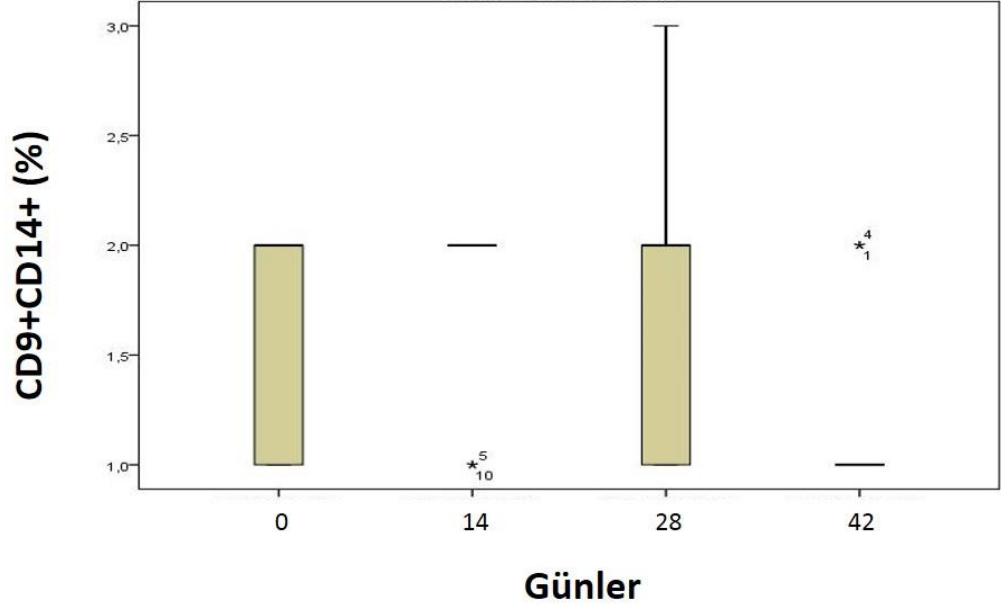


a) NL-ES'lerde CD9 ve CD11B ekspresyonları

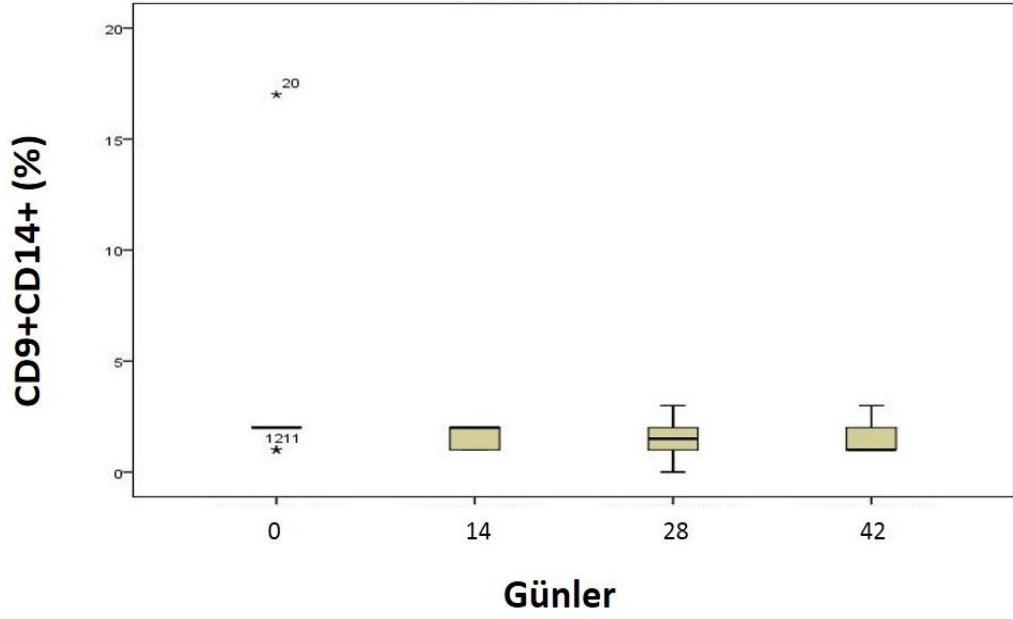


b) LR-ES'lerde CD9, CD11B ekspresyonları

Grafik-5: Depolanma sürecinde CD9 ve CD11B ekspresyon düzeyleri

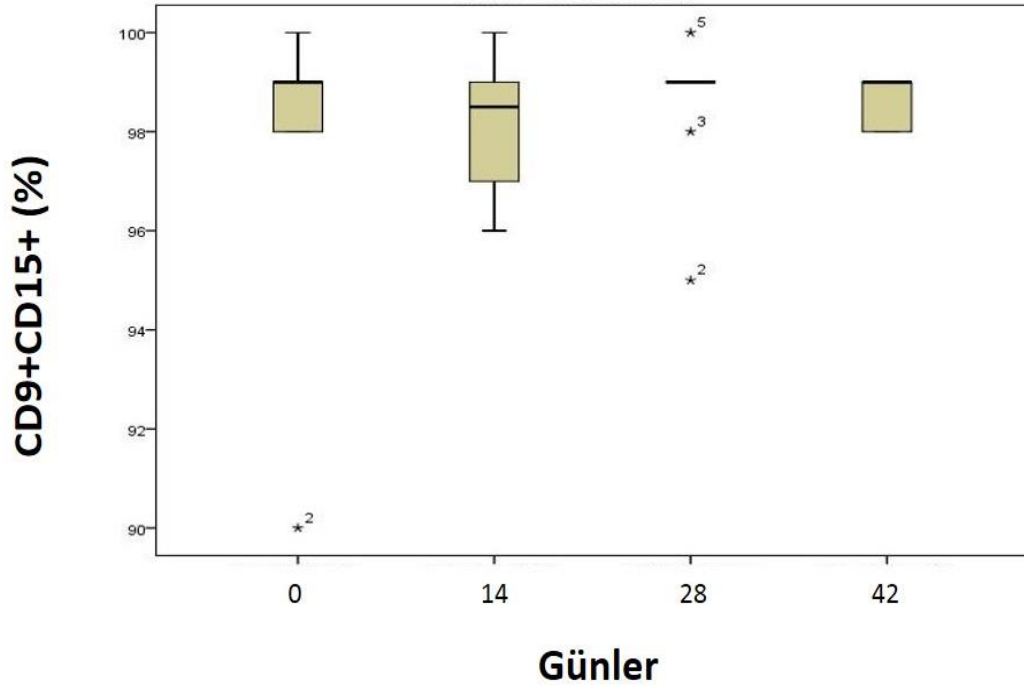


a) NL-ES'lerde CD9 ve CD14 ekspresyonları

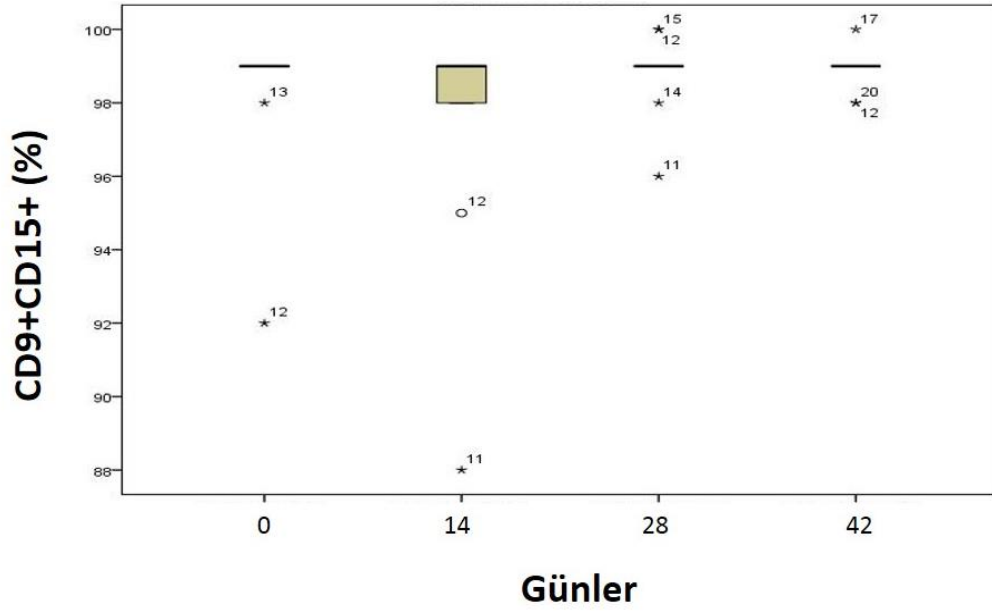


b) LR-ES'lerde CD9, CD14 ekspresyonları

Grafik-6: Depolanma sürecinde CD9 ve CD14 ekspresyon düzeyleri

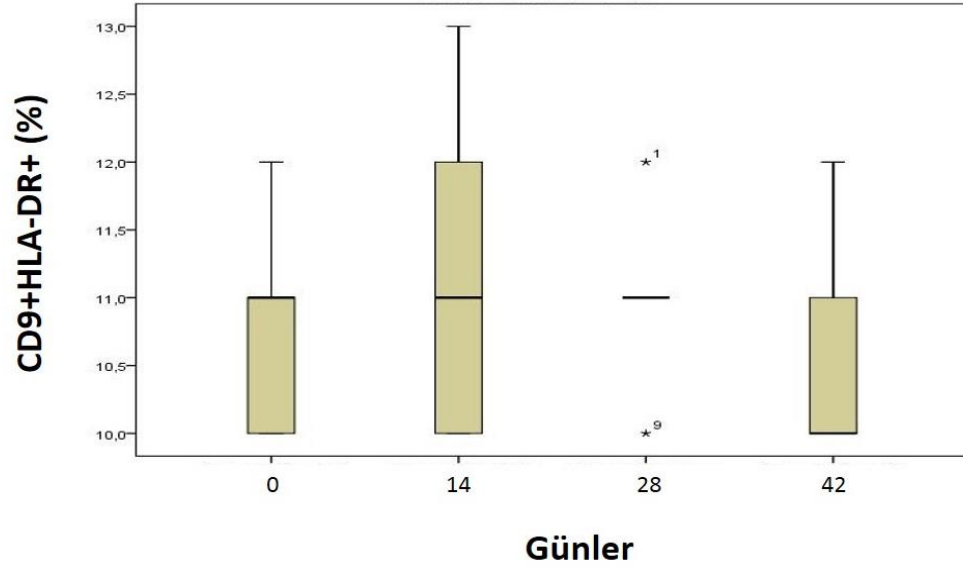


a) NL-ES'lerde CD9 ve CD15 ekspresyonları

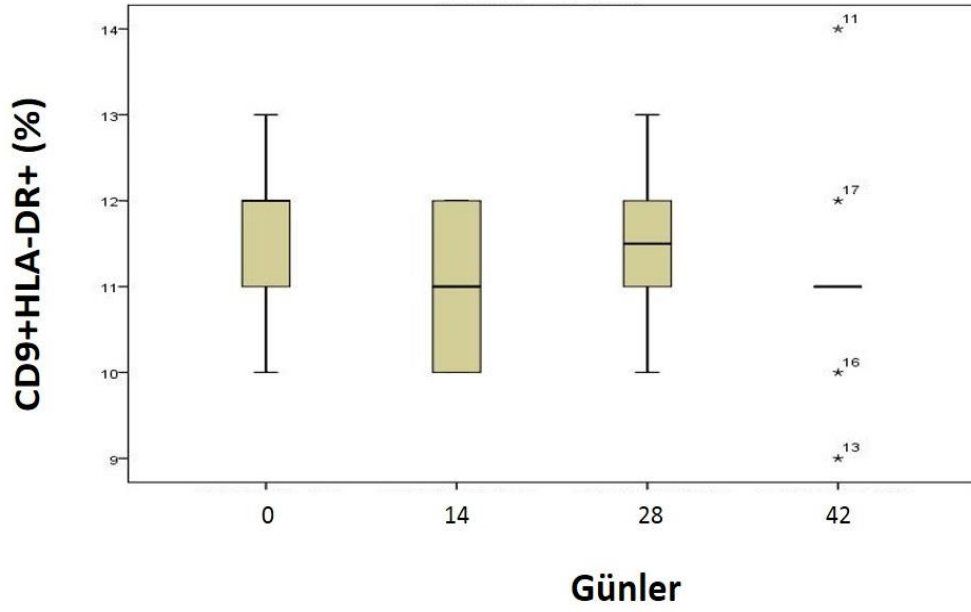


b) LR-ES'lerde CD9, CD15 ekspresyonları

Grafik-7: Depolanma sürecinde CD9 ve CD15 ekspresyon düzeyleri



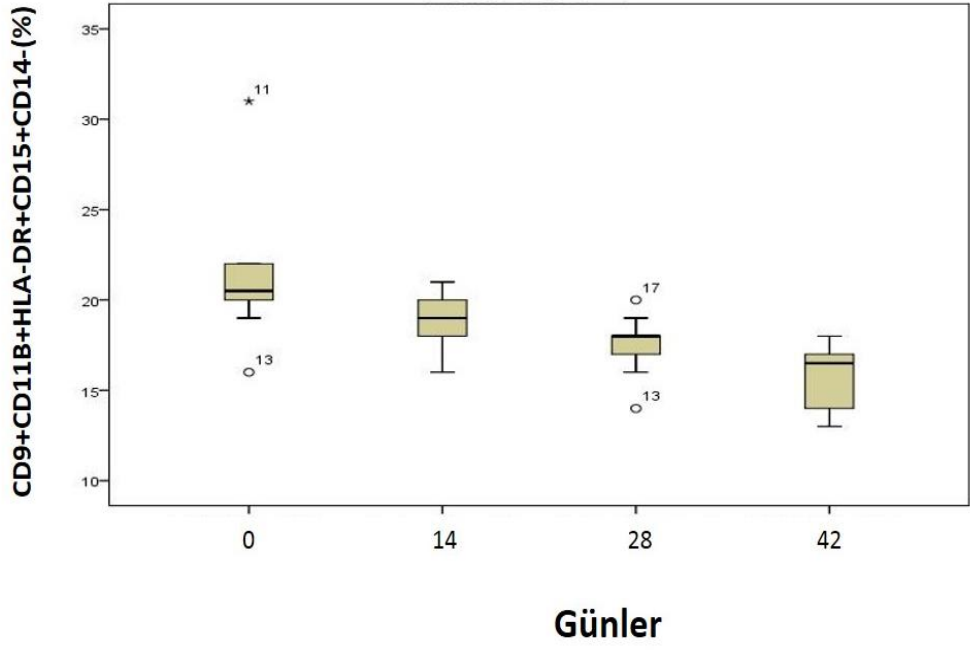
a) NL-ES'lerde CD9 ve HLA-DR ekspresyonları



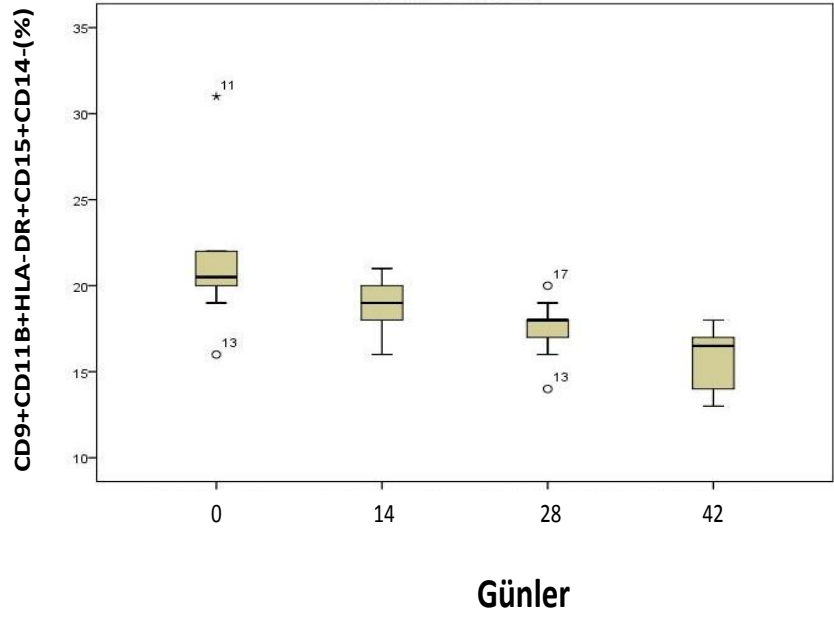
b) LR-ES'lerde CD9 ve HLA-DR ekspresyonları

Grafik-8: Depolanma sürecinde CD9 ve HLA-DR ekspresyon düzeyleri





a) NL-ES'lerde CD9,CD11B,HLA-DR,CD15,CD14 ekspresyonları



b) LR-ES'lerde CD9,CD11B,HLA-DR,CD15,CD14 ekspresyonları

Grafik-9: Depolanma sürecinde CD9,CD11B,HLA-DR,CD15,CD14 ekspresyon düzeyleri

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Allojenik kan transfüzyonu hayati öneme sahip bir tıbbi müdahaledir. ES'ları dolaşımdaki eritrosit seviyesinin düşük olduğu (anemi) durumlarda dokulara oksijen iletimini artırmak amacıyla kullanılır. Çeşitli tıbbi ve cerrahi müdahalelerde bu uygulamaya sıklıkla yer verilmektedir. ES kullanımı sonucunda ES'ler içerisinde bulunan lökositlere bağlı olarak febril komplikasyonlar, alloimmünizasyon, akciğer hasarı (transfusion-related acute lung injury; TRALI) ve sitomegalovirus enfeksiyonu geçişi gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu amaçla lökosit sayısının ürün içerisinde azaltılması için değişik yöntemler kullanılmaktadır. Kritik bakım hastalarının yaklaşık %30'u ve kalp cerrahisi hastalarının %50'sinden fazlası hastanede kaldıkları süre boyunca kan ürünleri almaktadırlar (Bennett-Guerrero ve ark., 2010; Raghavan ve Marik, 2005). Dünya genelinde yılda 90 milyon üniteden fazla ES transfüze edildiği düşünülmektedir ve her geçen gün gereksinim de artmaktadır (Almizraq ve ark., 2017). Neoadjuvan kemoradyoterapi gibi birçok yeni tıbbi uygulama hastaların AKT'ye olan ihtiyacını artırmaktadır (McCool ve ark., 2018). Ancak, AKT hastalara yarar sağlamanın yanısıra çok sayıda komplikasyonu da beraberinde getirmektedir. Bunlardan bir tanesi de transfüzyonla ilgili immünomodülasyon (TRIM)'dir. TRIM halen birçok açıdan aydınlatılamamış gizemli bir transfüzyon komplikasyonu durumundadır. TRIM, enfeksiyon artışı, kanser büyümesinin hızlanması, organ fonksiyon bozukluğu ve transfüzyon sonrası kısa süreli mortalite gibi olumsuz klinik sonuçlara neden olabilmektedir (Cata ve ark., 2013; Muszynski ve ark., 2017). Bu güne kadar TRIM'i tetikleyen etkenleri ve bu etkenlerin oluşturduğu düşünülen immünmodülatuvar değişiklikleri belirleyebilmek için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Etkeni belirlemeye yönelik çalışmalarda daha çok kan bileşenleri hedef alınırken, immünmodülatuvar değişiklikleri saptamaya yönelik çalışmaların odağı ise AKT alıcısı hastalar olmuştur. Ancak, TRIM'i yönlendiren asıl etkenlere ve alıcının immün sisteminde meydana geldiği düşünülen değişikliklere yönelik çeşitli görüşler bildirilmiş olsa da, TRIM halen nedenleri ve sonuçları açısından tam olarak aydınlatılamamış bir fenomen durumundadır.

Anabilim Dalımız tarafından daha önce bu konuda yapılmış bir araştırma da bulunmaktadır. “Eritrosit Süspansiyonlarında Depolanma Sürecinin T Hücre Alt Grupları Üzerine Etkisi” başlığı bu çalışmada kan bileşeni içindeki yardımcı T hücre alt grupları araştırılmış ve süreç boyunca birikim gösteren sitokinler değerlendirilmiştir (Bal ve ark., 2018). Bu çalışmada depolanma sürecinin farklı günlerinde NL-ES’ler içinde Th2, Th17, Treg hücrelerin aktivite kazandığı, süpernatanda TGF- $\beta$  düzeylerinde artışın olduğu saptanmış ve bu bulgular TRIM ile ilişkilendirilmiştir (Bal ve ark., 2018). Buna benzer ve yayınlanma aşamasında olan çalışmalar da bulunmaktadır. Tüm bu çalışmalardaki amaç TRIM’e neden olacak etkeni veya süreci belirlemek ve bunların lökoredüksiyonla ilişkilerini araştırmaktır.

TRIM’in allojeneik MNH’lerden kaynaklanabileceği ve lökoredüksiyonun TRIM etkisini engellemedeki yeterliliği konusundaki değişken bulgular (Bilgin ve Brand, 2008; Blumberg ve ark., 2007; Friese ve ark., 2008; Hebert ve ark., 2003; Phelan ve ark., 2007; Vamvakas ve ark., 2001; Vamvakas ve Blajchman, 2007; van de Watering ve ark., 1998), bu tez çalışmasında bizleri eksozomlara yönlendirmiştir. Bazı araştırmacılar, kan ürünlerinin süpernatanda bulunan çözünebilir biyolojik mediatörlerin ve ekstrasveziküller (EV) gibi subselüler bileşenlerin alıcıda immünosupresyona veya kötü prognoza neden olacağını bildirmişlerdir (Nickel ve ark., 2015; Muszynski ve ark., 2015; Hart ve ark., 2015; Danesh ve ark., 2014; Ki ve ark., 2018; Cata ve ark., 2013). Son zamanlarda kan bileşenleri içindeki EV’lerin immünomodülatör etkilere aracılık etmede önemli bir rol oynayabileceği üzerinde durulmaktadır (Belizaire ve ark., 2012; Krailadsiri ve ark., 1997; Zhang ve ark., 2014). Örneğin, depolama sırasında biriken ES ünitelerindeki EV’lerin, nötrofil aktivasyonuna katkıda bulunduğu ve transfüzyon alıcısında enflamatuvar yanıtı tetiklediği gösterilmiştir (Aatonen ve ark., 2012; Hunter ve ark., 2008). EV’lerin, immün sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilecek miRNA gibi genetik bilgileri aktardıkları öne sürülmüştür (Belizaire ve ark., 2012; Cardo ve ark., 2008). EV’lerin en küçük çaplı molekülleri olan ve çeşitli hücre tiplerinden salgılanan eksozomların rol aldıkları fizyolojik süreçlere ek olarak, farklı mekanizmalarla karsinogenez, metastaz ve immüno-modülasyon gibi patofizyolojik süreçlere de aracılık ettiği bildirilmiştir (Jan ve ark., 2019; Luo ve ark., 2019; Mathieu ve ark.,

2019; Okamoto ve ark., 2018; Qing ve ark., 2018). Köken aldıkları hücelere ait DNA parçalarını, kodlama yapan veya yapmayan RNA parçalarını ve proteinleri içeren eksozomlar içeriklerini alıcı hücelere aktararak bu etkilerini gösteriyor olabilirler.

Örneğin eksozomlara ait kodlama yapmayan RNA parçacıklarının karsinogenez ve immün-modülasyondaki önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Cypryk ve ark., 2018; Qing ve ark., 2018). Yani eksozomlar hücrelerden köken almaktadır, büyüklükleri gereği lökosit filtrelerinden geçebilme, depolanma süreci boyunca kan bileşeni içerisinde birikim gösterme ve alıcıda TRIM etkisi görülmesine neden olma olasılıkları söz konusudur. Bu durum bizi eksozomlarla ilgili araştırma yapmaya itmiştir. Aynı zamanda Danesh ve arkadaşlarının çalışması da bizim için yol gösterici olmuştur (Danesh ve ark., 2014). Bu amaçla planlanan çalışmamızda depolanma süreci boyunca ES'ler içindeki lökosit kaynaklı eksozom profilinde meydana gelebilecek olası değişiklikler araştırılmıştır. Eksozomlar özel bir kit ile ES'lerden ayrıştırılmış ve akan hücre ölçer yardımıyla tanımlanmıştır. Çalışmada özellikle son yıllarda tanımlanan miyeoloid kökenli baskılayıcı hücreler üzerine odaklanılmıştır.

Bize kaynaklık eden Danesh'in çalışmasında hedef yapılar ekstraselüler veziküller (EV) olmuş ve bu moleküller ultrasantrifügasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Danesh, EV'leri daha sonra büyüklüklerine göre küçük EV (eksozom olarak nitelemiş) ve büyük EV'ler olarak tekrar değerlendirilmiştir (Danesh ve ark., 2014). Ama sonuçları bu moleküller için ayrıca tartışmamıştır. Bizim çalışmamızda doğrudan eksozomlara odaklanılmış ve NL-ES ve LA-ES'lerden izolasyonları için özel bir purifikasyon kiti kullanılmıştır ve çalışma 3, 14, 28 ve 42. günlerde gerçekleştirilmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Almizraq ve arkadaşları LA-ES'lerin içindeki EV'leri 3, 7, 21 ve 42. depolanma günlerinde araştırmışlar ve depolanma sürecinde artış gösterdiklerini bulmuşlardır (Almizraq ve ark.,2017). Ancak farklı olarak bu çalışmada sadece LA-ES örneklerinin santrifügasyonu ile elde edilmiş EV'ler değerlendirilmiştir.

Danesh çalışmasında lökoredüksiyon kapasitesi %99,9 olan filtreler kullanılarak elde edilmiş LR-ES'leri kullanmış ve bu şekilde ürün içindeki lökosit sayısının 5.000.000 az olması sağlanmıştır. Çalışmamızda lökoredüksiyon kapasitesi %99,99 olan 4log filtreler kullanılarak LR-ES'ler elde edilmiş ve ürün içerisindeki lökosit

sayısı 500.000'den az olması sağlanmıştır. Buna ek olarak çalışmamızda lökoredüksiyonun ürün içerisindeki eksozom profili üzerine etkileri de değerlendirilirken, Danesh'in çalışmasında NL-ES grubu örnekler oluşturulmadığı için lökoredüksiyonun etkinliği değerlendirilememiştir.

Depolanma süreci boyunca epitel, monosit, NK, B ve T hücrelerden köken alan EV düzeyleri %5'in altında bulunurken, bizim çalışmamızda da depolanma süreci içerisinde Th, Tc, NK ve NK-T hücrelerden köken alan eksozomlar neredeyse hiç saptanamamıştır. T, B hücrelerden ve monositlerden köken alan eksozomların düzeyi ise genel olarak %3'ün altında bulunmuştur. Birbirine paralel ama düzey olarak farklı bu sonuç profilinin nedeni Danesh'in çalışmasında büyük EV'leri de içeriyor olmasından veya yöntemsel farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. EV çalışmalarında yöntemsel farklılıkların sonuçları etkileyebildiği gösterilmiştir (Almizraq ve ark., 2017). Bu çalışmada depolanma süreci boyunca LA-ES'ler içindeki EV'lerin artış gösterdikleri belirlenmiş olsa da, asıl farklı yöntemlerle yapılan değerlendirmelerin sonuçlar üzerindeki etkisine vurgu yapılmıştır. Molekül büyüklüğü 200 nm'den küçük olan EV'lerin depolanma süreci boyunca gösterdiği artış Tunable Resistive Pulse Sensing Assesment (TRPS) ile saptanabilirken, 200 nm'den büyük olanların gösterdiği artış hem TRPS hem de akan hücre ölçer aracılığıyla saptanabilmiştir. Bizim sonuçlarımızla Danesh'in çalışması arasındaki küçük farkın nedeni bizim eksozom, Danesh'in EV çalışmasına bağlı olarak ortaya çıkan akan hücre ölçer gözden kaçan daha küçük moleküller olabilir.

Bizim çalışmamızda granülositlerden köken alan eksozomlar depolanma süreci boyunca hem LR-ES hem de NL-ES gruplarında çok yüksek oranda saptanırken Danesh'in çalışmasında bu hücrelere bakılmamıştır. Ancak, çalışmasında bizden farklı olarak eritrosit ve trombosit kökenli EV'leri araştırmıştır. Eritrosit ve trombosit kökenli eksozomların her ikisi de depolanma süresinin yarısında artış gösterdikten sonra 42. günde trombosit kökenliler azalırken, eritrosit kökenliler ilk yarıdan daha yüksek oranda artış göstermiştir. Bu hücreler daha ayrıntılı araştırma yapmaya uygun hücreler olarak görünmektedir. Ama bizim çalışmamızda bu hücreler değerlendirilmemiştir. Amacımız TRIM ile eksozomları ilişkilendirmek olduğu için asıl hedefimiz immünsüpresif özellikleri olan MDSC'ler olmuştur. MDSC'ler myeloid hücrelerin tam

olarak tanımlanmış bir alt grubu olmaktan ziyade matür hücelere farklılaşmaları engellenmiş aktive immatür hücrelerin oluşturduğu heterojen bir topluluktur. Monositlere, makrofajlara veya DH'lere özgü hücre yüzeyi belirteçlerinin ifadesinden yoksun olan granülositik ve monositik morfolojili miyeloid hücrelerin bir karışımından meydana gelen hücrelerdir. Bu hücreler birçok patolojik koşullar altında immün yanıtları düzenleyen kritik faktörlerdendir. Akut ve kronik enflamasyon, enfeksiyon, travmatik stres ve kanser gibi durumlarda sayıları artış göstermektedir (Dolcetti ve ark., 2008; Gabrilovich, 2017). Böyle durumlarda bu hücrelerden eksprese edilen eksozom sayılarının artmasını beklemek yanlış olmayacaktır. Ancak sağlıklı kan bağışçılarında ve bu kişilerin bağışladığı kan bileşenlerinde yüksek düzeyde MDSC bulunmasını beklemek doğru değildir. Çalışmamızda ürün içerisinde MDSC düzeylerine bakılmamıştır. Ama MDSC kökenli eksozom düzeyleri depolanma koşul ve sürelerinde hem LR-ES hem de NL-ES'lerde anlamlı şekilde azalmıştır. Bu sonuçlar depolama koşullarında ürün içerisinde bulunan MDSC kökenli eksozomların, yani bağışçıdayken eksprese edilerek ürüne geçmiş olan MDSC kökenli eksozomların yok olmasına veya ürün içerisinde ekspresyonlarının büyük ölçüde azalmasına bağlı görünmektedir. Bu durum ES'lerin depolanma sıcaklığıyla (4-6°C) ilişkili bir etkinin var olabileceğini düşündürmektedir (Brooks ve ark., 2013). İçinde lökosit bırakılan NL-ES'lerde bile ekspresyon artışının olmaması sıcaklık ile ilgili görüşümüzü doğrular görünmektedir. Öte yandan NL-ES'lerde depolama sürecinde lökosit sayılarının anlamlı şekilde azalmasını sonuçlarımızdaki azalmanın nedeniymiş gibi kabul etmek mümkündür. Ancak bu bizi yanılgıya götüren bir yorum olacaktır. Eğer sıcaklık düzeyi eksozom ekspresyonunu etkilemiyor olsaydı, depolama süreci boyunca NL-ES'ler içerisinde meydana gelecek eksozom ekspresyonu LR-ES'lere göre fark oluşturmalıydı. İki grup arasında anlamlı fark bulunmaması sıcaklık düzeyiyle ilgili öngörümüzü desteklemektedir. Ayrıca MDSC kökenli eksozom düzeylerindeki azalmanın nedeni ne olursa olsun 42. gün örneklerinde azımsanmayacak düzeyde MDSC kökenli eksozom bulunuyor olması TRIM ile ilişkili olabilecekleri öngörümüzü canlı tutmuştur.

MDSC'ler kanserler gibi pek çok hastalıkta artış gösterirler ve ortamdan uzaklaştırılmaları dramatik bir iyileşme ve hatta bazen anti-tümör etkiye yol

açabilmektedir (Youn ve ark., 2010). Bu özelliklerini immün süpresyon yapma potansiyelleriyle açıklamak mümkündür. Bilindiği gibi MDSC'ler antijene özgü olarak veya olmayarak iki farklı yol ile immün baskılamada rol oynarlar. Antijene özgü etkilerini genellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NO üzerinden yaparken (Kusmartsev ve Gabrilovich, 2003; Kusmartsev ve ark., 2004; Nagaraj ve ark., 2007), antijene özgü olmayan etkilerini PGE<sub>2</sub>, membran bağlı TGF-β'ları, arjininaz-1 aktiviteleri ile meydana getirdikleri rapor edilmiştir (Kalinski, 2012; Li ve ark., 2009; Bronte ve Zanovello, 2005). Bu yollardan hangisi ile etki gösterecekleri içinde buldukları durumla, MDSC tipiyle ve bölgeyle ilişkilidir. Dalaktaki MDSC'lerin yüksek ROS düzeyleri aracılığıyla, bunun aksine tümör dokusundaki MDSC'lerin ise yüksek NO ve ARG1 ekspresyonlarıyla aktive T hücreleri baskılamaları bu duruma örnek olarak verilebilir (Solito ve ark., 2011). MDSC'lerin alt tipleri arasında kullanılan yolların farklılığı da bu duruma bir diğer örnektir. Granülositik tipte olanların ana baskılayıcı mekanizmasının ROS sentezi, monositik tipte olanların ise iNOS ve çeşitli sitokin salınımları olduğu gösterilmiştir (Movahedi ve ark., 2008). Sonuç olarak, MDSC'ler bu yollar sayesinde T hücre proliferasyonunun baskılanmasına (Bronte ve Zanovello, 2005; Srivastava ve ark., 2010); T hücre cevabının baskılanmasına (Bingisser ve ark., 1998; Harari ve Liao, 2004; Kusmartsev ve Gabrilovich, 2003; Kusmartsev ve ark., 2004; Gabrilovich ve Nagaraj, 2009); geçici bir T hücre tolereansına (Nagaraj ve ark., 2007; Nagaraj ve ark., 2010); NK hücrelerinin sitotoksitesinin, NKG2D ekspresyonunun ve IFN-γ üretimlerinin baskılanmasına (Li ve ark., 2009); MHC II ekspresyonunun azalmasına (Harari ve Liao, 2004) ve Treg'lerin gelişimine neden olabilirler (Huang ve ark., 2006). Bu değişikliklere bakıldığında TRIM ile MDSC'lerin bir ilişkisi olabileceği var saymak mümkündür. T hücre yanıtının, proliferasyonunun, sitokin üretiminin, NK aktivitesinin baskılanması ve Treg gelişimine yol açmaları TRIM gelişiminde rolleri olabileceğini düşündürmektedir. MDSC'ler aynı zamanda anjiyogenez, tümör hücresi invazyonu ve metastazlardaki artışlara da katkıda bulduklarının gösterilmesi de AKT sonrası kanser rekürrenslerinde rolleri olabileceğini düşündürmektedir (Youn ve Gabrilovich, 2010). Bununla birlikte gelişmiş birçok ülkede kan bileşenleri lökosit azaltılmış olarak kullanıldığı için ürün içerisinde bu etkiyi gösterecek sayıda MDSC bulunmayabilir. Fakat, MDSC'lerden köken alan eksozomlar bu fonksiyonu

gösteriyor olabilirler. Çünkü köken aldıkları hücelere ait birçok yüzey molekülünü ve içeriği taşıyan eksozomlar, MDSC'lere immün baskılayıcı özellik kazandıran tüm bu molekülleri ve özellikleri taşıyor olabilirler. Ayrıca lökosit filtrelerinden rahatlıkla geçebildikleri için lökoredüksiyonla azaltılamazlar. Bu özellikleri nedeniyle ilgimizi çeken MDSC'lerden köken alan eksozomlar çalışmamızda hem toplam (MDSC) hem de monositlerden (M-MDSC) ve granüositlerden (G-MDSC) köken alan MDSC'ler olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. M-MDSC'ler çok düşük düzeyde saptanıp depolanma süreci boyunca da değişiklik göstermedikleri için ihmal edilmiştir. MDSC ve G-MDSC'ler süreç boyunca hem NL-ES'lerde, hem de LR-ES'lerde yüksek oranda saptanmıştır. Depolanma süreci boyunca anlamlı şekilde azalsalar da 42.gün örneklerinde saptanan düzeyleri kabul edilebilir düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu sonuç kan bilşenlerinin depolanma süresi (Koch ve ark., 2008; Offner ve ark., 2002; Purdy ve ark., 1997; Zallen ve ark., 1999) ve transfüze edilen ürün sayısı (Bilgin ve Brand, 2008; vande ve ark., 1998) ile TRIM arasında doğrusal bir ilişki bulunduğunu öne süren görüşlerle uyummamaktadır. Bizim sonuçlarımızda immün baskılayıcı özellikleri nedeniyle TRIM etkisinde rolü olduğundan şüphelendiğimiz MDSC ve G-MDSC kökenli eksozomlar depolanma süresi boyunca azalma göstermiştir. Eğer MDSC ve G-MDSC kökenli eksozomlar TRIM'e neden oluyorsa bu iki hipotezi sonuçlarımız çürütecektir. Bu daha taze ES'lerin immünsupresif etkileri olduğunu savunan çalışmalara destek olan bir sonuçtur (Hendrickson ve ark., 2010; Hendrickson ve ark., 2011). Ancak, yine de uzun süre depolanmış ES'lerle TRIM gelişmeyeceğini düşünmek doğru olmayacaktır. Çünkü çalışmamızda ES'lerin 42. gün örneklerinde dahi yüksek miktarda MDSC ve G-MDSC kökenli eksozomların belirlenmiş olması bu şekilde düşündürmektedir.

Çalışmamızda LR-ES ve NL-ES örneklerinde depolanma süreci içinde görülen değişimleri lökoredüksiyon etkilemediğini de göstermiştir. Danesh'in çalışmasında araştırılmayan bu özellik, daha önceleri TRIM gelişiminde lökoredüksiyonun etkili olduğunu öne süren görüşlere ters bir durum oluşturmaktadır (Blumberg ve ark., 2007; Friese ve ark., 2008; Herbert ve ark., 2003). Bu da TRIM gelişiminde birden fazla değişkenin katkısı olabileceğini düşündürmektedir. Lökosit filtrelerinden geçebilen ve immünsupresif özellikleri olan moleküller bu tabloya yol açıyor olabilir.



Eritrositlerden salınan EV'ler olan ektozomlar bunlara örnek olarak verilebilir. Çünkü, ektozomların da makrofaj fonksiyonlarını bozduğu, TNF- $\alpha$  ve IL-8 düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (Sadallah ve ark., 2008). Bu çalışmada ürün içindeki ektozomların immünsupresif etkilerinin TRIM ile karıştırılıyor olabileceği bildirilmiştir.

ES'lerin bu etkisi bilinenin aksine eritrositlerde bulunan RNA parçacıklarıyla ilişkili de olabilir. Doss ve arkadaşları eritrositlerde miRNA'lar bulunduğunu ve bazılarının TGF- $\beta$  yolağı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Doss ve ark., 2015). Eritrosit ektozomlarının immün süpresif etkileri içerdikleri bu miRNA'lar aracılığıyla ortaya çıkıyor olabilir. Eritrositlerin bu etkisi de lökoredüksiyonun etkisiz kalmasının nedeni olabilir. Öte yandan sonuçlarımızdan yola çıkarak eksozomların da lökoredüksiyonun etkinliği azaltmada etkileri olan yapılardan olabileceklerini düşünmek mümkündür. Bu sayede alıcıya geçen eksozomlar hem MDSC ve G-MDSC kökenli olanlarda olduğu gibi kendi fonksiyonlarıyla hem de taşıdıkları kargoları aracılığıyla TRIM etkisine katılıyor olabilirler. ES'lerin içindeki eksozomların lökosit belirteçlerini taşımadığının ve hücre kültüründe insan periferik kan MNH'lerini uyurabildiğinin gösterilmesi de TRIM gelişimde rolleri olabileceği görüşünü desteklemektedir (Danesh ve ark., 2014). ES içindeki eksozomların T-hücre immün yanıtını baskıladığı öne sürülmesi de bu görüşe destek olmaktadır (Taylor ve Gercel, 2011). Öte yandan lökosit belirteçlerinin eksikliği nedeniyle alıcı immün sistemden kaçabilmeleri de etkilerini kolaylaştırıyor olabilir. Alıcıda oluşturdukları etki taşıdıkları kargoyla da ilgili olabilir. Bilindiği gibi eksozomlar köken aldıkları hücrelere ait kargoları taşırlar ve bu kargonun en önemli parçalarından birisi de mRNA'lar, miRNA'lar gibi RNA'lardır (Falcone ve Felsani, 2015). RNA içerikleri sayesinde hücre-hücre etkileşiminde rol oynayan eksozomlar, alıcı hücreye transfer olduğunda taşıdıkları RNA kargoları ile hücrenin fonksiyonunu değiştirebilirler (Minciacchi ve ark., 2015; Van der Pol ve ark., 2012). Taşıdıkları bu miRNA'lar aracılığıyla alıcı immün sistem hücrelerini etkileyerek immünmodulatuvar etkilere yol açıyor olabilirler. Bu moleküllerin etkisini araştırmak isteyen Huang ve arkadaşları ES'lerde eksozomları ve eksozomların taşıdığı miRNA'ları araştırmıştır. Bu çalışmada bazı miRNA'ların depolanma süreci boyunca artış gösterdiği saptanmış ve bu moleküllerin alıcıda çeşitli biyolojik süreçleri etkileyebileceği bildirmiştir (Huang ve

ark., 2019). Ancak bu çalışmadaki örnek sayısı sınırlı olduğu için sonuçlarını daha geniş çalışmalarla desteklemek gerekir.

Bugüne kadar yapılan araştırmalara rağmen, transfüzyon ile ilişkili immünomodülasyonda eksozomların (Eritrositlerden türetilmiş) rolü ve mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunun için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Eğer eksozomların etkileri kesinleştirilirse, bu durum bizleri eksozom oluşumu ve geçişini engellemek için farklı depolama yöntemleri geliştirmeye ya da kan bileşenlerini eksozomlardan veya EV'lerden arındıracak yeni yöntemler geliştirmeye zorlayacaktır.



## 6. KAYNAKLAR

- Aatonen M, Gronholm M, Siljander PR (2012) Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Semin Thromb Hemost* 38: 102–113.
- Aatonen M, Ohman T, Nyman TA et al (2014) Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 3: 24692.
- Admyre C, Johansson SM, Paulie S et al (2006) Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol*. 36: 1772-81.
- Adams JW (2008) New blood, old blood, or no blood? *The New England Journal of Medicine* 358: 1295-6.
- Akers JC, Gonda D, Kim R et al (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113: 1-11.
- Almizraq RJ, Seghatchian J, Holovati JL, Acker JP (2017) Extracellular vesicle characteristics in stored red blood cell concentrates are influenced by the method of detection. *Transfus Apher Sci* 56(2): 254-260.
- Angulo I, Rodriguez R, Garcia B et al (1995) Involvement of nitric oxide in bone marrow-derived natural suppressor activity. Its dependence on IFN-gamma. *J immunol* 155(1): 15-26.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381): 1305-1308.
- Azmi AS, Bao B, Sarkar FH (2013) Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 32: 623-642.
- Babcock GF, Alexander JW (1996) The effects of blood transfusion on cytokine production by TH1 and TH2 lymphocytes in the mouse. *Transplantation* 61(3): 465-468.
- Bal SH, Heper Y, Kumaş LT et al (2018) Effect of storage period of red blood cell suspensions on helper T-cell subpopulations. *Blood Transfus* 16(3): 262-272.
- Baumgartner JM, Silliman CC, Moore EE et al (2009) Stored red blood cell transfusion induces regulatory T cells. *J Am Coll Surg* 208:110-9.
- Belizaire RM, Prakash PS, Richter JR et al (2012) Microparticles from stored red blood cells activate neutrophils and cause lung injury after hemorrhage and resuscitation. *J Am Coll Surg* 214:648–55.
- Beko KR, Tran HO, Hewitt CW et al (1991) Mechanisms of prior blood transfusion-cyclosporine-induced tolerance: a potential role for immune-cellular chimerism. *Transplantation Proceedings* 23: 147-8.

- Ben MA, Jing-Yue Y, Wen-jie S et al (2016) Combining Exosomes Derived from Immature DCs with Donor Antigen-Specific Treg Cells Induces Tolerance in a Rat Liver Allograft Model *Sci Rep* 6: 32971.
- Bennett-Guerrero E, Zhao Y, O'Brien SM et al (2010) Variation in the use of blood transfusion in coronary artery bypass graft surgery. *J Am Med Assoc* 304: 1568–75.
- Betz M, Fox BS (1991) Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *The Journal of Immunology* 146(1): 108-113.
- Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ et al (2007) Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 110(9): 3234-44.
- Bilgin YM, van de Watering LM, Eijnsman L et al (2004) Double-blind, randomized controlled trial on the effect of leukocyte-depleted erythrocyte transfusions in cardiac valve surgery. *Circulation* 109(22): 2755-2760.
- Bilgin YM, Brand A (2008) Transfusion-related immunomodulation: a second hit in an inflammatory cascade? *Vox Sang* 95: 261-71.
- Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG et al (1998) Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 160 (12): 5729-5734.
- Birge RB, Ucker DS (2008) Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death Differ* 15: 1096–102.
- Birge R, Boeltz S, Kumar S, Carlson J et al (2016) Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death and Differentiation* 23: 962–978.
- Blajchman MA, Bardossy L, Carmen R et al (1993) Allogeneic blood transfusion-induced enhancement of tumor growth: two animal models showing amelioration by leukodepletion and passive transfer using spleen cells. *Blood* 81: 1880-2.
- Blajchman M, Bordin JO (1994) Mechanisms of transfusion-associated immunosuppression. *Curr Opin Hematol* 1: 457-61.
- Blumberg N, Heal JM (1994) Effects of transfusion on immune function. Cancer recurrence and infection. *Arch Pathol Lab Med* 118: 371-9.
- Blumberg N, Heal JM (1996) The transfusion immunomodulation theory: the Th1/Th2 paradigm and an analogy with pregnancy as a unifying mechanism. *Seminars in Hematology* 33(4): 329-340.
- Blumberg N, Zhao H, Wang M et al (2007) The intention-to-treat principle in clinical trials and meta-analyses of leukoreduced blood transfusions in surgical patients. *Transfusion* 47(4): 573-581.
- Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA (1994) Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products *Blood* 84: 1703-21.
- Bronte V, Zanovello P (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5 (8): 641-654.

- Brooks CR, van Dalen CJ, Hermans IF et al (2013) Identifying leukocyte populations in fresh and cryopreserved sputum using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 84(2):104-13.
- Brunson ME, Alexander JW (1990) Mechanisms of transfusion-induced immunosuppression. *Transfusion* 30: 651-8.
- Cardo LJ, Wilder D, Salata J (2008) Neutrophil priming, caused by cell membranes and microvesicles in packed red blood cell units, is abrogated by leukocyte depletion at collection. *Transfus Apher Sci* 38: 117–25.
- Cata J, Wang H, Gottumukkala V et al (2013) Inflammatory response, immunosuppression, and cancer recurrence after perioperative blood transfusions. *British Journal of Anaesthesia* 110(5): 690–701.
- Casella I, Feccia T, Chelucci C et al (2003) Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood* 101: 1316–23.
- Cheng J, Zhou L, Qin Y S et al (2009) Donor apoptotic lymphocyte transfusion-induced liver allograft tolerance by up-regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in peripheral blood. *Transplantation Proceedings* 41(9): 3893-3897.
- Clark DA, Gorczynski RM, Blajchman MA (2008) Transfusion-related immunomodulation due to peripheral blood dendritic cells expressing the CD200 tolerance signaling molecule and alloantigen. *Transfusion* 48: 814-21.
- Clayton A, Tabi Z (2005) Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. *Blood Cells Mol Dis* 34(3): 206-13.
- Cypryk W, Nyman TA, Matikainen S (2018) From inflammasome to exosome - Does extracellular vesicle secretion constitute an inflammasome-dependent immune response? *Frontiers in Immunology* 9: 2188.
- Danesh A, Inglis HC, Jackman RP et al (2014) Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood* 123:687-696.
- Deng J, Liu Y, Lee H et al (2012) S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell* 21: 642–54.
- Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ et al (2000) Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 165(3): 1259-65.
- Długońska H, Gatkowska J (2016) Exosomes in the context of *Toxoplasma gondii* – host communication. *Ann Parasitol.* 62(3): 169-174.
- Dolcetti L, Marigo I, Mantelli B et al (2008) Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett* 267(2): 216-25.
- Doss J, Corcoran DL, Jima DD et al (2015) A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes. *BMC Genomics* 16(1): 952.

- Dzik WH (1994) Mononuclear cell microchimerism and the immunomodulatory effect of transfusion. *Transfusion* 34: 1007-12.
- Dzik WH (2003) Apoptosis, TGF beta and transfusion-related immunosuppression: Biologic versus clinical effects. *Transfusion and Apheresis Science* 29: 127-9.
- Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC et al (2005) Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 52(11): 3337-48.
- Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F et al (2008) Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol*, 180(12): 7898-7906.
- Edinger AL, Thompson CB (2002) Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci* 99 (3): 1107-1109.
- Erler JT, Bennewith KL, Cox TR et al (2009) Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15: 35-44.
- Ersöz E, Can OB, Uzunoğlu S (2016) Eksozomların Kanserdeki Rolü. *CBU-SBED* 2(5): 144-152.
- Falcone G, Felsani A (2015) Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 34: 32.
- Feng Jf, Chen F, Liu H et al (2013) Induction of immune tolerance by pre-infusion of apoptotic lymphocytes derived from peripheral blood of donor rats before liver transplantation. *Minerva Chirurgica* 68: 183-9.
- Fridlender Z, Sun J, Kim S et al (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta, *Cancer Cell* 16(3): 183-194.
- Friese RS, Sperry JL, Phelan HA (2008) The use of leukoreduced red blood cell products is associated with fewer infectious complications in trauma patients. *The American Journal of Surgery* 196: 56-61.
- Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF et al (1997) Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 3(3): 483-490.
- Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor et al (2001) Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 166(9): 5398-5406.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9 (3): 162-174.
- Gabrilovich DI (2017) Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5(1): 3-8.

- Gafter U, Kalechman Y, Sredni B (1996) Blood transfusion enhances production of T-helper-2 cytokines and transforming growth factor beta in humans. *Clinical Science* 91: 519-23.
- Gantt CL (1981) Red blood cells for cancer patients. *Lancet* 2: 363.
- Ge Q, Zhou Y, Lu J et al (2014) miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules* 19(2):1568-75.
- Ghio M, Contini P, Mazzei C (1999) Soluble HLA class I, HLA class II, and Fas ligand in blood components: a possible key to explain the immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions. *Blood* 93: 1770-7.
- Ghio M, Contini P, Negrini S et al (2011) Down regulation of human natural killer cell-mediated cytotoxicity induced by blood transfusion: role of transforming growth factor-beta(1), soluble Fas ligand, and soluble Class I human leukocyte antigen. *Transfusion* 51: 1567-73.
- Giri K, Jeffrey S (2008) Exosomes Derived from M. Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*. 3(6): 2461.
- Grimshaw K, Sahler J, Spinelli SL et al (2011) New frontiers in transfusion biology: identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells. *Transfusion* 51: 874-80.
- Guo JR, Xu F, Jin XJ et al (2014) Impact of allogenic and autologous transfusion on immune function in patients with tumors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(1): 467-474.
- Gupta A, Pulliam L (2014) Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 11: 68.
- Harding C, Heuser J, Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 97(2): 329-39.
- Harari O, Liao JK (2004) Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des* 10 (8): 893-898.
- Hart S, Cserti-Gazdewich C, McCluskey S et al (2015) Red cell transfusion and the immune system,” *Anaesthesia* 70(1): 38–45.
- Hendrickson J, Hod E, Spitalnik S et al (2010) Storage of murine red blood cells enhances alloantibody responses to an erythroid-specific model antigen. *Transfusion*. 50: 642-8.
- Hendrickson J, hod E, hudson K et al (2011) Transfusion of fresh murine red blood cells reverses adverse effects of older stored red blood cells. *Transfusion* 51: 2695-702.

- Henryka D, Justyna G (2016) Exosomes in the context of *Toxoplasma gondii* – host communication. *Annals of Parasitology* 62(3): 169–174.
- Hebert PC, Fergusson D, Blajchman MA (2003) Clinical outcomes following institution of the Canadian universal leukoreduction program for red blood cell transfusions. *The Journal of the American Medical Association* 289: 1941-9.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H et al (2006) Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* 8: 1369–75.
- Hu A, Li Q, Shi H (2012). Donor-derived bone marrow transfusion produces mixed chimerism and promotes a Th2 shift in Th1/Th2 balance in rat heterotopic small bowel transplantation. *Digestive and Liver Disease* 44(12): 988-994.
- Huber D, Veinante P, Stoop R (2005) Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science* 8: 245-8.
- Huber V, Fais S, Iero M et al (2005) Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 128: 1796-1804.
- Huang B, Pan PY, Li Q et al (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor bearing host. *Cancer Res* 66 (2): 1123-1131.
- Huang H, Zhu J, Fan L (2019) MicroRNA Profiling of Exosomes Derived from Red Blood Cell Units. Implications in Transfusion-Related Immunomodulation *BioMed Research International*. ID 2045915.
- Hunter MP, Ismail N, Zhang XL et al (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE* 3(11):3694.
- Iero M, Valenti R, Huber V (2008) Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death and Differentiation* 15: 80–88.
- Jan A, Rahman S, Khan S et al (2019) Biology, pathophysiological role, and clinical implications of exosomes: a critical appraisal *Cells* 8(2): 99.
- Jensen LS, Andersen AJ, Christiansen PM et al (1992) Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery. *British Journal of Surgery* 79: 513-6.
- Kahlert C, Kalluri R (2013) Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 91: 431-437.
- Kaplan J, Sarnaik S, Gitlin J et al (1984) Diminished helper/suppressor lymphocyte ratios and natural killer activity in recipients of repeated blood transfusions. *Blood* 64: 308-10.
- Kalinski P (2012) Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 188 (1): 21-28.



- Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD (2005) Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 11(3): 1010-20.
- Kirkley SA (1999) Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 652-7.
- Koch C, Li L, Sessler DI (2008) Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *The New England Journal of Medicine* 358: 1229-39.
- Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL et al (2010) A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res* 16 (18): 4583- 4594.
- Kolowos W, Gaipf US, Sheriff A et al (2005) Microparticles shed from different antigen-presenting cells display an individual pattern of surface molecules and a distinct potential of allogeneic T-cell activation. *Scand J Immunol* 61(3): 226–233.
- Krailadsiri P, Seghatchian J, Bode AP (1997) Microvesicles in blood components: laboratory and clinical aspects. *Clin Appl Thromb Hemost* 3: 86–95.
- Kusmartsev S, Gabrilovich DI (2003) Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol* 74 (2): 186-196.
- Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D et al (2004) Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 172 (2): 989-999.
- Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E (2008) Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol* 18(5): 199-209.
- Lannan KL, Sahler J, Spinelli SL et al (2013) Transfusion immunomodulation-the case for leukoreduced and (perhaps) washed transfusions. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 50(1): 61-68.
- Li H, Han Y, Guo Q et al (2009) Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGFβ1. *J Immunol* 182 (1): 240-249.
- Licarete E, Ganz S, Recknagel M, Giovanni D (2012) Prevalence of collagen VII-specific autoantibodies in patients with autoimmune and inflammatory diseases. *BMC Immunol* 13: 16.
- Luo Z, Wu F, Xue E et al (2019) Hypoxia preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells survival by inducing HIF-1α in injured neuronal cells derived exosomes culture system. *Cell Death & Disease* 10(2): 134.
- Marino J, Babiker-Mohamed MH, Crosby-Bertorini P et al (2016) Donor exosomes rather than passenger leukocytes initiate alloreactive T cell responses after transplantation. *Sci Immunol* 14;1(1): 8759.

- Mathieu M, Martin-Jaular G (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology* 21(1): 9–17.
- Magee CC, Sayegh MH (1997) Peptide-mediated immunosuppression. *Current Opinion in Immunology* 9: 669-75.
- McCool KW, Sampene E, Polnaszek B et al (2018) Neoadjuvant chemotherapy is associated with a high rate of perioperative blood transfusion at the time of interval cytoreductive surgery. *BMC Cancer* 1: 1041.
- Mincheff MS, Meryman HT, Kapoor V et al (1993) Blood transfusion and immunomodulation: a possible mechanism. *Vox Sanguinis* 65: 18-24.
- Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D (2015) Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 40: 41-51.
- Miyaniishi M, Tada K, Koike M et al (2007) Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450 (7168): 435-9.
- Morel O, Morel N, Jesel L et al (2011) Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol* 33(5): 469–486.
- Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J et al (2008) Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell suppressive activity. *Blood* 111(8): 4233-4244.
- Mowbray JF, Gibbins C, Liddell H et al (1985) Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet* 1: 941-3.
- Muszynski J, Frazier E, Nofziger E et al (2015) Red blood cell transfusion and immune function in critically ill children: A prospective observational study. *Transfusion* 55(4):766–774.
- Muszynski J, Spinella P, Colette J et al (2017) Juffermans N, et al. Transfusion-related immunomodulation: review of the literature and implications for pediatric critical illness. *Transfusion* 57(1):195-206.
- Mynster T, Dybkjoer E, Kronborg G et al (1998) Immunomodulating effect of blood transfusion: is storage time important? *Vox Sanguinis* 74: 176-81.
- Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V et al (2007) Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 13 (7): 828-835.
- Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI et al (2010) Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 184 (6): 3106-3116.
- Nagaraj S, Nelson A, Youn JI et al (2012) Antigen-specific CD4(+) T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling. *Cancer Res* 72 (4): 928-938.

- Naji A (1996) Induction of tolerance by intrathymic inoculation of alloantigen. *Current Opinion in Immunology* 8: 704-9.
- Nickel R, Horan J, Fasano R et al (2015) Immunophenotypic parameters and RBC alloimmunization in children with sickle cell disease on chronic transfusion. *American Journal of Hematology* 90(12): 1135–1141.
- Nielsen HJ, Hammer JH, Moesgaard F et al (1991) Comparison of the effects of SAG-M and whole-blood transfusions on postoperative suppression of delayed hypersensitivity. *Canadian Journal of Surgery* 34: 146-50.
- Nielsen HJ, Reimert CM, Pedersen AN et al (1996) Time-dependent, spontaneous release of white cell and platelet-derived bioactive substances from stored human blood. *Transfusion* 36: 960-5.
- Offner PJ, Moore EE, Biffl WL (2002) Increased rate of infection associated with transfusion of old blood after severe injury. *Archives of Surgery* 137: 711-6.
- Okamoto M, Fukushima Y, Kouwaki T et al (2018) MicroRNA-451a in extracellular, blood-resident vesicles attenuates macrophage and dendritic cell responses to influenza whole-virus vaccine. *The Journal of Bio. Chem.* 293(48): 18585– 18600.
- Opelz G, Sengar DP, Mickey MR et al (1973) Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc* 5: 253-9.
- Pandey P, Chaudhary R, Aggarwal A et al (2010) Transfusion-associated immunomodulation: Quantitative changes in cytokines as a measure of immune responsiveness after one time blood transfusion in neurosurgery patients. *Asian Journal of Transfusion Science* 4(2): 78-85.
- Pang Y, Baoying Z, Simpson L et al (2012) Neuron-oligodendrocyte myelination co-culture derived from embryonic rat spinal cord and cerebral cortex. *Brain Behav* 2(1): 53–67.
- Perez RV, Swanson C, Morgan M et al (1997) Portal venous transfusion up-regulates Kupffer cell cyclooxygenase activity: a mechanism of immunosuppression in organ transplantation. *Transplantation* 64(1): 135-139.
- Peters WR, Fry RD, Fleshman JW et al (1989) Multiple blood transfusions reduce the recurrence rate of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 32: 749-53.
- Piccin A, Murphy WG, Smith OP (2007) Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 21(3):157-71.
- Pisitkun T, Shen R, Knepper M (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci* 101(36): 13368–13373.
- Prado CM, Lieffers JR, McCargar LJ et al (2008) Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol* 9(7): 629-35.

- Puppo F, Contini P, Ghio M et al (2000) Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes. *International Immunology* 12: 195-203.
- Purdy FR, Tweeddale MG, Merrick PM (1997) Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients. *Canadian Journal of Anesthesia* 44: 1256-61.
- Qing L, Chen H, Tang J, Jia X (2018) Exosomes and their MicroRNA cargo: new players in peripheral nerve regeneration. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 32(9): 765–776.
- Quah BJ, O'Neill HC (2007) Mycoplasma contaminants present in exosome preparations induce polyclonal B cell responses. *J Leukoc Biol* 82(5):1070-82.
- Raghavan M, Marik PE (2005) Anemia, allogenic blood transfusion, and immunomodulation in the critically ill. *Chest* 127: 295–307.
- Raposo G, Nijman H W, Stoorvogel W et al (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *JEM Home* 183 (3): 1161.
- Ren Y, Yang J, Xie R et al (2011) Exosomal-like vesicles with immune-modulatory features are present in human plasma and can induce CD4+ T-cell apoptosis in vitro. *Transfusion* 51(5): 1002–1011.
- Ristorcelli E, Beraud E, Verrando P et al (2008) Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells. *FASEB J* 22(9): 3358-69.
- Sadallah S, Eken C, Schifferli JA (2008) Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties. *J Leukoc Biol* 84(5): 1316–1325.
- Schiller M, Parcina M, Heyder P et al (2012) Induction of type I IFN is a physiological immune reaction to apoptotic cell-derived membrane microparticles. *J Immunol* 189(4): 1747–1756.
- Schageman J, Zeringer E, Li M et al (2013) The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA Cargo. *Biomed Res Int* 2013:253957.
- Schorey JS, Bhatnagar S (2008) Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 9: 871-881.
- Segura E, Nicco C, Lombard B et al (2005) ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106(1): 216-23.
- Shojaei F, Wu X, Qu X et al (2009) G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 6742–7.
- Silliman CC, Moore EE, Kelher MR et al (2011) Identification of lipids that accumulate during the routine storage of prestorage leukoreduced red blood cells and cause acute lung injury. *Transfusion* 51: 2549-54.

- Singal D, Leber B, Harnish D (1991) Molecular genetic basis for the antiidiotypic antibody response associated with successful renal allograft survival in humans. *Transplantation Proceedings* 23: 1059- 61.
- Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S (2005) Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol* 174 (2): 636-645.
- Solito S, Bronte V, Mandruzzato S (2011) Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* 90 (1): 31-36.
- Srivastava MK, Sinha P, Clements VK et al (2010) Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res* 70 (1): 68-77.
- Stenvist A, Nagaeva O, Baranov V et al (2013) Exosomes Secreted by Human Placenta Carry Functional Fas Ligand and TRAIL Molecules and Convey Apoptosis in Activated Immune Cells, Suggesting Exosome-Mediated Immune Privilege of the Fetus. *J Immunol* 191 (11): 5515-5523.
- Strasser EF, Happ S, Weiss DR (2013) Microparticle detection in platelet products by three different methods. *Transfusion* 53(1): 156–166.
- Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M et al (2011) Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 30: 83–95.
- Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C (2006) Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol* 176(3): 1534-42.
- Taylor DD, Gercel C (2011) Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Seminars in Immunopathology* 33: 441-54.
- Terasaki PI (1984) The beneficial transfusion effect on kidney graft survival attributed to clonal deletion. *Transplantation*: 37(2): 119-25.
- They C, Boussac M, Véron P et al (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166: 7309-7318.
- They C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2(8): 569–579.
- They C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses 9(8): 581-93.
- They C, Amigorena S, Raposo G (2013) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 3: 3-22.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S et al (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319(5867): 1244-7.

- Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr et al (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 645(1): 63-70.
- Vamvakas EC, Blajchman MA et al (2001) Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction. *Blood* 97: 1180-95.
- Vamvakas EC, Blajchman MA (2007) Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update. *Blood Reviews* 21: 327-48.
- van den Boorn JG, Schlee M, Coch C et al (2011) SiRNA delivery with exosome nanoparticles. *Nat Biotechnol* 29: 325-326.
- Van De Watering L, Hermans J et al (1998) Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Circulation* 97: 562-8.
- Van der Pol E, Böing AN, Harrison P et al (2012) Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 64: 676-705.
- Vasina EM, Cauwenberghs S, Feijge MA et al (2011) Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell Death Dis* 2: e211.
- Veron P, Segura E, Sugano G et al (2005) Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis* 35(2): 81-8.
- Viaud S, Terme M, Flament C et al (2009) Dendritic Cell-Derived Exosomes Promote Natural Killer Cell Activation and Proliferation: A Role for NKG2D Ligands and IL-15R $\alpha$ . *PLoS ONE* 4(3): e4942.
- Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C et al (2014) Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 28: 3-13.
- Walker JD, Maier CL, Pober JS (2009) Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J Immunol* 182(3): 1548-59.
- Waymack JP, Gallon L, Barcelli U (1986) Effect of blood transfusions on macrophage function in a burned animal model. *Current Surgery* 43: 305-7.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G et al (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7(3): 297-303.
- Wood ML, Gottschalk R, Monaco AP (1988) Effect of blood transfusion on IL-2 production. *Transplantation* 45: 930-5.
- Yan HH, Pickup M, Pang Y et al (2010) Gr-1+CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. *Cancer Res* 70: 6139-49.
- Youn JI, Gabrilovich DI (2010) The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* 40 (11): 2969-2975.

Zallen G, Offner P, Moore EE (1999) Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *The American Journal of Surgery* 178: 570-2.

Zhang J, Xie F, Delzell E, Chen L et al (2013) Trends in the use of biologic agents among rheumatoid arthritis patients enrolled in the US medicare program. *Arthritis Care Res* 65(11): 1743-51.

Zhang B, Yin Y, Lai RC, Lim SK (2014) Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol* 5:518.

Zhu X, Yu B, You P et al (2012) Ubiquitin released in the plasma of whole blood during storage promotes mRNA expression of Th2 cytokines and Th2-inducing transcription factors. *Transfusion and Apheresis Science* 47(3): 305-311.

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A et al (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4(5): 594-600.

## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

Ab	: Antikor
ASH	: Antijen Sunan Hücre
BHR	: B-Hücre reseptörü
CD	: Cluster of differentiation
DH	: Dendritik Hücre
ESCRT	: Endosomal sorting complex responsible for transport
EV	: Extracellular vesicle
Exo	: Exosome
FasL	: Fas ligand
Ig	: Immunoglobulin
ICAM	: Intercellular Adhesin Molecule
HSP	: Heat shock protein
HIV	: Human Immunodeficiency virüs
IL	: Interleukin
ILV	: Intraluminal vesicle
IFN- $\gamma$	: Interferon-gamma
IP	: Interferon induced protein
LBP	: LPS-binding protein
LPS	: Lipopolysaccharide
MHC	: Major Histocompatibility Complex
miRNA	: Micro RNA
mtDNA	: Mitochondrial DNA
MV	: Microvesicle
MVE	: Multivesicular Body
MSC	: Mesenchymal stem cell
NK	: Natural killer



NO	: Nitrik oxide
NOD	: Nucleotide-binding oligomerization domain
ODN	: Oligodeoxynucleotide
PAMP	: Pathogen associated molecular patterns
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
Pdc	: Plasmacytoid dendritic cells
PRR	: Pattern recognition receptors
PS	: Phosphatidylserine
RIG	: Retinoic acid inducible gene
RIP	: Receptor-interacting protein
TCR	: T-cell receptor
TF	: Transcription factor
Th	: T-helper
TIR	: Toll/IL-1 receptor
TLR	: Toll-like Receptor
TNF	: Tumor Necrosis Factor
Treg	: Regulatory T-cell
AKT	: Allojenik Kan Transfüzyonunun
ES	: Eritrosit Süspansiyon
TRIM	: Transfüzyonla İlişkili İmmün Modülasyon
MDSC	: Myeloid Derived Suppressor Cell
GVHD	: Kronik Graft Versus Host Disease
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle edici faktoru
TSAP6	: Tümör Baskılayıcı Aktive Edilmiş yol-6
MFGE8	: Milk Fat Globule EGF Factor 8
MNH	: Mononükleer hücreler
Tc	: Sitotoksik T hücre
PS	: Fosfatidilserin

## 8. EKLER

EK1. kullanılan eksozom miktarı

Bağışçılar listesi		BCA değerleri (µg/µl)	Eksozom miktarı (µl)
B1-0	NLR	297	17 µl
	LR	284	18 µl
B2-0	NLR	276	18.50 µl
	LR	290	17.50 µl
B3-0	NLR	270	18.50 µl
	LR	263	19 µl
B4-0	NLR	266	19 µl
	LR	231	22 µl
B5-0	NLR	260	19.50 µl
	LR	286	17.50 µl
B6-0	NLR	268	19 µl
	LR	238	21.50 µl
B7-0	NLR	337	15v µl
	LR	178	28 µl
B8-0	NLR	281	18 µl
	LR	191	26 µl
B9-0	NLR	202	25 µl
	LR	214	24 µl
B10-0	NLR	269	19 µl
	LR	401	13 µl

Bağışçılar listesi		BCA değerleri (µg/µl)	Eksozom miktarı (µl)
B1-14	NLR	332	17 µl
	LR	308	18 µl
B2-14	NLR	297	17 µl
	LR	375	15 µl
B3-14	NLR	240	21 µl
	LR	259	20 µl
B4-14	NLR	336	15 µl
	LR	273	19 µl
B5-14	NLR	272	18.50 µl
	LR	293	17 µl
B6-14	NLR	342	15 µl
	LR	271	18.50 µl
B7-14	NLR	349	15 µl
	LR	297	17 µl
B8-14	NLR	367	14 µl
	LR	276	18.50 µl
B9-14	NLR	247	20 µl
	LR	249	20 µl
B10-14	NLR	281	18 µl
	LR	330	16 µl

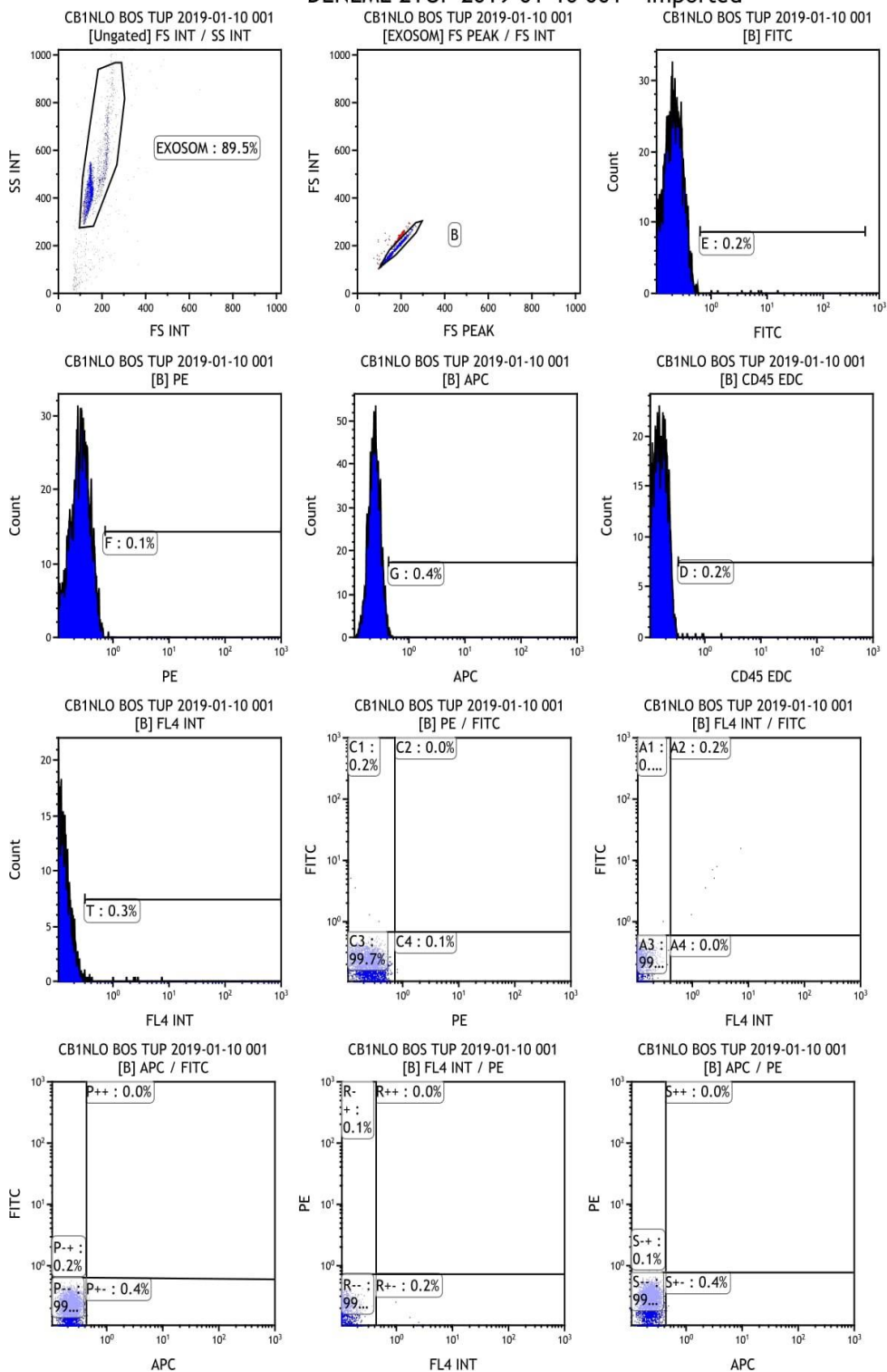
EK2. kullanılan eksozom miktarı

Bağışçılar listesi		BCA değerleri (µg/µl)	Eksozom miktarı (µl)
B1-21	NLR	362	14 µl
	LR	397	13 µl
B2-21	NLR	348	14.5 µl
	LR	352	14.5 µl
B3-21	NLR	297	17 µl
	LR	240	21 µl
B4-21	NLR	274	18.5 µl
	LR	296	17 µl
B5-21	NLR	273	18.5 µl
	LR	295	17 µl
B6-21	NLR	332	15 µl
	LR	246	20 µl
B7-21	NLR	238	21 µl
	LR	226	22 µl
B8-21	NLR	293	17 µl
	LR	216	23 µl
B9-21	NLR	182	28 µl
	LR	221	23 µl
B10-21	NLR	262	19 µl
	LR	283	18 µl

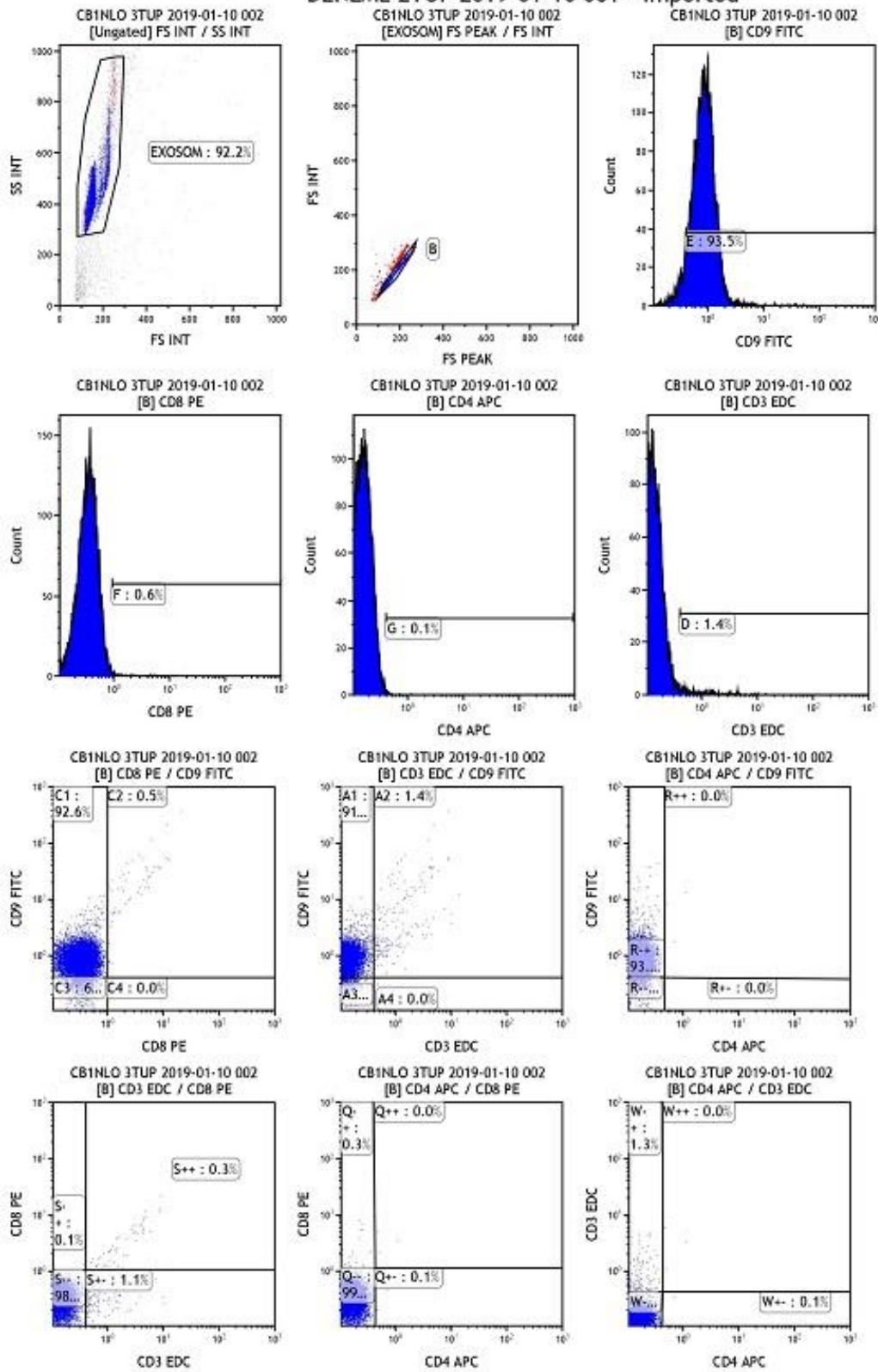
Bağışçılar listesi		BCA değerleri (µg/µl)	Eksozom miktarı (µl)
B1-42	NLR	373	14 µl
	LR	262	19 µl
B2-42	NLR	366	14 µl
	LR	334	15 µl
B3-42	NLR	274	18.5 µl
	LR	289	17.5 µl
B4-42	NLR	352	14.5 µl
	LR	301	17 µl
B5-42	NLR	308	16.5 µl
	LR	301	17 µl
B6-42	NLR	311	16 µl
	LR	329	15.5 µl
B7-42	NLR	285	17.5 µl
	LR	252	20 µl
B8-42	NLR	232	22 µl
	LR	236	22 µl
B9-42	NLR	301	17 µl
	LR	214	24 µl
B10-42	NLR	268	19 µl
	LR	232	21.5 µl

EK3: Akan Hücre Ölçer sonuçları

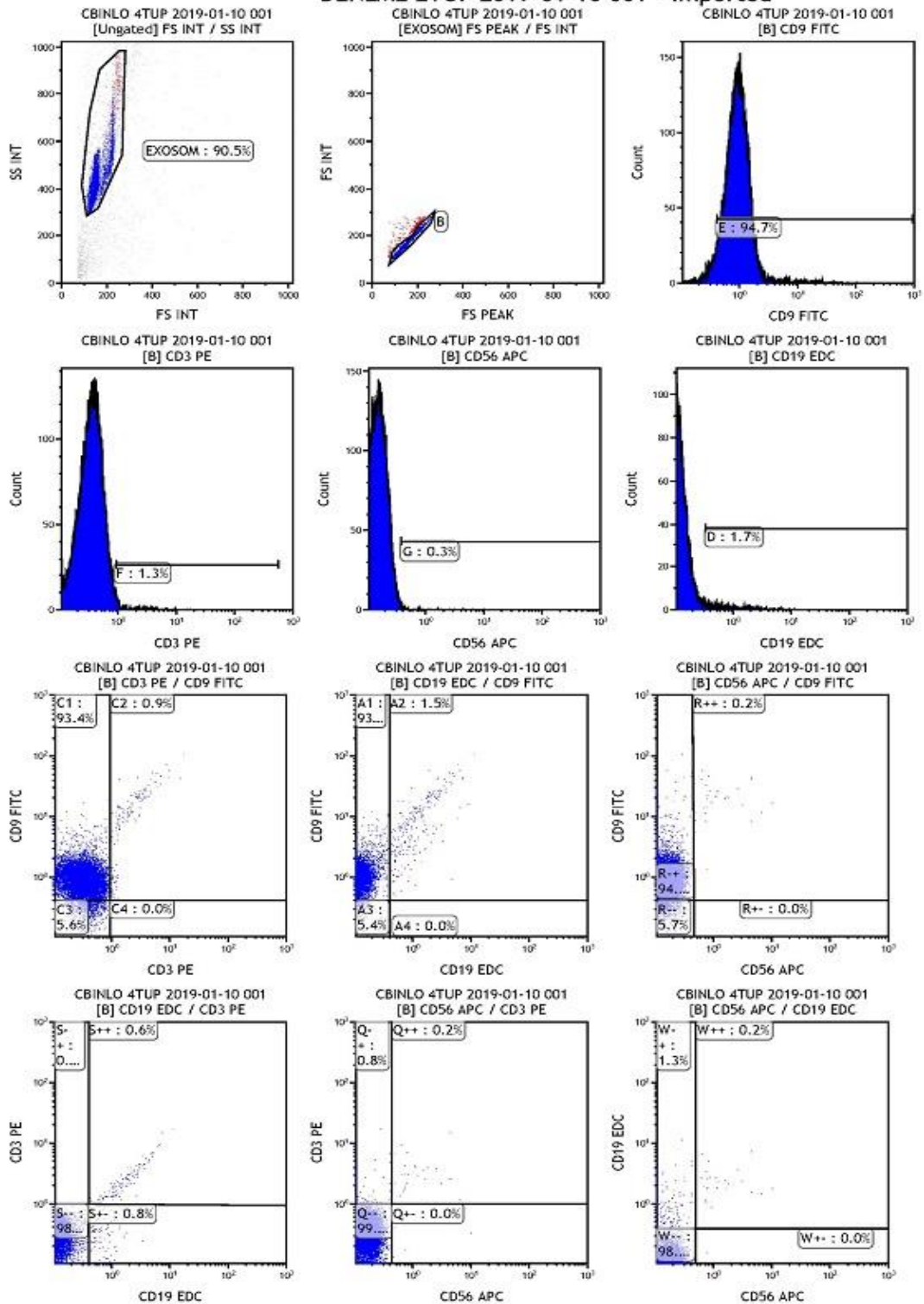
CB1NLO BOS TUP 2019-01-10 001  
DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



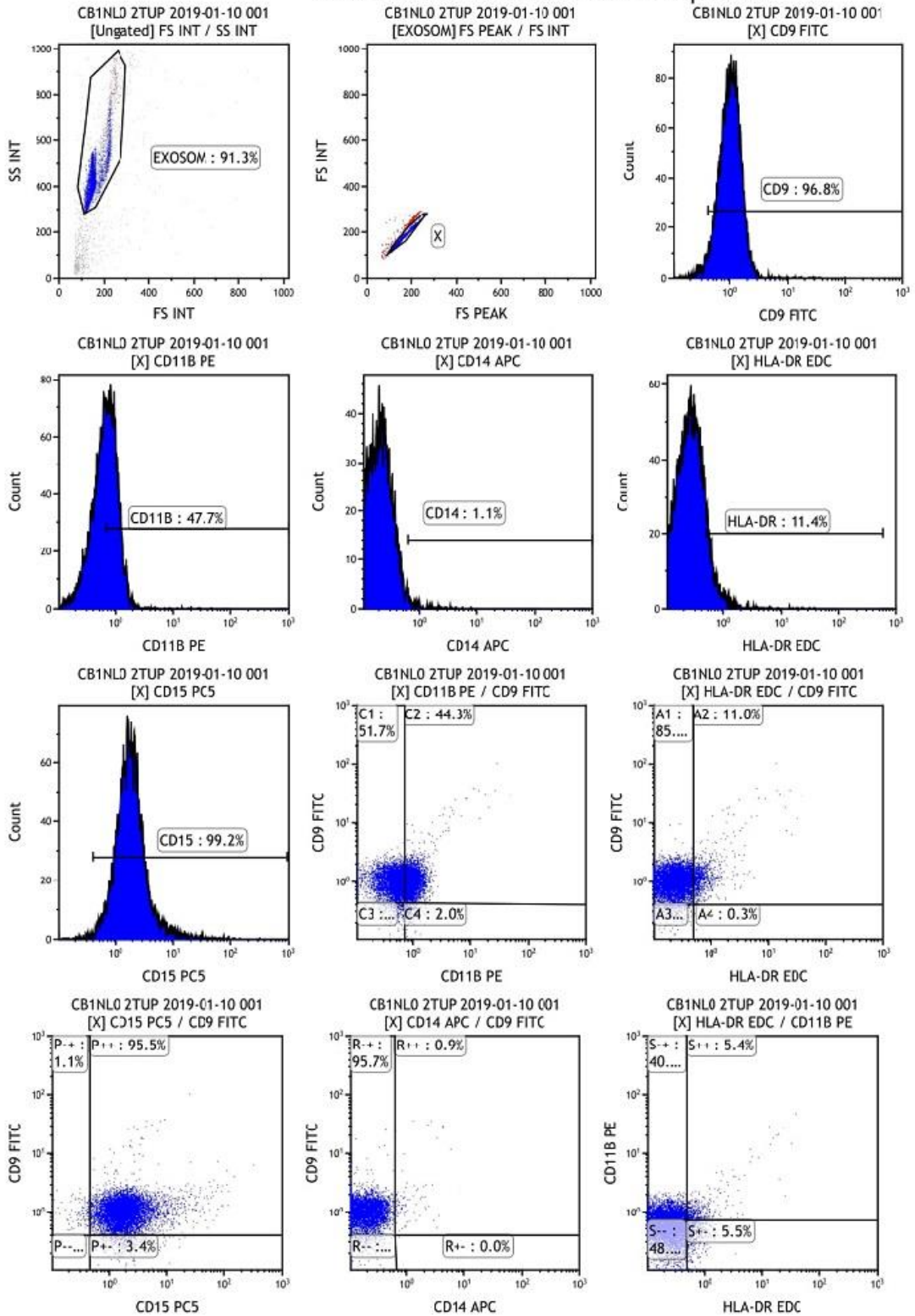
CB1NLO 3TUP 2019-01-10 002  
 DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



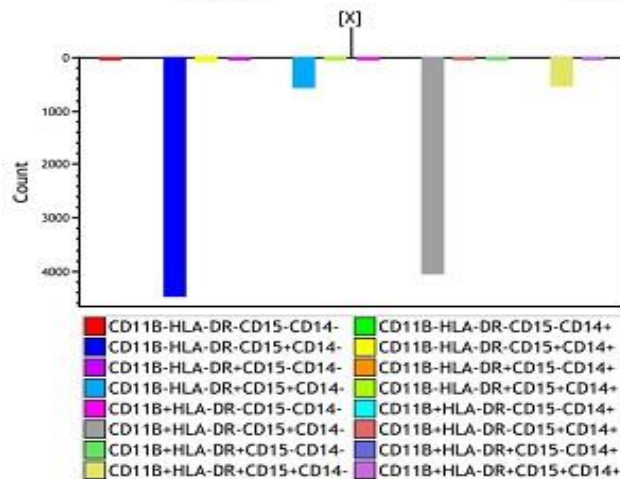
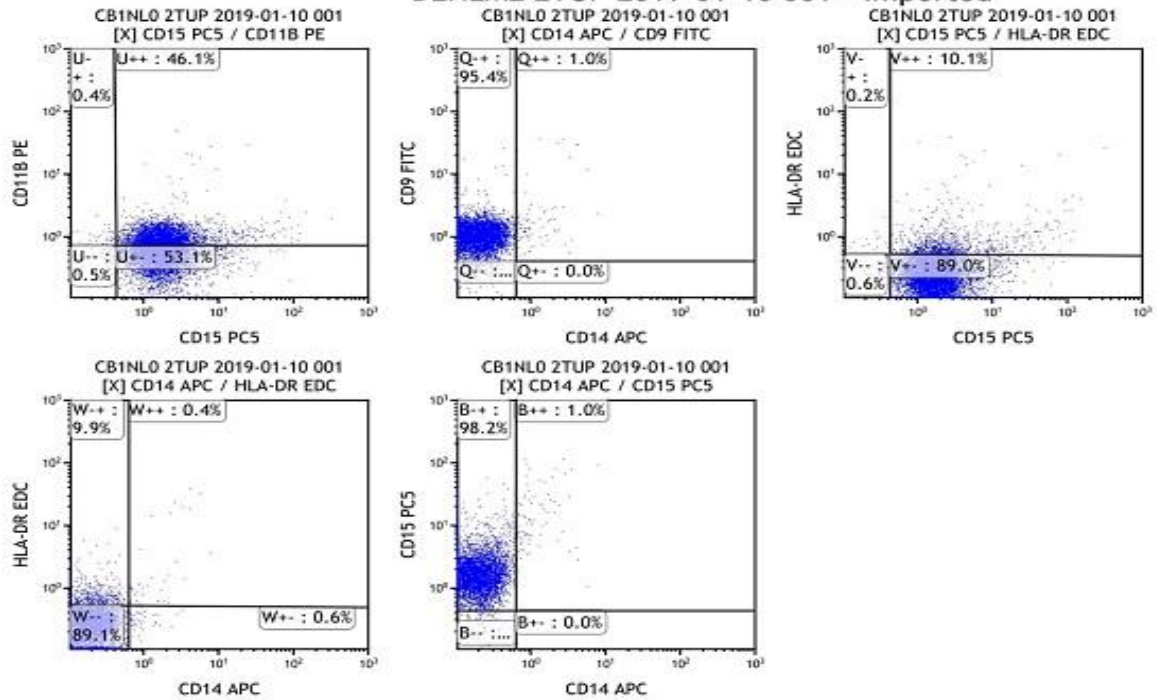
**CBINLO 4TUP 2019-01-10 001  
DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported**



CB1NLO 2TUP 2019-01-10 001  
 DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



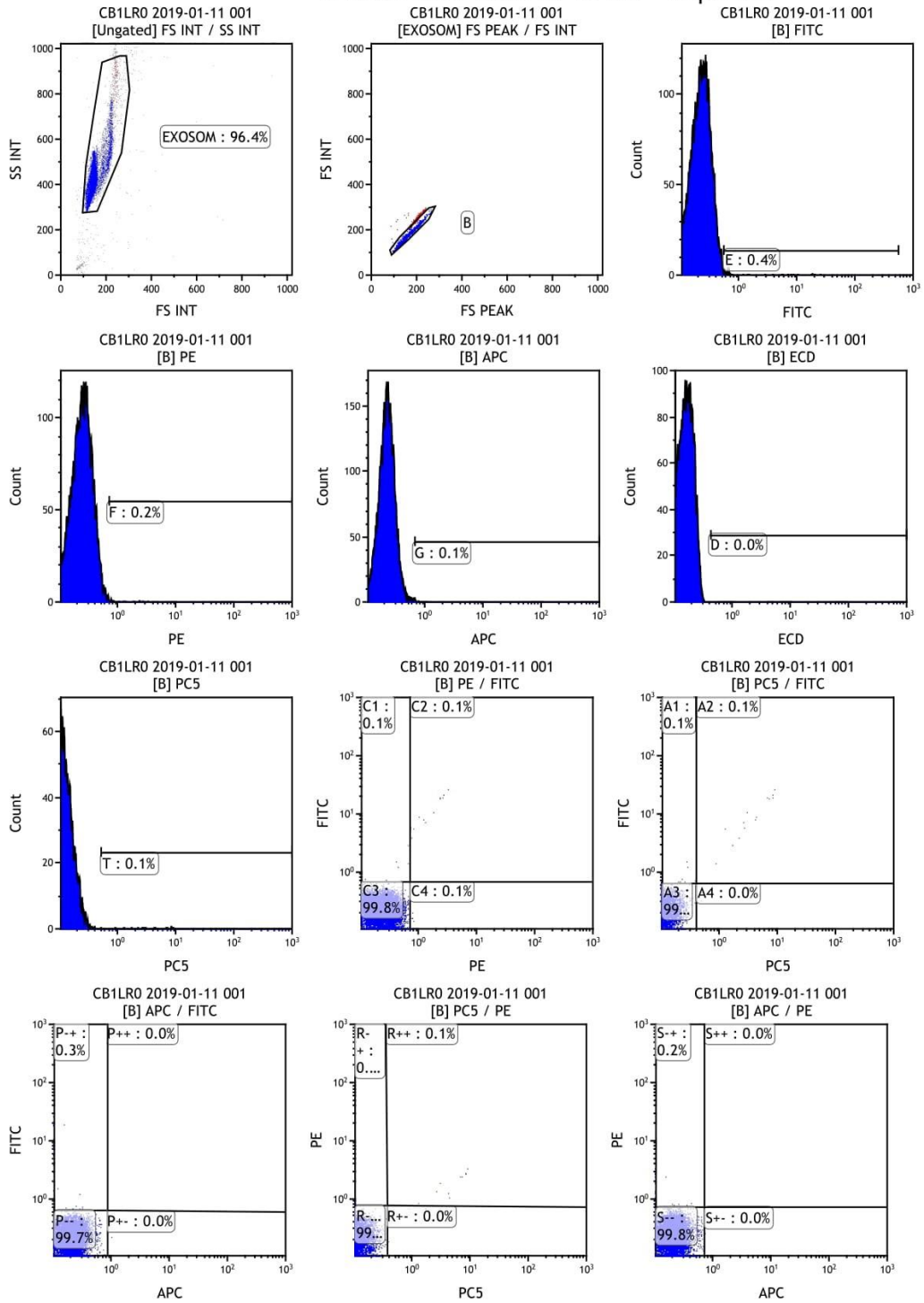
CB1NLO 2TUP 2019-01-10 001  
 DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



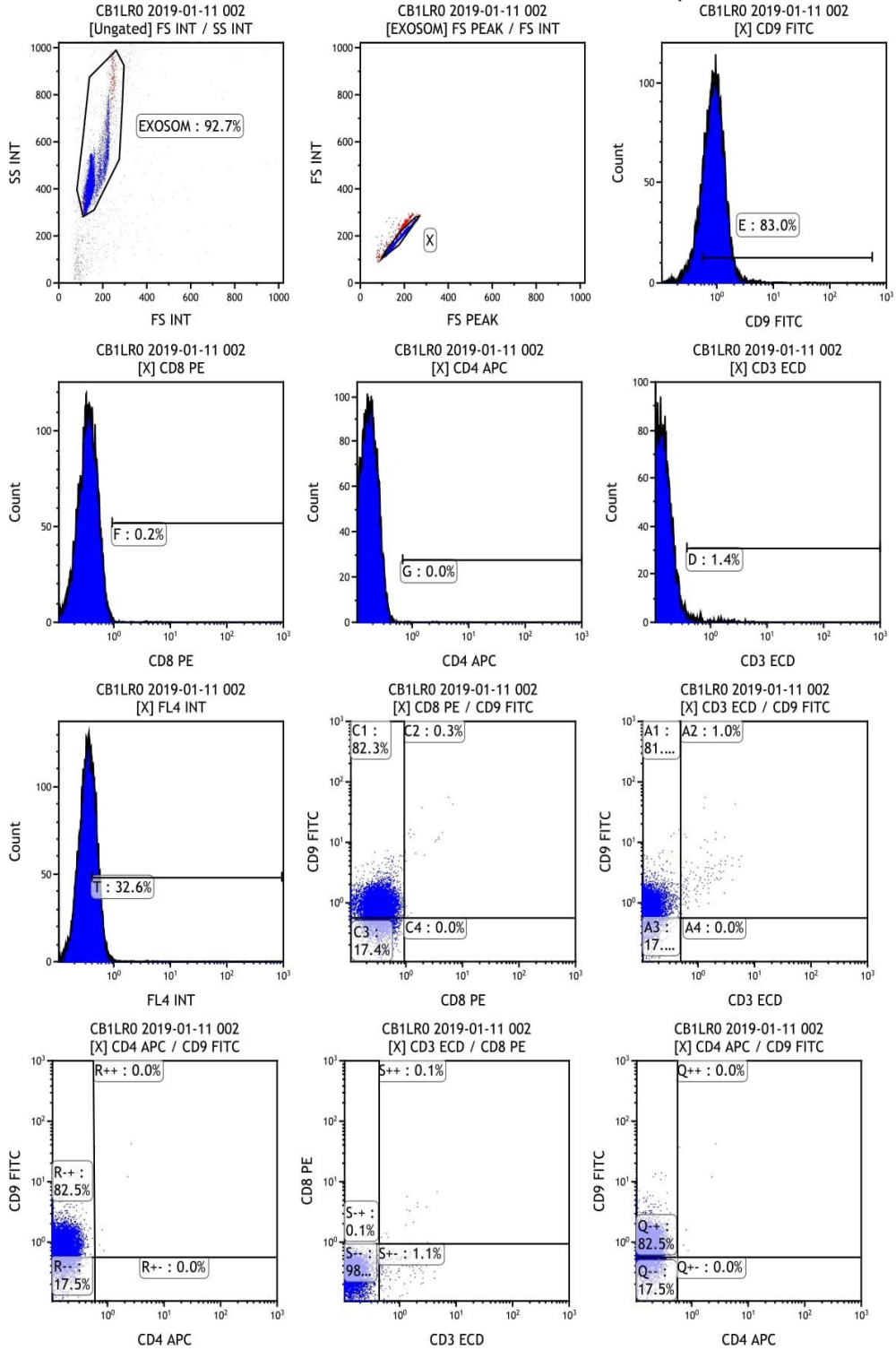
Gate	%Gated
All	100.0
CD11B-HLA-DR-CD15-CD14-	0.3
CD11B-HLA-DR-CD15-CD14+	0.0
CD11B-HLA-DR-CD15+CD14-	45.9
CD11B-HLA-DR-CD15+CD14+	0.4
CD11B-HLA-DR-CD15-CD14-	0.1
CD11B-HLA-DR-CD15-CD14+	0.0
CD11B-HLA-DR-CD15+CD14-	5.4
CD11B-HLA-DR-CD15+CD14+	0.1
CD11B+HLA-DR-CD15-CD14-	0.2
CD11B+HLA-DR-CD15-CD14+	0.0
CD11B+HLA-DR-CD15+CD14-	41.5
CD11B+HLA-DR-CD15+CD14+	0.3
CD11B+HLA-DR+CD15-CD14-	0.1
CD11B+HLA-DR+CD15-CD14+	0.0
CD11B+HLA-DR+CD15+CD14-	5.3
CD11B+HLA-DR+CD15+CD14+	0.3



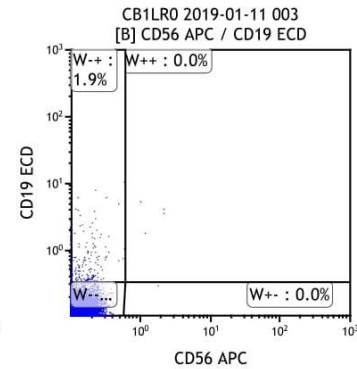
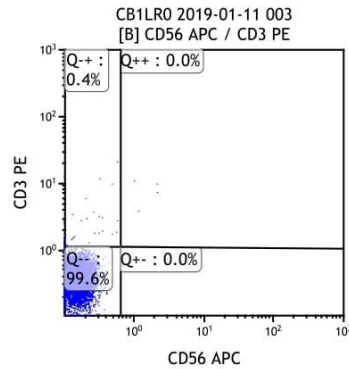
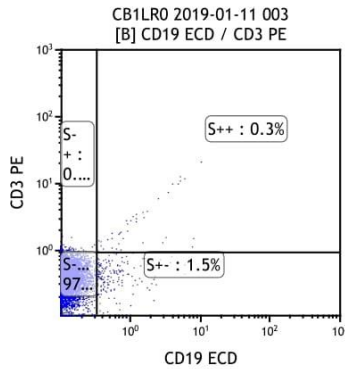
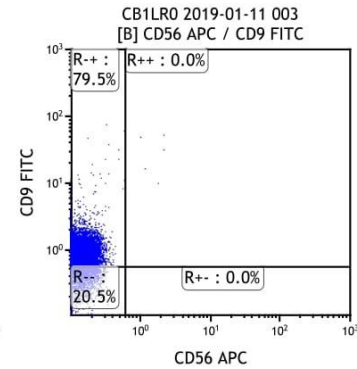
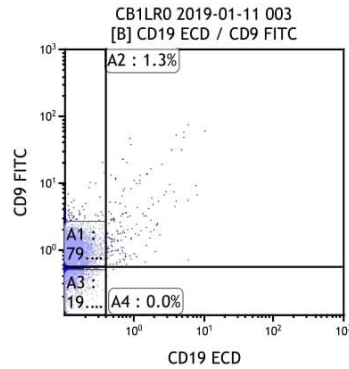
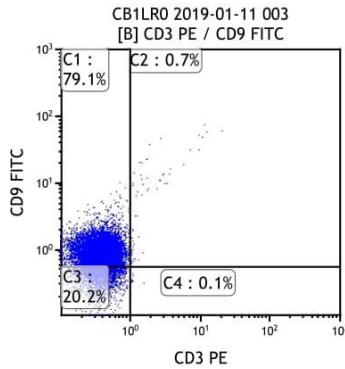
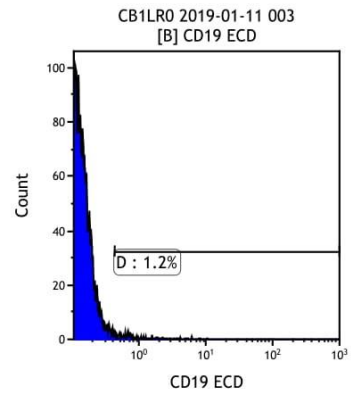
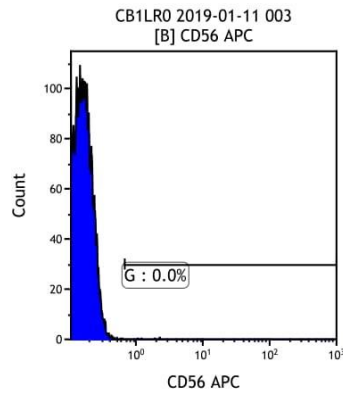
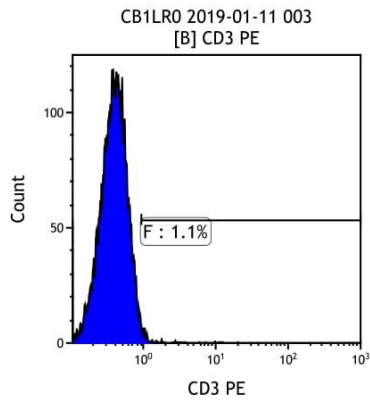
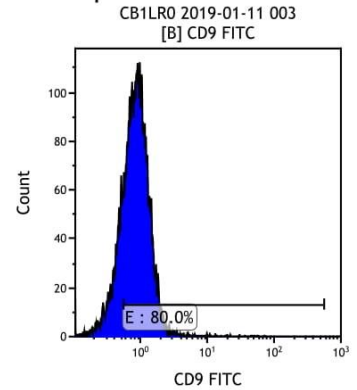
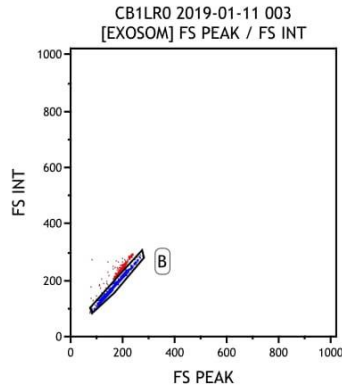
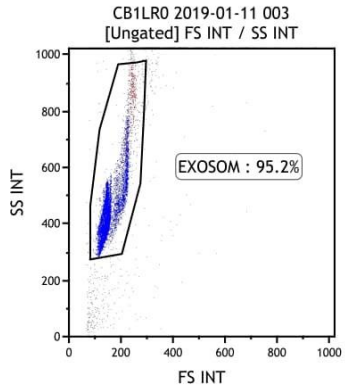
CB1LR0 2019-01-11 001  
 DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



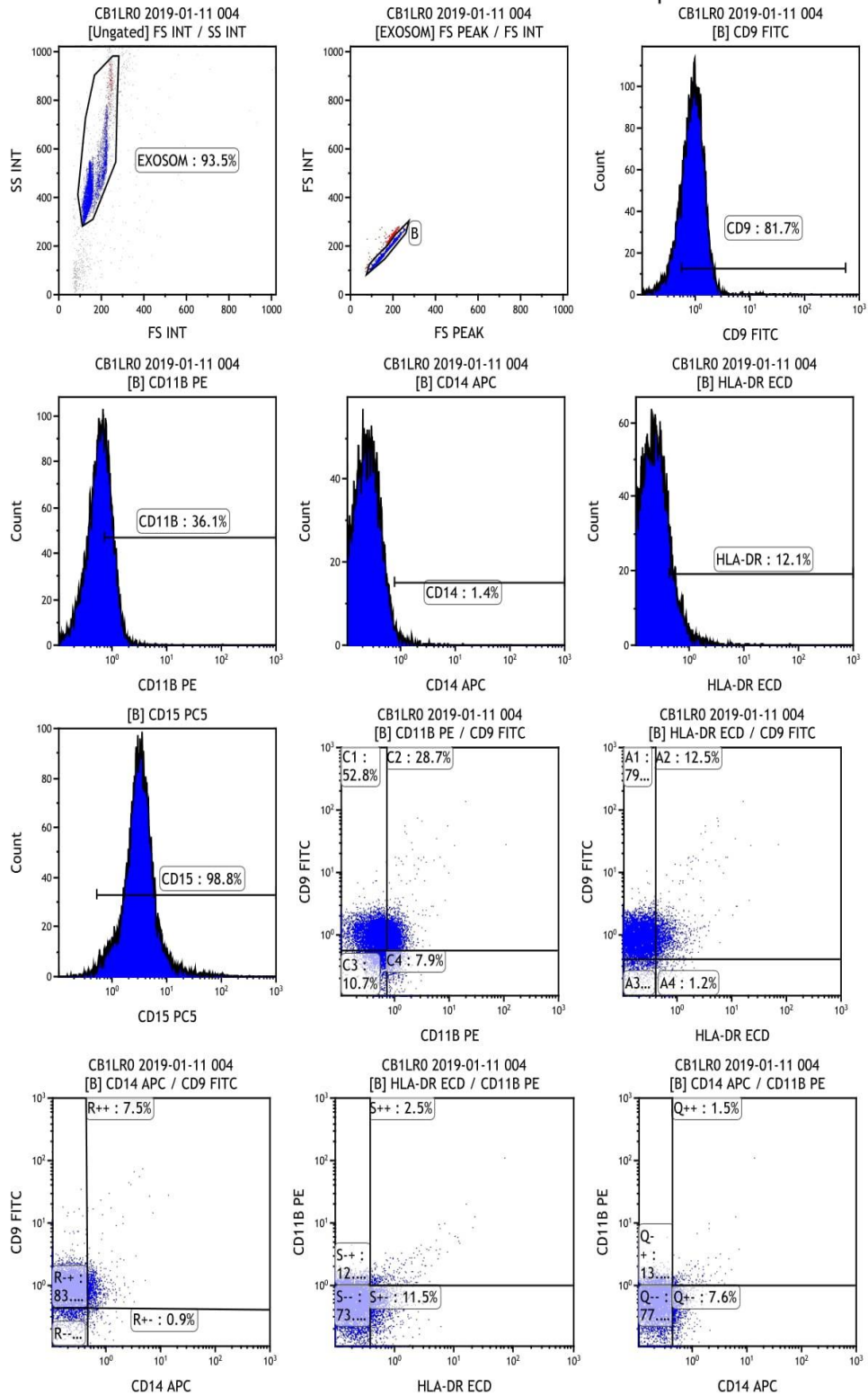
CB1LR0 2019-01-11 002  
 DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



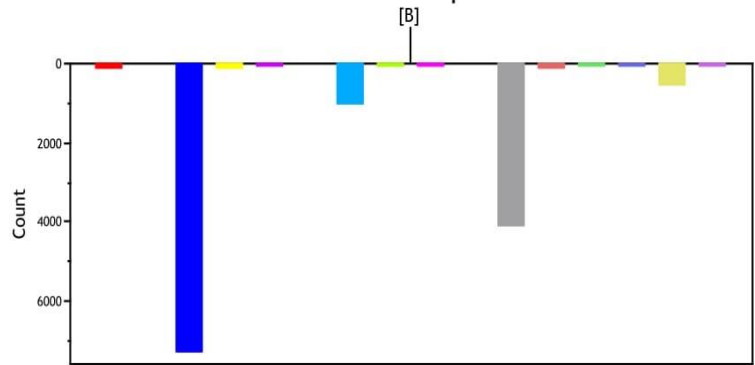
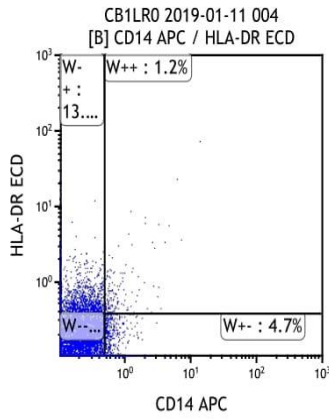
CB1LR0 2019-01-11 003  
 DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



CB1LR0 2019-01-11 004  
 DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



CB1LR0 2019-01-11 004  
 DENEME 2TUP 2019-01-10 001 - Imported



- CD11B-HLA-DR-CD15-CD14-
- CD11B-HLA-DR-CD15+CD14-
- CD11B-HLA-DR-CD15-CD14+
- CD11B-HLA-DR+CD15-CD14-
- CD11B-HLA-DR+CD15+CD14-
- CD11B-HLA-DR+CD15-CD14+
- CD11B-HLA-DR+CD15+CD14-
- CD11B-HLA-DR+CD15+CD14+
- CD11B+HLA-DR-CD15-CD14-
- CD11B+HLA-DR-CD15-CD14+
- CD11B+HLA-DR-CD15+CD14-
- CD11B+HLA-DR-CD15+CD14+
- CD11B+HLA-DR+CD15-CD14-
- CD11B+HLA-DR+CD15-CD14+
- CD11B+HLA-DR+CD15+CD14-
- CD11B+HLA-DR+CD15+CD14+

Gate	%Gated
All	100.0
CD11B-HLA-DR-CD15-CD14-	0.6
CD11B-HLA-DR-CD15-CD14+	0.0
CD11B-HLA-DR-CD15+CD14-	55.1
CD11B-HLA-DR-CD15+CD14+	0.5
CD11B-HLA-DR+CD15-CD14-	0.2
CD11B-HLA-DR+CD15-CD14+	0.0
CD11B-HLA-DR+CD15+CD14-	7.4
CD11B-HLA-DR+CD15+CD14+	0.1
CD11B+HLA-DR-CD15-CD14-	0.2
CD11B+HLA-DR-CD15-CD14+	0.0
CD11B+HLA-DR-CD15+CD14-	31.0
CD11B+HLA-DR-CD15+CD14+	0.5
CD11B+HLA-DR+CD15-CD14-	0.1
CD11B+HLA-DR+CD15-CD14+	0.0
CD11B+HLA-DR+CD15+CD14-	4.0
CD11B+HLA-DR+CD15+CD14+	0.3

## 9. TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım süresince bana rehber olan, çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum danışman hocam Prof. Dr. H. Barbaros ORAL'a,

Doktora öğrenimim boyunca tez çalışmama yardımcı olan, manevi desteğini esirmeyen ve bana her zaman vakit ayıran hocam Prof. Dr. Ferah BUDAK'a,

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleriyle bana birçok konuda yardımcı olan değerli abim Dr. Salih Haldun BAL'a

Çalışmam için kanlarını bağışlayan değerli kan bağışçısı kardeşlerim, bağışçılardan kanların alınması, işlenmesi, akan hücre ölçer çalışmalarında büyük emek harcayan başta sevgili Figen AYMAK ve Deniz GÜLKAYA olmak üzere tüm İmmünoloji laboratuvarı çalışanı dostlarıma teşekkür ederim. Takım ruhunun enerjisini, paylaşımın gücünü ve fedakarlığın büyüklüğünü yaşattınız.

Desteklerini esirgemeyen ve beni yüreklendiren sevgili arkadaşlarıma, Gülsüm ITAK, Sema SONMEZ, Pınar HIZ, Elif ARDAHANLI teşekkür ederim.

Beni hayatımın her döneminde destekleyen, kararlarıma her zaman saygı duyan ve uzakta olsalar bile bunu hissettirmeyen sevgili babam, annem ve abım,

Çalışmamıza maddi katkıda bulunan BAP'a (DDP(T)-2017/9) nolu "Eritrosit Süspansiyonlarının Depolanma Sürecinde Eksozom/Mikropartikül Profilineki Değişiklikler İncelenmesi" isimli proje, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

12.08.1985 tarihinde Tabriz’da (İRAN) doğdu. Lise öğrenimini Alavi Lisesinde tamamlamıştır. 2003 yılında Tabriz Üniversitesi sağlık Bilimleri Fakültesinde Veterinerlik bölümünde başladığı lisans eğitimini 2009 yılında tamamlamıştır. 2014 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji (İmmünoloji) Anabilim dalında doktora eğitimine başlamıştır.

