T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

HİPOKSİK ORTAMIN MİKROVEZİKÜLLERE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Nur Seda ŞAHİN

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin GÖNEN

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2019
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

HİPOKSİK ORTAMIN MİKROVEZİKÜLLERE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Nur Seda ŞAHİN

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin GÖNEN

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TYL-2017-7712 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ağustos 2019
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Nur Seda ŞAHİN

YÖNERGEYE UYGUNLUK

"Hipoksik Ortamın Mikroveziküllere Etkisinin Değerlendirilmesi" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Nur Seda ŞAHİN

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin GÖNEN

Kök Hücre Bilimleri ABD Başkanı
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin GÖNEN danışmanlığında **Nur Seda ŞAHİN** tarafından hazırlanan **"Hipoksik Ortamın Mikroveziküllere Etkisinin Değerlendirilmesi"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Kök Hücre Bilimleri** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

19 / 08 / 2019

JÜRİ:

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin GÖNEN .....

(Erciyes Üniversitesi Halil Bayraktar S.H.M.Y.O. Dişçilik Hizmetleri Bölümü)

Üye: Doç. Dr. Gökçen DİNÇ .....

(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Halis Ali ÇOLPAK .....

(Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgi ve katkılarıyla yol gösteren, sonsuz sabırla beni her zaman çalışmaya teşvik eden gerek akademik gerekse sivil hayatta desteğini ve emeğini asla esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin GÖNEN'e,

Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkez Müdürü Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL ve Mesul Müdür Sayın Prof. Dr. Mustafa ÇETİN hocalarıma,

Deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardım ve emeğini esirgemeyen hocam Öğr. Gör. Dilek BAHAR ve Bio. Buket Banu ÖZKAN' a,

Çalışmalarım süresince benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, hayatımın her evresinde sabır göstererek beni daima destekleyen aileme ve nişanlım Burak Emre GÖKDEMİR'e,

Ayrıca; bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TYL-2017-7712) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Nur Seda ŞAHİN

Kayseri, Ağustos 2019

HİPOKSİK ORTAMIN MİKROVEZİKÜLLERE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nur Seda ŞAHİN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2019
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin GÖNEN

ÖZET

Günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kök hücreler denenmeye ve/veya kullanılmaya başlanmıştır. Literatürde hastaya hücre uygulamadan hücrelerin etkinliğinden faydalanılan yeni konseptin adı: Hücresiz hücresel tedavilerdir. Bu şekilde hücreler hastaya verilmez ancak hücrenin ürettiği içerik hastaya taşınır. Bu taşınan içerik eksozomları da içeren mikroveziküllerdir. Hipoksi oksijen konsantrasyonunun azalarak kritik eşik değerin altına düştüğü koşulu ifade etmektedir. Çalışmanın amacı, oksijen konsantrasyonunun daha düşük olduğu hipoksik ortamın; elde edilen eksozomlar üzerine etkisini değerlendirmektir.

Bu amaçla, farklı oksijen konsantrasyonlarında (%21, %5, %3) h-UK mezenkimal kök hücreleri ve tam kandan izole edilen nötrofil hücrelerinin kültürü yapıldı ve eksozomları izole edildi. Eksozomlar SEM, partikül boyut analizi ve western blot yöntemi ile tanımlandı. Umblikal kord kaynaklı eksozomların lenfosit proliferasyonuna olan etkisi Kİ67 ve XTT proliferasyon testleri ile belirlenerek etkinlilik analizi yapıldı.

Çalışmanın sonucunda farklı oksijen koşulları ve farklı kaynaklardan başarılı bir şekilde eksozom izolasyonu yapıldı. İzole edilen eksozomların miktarı, miktar tayin kiti ile belirlendi. Çalışılan grupların miktarları hesaplandı ve ortalama miktar 88-93x10^7 olarak ölçüldü. Sonuç olarak %5 hipoksi grubunda daha fazla miktarda eksozom izole edildi ancak gruplar arası yapılan karşılaştırmada miktar olarak bir fark gözlenmedi ($p_{nötrofil}$= 0,22, $p_{h\text{-}UK}$=0.43). SEM analizinde eksozomların çapları h-UK-MKH örneklerinde ortalama 66.07±15.33 nm olarak ölçülürken, nötrofil hücrelerinde ortalama 63.66±5.38 nm olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki %3 hipoksi nötrofil kaynaklı eksozom grubunda daha büyük boyutta eksozom izole edildi ($p<0.001$). Partikül boyut analizinde yapılan ölçüm ile elde edilen sonuçlarda h-UK kaynaklı eksozomların boyutu 68.98 nm olarak hesaplanırken, nötrofil eksozomları 53.35 nm olarak hesaplandı. Western blot

analizinde eksozomlar tarafından CD63 ve CD9 yüzey belirteçlerini eksprese eden protein bantları gösterildi. %3 hipoksi ile elde edilmiş h-UK kaynaklı eksozom grubunun normoksi ve %5 hipoksiye göre, lenfosit proliferasyon testi sonucunda daha etkin olduğu belirlendi ($p<0.001$).

%3 hipoksik koşul varlığı; nötrofil eksozomlarının daha büyük boyutta olmasına ve umbilikal kord eksozomlarının daha etkin olmasına yol açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kök hücre, Hipoksi, Ekstraselüler Vezikül, Eksozom, Hücresiz Hücresel Tedavi

EVALUATION OF THE EFFECT OF HYPOXIA CONDITION ON MICROVESICLES

Nur Seda ŞAHİN

Erciyes University, Graduate School of HealthSciences
Master Thesis, August 2019
Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin GÖNEN

ABSTRACT

At the present time, stem cells are being tested and / or used in the treatment of many diseases. The name of the new concept in the literature, which benefits from the effectiveness of cells without administering cells to the patient, is called Cell-free cellular treatments. In this way, the cells are not delivered to the patient, but the content produced by the cell is transported to the patient. These transported contents are microvesicles, including exosomes. Hypoxia refers to the condition where the oxygen concentration decreases and falls below the critical threshold. The aim of this study was to investigate the hypoxic environment where oxygen concentration was lower; to evaluate the effect on the resulting exosomes.

For this purpose, h-UK mesenchymal stem cells and neutrophil cells isolated from whole blood were cultured at different oxygen concentrations (21%, 5%, 3%) and exosomes were isolated. Exosomes were identified by SEM, particle size analysis and western blot method. The effect of umbilical cord-derived exosomes on lymphocyte proliferation was determined by Ki67 and XTT proliferation tests and efficiency analysis was performed.

As a result of the study, exosome isolation was performed successfully from different oxygen conditions and different sources. The amount of isolated exosomes was determined by the quantification kit, and the amounts of the studied groups were calculated and the average amount was measured as 88-93x107. As a result, more exosomes were isolated in the 5% hypoxia group but no difference was observed in the comparison between the groups ($p_{neutrophil} = 0.22$, $p_{h\text{-}UK} = 0.43$). Diameters of exosomes were measured as 66.07 ± 15.33 in h-UK-MSC samples and 63.66 ± 5.38 in neutrophil cells. Exosomes of larger size were isolated in the 3% hypoxia neutrophil-derived exosome group between the groups ($p<0.001$). In the results obtained by the particle

size analysis, h-UK-derived exosomes were calculated as 68.98 nm, while neutrophil exosomes were calculated as 53.35 nm. Western blot analysis showed protein bands expressing CD63 and CD9 surface markers by exosomes. H-UK-derived exosome group obtained by 3% hypoxia was found to be more effective than lymphocyte proliferation test compared to normoxia and 5% hypoxia ($p<0.001$).

3% presence of hypoxic condition; the neutrophil exosomes are larger in size and the umbilical cord exosomes are more effective.

Keywords: Stem cell, Hypoxia, Extracellular Vesicle, Exosome, Cell-free Cellular Therapy

İÇİNDEKİLER

HİPOKSİK ORTAMIN MİKROVEZİKÜLLERE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4. BÖLÜM
BULGULAR

5. BÖLÜM
TARTIŞMA VE SONUÇ

KISALTMALAR

MKH : Mezenkimal Kök Hücre

ESV : Ekstraselüler Vezikül

HLA : İnsan Lökosit Antijeni

GMP : İyi Üretim/ İmalat Uygulamaları

GVHD : Graft-Versus Host Hastalığı

HIF : Hipoksi Uyarılabilir Faktör

HIF-1α : Hipoksi Uyarılabilir Faktör 1 alfa

dd H_2O : Double distile su

DMSO : Dimetil Sülfoksit

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

NET : Nötrofil hücre dışı tuzakları

NK hücreleri : Doğal öldürücü hücreler

DH : Dendritik hücre

SLE : Sistemik lupus Eritematozus

IFN-α : İnterferon alfa

PBMC : Periferik kan mononükleer hücre

F4 : Akış Alan- Akış Fraksiyon

SEC : Boyut dışlama kromotografisi

HFD : Hidrostatik filtrasyon diyaliz

AML : Akut miyeloid lösemi

CD326 : Epitelyal hücre adezyon molekülü

DİO : Floresan karbosiyanin boyası

EDTA : Etilen diamintetra asetik asit

SDS : Sodyum dodesil sülfat

PAGE : Poliakrilamid jel

SEM : Taramalı elektron mikroskobu

PBS : Phosphate Buffer Salin

FBS : Fötal bovine serum

b-HLH : Bazik Sarmal-Helix-Sarmal

PAS : Per ANRT Sim

HRE : Hipoksi Regülasyon Elementleri

EKH : Embriyonik kök hücre

HKH : Hemopoetik kök hücre

DPKH : Diş pulpa kök hücresi

KPH : Kalp projenitör hücresi

PAEH : Pulmoner arter endotel hücresi

DMOG : Dimetil ogsalil glisin

Tetraspanin : CD9, CD63, CD81

TSG101 : Tümör duyarlılık geni

HSP : Isı şok proteini

İpkh : İndüklenmiş pluripotent kök hücre

h-UK MKH : insan göbek kordonu kök hücresi

PEG : Polietilen glikol

RPMI : Mononükleer hücre büyüme medyumu

α-MEM : Göbek kordonu mezenkimal kök hücre büyüme medyumu

TAUM : Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi

RİPA : Lysis and extraction buffer

PVDF : Poli Vinil Di Florür membran

TBS : Tris Buffer Saline

TBS-t : Tris Buffer Saline- Tween 20

ECL-femto : Enhanced Chemi Luminescence

PHA : Fitohemaglutinin

kDA : Kilo dalton

NEP : Neprisilin

AKI : Akut böbrek hasarı

SCID : Şiddetli kombine immün yetmezlik

SPR : Yüzey plazmon rezonansı

Oct4 : Pluripotens yüzey belirteçleri

NANOG : Pluripotens yüzey belirteçleri

SOX2 : Pluripotens yüzey belirteçleri

CXCR4 : Kemokin ve kemokin reseptörü

G-CSFR : Granülosit koloni uyarıcı faktör reseptörü

MWCO : Moleculer Weight Cut Off

TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

1. GİRİŞ

Günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kök hücreler denenmeye ve/veya kullanılmaya başlamıştır. Kök hücreler ile ilgili deneysel çalışmalar yapılsa da klinik çalışmalar sayıca yetersizdir. Bunun nedeni ise hücrelerin klinikte kullanılmasının önündeki etik süreçler ve canlı ilaç olarak isimlendirilen tedavi ajanının uzun süreç sonuçlarının olmayışındaki eksikliklerdir. Literatürde hastaya hücre uygulamadan hücrelerin etkinliğinden faydalanılan yeni konseptin adı: 'hücresiz hücresel tedaviler'dir. Bu şekilde hücreler hastaya verilmez ancak hücrenin ürettiği içerik hastaya taşınır. Hücre içi içerik ise mikroveziküllerdir. Mezenkimal kök hücreler (MKH), birkaç hücre tipine farklılaşma kabiliyetine sahiptir ve böylece rejeneratif tıp için bir hücre rezervuarı görevi görürler. MKH 'lerin çeşitli hastalıklara terapötik uygulanması konusundaki güncel ilgisinin, immünosüpresif ve anti-inflamatuar özellikleriyle bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. MKH' lerin anti-inflamatuar etkilerinin kilit mekanizmalarından biri, parakrin etkileri olan faktörlerin salgılanmasıdır. Son zamanlarda MKH'lerin parakrin işlevlerinin, ekstraselüler veziküller (ESV) aracılığıyla ortaya çıktığı bilinmektedir (1). ESV' ler ağırlıklı olarak endozomal bölmeden salınır ve orijin hücrelerinden miRNA, mRNA ve protein bir kargo içerirler. Eksozomlar, proteinler, lipidler, mRNAlar, miRNAlar, lncRNAlar (long non-coding), tRNA, genomik DNA, cDNA ve mtDNA gibi birçok biyoaktif molekülü içermektedir (1).

Hücre içi iletişim, çok hücreli organizmaların temel bir özelliğidir ve direkt hücre-hücre teması veya salgılanan moleküllerin aktarımı yoluyla olabilir (2). ESV' ler içerikleri kontrol edilebilen veya modüle edilebilen biyolojik süreçler pıhtılaşma, lokal inflamasyon, hücre farklılaşması, vasküler yaşlanma ve yeniden şekillenmeyi içerirler. ESV'ler bir hücre tarafından hücre dışı alana salınırlar ve eksozomlar, mikro veziküller veya ektozomlar ve apoptotik cisimler olarak 3 gruba ayrılırlar (3). Eksozomlar ekzositoz ile salınırken, mikroveziküller veya ektozomlar plazma membranının dışarıya doğru tomurcuklanarak salgılanır. Apoptotik cisimler ölü hücreler tarafından apoptozun sonraki evreleri boyunca serbest bırakılır, böylece hücre atıkları bağışıklık sistemi

hücreleri tarafından kolaylıkla ortadan kaldırılabilir (4). Eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimler gibi ESV' ler, hücreler tarafından *in vitro* olarak kültür ortamına salınır. Ayrıca *in vivo* olarakta doğal ortamlarına salınırlar ve kan, idrar, amniyon sıvısı, anne sütü, seminal sıvı, tükrük ve malign efüzyonlarda bulunurlar. Salınan veziküllerden eksozomların boyutu homojen iken, diğer mikroveziküllerin boyutları heterojen ve hücre içi orijinlidir. Eksozomlar, plazma membranının multivesiküler cisimcikler olarak adlandırılan spesifik endozomal bölmelerle kaynaştırılması yoluyla üretilirken, mikroveziküller plazma membranından dışa tomurcuklanarak oluşturulur (5).

Son zamanlarda MKH' ler, hücre tedavisi ve rejeneratif tıbba yönelik umut verici bir araç olarak dikkat çekmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında daha çok büyüme faktörlerinin, besin maddelerinin ve pH gibi özelliklerin hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kültür ortamında bu özelliklerden en az araştırılanı ise oksijen koşullarıdır. Bunun sebebi çalışmalarda atmosferik oksijenin hücre büyümesi için yeterli olduğunun düşünülmesidir (6). Oksijen, tüm hücresel fonksiyonların gerçekleşmesi için gerekli temel moleküldür. Laboratuvar ortamında kültüre edilen hücreler deniz seviyesinde yaklaşık 150 mmHg PO_2'ye karşılık gelen %21'lik oksijen konsantrasyonuna ihtiyaç duyarken; insan vücudundaki hücreler normoksik şartlarda (40-100 mmHg)' lık bir oksijen konsantrasyonda yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Oksijen konsantrasyonunun azalarak kritik eşik değer olan %6' nın altına düştüğü; organ, doku ve hücrelerin fonksiyonlarının duraksadığı ve hatta bozulduğu durumlar ise hipoksik koşullar olarak ifade edilmektedir (6).

MKH' ler özellikle adipoz kökenli kök hücreler, düşük oksijen seviyesindeki bölgede (<%3-5) bulunmaktadır. Düşük oksijen seviyesi kök hücre mikroçevresi için önemli bileşenlerdendir ve kök hücrelerin özelliklerini devam ettirmeleri için gerekli sinyalleri sağlamaktadır. Kök hücreler mikroçevresinde düşük oksijen seviyesinde bulunmalarına rağmen genellikle %20-21' lik atmosferik oksijen ortamında kültüre edilmektedir (7). Adipoz kökenli kök hücreleri bulunduğu oksijen seviyesinden daha yüksek ortamda kültüre etmek, kök hücrelerin büyüme, farklılaşma, adhezyon yeteneklerini, büyüme faktörlerin salgılanması veya yenileyici potansiyellerini de etkileyebilmektedir. Niş içerisinde hücrelerin düşük oksijen seviyelerinde bulunması kök hücrelere çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Bunlardan birisi düşük oksijen seviyesinde kök hücrelerin enerji metabolizmalarını aerobikten anaerobik metabolizmaya çevirmeleridir. Bu

dönüşüm sayesinde hücrede ROS (reaktif oksijen bileşenleri) üretimi azalarak DNA hasarı düşük seviyeye indirilir (7).

MKH' lerin yenileyici tıpta kullanılmasının önemli bir nedeni de birçok soya farklılaşabilme yetenekleridir. Yapılan çalışmalarla adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin çeşitli soylara farklılaşma potansiyellerinin hipoksik kültür şartlarında arttığı veya azaldığı gösterilmiştir (8).

Hücrelerin tedavi amaçlı kullanımı için işlemlerin uluslararası kabul edilmiş standartlarda, iyi imalat şartlarında (GMP, Good manufacturing practice) yapılması gereklidir. Hücresel ekspansiyon yapılırken hücrelerde ortaya çıkabilecek değişimler, *in vivo* uygulama sonrası yeterli sayıda klinik güvenlik çalışmasının olmaması mikroveziküleri ön plana çıkartmıştır. Böylece çalışmamızda; oksijen satürasyonunun daha düşük olduğu, vücut içi ortamımızı taklit eden hipoksik ortamın; nötrofillerden ve umblikal kord kaynaklı MKH' lerden elde edilen mikroveziküller üzerine etkisi, hücrelerin üretildiği ve mikroveziküllerin toplandığı fiziksel ortam değişikliklerinin mikrovezikül kalitesine etkinlilik testi, partikül boyut analizi, karakterizasyon ve morfolojik olarak nasıl etki ettiği amaçlanmaktadır.

2. BÖLÜM
GİRİŞ ve AMAÇ

2.1. Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp

Hücre replasman tedavisi için kök hücre teknolojilerinin gelişimi son yıllarda hızla ilerlemiştir. Hastaya özgü ürün geliştirme ve üretimi, otolog hücre tedavilerinin temel darboğazlarından ve maliyet faktörlerinden biridir. Tıp biliminin en yeni ve gelişmekte olan kolu olan rejeneratif tıp, vücudun rejeneratif tepkilerinin yeterli olmadığı durumlarda, ciddi yaralanmalar veya kronik hastalık koşulları olan hastaların spesifik dokularının ve / veya organlarının fonksiyonel restorasyonu ile ilgilenmektedir (9).

Konvansiyonel hücre replasman tedavilerine ek olarak, hedef dokunun onarımı ve yenilenmesini teşvik etmek için, parakrin etkilerle terapötik moleküller içeren transplante edilmiş kök hücreler, daha iyi hayatta kalma oranı, çoğalma ve farklılaşma veya spesifik fonksiyonel moleküllerin salgılanmasını sağlar. *İn vivo* fonksiyonlarda gelişmiş ve *in vitro* olarak modüle edilmiş hücre nakli ve ayrıca doğrudan hastalar tarafından alınabilen *in vivo* olarak etki gösterebilen geleneksel terapötikler, (kimyasal veya biyolojik ilaçlar) rejeneratif tıbbın ortaya çıkmasının sebepleri arasındadır (10). Rejeneratif tıbbın elemanları arasında doku, organ ve çeşitli vücut sıvılarından toplanan mezenkimal kök hücrelerde yer almaktadır. Kök hücrelerin nakli, doku rejenerasyonunun indüklenmesi ve patojen veya malign hücrelerin immünolizi için otolog, allojenik ve sinjenik olabilir. Konak ve greft reddinin sonuçlarından kaçınmak için, doku ve organ nakli insan lökosit antijenlerinin (HLA) doku tiplemesi ve ayrıca immün baskılayıcı kullanımı önerilmektedir (11). Dokudan izole edilen hücre sayısının rejeneratif sonuç üzerine etkisi vardır (12). Bu durumda, daha önce *in vitro* olarak transplante edilecek uygunlukta olan kök hücrelerin çoğaltılması gereklidir (13). Başarılı rejeneratif sonuçlar için, nakledilen kök hücreler hayatta kalmalı, çoğalmalı, bölgeye özgü şekilde farklılaşmalı ve konak dolaşım sistemine entegre olabilmelidir (14).

2.2. Mezenkimal Kök Hücre ve Tedavi Seçenekleri

Mezenkimal kök hücrelerin varlığı (MKH) ilk kez rus bilim adamı Alexander Fridenshtein tarafından 1978 yılında gösterilmiştir ve ülkemizde ise kök hücrelerin hücresel tedavideki gelişim tarihi 1960'lı yılların başında, ceninler ile yürüttüğü hücre kültürü çalışmaları sırasında kök hücre kavramını ilk kez gündeme getiren Ordinaryüs Prof.Dr. Süreyya Tahsin Aygün ile başlamaktadır. MKH' ler; kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri nedeniyle rejeneratif tıp için önemli dejenerasyon kaynaklarıdır (15). MKH' ler erken gelişimin mezodermal interstisyel dokusundan türetilen pluripotent kök hücrelerdir (16). Bunlar bireysel ontogenez ve otoimmün hastalıklar sırasında doku onarımı ve yenilenmesi için kullanılır (17,18). Yüksek proliferasyon yetenekleri ve çok işlevli farklılaşma kabiliyetleri nedeniyle, belirli koşullar altında endometrial hücrelere, osteoblastlara, kondrositlere ve kardiyomiyositlere farklılaşabilir (19-22). MKH' ler yağ dokusu, kemik iliği, göbek dokusu ve dental pulpa gibi birçok yetişkin dokusundan başarıyla izole edilmiştir (23-26). Bununla birlikte, çeşitli doku kaynaklarından gelen MKH'ler farklı biyolojik özelliklere sahip olabilir.

Mezenkimal kök hücreler heterojendir ve karakterizasyonu için belirlenmiş tek bir biyobelirteç mevcut değildir. Bu nedenle, 2006 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği tarafından bildirilen bir dizi özellik ile tanımlanması sağlanır (27). Bu özelliklere göre MKH' lerin; kendini yenileme yeteneği (self-renewal), CD105, CD90 ve CD73 gibi yüzey belirteçlerini eksprese ederken CD34, CD14, HLA-DR ve CD45 gibi yüzey belirteçlerini eksprese etmemeleri, *in-vitro* koşullarda kemik, yağ ve kıkırdağa diferansiye olabilmeleri gerekmektedir. MKH' ler stromal kökenleri, fibroblast benzeri morfolojilerinin yanı sıra kültürde plastik yüzeye hızlı adhezyonu ile karakterize edilir. Basit ve kolay elde edilebilir, kültür ortamında yüksek ve hızlı prolifere olur ve birçok pasaj boyunca karyotiplerinde değişme olmaksızın bu proliferasyonu devam ettirilebilirler (28,29). MKH' ler dokudan izole edilip kültüre alındıklarında primer MKH kültürü olarak adlandırılır, bu fazı takiben logaritmik faz ve son olarak bir senesent fazdan oluşan bir büyüme eğrisi sergiler. Uygun koşullar altında logaritmik faz esnasında (pasaj 2-3) kolaylıkla 50 popülasyon katlanmasına kadar çoğaltılabilir ve böylece terapötik dozlara ulaşılması mümkün olur. Ayrıca, düşük

immünojeniteye sahip olmaları nedeniyle rejeneratif tedaviler için allojenik kullanıma da uygun olan bir adaydırlar.

Mezenkimal kök hücrelerin klinik şartlarda kullanılması için özel laboratuar şartlarında üretilmesi gereklidir. GMP (Good Manufacturing Practice- İyi Üretim Uygulamaları) şartlarında hücre üretimi, temel kök hücre bilimlerinden klinik araştırmalara ve uygulamalara translasyon için yüksek bir kalite güvence sistemi sağlar. GMP kılavuzlarına göre; biyolojik ürünün uygun klinik sınıfının belirlenmesi, hazırlanması, klinik uygulamalar için hücre ürünlerinin güvenliğinin sağlanması, kalitesinin değerlendirilmesi, özelliklerinin ve kimliğinin belirlenmesi ve transferinin sağlanması gerekmektedir. Öte yandan, gelişmiş hücresel tedavi protokolleri, kapsamlı doğrulama, süreç kontrolü ve kapsamlı dokümantasyon gerektirir (30). Ülkemizde *'İnsan Doku ve Hücre Ürünlerinin Ruhsatlandırılması ve Bu Ürünlerin Üretim, İthalat, İhracat, Depolama ve Dağıtım Faaliyetlerini Yürüten Merkezler Hakkında Tebliğ*' e göre, hücre-doku üretim faaliyeti, GMP kılavuzunda belirtilen partikül ve mikrobiyal yük açısından B sınıf hava kalitesine sahip alan içerisinde yerleşik partikül ve mikrobiyal yük açısından A sınıfı hava kalitesine eşdeğer bir ortamda yapılır (31). GMP şartlarında MKH üretimi 3-4 hafta gerektiren bir süreçtir.

2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Alanları

Deneysel araştırmalar sonucunda elde edilen çeşitli kök hücre ürünleri, doku yenilenmesi (kıkırdak, cilt fibroblast ürünü), kan hastalıkları, doku onarımı (bağırsak, karaciğer, böbrek), kan kanseri, solid tümör dokusu ve karaciğer yetmezlikleri gibi hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır (32-34).

2.2.1.1. Kanser Tedavisinde Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması

Solid tümörlerin tedavisinde günümüzde radyoterapi ve yüksek doz kemoterapi ve uygulanmaktadır. Bu tedaviler sonrasında kanser hastalarının yaşam kalitesinin arttırılması amacıyla bazı durumlarda sağlıklı bireylerden alınan periferik kök hücreler verilmekte bazı durumlarda ise kemik iliği kök hücrelerinin yerine allogeneik kemik iliği nakli yapılmaktadır. Bu tedavi koşullarına alternatif olarak nakil amacıyla kordon kanı kök hücreleri ve *in vitro* üretimi sağlanan kemik iliği kaynaklı MKH' ler kullanılmaktadır. Bazı kanser çeşitleri üzerinde kök hücre ürünlerinin klinik etkinliğinin kanıtlanması, biyogüvenilirlik, biyoeşdeğerlik ve yan etkilerinin izlenmesi (Faz III) çalışmalarına devam edilmektedir (35,36).

2.2.1.2. Çeşitli Kan Hastalıklarında Mezenkimal Kök Hücre Kullanımı

Akut ve kronik lösemiler gibi çeşitli kan hastalıklarının tedavisinde güncel uygulanan bir tedavi seçeneği olan kemik iliği nakillerinin yanı sıra, özel laboratuvar koşullarında iyi üretim uygulamasına sahip (GMP) *in vitro* üretimi gerçekleştirilen kemik iliği kaynaklı MKH' ler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Anemi ile seyreden çeşitli kan hastalıkları (edinsel aplastik anemi, lösemi), bağışıklık sistemi yetmezlikleri, plazma hücresi bozuklukları ve metabolik hastalıklarda mezenkimal kök hücre uygulamalarının yanında etik süreçlerden ve invaziv işlemlerden biraz olsun arındırılmış olduğu için kordon kanı kök hücreleri de önemli hematopoetik kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır (34,37-39).

2.2.1.3. Ortopedi Hastalıklarında Mezenkimal Kök Hücre Kullanımı

Günümüzde ortopedik cerrahide kök hücrelerin kullanıldığı başlıca alanlarda kırık hattında iyileşme kapasitesinin arttırılması, fizis hattı hasarlarının iyileştirilmesi, psödoartroz tedavisi, kondral defektlerin tamiri ve iskemi olan durumlarda, hazırlanan kök hücre uygulamaları sayesinde özellikle alt ekstremitelerdeki vaskülarizasyonun arttırılması gelmektedir (40-43). Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde hücre kaynağı olarak allogeneik veya otolog kaynaklı kondrositlere alternatif olarak, kıkırdak, kemik, sinoviyal doku, kas, tendon ve yağ dokusu gibi birçok farklı dokuya farklılaşma kapasitesi olan pluripotent MKH' ler de kullanılabilir. Eklem kıkırdağına en yakın doku olan sinoviyal dokunun vücuttaki kondrogenetik ve kıkırdak dokuya farklılaşabilmesi ve yüksek proliferasyon özelliği göstermesinden dolayı, çeşitli kullanım avantajlarına sahip olduğu bildirilmektedir (40). Kemik ve kıkırdak için uygulanan biyoçözünür ve biyoemilir polimerler; hidroksiapatit, kollajen, fibrin, hyaluronik asit halen uygulamada olan ve çeşitli araştırmalarda kullanılan zemin materyalleridir (42,44). Bu yöntem ile hücre ve doku oluşumunu desteklemek için zemin vazifesi gören üç boyutlu biyomateryal üzerine uygulanan hücrelerin homojen dağılımını sağlamakta, biyokimyasal molekül özelliklerinden dolayı belirli bir süre sonra çözünerek yerini asıl ev sahibi dokuya bırakmaktadır. Zemin materyaller kullanılarak gerçekleştirilen kök hücre tedavisinde, dikiş gerektirmeden ve defekt boyutunda sınırlama olmaksızın hastalıklı bölgenin tedavisi mümkündür (43).

2.2.1.4. Diş Hekimliğinde Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları

Çekilen ya da kendiliğinden düşen insan süt dişi pulpasından elde edilen kök hücreler yüksek derecede proliferatif özellik göstermektedir. Bu hücreler, adipositler, endotelyal

hücreler, nöral hücreler ve odontoblastlar gibi farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip genetik olarak kendisiyle tamamen aynı hücreleri oluşturabilen multipotent hücrelerdir (45). Erişkin diş pulpasından da yüksek derecede proliferasyon özelliği olan ve *in vitro* şartlarda odontoblastlara dönüşen hücrelerin izole edilebileceği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (46-48). Diş pulpası kök hücrelerinin diş dokularının tamir edilmesinde, kemik rejenerasyonu oluşturmada, nöral doku yaralanmaları ve dejeneratif hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (49).

2.2.1.5. Graft-Versus Host Hastalığı ve Mezenkimal Kök hücre Tedavisi

Graft Versus Host hastalığı (GVHD), genetik uyumun iyi olmadığı koşullarda yapılan kemik iliği nakillerinden sonra gerçekleşen vericinin greftinin hastanın (alıcı) vücudunu yabancı madde olarak algılayıp onu yok etmeye çalışarak saldırıya geçmesi sonucu oluşur. GVHD, allogeneik hematopoetik kök hücre transplantasyonlarından sonra alıcının farklı dokularına karşı saldırıya geçen donör T-lenfositlerine bağlı olarak gelişen morbidite ve mortalitesi yüksek, yaygın bir komplikasyondur. Bu saldırı sonucunda cilt, gözler, karaciğer ve gastrointestinal sistem gibi vücudun farklı bölümlerinde çeşitli etkiler ortaya çıkabilir. Allogeneik nakilde, aile üyelerinden, akraba dışı donörlerden ya da kordon kanı ünitelerinden temin edilen kök hücreler kullanılmaktadır (39). Allogeneik kemik iliği nakli sonrası akut ve kronik GVHD profilaksisi ve tedavisinde selektif immünosüpresif özelliğinden dolayı klinikte en fazla kemik iliği kaynaklı MKH kullanılmaktadır (50,51).

2.2.1.6. Miyokardiyal Rejenerasyonda Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları

Kemik iliği kaynaklı MKH'nin kalp kası içine entekte edilmesi sonucu enfarktüs alanını sınırladığı, kardiyak fonksiyonunu yerine getiren bu hücrelerin kardiyomiyosit, endotelyal hücre, düz kas hücresine farklılaşma özelliği gösterdiği bildirilmiştir (52-54). İskemik kalp hastaları üzerinde uygulanan nakil çalışmaları sonucunda elde edilen olumlu sonuçların, mekanik revaskülarizasyon imkânı bulunmayan iskemik kalp hastaları için alternatif bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmetedir (55). İnsan göbek kordonu Wharton jeli matriksine ait MKH'nin kalp dokusu, nöron ve glia ve gibi çeşitli hücre türlerine farklılaştığı yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmektedir (56).

2.3. Hücresel Tedavide Nötrofilin Etkisi

Kemik iliği, kan hücrelerinin geliştiği süngerimsi bir dokudur. Kemiklerin ortasındaki boşlukları kaplayarak kan üretimini üstlenir. Yeni doğanlarda tüm kemikler aktif kemik

iliği ile doludur. Erişkinlerde ise omurga, kalça, omuz kemikleri, kaburgalar, göğüs kemikleri ve kafatası aktif kemik iliği içermektedir. Kemik iliğinde zamanla olgun kan hücrelerine dönüşen kan kök hücreleri üretilir. Bu hücreler lenfoid ve myeloid kök hücrelerine dönüşerek kan hücrelerinin öncü progenitör hücrelerini oluştururlar. Myeloid kök hücreler üç alt grupta toplanır. Bunlar;

- Kırmızı kan hücreleri (Alyuvarlar- Eritrositler): Akciğerlerden oksijeni vücudun tüm hücrelerine taşıyan bir protein olan hemoglobin içerirler. Kana kırmızı rengi veren bu hücrelerdir. Tüm hücrelerde oluşan karbondioksiti hücrelerden toplayarak akciğerlere taşır ve karbondioksit respirasyon ile dışarı atılır.
- Trombositler (Kan Pulcukları): Bunlar vücudun hasarlanan herhangi bir bölgesinde kanamanın durmasına yani pıhtılaşmaya yardım eden küçük hücrelerdir.
- Beyaz kan hücreleri (Akyuvarlar- Lökositler): Bunlar da 3 gruba ayrılır;
    - Granülositler
        - Nötrofil
        - Bazofil
        - Eozinofil
    - Monositler
    - Lenfositler

Bunlardan nötrofiller ve monositler, fagositler olarak da adlandırılan, yabancı hücreleri içine alarak yok eden beyaz kan hücreleridir. Bakteri veya mantarları da aynı şekilde yok edebilirler. Alyuvarların ve kan pulcuklarının aksine monositler kandan ayrılıp dokulara girerler, orayı işgal eden organizmalara saldırır ve enfeksiyonlarla mücadeleye yardım ederler. Eozinofil ve bazofiller ise vücuda alerjik etki yapan maddelere ve parazitlere karşı reaksiyonlarda görev alan beyaz kan hücreleridir. Lenfoid kök hücreler ise beyaz kan hücrelerinden lenfositlere dönüşür. Lenfositlerin de öncü hücrelerine blast denir. Lenfositlerin çoğu lenf bezlerinde, dalakta ve lenf kanallarında bulunurlar, ancak bir kısmı kana geçer. Her biri bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan üç tip lenfosit vardır.

- B-Lenfositler: Enfeksiyonlarla mücadele eden ve antikor denilen koruyucu maddeleri üretmektedirler.
- T-Lenfositler: Antikor üreten B-Lenfositlere yardım etmekle görevlidirler.
- NK hücreleri (doğal katil hücreler): Vücudu kanser hücrelerine ve virüslere karşı korumak için bu hücrelere saldıran doğal hücrelerdir (57).

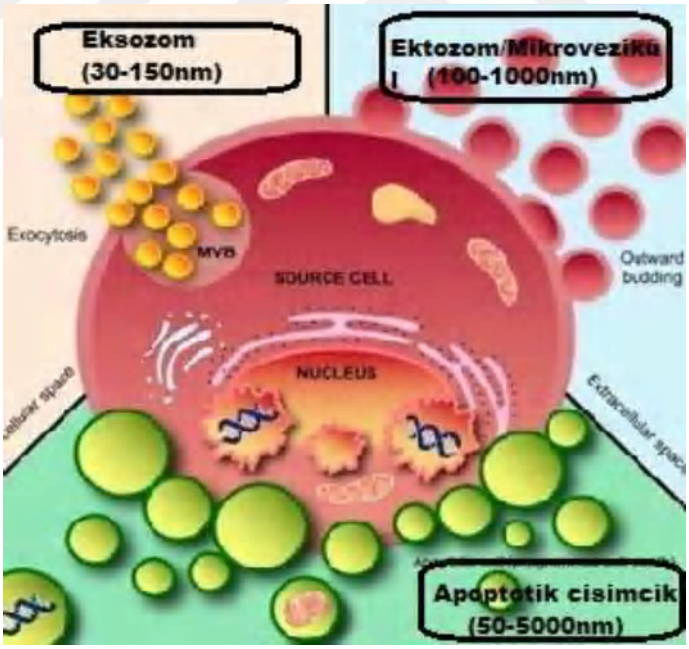
Nötrofiller, insan dolaşımındaki tüm beyaz kan hücrelerinin%50-70'ini oluşturan miyeloid hücrelerdir. Geleneksel olarak, nötrofiller enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattı ve enflamatuar sürecin ana bileşeni olarak görülmektedir. Ek olarak, kanıtların biriktirilmesi nötrofillerin kanser biyolojisinin birçok yönünden de kilit bir rol oynayabileceğini göstermektedir (58).

Nötrofillerin istilacı patojenleri öldürdüğü işlem üç ana mekanizmaya bağlıdır: i) patojenin reseptör aracılı hücre içinde bir vakuole alımı, ii) patojen içeren vakuolde yüksek derecede toksik ROS üretimi, iii) çeşitli antimikrobiyal mediatörler içeren nötrofil granüllerinin vakuole füzyonu. Bu adımlar, ligandların doku bileşenleri üzerinde biriktirildiği enflamatuar hastalıklara da katkıda bulunabilir ve nötrofil dışındaki hücrelere sitolitik içeriklerin ve oksidatif ürünlerin salınımına yol açar (59). Nötrofil fagositozu çok hızlıdır- IgG ile opsonize olmuş partiküllerin alımı 20 saniyeden daha kısa sürede gerçekleşir (60). Nötrofillerin sadece hücre dışı patojenlerin öldürülmesinde rol oynadığını değil aynı zamanda dendritik hücreler, lenfositler, NK hücreleri ve diğer immün hücrelerle çapraz iletişim yoluyla hücre içi patojenlere ve virüslere karşı bağışıklık tepkisine katkıda bulunduğunu gösteren birçok immünmodülatör çalışma vardır. Bu çapraz iletişimlerin çoğuna nötrofillerin bir dizi sitokin salgılaması veya doğrudan diğer immün hücrelerle etkileşime giren çok sayıda hücre yüzey molekülü eksprese etmesi kabiliyeti aracılık eder (61). Laktoferrin, a-defensinler ve kemokinler dahil olmak üzere birçok nötrofil ürünü, dendritik hücreler (DH) için kemotaktiktir ve enfeksiyon bölgelerine hızlı DH alımı için gereklidir (62,63). Nötrofillerin DH'lere doğrudan bağlanması, DH'lerin daha etkili antijen sunan hücrelere olgunlaşmasını teşvik eder ve DH'lerin nötrofil kaplanmış patojen ürünlerine erişimini sağlar (64,65). Bunlar gibi nötrofil-DH etkileşimleri, Crohn hastalığı hastalarının kolon mukozasında tanımlanmıştır (66). Nötrofiller, SLE ve diyabet gibi otoimmün hastalıklarda DH'lerin aktifleştirilmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (67,68). LL-37 peptidleri ile kompleksleşmiş kromatin içeren NET'ler, plazmasitoid

DH' lerden IFN-a üretimini indükler. IFN-a gibi, Tip I interferonlar ayrıca nötrofilleri uyarır, ayrıca NET oluşumunu teşvik eder ve böylece nötrofiller ve DH'ler arasında kendiliğinden yükselen bir enflamasyon döngüsü oluşturur. Bu immünosüpresif nötrofil fonksiyonlarının aksine, birçok gözlem, inflamatuar nötrofilin filtrasyonunun bazı kanser türlerinde bir antitümör etkisi sağladığını göstermektedir (69). Nötrofiller, tümör hücresinde oksidatif hasara neden olan ROS üretimi yoluyla özellikle *in vitro* olarak tümör hücrelerini doğrudan öldürebilir. ROS üretimi, metastatik hücreleri farklı şekilde etkileyebilir, bu nedenle meme kanseri hastalarında "tümör baskılayan nötrofiller" in bir çalışmasında önerildiği gibi tümör yayılımını sınırlayabilir (70).

2.4. Mikroveziküller

Mikroveziküller boyutlarına göre; apoptotik cisimler (500-1000nm), ektozomlar veya mikro parçacıklar (100-350nm) ve eksozomlar (30-150nm) olarak sınıflandırılırlar (71-73). Bu hücre dışı veziküller birçok biyolojik işlemde ve belirgin bir şekilde hücreler arası iletişimde rol oynamaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 Bir hücre tarafından salınan hücre dışı veziküllerin (ESV) alt tiplerinin şematik gösterimi (4).

Tablo 2. 1 Mikroveziküller hakkında kısa bilgi (3 numaralı kaynaktan Türkçe'ye çevrilerek uyarlanmıştır)

	Vezikül popülasyonu		
	Eksozomlar	Ektozomlar	Apoptotik cisimler
Çapı	30-100 nm	100-1000 nm	1000–4000 nm
Görünüm	Homojen	Heterojen	Heterojen
sedimantasyon	100.000-120.000 × *g*	16.000 - 20.000 × *g*	5000–16.000 × *g*
Filtrasyonu	20–200 nm	> 200 nm	> 1000 nm
Salınım Mekanizması	Multiveziküler cisimlerin ekzositozu	Plazma zarından tomurcuklanma	Hücre küçülmesi ve ölümü
Hücre içi depolama	Evet	Yok hayır	Yok hayır
Ana protein belirteçleri	Tetraspaninler, HSP70, HSP90, Alix, Rab5a / b	integrinler, Selektinler, CD40, MMP, Lineage belirteçleri, Ezrin	Histonlar
Lipid bileşimi	Kolesterol, Seramid	Fosfatidiserin, Kolesterol	Fosfatidiserin
Genetik bilgi	Kodlamayan RNA, mikro RNA	mRNA, mikro RNA	mRNA, mikro RNA, DNA
Bağışıklık sistemi üzerindeki etki	İmmunostimülanlar	immünsupresifler	immünsupresifler

2.4.1. Eksozomlar

Eksozomları 1983 yılında Pan ve arkadaşları ile Harding ve arkadaşları peş peşe yaptıkları çalışmalar ile kanıtlamışlardır (74,75). Daha sonra, 1989 yılında Johnstone ve arkadaşları bu vezikülleri "eksozomlar" olarak adlandırmıştır. Eksozomlar, elektron mikroskobu ile incelendiğinde membranları belirli, değişen çaplara sahip düzleşmiş küreler gibi görünen bir morfolojiye sahiptirler (76). Yaklaşık 5nm arasında bir ortalama kalınlığı ve karakteristik çift lipit katmanı vardır. Eksozomların lipit bileşenleri arasında seramid (bazen eksozomları lizozomlardan ayırt etmek için kullanılır), kolesterol, sfingolipitler ve uzun doymuş yağ asil zincirleri ile fosfoligeritler bulunur. Eksozomların dış yüzeyi mannoz, polilaktosamin, alfa-2,6 sialik asit ve N-bağlı glikanlar gibi sakkarit zincirleri bakımından zengindir (77). Eksozomlar, fibroblastlar, bağırsak epitel hücreleri, nöronlar, adipositler ve tümör hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücrelerden salınabilir ve bunlar sinovyal sıvı, anne sütü, kan, idrar, tükürük, amniyon sıvısı gibi birçok biyolojik sıvıda bulunur (163). Eksozomların biyolojisi, fonksiyonu ve heterojenliği, orjin hücresine ve eksozom üretildiği sıradaki doku veya hücrenin durumuna bağlıdır. Önceki çalışmalar, eksozomların, fazla ve / veya işlevsel olmayan hücresel bileşenleri dışarı çıkaran hücresel çöp torbaları olarak işlev görebileceğini göstermiştir. Ek olarak, endositik veziküller, hücre yüzeyi proteinlerinin ve sinyal moleküllerinin geri dönüşümünde rol oynar. Son çalışmalar,

eksozomlar, anjiyogenez, antijen sunumu, apoptoz, koagülasyon, hücresel homeostazı, inflamasyon ve hücreler arası sinyal iletiminide rol oynadığını göstermiştir. Bu roller, RNA, protein, enzim ve lipidleri transfer etme yeteneklerine bağlanır, böylece kanser, nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda fizyolojik ve patolojik süreçleri etkiler. Birçok eksozom, onları salgılayan hücre tiplerinden bağımsız olarak ortak olan proteinleri içerirken, sadece küçük bir protein fraksiyonu hücreye özgüdür ve bu salgılanan proteinler hücrelerin tipini ve patofizyolojik koşullarını yansıtır (78,79). Tipik olarak eksozomlarda bulunan proteinler arasında trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü, laktadherin, transmembran proteinleri ve lizozom ile ilişkili zar proteini-2B, zar taşınması ve füzyon proteinleri, flotiller, GTPazlar, ısı şok proteinleri, tetraspaninler (CD9, CD63, CD81) ve multiveziküler vücut biogenezine katılan proteinler bulunur (79-82). Bu nedenle bu karakteristik proteinler, eksozomların izolasyonu ve miktar tayini için iyi biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır. Eksozomların taşıdığı diğer bir önemli kargo, deoksinükleik asitleri (DNA), kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan ribonükleik asit (RNA), messenger RNA (mRNA) ve mikroRNA (miRNA) gibi nükleik asitlerdir (83). Bu nükleik asitlerin, eksozomlar izole edildikten sonra doğru bir şekilde ölçülmesi gerekir, çünkü profilleri titizlikle birçok tıbbi durumu ve hastalıkları yansıtır (84,85).

2.4.2. Eksozom İzolasyon Teknikleri

Eksozomları çalışılabilir ve uygulanabilir hale getirmek için, geniş bir yelpazedeki hücresel atık ve diğer heterojen bileşenlerden spesifik olarak izole edilmesi gerekmektedir. Eksozomların izole edilmesinde kullanılan teknikler, yüksek verimlilik sergilemeli ve eksozomları çeşitli örnek matrislerinden izole edebilmelidir. İzole edilen eksozomların kalitesini incelemek için boyut dağılımlarını, morfolojilerini, miktarlarını ve biyokimyasal kompozisyonlarını ölçmek için çeşitli optik ve optik olmayan teknikler geliştirilmiştir. Bilim ve teknolojideki hızlı gelişmelerle birlikte, eksozomların kayda değer miktarda ve saflıkta izolasyonu için birçok teknik kullanılmaktadır. Her teknik, izolasyonlarına yardımcı olmak için yoğunlukları, şekilleri, büyüklükleri ve yüzey proteinleri gibi belirli bir eksozom özelliğini kullanır. Her gruptaki varyantlar, eksozom izolasyonu için benzersiz bir dizi avantaj ve dezavantaj sağlamaktadır (86).

2.4.2.1. Ultrasantrifüj Yöntemi ile İzolasyon

Heterojen bir karışımı (süspansiyon) bir merkezkaç kuvveti ile santrifüjleme işlemi uygulandığı zaman süspansiyon içindeki partikül bileşenlerini yoğunluklarına, boyutlarına ve şekillerine göre çökeltilecektir. Daha yoğun ve / veya daha büyük parçacıklar ilk önce çökelmeye başlamaktadır. Santrifüjleme, genellikle parçacık halindeki malzemeleri ayırmak ve saflaştırmak, ayrıca nükleik asitler ve proteinler gibi biyopolimerler dahil olmak üzere polimerik malzemelerin hidrodinamik özelliklerini analiz etmek için kullanılır (87). Uygulanan merkezkaç kuvvetine bağlı olarak, bir süspansiyondaki parçacıklar fiziksel özelliklerine, çözücünün yoğunluğu ve viskozitesine göre sırayla ayrılabilir. Ultrasantrifüjleme işlemi, 1.000.000 xg' ye kadar olağanüstü yüksek santrifüj kuvvetleri üretmek için optimize edilmiş bir santrifüjleme prosesidir. İki tip ultrasantrifüj vardır bunlar; analitik ve preparatif ultrasantrifüjdür. Partiküllü malzemelerin fizikokimyasal özelliklerini ve polimerik malzemelerin moleküler etkileşimlerini araştırmak için analitik ultrasantrifüjleme kullanılır. Virüsler, bakteriler, hücre altı organeller ve hücre dışı veziküller gibi küçük biyo-partiküller için ise preparatif ultrasantrifüjleme tekniği kullanılır. Ultrasantrifügasyon temelli eksozom izolasyonu, altın standart olarak kabul edilir ve eksozom izolasyonunda en sık kullanılan ve bildirilen tekniklerden biridir.

Ultrasantrifüjlemenin, eksozom araştırmalarında kullanıcılar tarafından kullanılan tüm izolasyon tekniklerinin %56' sını oluşturduğu tahmin edilmektedir (88). Çoğu zaman kullanımı kolay, az teknik uzmanlık gerektiren, zaman içinde satın alınabilirlik (yani uzun süreli kullanım için bir ultrasantrifüj makinesi) ve az zaman alan izolasyon tekniği olması bu yaklaşımı güçlendirmiştir. Bu nedenlerden dolayı, ultrasantrifüjlemeye dayalı teknikler, eksozom araştırmalarında araştırmacılar arasında oldukça popüler bir seçenek haline gelmiştir. İki tip preparatif ultrasantrifüj vardır. Bunlar diferansiyel ultrasantrifüj ve yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjdür.

Eksozomların diferansiyel ultrasantrifüjleme ile izolasyonu, bir numunedeki diğer bileşenlerden yoğunluklarına ve boyut farklılıklarına dayanarak izole etmek için genellikle farklı santrifüj kuvveti ve süresine sahip bir dizi santrifüjleme döngüsünden oluşur. Ultrasantrifüj için, kullanılan merkezkaç kuvveti tipik olarak ~ 100.000 ile 120.000xg arasındadır. İzolasyon işlemine başlamadan önce, bir numunenin büyük biyo-parçacıklardan kurtulması için genellikle bir temizleme aşaması gerçekleştirilir ve örnek, eksozomal proteinlerin bozulmasını önlemek için proteaz inhibitörleri ile

muamele edilir (89). Kullanılan merkezkaç kuvvetine bağlı olarak eksozomlar dipte pellet olarak çöker ve izolasyon süresince süpernatan aspire edilerek pellet fosfat tamponlu salin (PBS) gibi uygun bir ortamda yeniden süspanse edilir ardından artan kuvvet ile sonraki santrifüjleme işlemlerine tabi tutulur. Son olarak, izole edilen eksozomlar bir kez daha resüspanse edilir ve analize kadar -80 ° C'de saklanır. Bu eksozomları izole etme yöntemi ayrıca peletleme yöntemi veya basit ultrasantrifüjleme yöntemi olarak da bilinir (90,91).

Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme ise bir diğer ultrasantrifügasyon işlemidir. Bunlar izopiknik ultrasantrifüj ve hareketli bölge ultrasantrifüjü olarak iki kısma ayrılmaktadır. Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifügasyonun kullanımı, eksozomlar gibi hücre dışı veziküllerin izolasyonunda giderek daha popüler hale gelmiştir. Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjlemede, eksozomların ayrılması, alttan üste aşamalı olarak azalan yoğunluğu olan bir santrifüj tüpünde önceden oluşturulmuş bir yoğunluk gradyanı ortamında eksozomları boyutlarına, kütlelerine ve yoğunluklarına göre ayırarak gerçekleştirilir. Numune, yoğunluk gradyan ortamının tepesi üzerine dar bir bant halinde katlanır ve uzatılmış bir ultrasantrifüjleme turuna tabi tutulur. Merkezkaç kuvveti uygulandığında, örnekteki eksozomları içeren çözücüler, yoğunluk gradyan ortamı boyunca her biri kendine özgü sedimantasyon oranında dibe doğru çökerek hareket eder, böylece ayrı çözünen bölgelere yol açar. Ayrılan eksozomlar daha sonra basit fraksiyon toplanmasıyla uygun şekilde geri kazanılabilir. Analitik uygulamalar için sürekli bir gradyan kullanılırken, süreksiz bir gradyan (kademeli gradyan), ayrılan eksozomların yoğunluk gradyan katmanlarının ara yüzüne yerleştirildiği ve böylece toplanmaları büyük ölçüde kolaylaştırdığı hazırlayıcı amaçlar için daha uygundur. Diferansiyel ultrasantrifügasyonun aksine, yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjlemenin bir dezavantajı, kapasitesinin büyük ölçüde dar yük bölgesi ile sınırlı olmasıdır. İzopiknik ultrasantrifüjlemede, bir numunedeki tüm çözünme yoğunluk aralığını kapsayan bir yoğunluk gradyan ortamı bir santrifüj tüpüne yüklenir. Alternatif olarak, eksozom içeren bir numune, sezyum klorür gibi kendiliğinden gradyan oluşturan bir materyal ile karıştırılabilir. Santrifüjleme sırasında, eksozomlar izopiknik pozisyonlarına hareket ederken, sezyum klorür tarafından yoğunluk gradyanı üretilir. Eksozomlar bu teknik ile yoğunluk olarak 1.10 ve 1.21 g/ ml arasında elde edilebilir (92). İlgili yoğunluk bölgesinden elde edilen kısım daha sonra PBS içinde

tekrar resüspanse edilerek saf eksozom örneklerini toplamak için ~ 100.000 xg' de kısa bir ultra santrifüje tabi tutulur.

Hareketli bölge ultrasantrifugasyonunda, eksozom içeren bir örnek, çözünenlerin herhangi birinden daha düşük bir yoğunluğa sahip bir gradyan yoğunluk ortamının üstüne ince bir bölge olarak yüklenir. Eksozomlar, sadece diğer tüm solitlerden yoğunluk farklılıklarına bağlı olduğu izopiknik ultrasantrifüjlemenin aksine, numunedeki eksozomlar, yoğunlukları yerine boyutlarına ve kütlelerine göre ayrılır. Bu, hücre dışı veziküllerin benzer yoğunluklarda fakat farklı boyutlarda ayrılmasını sağlar. Eksozomlar dahil çözünenlerin yoğunlukları, gradyan ortamının yoğunluğundan daha büyük olduğundan, hareketli bölge ultrasantrifüjlemesi statikten ziyade dinamiktir. Başka bir deyişle, uzun süre bir santrifüjleme işlemi gerçekleştirildiğinde, tüm çözücüler santrifüj tüpünün dibinde toplanacaktır. Bu nedenle, santrifüjleme süresi dikkatlice optimize edilmelidir. Ek olarak, eksozomların topaklanmasını önlemek için, yüksek yoğunluklu bir madde genellikle santrifüj tüpünün tabanına yerleştirilir. Buna karşılık, eksozomlar, santrifüjleme süresine bakılmaksızın, izopiknik ultrasantrifüjde santrifüj tüpünün dibine asla çökelmeyecektir. Eksozomların heterojenliği ve hücre dışı veziküllerin boyutunda önemli miktarda verim olsada, diferansiyel ultrasantrifüjleme genellikle kontaminasyon ve eksozom kayıplarından muzdariptir. Ultrasantrifüj yöntemi ile, düşük yoğunluklu eksozomların yüzmesi sağlanır ve eksozomları daha da saflaştırmak için sıklıkla izopiknik veya hareketli bölge teknikleri kullanılır. Bu tekniğin izole edilen eksozom miktarını iyileştirebildiği bilinmektedir (93,94). Karakterizasyondan sonra, eksozomları içeren ilgi fraksiyon PBS içinde seyreltilir ve daha fazla analiz için saf eksozomlar elde etmek için ~ 100.000 xg' de yeniden ultrasantrifüjleme işlemine tabi tutulabilir.

2.4.2.2. Boyuta Dayalı İzolasyon-Ultrafiltrasyon

Popüler boyuta dayalı eksozom izolasyon tekniklerinden biri de ultrafiltrasyondur. Ultrafiltrasyonun temelleri, asılı partiküllerin veya polimerlerin ayrılmasının esas olarak boyutlarına veya moleküler ağırlıklarına bağlı olduğu geleneksel membran filtrasyonundan farklı değildir. Bu nedenle, boyutlarına bağlı olarak, eksozomlar, tanımlanmış moleküler ağırlık veya boyut dışlama limitlerine sahip membran filtreleri kullanılarak izole edilebilir (95). Ultrafiltrasyon, ultra santrifüjden daha hızlıdır ve özel ekipman gerektirmez (96). Bununla birlikte, ultrasantrifüj yöntemi,

potansiyel olarak aşağıda kalan büyük veziküllerin deformasyonuna ve parçalanmasına neden olabilir ve analiz sonuçlarını değiştirebilir (97).

Kısa santrifüjleme periyodlarına sahip nanomembran konsantratörleri, ultrasantrifüjleme kadar etkili olan idrar eksozomlarını hızla zenginleştirebildikleri ve başarılı bir izolasyon için 0.5 mL kadar idrar miktarının yeterli olduğu gösterilmiştir.

Eksozom izolasyonunun başarısını doğrulamak için, western blot ile eksozomal biyobelirteçleri, eksozomların tipik özelliklerini incelemek içinde çeşitli elektron mikroskopları kullanılmaktadır. Nanomembran konsantratörleri böbrek hastalıklarının teşhisine yardımcı olma potansiyeline sahiptir (98).

İdrar, serum, beyin omurilik sıvısı ve hücre kültür ortamı gibi hücre içermeyen numuneler için, eksozom izolasyonu ve izole edilmiş eksozomlardan RNA ekstraksiyonu için ticari bir eksozom izolasyon kiti geliştirilmiştir (99). Kit, eksozomların ve diğer hücre dışı veziküllerin yakalandığı bir şırınga filtre bazlı hızlı fraksiyonlama işleminden yararlanır. İki membran, şırınga filtresinde sırayla yapılandırılır, böylece alt zar üzerinde eksozomlar yakalanırken, bir örnek iki zardan geçirildiğinde, apoptotik cisimler ve mikro-veziküller gibi daha büyük hücre dışı veziküller üst zar üzerinde tutulur. Eksozomlar tarafından taşınan RNA'lar daha sonra, yakalanan eksozomlar, bir RNA ekstraksiyon kokteyli alt membrandan geçirilerek parçalandığında salınır. Daha sonra, miRNA saptama ve ekspresyon profili kantitatif gerçek zamanlı ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile gerçekleştirilir. Ultrasantrifügasyon ve eksozom çökeltme ile karşılaştırıldığında, ultrafiltrasyon, floresan boyaması ile ölçüldüğü gibi idrardan en yüksek ekzomal RNA verimine sahip olduğu gösterilmiştir (100).

Sıralı filtrasyon, düşük manipülasyon kuvvetlerinin bir sonucu olarak eksozomların yüksek saflıkta ve işlevsel bütünlükte izolasyonuna izin verir. Örneğin, klinik denemelerde terapötik eksozomları izole etmek için döteryum / sükroz bazlı yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjasyon ile birleştirilmiş teğetsel akış filtrasyonu kullanılmıştır (101,102). Ultrafiltrasyon yöntemi; hızı, otomasyonu, ölçeklenebilirliği ve terapötik eksozom izolasyonu açısından araştırma ve uygulamaların *''bench side to bed side''* etkisini kolaylaştırmaktadır (103).

Eksozom izolasyonuna uygulanan bir başka boyut bazlı ayırma tekniği, boyut dışlama kromatografisidir (SEC). SEC'de, makromolekülleri ve partiküllü maddeleri boyutlarına göre ayırmak için gözenekli bir sabit faz kullanılır. Küçük hidrodinamik yarıçaplı bir

numunedeki bileşenler gözeneklerden geçebilir ve böylece geç elüsyona neden olur. Eksozomlar dahil olmak üzere geniş hidrodinamik yarıçaplı bileşenler, gözeneklerin dışında kalır (104). Örneğin, mezenkimal kök hücre-koşullandırılmış medyum içindeki eksozomlar, boyut dışlama fraksiyonları ile izole edilebilir ve mezenkimal kök hücre, ekzomları salgılayarak miyokard iskemisi / reperfüzyon hasarı sırasında kardiyoproteksiyona aracılık eder. İzole edilen eksozomların, transmisyon elektron mikroskobu ile incelendiğinde yapısal olarak aynı olduğu gözlenmiştir (105).

Boyuta dayalı eksozom izolasyon tekniklerinin nispeten yeni bir üyesi, akış alan-akış fraksiyon işlemidir (F4). F4 kullanılarak, insan sinir kök hücre kültüründen eksozomları izole etmek için başarılı girişimlerde bulunulduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Eksozom içeren fraksiyon, transmisyon elektron mikroskobu ve sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi ile doğrulanmıştır (106). Bu entegre sistem, eksozomları hızla izole edebilir ve karakterize edebilir, böylece eksozom araştırma ve uygulamasını büyük ölçüde kolaylaştıracak potansiyele sahiptir (107).

Büyük numune hacimlerinin işlenmesi için diferansiyel / gradyan ultrasantrifügasyona uygulanabilir bir alternatif sağlamak için, hücre dışı veziküllerin idrardan zenginleştirilmesi ve izole edilmesi için hidrostatik filtrasyon diyaliz (HFD) olarak adlandırılan basit ve etkili bir ayırma tekniği yakın zamanda Musante ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (108). Çözeltilerin ayrılmasının, belirli bir MWCO değerine sahip bir diyaliz membranı boyunca difüzyonla sağlandığı geleneksel diyalizden farklı olarak, bir numune, bir diyaliz borusundan düşük bir hidrostatik basınçla zorlanır. Çözücü ve küçük çözücüler diyaliz tüpünden serbestçe geçerken, eksozomlar dahil hücre dışı veziküller diyaliz tüpünde tutulur. Ayrıca HFD'nin daha az emek ve maliyetle ultrasantrifüjleme tabanlı teknikleri geride bıraktığı da gösterilmiştir (108).

2.4.2.3. İmmüno-Afinite Teknikleri

Eksozom membranında bol miktarda protein ve reseptör bulunması, bu proteinler (antijenler) ve bunların antikorları arasındaki immün-dirençli etkileşimlere, reseptörler ve ligandlar arasındaki spesifik etkileşimlere dokunarak, eksozomların izolasyonu için oldukça spesifik teknikler geliştirmekte mükemmel bir fırsat sunar. Eksozomların izolasyonu için immünoaffinite yakalamaya dayalı teknikler geliştirilmiştir. İdeal olarak, immünoizolasyon için eksozom biyobelirteçleri membrana bağlı, çözünebilir muadilleri bulunmayan ve sadece belirli biyolojik kaynaklara tutunabilen eksozom yüzeyinde yüksek oranda konsantre veya eksprese edilen belirteçleri eksprese

edebilmelidir. İmmünafinite için, Zarovni ve arkadaşları immünoafinite yakalama - manyeto-immünokaptür kullanımlarında mikron altı boyutta manyetik parçacıklar geliştirdi (88).

Tetraspanin ailesinin ilk karakterize edilen üyesi olan CD63 membran proteini, çoğu insan eksozomunda bol miktarda eksprese edilir (109,110). Bu nedenle, eksozom yüzeyindeki CD63, eksozomların kompleks numune matrislerinden seçici izolasyonu için cazip bir strateji sunar. Örneğin, manyeto-immünokaptür kavramına dayanan ticari bir eksozom izolasyon kiti geliştirilmiştir ve yüksek saflıkta eksozom izole etmeyi hedeflemiştir (111). Benzer bir girişimde, akut miyeloid lösemi (AML) hastalarının plazmasından eksozom izolasyonu için, eşsiz bir AML biyobelirteci olan CD34 için antikorla kaplanmış manyetik mikro-boncuklar kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen ekzomların, transmisyon elektron mikroskobu ile incelendiğinde tipik eksozomal morfolojiye sahip olduğu ve immün baskılamaya aracılık etmek için biyolojik aktivitelerini de koruduğu belirtildi (112). Ayrıntılı bir araştırma, immünoafinite yakalamanın, ultrasantrifügasyon ve yoğunluk gradyanlı ultra santrifüjlemeyle karşılaştırıldığında, kolon kanseri hücre kültürü ortamından eksozomları izole etmek için üstün bir strateji olduğunu göstermiştir (113). Yine, tümör eksozomları üzerinde aşırı eksprese edilen epitelyal hücre adezyon molekülünü (CD326) hedef alan antikorlarla kaplı manyetik boncuklar kullanılmıştır (106). Başka bir örnekte, kolorektal kanser hücresi kültürü ortamından eksozomları izole etmek için farklı olarak ultrasantrifüj, ultrafiltrasyon ve immünoafinite yakalamayı birleştirdi ve diferansiyel ultrasantrifüj ve ultrafiltrasyon izolasyonundan sonra, immüno-elektron mikroskobu ve Western blot, izole edilen eksozomların kimliğini doğruladı. Daha sonra, eksozomlar, kolon epitel hücresine özgü A33 antikor kaplı manyetik boncuklar kullanılarak immünoafinite yakalama ile saflaştırıldı. Proteomik analizler kolon kanserindeki çeşitli proteinleri potansiyel tanısal biyobelirteçler olarak tanımladı (114).

2.4.2.4. Presipitasyon Yöntemi

Eksozomlar; çözünürlüklerini veya dağılabilirliklerini değiştirmek için, biyolojik sıvıların dışında başka ortamlara da konulabilir. Bu amaçla, polietilen glikol (PEG) gibi su içermeyen polimerler devreye girer (96). Bu polimerler, su moleküllerini bağlar ve daha az çözünür bileşenleri çözeltiden dışarı bırakır (96,109). Genel olarak, numuneler 8000Da moleküler ağırlığa sahip PEG içeren bir çökeltme çözeltisi ile inkübe edilir (97). Gece boyunca 4 ° C'de inkübasyondan sonra, çökelti içeren eksozomlar, düşük

hızlı santrifüjleme veya filtrasyon yoluyla izole edilir. Eksozom presipitasyon yönteminin kullanımı kolaydır, herhangi bir özel ekipman gerektirmez ve bu mevcut teknolojilerden yararlanarak klinik kullanıma kolay entegrasyon sağlar (96). Şu anda, birkaç eksozom çöktürme kiti ticari olarak temin edilebilir ve kitlerin bazıları serum, plazma, asitler, idrar, beyin omurilik sıvısı ve kültür ortamı dahil vücut sıvılarıyla uyumludur. Presipitasyon yapmadan önce, numunelerin önce hücrelerden ve hücresel atıklardan arındırılmış olması gerekir. Bu kitlerle ürinereksozom çöktürmenin, diferansiyel ultrasantrifügasyon ve nanomembrankonsantratörleriyle karşılaştırıldığında en yüksek verime ulaştığı gösterilmiştir (115,116). Geliştirilen bazı toplam eksozom izolasyon kitleri hücre kültür ortamı, idrar, serum ve beyin omurilik sıvısı, asitli akışkan, amniyon sıvısı, süt ve tükürük gibi diğer vücut sıvıları ve ayrıca plazma için kit içeriğinde ayrı bir reaktif sunar (117).

2.4.2.5. Mikro-Akışkan Tabanlı İzolasyon Teknikleri

Mikrofabrikasyon teknolojisinin hızlı ilerlemesi, mikro akışkanların temelindeki mikroskoplardaki fiziksel ve biyokimyasal özelliklerden faydalanarak, hızlı ve verimli bir şekilde izole edilmesi için sunulmuştur. Boyut, yoğunluk ve immünoafinite gibi genel yaklaşımlara ek olarak, akustik, elektroforetik ve elektromanyetik manipülasyonlar gibi yenilikçi sıralama mekanizmaları da uygulanabilir. Bu tür cihazların kullanımıyla, numune hacminde artış beklenirken reaktif tüketiminde ve izolasyon süresinde önemli düşüşler beklenir (118,119). Eksozom ve diğer hücre dışı veziküller ile hücre kalıntıları arasındaki büyüklük farkından yararlanmak için, Wang ve arkadaşları kirpikli mikropillarile mikro-akışkan bir cihaz tasarlamıştır. Bu kirpikli micropillar yapılar, 40 ile 100 nm arasında çaplara sahipken, proteinleri, diğer hücre dışı vezikülleri ve hücresel atıklarını filtrelerken, kirpikli yapılar açılır ve 83 nm'liklipid vezikülleri ile 30 µL'ye kadar olan bir numune hacminde test edildiğinde %60' lık bir tutma oranı elde edilir. Daha büyük veziküller (500nm) için tutma oranı %10 dur (120). Özgüllüğü büyük ölçüde arttırmak ve eksozum alt tipleme kabiliyetini tanıtmak için, Chen ve arkadaşları, ilk önce spesifik eksozomların izolasyonu için bir mikro akışkan çip ile immünoaffinite yakalamayı birleştirmeye çalıştılar. Daha önce tartışılan konvansiyonel immünoafinite yakalama yaklaşımlarına benzer şekilde, eksozom izolasyonun merkezinde, zara bağlı proteinler (antijenler) ile çip üzerinde immobilize edilmiş antikorları arasındaki spesifik etkileşim yaratarak, spesifik eksozomların diğer tüm hücre dışı veziküllerden izolasyonu sağlanır. Çip üzerine inşa edilmiş ek

fonksiyonellikler yerinde karakterizasyonu ve nükleik asit ekstraksiyonunu mümkün kılmıştır. Bir testi tamamlamak için 60 dakikalık bir çalışma süresi ile 400ml kadar serum gerekmektedir (121). Bu doğrultuda ticari bir ürün geliştirilmiş olup piyasada ExoChip adı ile mevcuttur. ExoChip, eksozomlarda yaygın olarak aşırı eksprese edilmiş bir antijen olan anti-CD63 ile fonksiyonelleştirilmiş bir immünoçiptir. Bir flüoresan karbosiyanin boyası (DiO) spesifik olarak eksozomları boyar. Bir plaka okuyucu kullanılarak kantifikasyon yapılır. ExoChip, exozomalmiRNA profili oluşturmak için bozulmamış RNA içeren eksozomları izole eder (122).

Bu izolasyon ve karakterizasyon tekniklerinden başka eksozomları bulundukları ortamda etkileyebilir. Bunlardan bir tanesi vücut ortamımızı taklit eden düşük oksijen seviyesidir

Tablo 2.2. Eksozom izolasyon tekniklerinin karşılaştırılması

İzolasyon Tekniği	**İzolasyon prensibi**	**Potansiyel Avantaj**	**Potansiyel Dezavantaj**
Ultrasantrifüj temelli teknikler	Parçacıklı bileşenlerin ve çözünenlerin yoğunluk, boyut ve şekil esaslı ardışık ayırmaları	Ayırma reaktifleri ile düşük maliyet ve yüksek miktarda eksozom üretimi sağlar.	Yüksek ekipman maliyeti ile yavaş ve uzun çalışma süresi gerektirir. Yüksek hızlı santrifüjleme, eksozomlara zarar verebilir.
Boyuta dayalı teknikler	Eksosom ve diğer partiküllü bileşenler arasındaki boyut farkına dayanır.	Ultrafiltrasyon: Hızlı, özel ekipman, ile doğrudan RNA ekstraksiyonu gerektirmez. SEC: yüksek saflıkta eksozomlar ile biyolojik aktiviteyi korur; üstün tekrarlanabilirlik, orta örnekleme kapasitesi sağlar.	Ultrafiltrasyon: Yüksek ekipman maliyeti, izole edilmiş eksozomların orta saflığı, filtre tıkanması ve membranlara bağlanma nedeniyle eksozom kaybına yol açabilir. SEC: Uygun ekipman maliyeti, uzun çalışma süresi içerir ölçeklendirme için özel ekipman gerektirir.

Tablo 2.2. (Devamı) Eksozom izolasyon tekniklerinin karşılaştırılması

Presipitasyon Yöntemi	Su-hariç polimerlerin kullanımıyla çözünürlük, dağılma veya eksozomların faz değiştirmesi	Kullanımı kolay, özel donanım, büyük ve ölçeklenebilir örnekleme kapasitesi gerektirmez	Proteinler ve polimerik malzemeler gibi diğer eksozomal olmayan bileşiklerin birlikte çökeltilmesine yol açar. Uzun çalışma süresi ile izolasyon öncesi ve sonrası temizlik gerektirir.
Immunoafinite yakalamaya dayalı teknikler	Eksozomların membran bağlı antijenleri ile immobilize edilmiş antikorlar arasındaki spesifik etkileşime dayanan izolasyon	Spesifik eksozomların izolasyonu için mükemmel, Yüksek derecede saflaştırılmış eksozomlar içerir.	Yüksek reaktif maliyeti, eksozom etiketlerinin oluşturulması gerekir, düşük verim içerir ve antijenik epitop bloke edilebilir
Mikro akışkanlara dayalı teknikler	İmmün afinite, boyut ve yoğunluk gibi eksozom özelliklerine dayanan mikro ölçekli izolasyon.	Hızlı, düşük maliyetli, taşınabilir, kolay otomasyon ve entegrasyon sağlanır	Klinik örnekler üzerinde standardizasyon eksikliği ve büyük ölçekli testler, yöntem doğrulama eksikliği, orta-düşük örnekleme kapasitesi.

2.5. Eksozomların Karakterizasyonu

Boyut, şekil, yüzey belirteçleri, yoğunluk ve gözeneklilik gibi eksozomların fizikokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi, biyolojik etkileşimlerini belirlemek için gereklidir ve bu nedenle, bu özelliklerin doğru belirlenmesi çok önemlidir. Eksozomları karakterize etmek için rutin olarak birkaç teknik kullanılmıştır. Bunlar NTA (nanopartikül izleme analizi), DLS (dinamik ışık saçılımı), TRPS (dirençli nabız algılama), akış sitometrisi, western-blot ve elektron mikroskobisidir. Ancak, bu tekniklerin her birinin dikkate alınması gereken kendi sınırlamaları vardır.

Eksozomlar, morfolojileri ve boyut dağılımlarına göre ayırt edilebilen hücreler tarafından salınan bir dizi farklı mikro ve nano ölçekli veziküllerden biridir. Optik yöntemlerde 300 nm'den küçük parçacıklar görünmez olduğundan, morfolojilerini

karakterize etmek için elektron mikroskopisi (EM) gereklidir. İletim EM (TEM) eksozom morfolojisini karakterize etmek için standart bir araç olarak kabul edilir olsa da tarama EM (SEM) son zamanlarda ortaya çıkan alternatif bir yaklaşımdır. Genel olarak, TEM ve SEM önce numune işleme adımlarını içerir ve yüksek çözünürlüklü nano yapıları tespit etmek için elektron ışınlarını kullanır.

Eksozom karakterizasyonu, biyofiziksel, moleküler ve mikro-akışkan yöntemler dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Eksozomal boyut aralığını karakterize etmek için biyofiziksel yöntemler kullanılır. Bu tür bir biyofiziksel yaklaşım, 10 nm ila 2 um aralığında eksozomların konsantrasyonunu ve boyut dağılımını ölçebilen NTA gibi optik parçacık izlemedir. Partiküllerin hızını ölçmek için eksozomal hareket yolu tespit edilir. Bu yöntemin sonucunda, parçacıkların büyüklüğü, dağılımı, konsantrasyonu ve fenotipi elde edilebilir. NTA kullanmanın avantajı, eksozomlar da dahil olmak üzere farklı EV'leri tespit etme ve 30 nm'ye kadar çapa sahip küçük parçacıkları ölçme yeteneğidir. Numune hazırlama bu yöntemi kullanarak çok hızlı ve kolaydır ve ölçüm sadece birkaç dakika sürer. Dahası, ölçümler yapıldıktan sonra örnekler doğal formlarında geri kazanılabilir, bu da bu tekniği daha da çekici kılar. Ek olarak, yöntem floresan etiketli antikorlar uygulayarak EV'lerde antijenlerin varlığını tespit edebilir (124).

Foton korelasyon spektroskopisi olarak da bilinen DLS (dinamik ışık saçılımı), eksozomların boyutunu ölçmek için alternatif bir tekniktir. DLS'nin çalışma prensibi, monokromatik bir uyumlu lazer ışınının bir partikül süspansiyonundan geçmesidir. Bir numunedeki parçacıkların göreceli Brownian hareketlerinden kaynaklanan yapıcı ve yıkıcı girişimin neden olduğu saçılma yoğunluğundaki zamana bağlı dalgalanmalar gözlemlenir. Bu yöntemin kullanımı basittir, ancak parçacıkları görselleştirmez. Bu yöntemin yararı, boyutu 1 nm ila 6 um arasında değişen parçacıkları ölçme yeteneğidir. Süspansiyonda daha büyük veziküller mevcut olduğunda, düşük bir miktarda bile olsa, daha küçük parçacıkların tespiti problemli hale gelir. Teknik, analiz edilen veziküllerin çap aralığını sağlayabilir, ancak EV'lerin hücresel orijini hakkında herhangi bir biyokimyasal veri veya bilgi sağlamaz.

Son zamanlarda, ayarlanabilir dirençli nabız algılaması (TRPS) yeni bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Enzim dağılımını ve eksozom konsantrasyonunu ölçerken ve yaklaşık 50 nm çapa kadar olan kolloidal partikülleri karakterize eder. Bu tekniğin göze çarpan

özelliği partikül karakterizasyonu ve eksozomların konsantrasyon ölçümüdür. Parçacık bazında subjektif olmayan karakterizasyon yeteneğine sahiptir. TRPS, manyetik boncuklar ve çeşitli biyomoleküller dahil olmak üzere çeşitli nanoparçacık süspansiyonlarını başarıyla ölçmek için kullanılmıştır. Bu tekniğin dezavantajı, TRPS ölçümlerinin, gözeneklerin parçacıklar tarafından bloke edilebileceği sistem kararlılığı sorunlarına ve parçacıkların sistemin arka plan gürültüsüne karşı algılanamayacak kadar küçük olduğu hassasiyet sorunlarına duyarlı olmasıdır.

Akış sitometrisi, eksozomal yüzey proteinlerini karakterize etmek için kullanılan moleküler bir yaklaşımdır. Ayrıca eksozomların boyutunun ve yapısının ölçülmesine de izin verir. Akış sitometrisi, eksozom analizi için en sık kullanılan tekniklerden biridir, çünkü tek eksozomların hücresel kökenini belirleme kabiliyetine sahiptir. İlk örnek hacmi, bu tekniği kullanarak eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonunda önemli bir rol oynar. Akış sitometrisi, klinik numunelerin tekrar üretilebilir analizine iyi adapte edilmiş, süspansiyondaki hücre ve partiküllerin farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin analizine izin veren ve eksozomların boyutunun ve yapısının ölçülmesine izin veren bir tekniktir. Geleneksel akış sitometreleri, 300 nm'den büyük parçacıkları ölçebilir, ancak ileri dağılmış ışığa (FSC) dayanarak daha küçük parçacıkları tespit edemez. Bu nedenle, bu yöntemler eksozomların doğrudan tespit edilmesine izin vermez. Bir akış sitometresinin çalışma prensibi, belirli bir dalga boyuna sahip bir lazer ışınının asılı parçacıklar içeren bir akışkan akışına yönlendirilmesidir. Işık saçılma derecesi, numunelerdeki parçacıkların varlığına bağlıdır. Ayrıca, bu teknik, floresan boyalarla etiketlenmiş parçacıkları ölçer. Buna dayanarak, akış sitometrisi partiküllerin göreceli büyüklüğünü ve granülasyonunu analiz edebilir. Bu nedenle, son zamanlarda, lekeli eksozomları arka plandaki kirleticilerden ayırmak için daha yüksek hassasiyetli ileri saçılma tespiti, floresan amplifikasyonu ve yüksek çözünürlüklü görüntüleme özelliğine sahip yüksek kaliteli, özel bir akış sitometresi geliştirilmiştir. Yeni nesil akış sitometreleri, gelişmiş bir partikül çözünürlüğü sağlayan FSC tespiti için çoklu açılar kullanır. Bu tekniğin avantajları, askıya alınmış eksozomların hızlı bir şekilde ölçülmesine izin vermesi, 300 nm'den küçük eksozomları tespit edebilmesi ve eksozomların antijen ekspresyon seviyesine göre ölçülebilmesi ve / veya sınıflandırılabilmesidir.

Ek olarak, eksozomları karakterize etmek için başka birkaç moleküler yaklaşım mevcuttur. Bunlar, bir lazer ile numunelerin aydınlatılmasına dayanan Raman spektroskopisini içerir. Bu teknik, eksozomların kimyasal yapısı hakkında bilgi sağlar. Eksozomların mikroakışkanlar kanalları üzerindeki spesifik antikorlara bağlanmasını karakterize etmek ve daha sonra bağlı vezikülleri elemek için bir mikroakışkan bazlı teknik kullanılmıştır. Ayrıca, eksozomlar, RNA gibi kargo moleküllerinin varlığı ile karakterize edilebilir. RNA içeriği, mikro dizi analizi, yeni nesil sıralama ve PCR ile analiz edilebilir (125).

2.6. Hipoksik Ortamın Kök Hücre ve Eksozomlar Üzerine Etkisi

Bütün hücreler yaşam fonksiyonlarını yerine getirmek için oksijen ve oksijenli ortama ihtiyaç duyarlar. Atmosferde %21 oranında bulunan oksijen, insan vücudunda dokulardaki oranına göre %1 ile %12 arasında değişmektedir. Örneğin; kalp, böbrek ve karaciğerde %4-12, beyinde %0.5-7, gözlerde %1-5 oranında oksijen bulunmaktadır. Bazı durumlarda vucüdun tümüne ya da belli bölgelerine oksijen ulaşmaz ve buna hipoksi adı verilir. Eğer tüm vücutta oksijen yetersizliği varsa bu genel hipoksi, vücudun belirli bölgelerinde varsa buna ise lokal hipoksi denmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında daha çok büyüme faktörlerinin, besin maddelerinin ve pH gibi özelliklerin hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kültür ortamında bu özelliklerden en az araştırılanı ise oksijen koşullarıdır. Bunun sebebi çalışmalarda atmosferik oksijenin hücre büyümesi için yeterli olduğunun düşünülmesidir. Buna rağmen 1958 yılında ilk kez düşük oksijen koşullarının mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisine yönelik bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada düşük oksijen seviyesindeki hücrelerin atmosfer koşullarındaki oksijen seviyesine kıyasla daha fazla çoğaldığı tespit edilmiştir. Son yıllarda iyi üretim uygulamaları (GMP) ve hücre proliferasyonundaki standardize çalışmalar sonucunda hipoksinin, mezenkimal kök hücrelerin iyileşme, göç etme ve farklılaşma potansiyelleri için önemli bir düzenleyici olduğu düşünülmektedir (123,126). Hipoksi ve HIF' ler embriyonik kök hücrelerin korunmasına, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin oluşmasına, hematopoetik kök hücrelerin işlevselliğine katkıda bulunur. Oksijen kök hücre mikro çevresinde önemli bir faktördür. Hipoksi sinyali ve HIF' ler, kök hücre biyolojisini düzenleyen hem kök hücrelerdeki hem de nişlerdeki hücresel metabolizmanın modellenmesinde önemli rol oynar ve kök hücrelerin farklılaşmamış bir durum ve çok yönlü farklılaşma potansiyelini

korumalarını sağlayan bir dizi özelliği temsil eder (127). Hipoksinin etkilerine öncelikle hipoksiye indirgenebilir faktörler (HIF' ler) aracılık eder (128,129).

Bugüne kadar tanımlanmış üç tip HIF proteini vardır: HIF-1, HIF-2 ve HIF-3. Her üç protein de dimerik yapıya sahip ökaryotik transkripsiyon faktörleridir. Proteinlerin α-alt üniteleri birbirinden farklılık gösterirken (HIF-1α, HIF-2α, ve HIF-3α); β-alt üniteleri birbirinin aynı (ARNT) yapıdadır. Dokularda hipoksiye karşı ilk 24 saatten daha kısa bir süre içinde gelişen hızlı cevabı HIF-1α koordine etmektedir (130-132). HIF' ler, aril-hidrokarbon reseptörü nükleer translokatörü (ARNT) olarak da bilinen bir alfa alt biriminden (HIF-a) ve bir beta (HIF-β) alt biriminden oluşan heterodimerlerdir (129). Bugüne kadar, üç alfa alt birimi (HIF1A, HIF2A, HIF3A) ve iki beta alt birimi (ARNT, ARNT2) tanımlanmıştır (132-135). HIF-a alt birimlerinin tümü, DNA bağlanması için bir N-terminali b-HLH alanı, heterodimerizasyon için bir PAS alanı ve protein stabilitesinin düzenlenmesi için oksijene bağlı bir degradasyon (ODD) alanı içerir. HIF1A her yerde açık bir şekilde ifade edilirken, HIF2A ve HIF3A' nın ekspresyonu spesifik hücre tipleriyle sınırlıdır (136). HIF-a alt birimi, oksijene bağlı bir proteolitik bozunma ile düzenlenir, buna karşılık HIF-β alt birimi, yapısal olarak ifade edilir. Hipoksi altında HIF-a stabilize edilir ve çeşitli hipoksi ile indüklenebilen genlerin transkripsiyonunu arttırmak için ARNT ile dimerize olan çekirdeğe aktarılır (137,138). HIF-α / ARNT heterodimer, hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için histonasetiltransferazları düzenler (139,140). Ayrıca HIF-a aktivitesi, fosforilasyon, asetilasyon ve sümolasyon gibi ilave protein modifikasyonları ile de düzenlenir (141-143).

Hipoksinin kök hücrelerin farklılaşması üzerine önemli rolü vardır (144-147). Hipoksinin farklı stromal hücrelerde eksozom salımını arttırdığı bilinmektedir (153-159).

2.7. Mezenkimal Kök Hücre Eksozomunun Terapötik Etkisi

Uzun yıllar boyunca, MKH sekretomundaki aktif terapötik faktörü belirleme çabaları, büyüme faktörlerine , sitokinlere ve kemokinlere olan ilgiyi artırmıştır (160). Umut vaat eden birçok aday faktöre rağmen, MKH' lerin etkinliğini tek bir faktör yeterince gösteremez. Bruno ve arkadaşları, MKH salgılanmasının gliserol ile indüklenen akut böbrek hasarı üzerindeki iyileştirici etkisini mikroveziküllere bağlamıştır. Bu mikroveziküllerin boyutu 80 nm ile 1000 nm arasında değişmektedir

(161). Buna karşılık, Lai ve arkadaşları MKH' lerin salgıladıkları eksozomların, 50-100 nm çapa sahip ve endozomal bir kökene sahip olan bir membran kesecik sınıfı Alix, TSG101 ve tetraspanin (CD9, CD63, CD81) gibi eksozom ile ilişkili proteinlere sahip olduklarını göstermiştir (162). Hem mikroveziküller hem de eksozomlar, hücre dışı veziküllerdir. Hücre dışı veziküller genellikle hücreler arası iletişim araçları olarak varsayılır ve lipidleri, nükleik asitleri (mRNA'lar ve miRNA'lar) ve proteinler arasındaki kargo içeriğini yansıtan alıcı hücrelerde biyolojik tepkileri ortaya çıkarmak için proteinler ve hücreler arasında protein transfer etme işlevi görürler (163) . Eksozomlar ve mikro-veziküller arasındaki temel fark, eksozomların çok hücreli cisimlerin plazma zarlarıyla füzyonu yoluyla salınması ve 30-150 nm çapa sahip olmaları iken mikro-veziküllerin plazma zarından koparak oluşması ve 100-1000 nm çapa sahip olmasıdır. Ancak literatürde yaygın olarak araştırılan ve çalışmalar yapılan grup eksozomlardır (164). Eksozomlar, mezenkimal kök hücreler, B ve T lenfositler, dendritik hücreler, mast hücreleri, trombositler ve tümör hücreleri gibi birçok hücre tipi tarafından salgılanır ve kan, idrar, beyin omurilik sıvısı, anne sütü ve tükürük gibi çoğu vücut sıvısında bulunur (163).

Son yıllarda, MKH'den salınan eksozomların, MKH' lerin doku tamirinde rejeneratif ve immünomodülatör yeteneklerini destekleyen temel terapötik ajan olarak bildirilmektedir (165). Bugüne kadar eksozomlar; adipoz doku, kemik iliği, fetal dokular, göbek kordonu, EKH ve iPSC' den türetilmiş MKH' lerden izole edilmiştir (162,166-171). MKH eksozomundaki RNA iletiminin MKH eksozomlarının doku kaynaklarına göre değiştiği bildirilmiş olmasına rağmen, terapötik etkinliğinin elde edilen doku kaynaklarına bağlı olmadığı da bildirilmiştir (172,173). Eksozomal proteinler ve mikroRNA' lar fonksiyonel olarak karmaşıktır ve iletişim, yapı, mekanik, enflamasyon, eksozom biyogenezi , doku onarımı ve rejenerasyonu ile metabolizması gibi birçok farklı biyokimyasal ve hücresel süreçte yer almaktadır. Biyolojik aktivitelerin bu geniş dağılımının MKH' lerin sağladığı, çeşitli hücre tepkilerini ortaya çıkarma ve birçok hücre tipiyle etkileşime girme potansiyelini ortaya koymaktadır (174).

2.8. İn Vitro Hipoksi Modelleri

İnsan hastalıklarının fonksiyonlarını taklit edebilen *in vitro* hastalık modellerinin gelişimi son yıllarda artan ilgi görmüştür. Mekanik, kimyasal ve hücresel

bileşenleri ayrı ayrı manipüle ederek, insanlarla sınırlı bir ilgisi olan ve hastalığa kritik hücresel ve moleküler katkı maddelerini tanımlamak veya değiştirmek zor olan bütün hayvan modellerinin ana sınırlamalarının üstesinden gelmek mümkün hale gelir. Hipoksi ve gradyanları hem fizyolojik hem de patolojik olaylarda biyolojik sistemlerin modülasyonunda önemli rol oynar. Oksijen gerilimi, embriyonik gelişim, metabolizma ve anjiyogenez dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere çeşitli hayati biyolojik süreçleri etkiler. Düşük oksijen gerilimi olan hipoksi, birçok akut ve kronik hastalığın patofizyolojisinde önemli bir faktördür. Hipoksi, sistemik enflamatuar yanıt, tümörgenez ve iskemik kalp hastalığı ve pulmoner hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojik durumların gelişiminde rol oynar. Oksijen gerilimlerini veya gradyanlarını kontrol etmek bu nedenle hücre, doku ve organ araştırması için fizyolojik olarak ilgili *in vivo* ortamları taklit etmek için kritik öneme sahiptir.

Makro ve mikro ortamlardaki oksijeni kontrol etmek için birçok teknoloji ve cihaz geliştirilmiştir. Makro ortamların global oksijen kontrolü için mevcut teknikler arasında hipoksik oda (hypoxic chambers), çalışma istasyonu (workstations), perfüzyon odası (perfusion chambers) veya doğrudan oksijen tutucu ajanlar ilave edilir. Bir seferde sadece bir hipoksik seviyenin tek bir koşulunu sağlamak, yavaş dengelenme süresi ve kontrollü olarak *in vivo* fizyolojik oksijen gradyanlarını sağlayamamak dahil olmak üzere, kritik zorluklar bulunmaktadır. Dahası, oksijen tutucu ajanlar hücre büyüme ortamını değiştirir ve hücresel tepkileri etkileyebilir (175).

3. BÖLÜM
GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Yerel Etik Kurulu 2018/185 sayılı onayı ile yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilme kriterleri; herhangi sistemik bir hastalığının (diyabet, immun yetmezlik vs) olmaması, 18-35 yaş aralığında sağlıklı gönüllü olması ve viral negatiflik iken; çalışmanın dışlama kriterleri herhangi sistemik hastalığının olması, belirtilen yaş aralığında olmaması, aktif viral hastalığı olması ve anti-aggregan ilaç kullanıyor olmasıdır. Çalışmaya onay veren 5 sağlıklı gönüllüden 2 tüp (20cc) kan alınarak testler gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2017-7712 kodlu proje ile desteklenmiştir.

3.1. Mezenkimal Kök Hücrenin Eldesi ve Hipoksik Modelin Oluşturulması

Mezenkimal kök hücrelerin eldesi için Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi' nden temin edilen hazır h-UK mezenkimal kök hücre hatları kullanıldı. Hücreler 37^{o}C su banyosunda çözdürülerek 75cm^{2} 'lik hücre kültür kaplarına (TPP, İsviçre) ekim yapıldı. Kültür kabında hücrelerin büyümesi ve çoğalabilmesi için αMEM besiyeri (Biological Industries, ABD) içerisine %1 antibiyotik (Biological Industries, ABD), %1 stabil L-glutamin (Biological Industries, ABD) ve %10 allojenik insan serumu eklendi ve 37^{o}C de %5 CO_2 içeren inkübatörde (Sanyo, Japonya) %21 O_2 (normoksi), %5 O_2 (hipoksi), %3 O_2 (hipoksi) kültür koşullarında 3 gün inkübe edildi. Hücreler için hipoksik ortam koşulları ayrı bir hipoksi inkübatörü (Newbrunswick, Kanada) ile oluşturuldu. İnkübatör en düşük %3 hipoksi seviyesinde çalışmaktadır (*Şekil 2).* Hücreler %70 üzerinde konfuluent olunca tripsin metodu ile kültür kabının tabanından kaldırılarak pasajlandı ve hücreler 3. pasaja gelene kadar bu işlem tekrarlandı. 3. pasaja ulaşan hücrelerin besiyeri serolojik pipet yardımıyla çekildi ve tekrar serum içermeyen besiyeri eklenerek eksozom salınımı sağlandı. 24 saat sonunda

besiyeri çekilerek hücrenin sekretomları toplandı. Bu sekretom mikroveziküllleri ve diğer ajanları içermekteydi.

Şekil 3. 1 Hipoksik modelin oluşturulduğu hipoksi inkübatör (Newbrunswick, Kanada)

3.1.1. h-UK Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

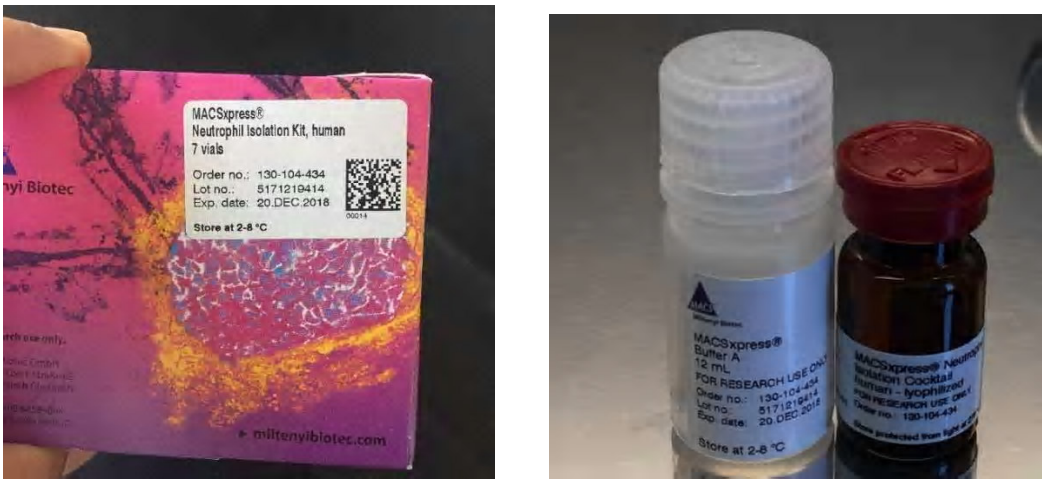
MKH fenotipini belirlemek için Uluslararası Hücresel Terapi Derneği tarafından standart olarak kabul edilen CD34, CD45, CD73, CD90 ve CD105 hücre yüzey belirteçleri kullanıldı (176). Stem Flow hMSC analysis kiti (BD, ABD) kullanılarak protokole uygun bir şekilde antikorlar ile inkübe edildi. Protokol talimatlarına göre hücreler, ortak MKH belirteçlerinin ifadesi için akış sitometrisi ile incelendi. MKH' lerin değerlendirilmesinde İnsan MSC Analiz Kiti (BD, ABD) kullanıldı. Üreticinin talimatlarına göre hücreler önceden konjuge antikorlarla boyandı. Kısaca, hMKH' ler 1x 10^6 hücre konsantrasyonunda 10 dakika süreyle spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak için BD ™ Accutase ™ Hücre Ayırma Solüsyonu ile inkübe edildi. Daha sonra, MKH-pozitif belirteçler (CD90-FITC, CD105-PerCP-Cy5.5, CD73-APC) ve negatif belirteçler (CD45-PE, CD34-PE, CD11b-PE, CD19-PE, HLA- için antikor kokteyli DR-PE) hücrelere eklendi. Ek olarak, iki ayrı tüpte, PE-konjüge edilmiş fare monoklonal CD44-PE antikoru veya PE-konjüge edilmiş fare monoklonal CD142-PE antikoru MKH 'lere eklendi. 22° C' de 20 dakika inkübasyondan sonra, fazla antikorları çıkarmak için hücreler BD Pharmingen ™ Blot Tamponu (PBS-Cell Wash) ile yıkandı ve BD

Pharmingen ™ Blot Tamponu (PBS-Cell Wash) içerisinde 300-500 ul'de tekrar süspanse edildi. Ardından akım sitometri cihazında (Beckman Coulter Novios, ABD) görüntülenerek MKH varlığı ve karakterizasyonu yapıldı.

3.2. Tam Kandan Nötrofil İzolasyonu

Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar 2018\185 onay numaralı etik kurul kararı ile Erciyes Üniversitesi Mehmet-Kemal DEDEMAN Hematoloji ve Onkoloji Hastanesi' nde bulunan gönüllü olur formları alınmış sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüpe 20cc kan alındı. Tüpteki antikoagülanın (EDTA) görevi kandaki kalsiyumu bağlıyarak kanın pıhtılaşmasını önlemektir. Sağlıklı gönüllülerden alınan tam kandan nötrofil elde edilmiştir.

Nötrofil izolasyonu Miltenyi Biotec firması tarafından üretilen MACSxpress (Human Whole Blood Neutrophil Isolation Kit, 130-104-434, MiltenyiBiotec, Almanya) kiti kullanılarak yapıldı. Kitin içerisinde bulunan liyofilize pellet ile kokteyl hazırlanarak tam kan ile karıştırıldı. MACS mix rotatörde kan ile kokteyl solüsyonun daha fazla karışması sağlandı ve macs seperatöre konuldu. Kitin izolasyon mekanizmasına göre ağır olan kırmızı kan hücreleri dibe çöktü istenmeyen diğer kan hücreleri mikro boncuklarla işaretlenerek seperatörde oluşturulan manyetik alan ile tüp çeperinde yapışarak etiketlendi. Hedef hücre olan nötrofiller ise süpernatantta kalarak pipet yardımıyla toplandı.

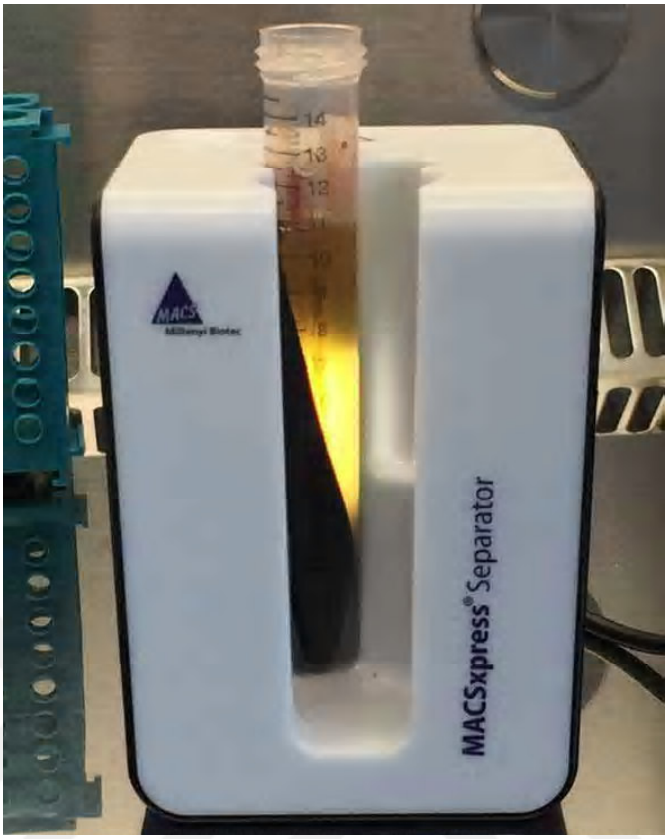


Şekil 3. 2 Nötrofil izolasyon kiti

Kitin protokolü şu şekildedir:

1. Edtalı tüpe 8ml kan alındı.
2. Kitin içerisinden çıkan liyofilize pellet üzerine 2ml Buffer A eklenip köpük oluşturmadan 2-3 kere pipetaj yapılarak pellet çözüldü ve homojen hale getirildi.
3. 1 volüm tam kan için 0,25 volüm pellet (liyofilize pellet+Buffer A) ve 0,25 volüm Buffer B eklenerek final kokteyl hazırlandı.
4. 8ml kan, 15ml falkon tüpe alındı ve üzerine 4ml final kokteyl eklenerek tüp sıkıca kapatıldı. 3-4 defa alt üst edilerek karışması sağlandı.
5. 5 dakika oda sıcaklığında 12 rpm de macsmix rotatörde çevrildi.
6. Rotatörden çıkarılan falkon, kapağı açık şekilde macs seperatöre konuldu ve 15 dakika lamina air flow kabin içerisinde inkübe edilerek oluşturulan manyetik alan ile hedef hücrelerin ayrılması sağlandı. Burada manyetik işaretli hücreler tüpün duvarına yapıştı, eritrositler tüpün tabanına çöktü ve nötrofiller supernatant içerisinde kaldı.
7. Bir başka 15ml tüpe macs separator içerisinden tüp çıkarılmadan supernatant alındı ve hedef hücreyi içermekteydi. Eritrosit tabanında 1-2ml bırakılarak nötrofil toplama işlemi tamamlandı.

Şekil 3. 3 Kanın rotatörde karıştırılması

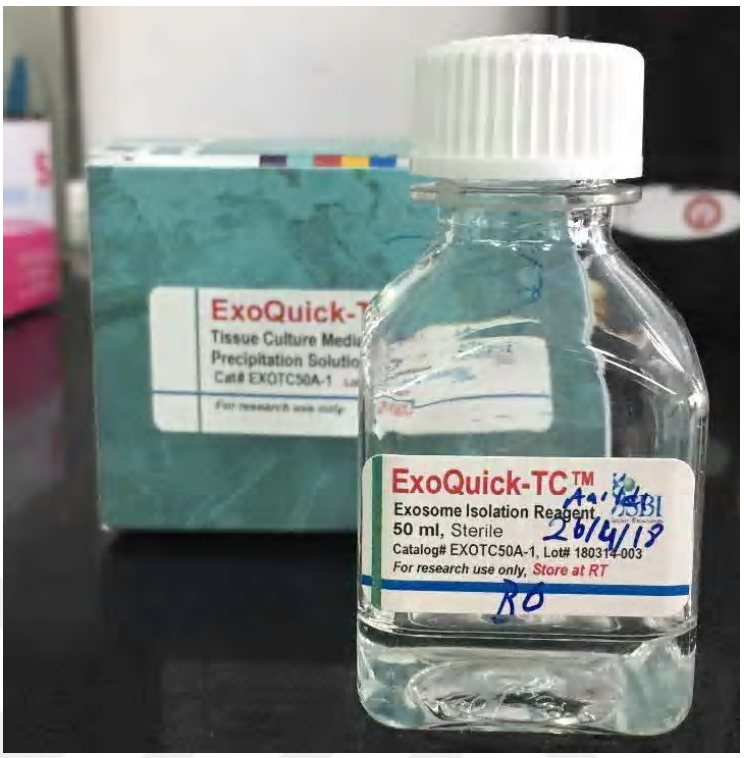


Şekil 3. 4 Hedef hücre nötrofiller

3.3. Eksozom İzolasyonu

3.3.1. Kit Kullanarak İzolasyon

Eksozom izolasyon yöntemi olarak System Bio Sciences firması tarafından üretilen ExoQuick-TC (#EXOTC50A-1, System Bio sciences, ABD) kiti kullanıldı. Eksozom üretimi için hUK-MKH ve kültürdeki nötrofil hücreleri 24 saat boyunca serumsuz besiyeri ile inkübe edildi ve inkübasyon süresi dolduktan sonra kite ait izolasyon solüsyonu kullanılarak eksozom izole edildi. Bu işlem için kit prosedüründe yazan protokol uygulandı.



Şekil 3. 5 ExoQuick- Tc eksozom izolasyon kiti

Protokol şu şekildedir:

1. 1x150 cm^2 flasktan 20 ml hücre kültür besiyeri toplandı.
2. Besiyeri 3000x *g*'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek hücreler ve hücre atıkları çöktürüldü.
3. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve süpernatant hacminin 1/5'i olacak şekilde, 20 ml besiyeri için 4 ml eksozom isolasyon solüsyonu eklendi.
4. Homojen bir karışım elde etmek için iyice vortekslendi. Ardından +4ºC'ye kaldırılarak 24 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası örnekler 1500x *g*'de 30 dakika boyunca +4ºC'de santrifüj edildi. Santrüfüj sonrası oluşan süpernatant atıldı ve pellet 500 ul PBS ile resüspanse edilerek –80ºC'ye kaldırıldı.

3.3.2. Manuel İzolasyon

3.3.2.1. Solüsyonların Hazırlanması

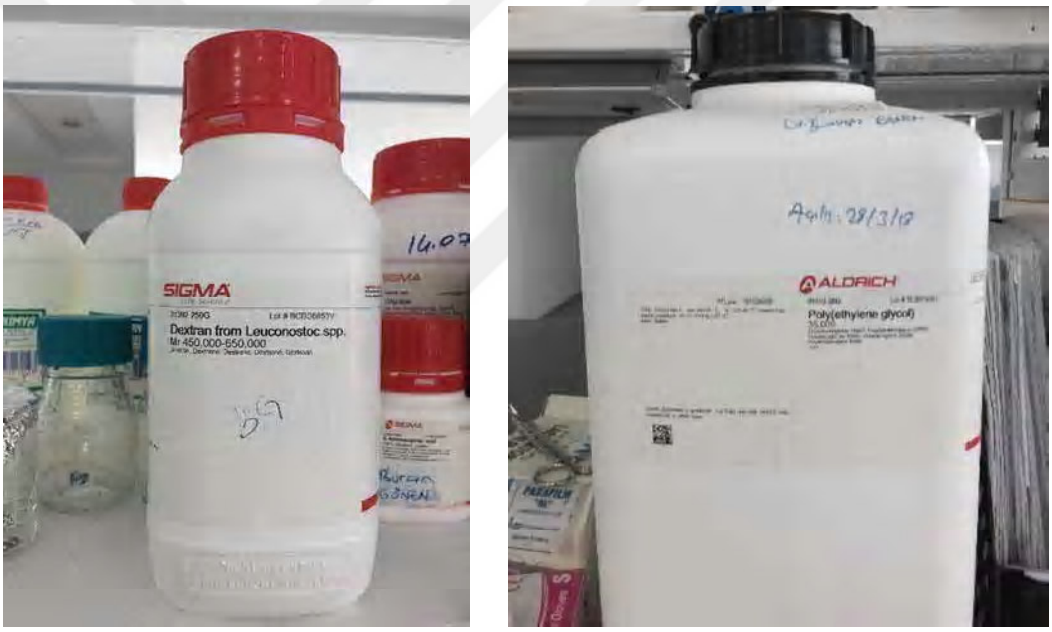
3.3.2.1.1. Çöktürme Solüsyonu (2X)

70gr. polyetilen glikol (PEG Sigma, ABD) ile 30gr. dextran (DEX Sigma, ABD) 1lt. ddH_2O (double distile su) ile çözdürüldü. ddH_2O su Genom ve Kök Hücre Merkezi' nde bulunan double distile su cihazından (ELGA PurePac Purelabflex, İngiltere) alındı.

Plastik beherde balık yardımıyla manyetik karıştırıcıda (Heidolph, Almanya) 2-3 saat süreyle karışarak homojen hale gelmesi sağlandı.

3.3.2.1.2. Yıkama Solüsyonu (1X)

35gr. poly etilen glikol (PEG) ile 15gr. dextran (DEX) 1lt. ddH_2O ile çözdürüldü. ddH_2O su Genom ve Kök Hücre Merkezinde bulunan double distile su cihazından (ELGA PurePacPurelabflex, İngiltere) alındı. Yıkama solüsyonu da plastik beher içerisinde balık yardımıyla manyetik karıştırıcıda 2-3 saat süreyle karışarak homojen hale gelmesi sağlandı. Karışma tamamlanınca 1000xg de 10 dakika santrifüj (Hettich, Rotina 380, Almanya) edildi ve santrifüj sonrası solüsyonun üstünde kalan %80'lik kısım başka bir falkona alındı pellet atılarak kullanıma hazır hale getirildi.



Şekil 3. 6 Eksozom manuel izolasyon malzemeleri

3.3.2.3. İzolasyon İşlemi

Hücreler çoğalmaya başlayınca serum içermeyen αMEM besiyeri (Biological Industries, ABD) ile RPMI (Gibgo, ABD) besiyerine alınarak 1 gün süreyle umbilikal kord ve nötrofil hücrelerinden eksozom salınımı sağlandı. Ertesi gün hücre kültür şişelerinden besi ortamı ile birlikte hücreler çekilerek 3000xg de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınarak 0,22µm filtreden geçirildi. Alınan süpernatantın miktarı ölçülerek aynı oranda 2x PEG-DEX yıkama solüsyonu eklenerek +4°C 1000xg de 10 dakika santrifüj edildi. Toplam hacmin %80' i hesaplanarak alındı ve alınan miktar kadar 1x PEG-DEX çöktürme solüsyonu eklenerek +4°C 1000xg de 10 dakika santrifüj edildi.

Bu işlem birkaç kez tekrarlanarak yıkama işlemi yapıldı. Toplam hacmin %90'ı hesaplanarak alındı ve atıldı. Kalan %10 kısma 1:2 oranda soğuk absolt etanol (Merck Darmstadt, Germany) eklendi ve +4°C de 13.500xg de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınıp pellet atıldı. Toplanan supernatant konsantratöre alınarak burada 3-4 saat 30°C de alkol uçurma işlemi yapıldı.

Şekil 3. 7 Eksozomların konsantratör cihazında yoğunlaştırılması

3.4. Eksozom Karakterizasyonu

İzole edilen eksozomların tanımlanması için SEM analizi, ZetaSizer cihazında partikül boyut analizi, western blot yöntemi ile yüzey belirteçlerinin varlığı ve eksozom miktarı hesaplaması yapıldı.

3.4.1. SEM Boyut Analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile de yüksek büyütmelerle malzemelerin yüzey özellikleri, porlu bir yapıda olup olmadıkları ve boyutları analiz edilebilir. SEM'de, elektron ışını numuneyi geçtiğinde elektron paraziti ile bir görüntü oluşturulur. Analiz edilen örneklerin ölçümden önce sabitlenmesi ve susuzlaştırılması gerekir ve görüntü elde etme vakum koşulları altında gerçekleştirilir.

Eksozomların görüntülenmesi için Erciyes Üniversitesi TAUM bünyesinde bulunan SEM (Scanining Electron Microscope-Taramalı Elektron Mikroskobu Zeiss GEMINI 500) cihazı kullanıldı. Bunun için eksozom süspansiyonundan 30 µl temiz bir lam üzerine damlatılıp tip yardımıyla yayılması sağlandı. Örnek oda sıcaklığında çeker ocak içersinde kurumaya bırakıldı ve ardından SEM'de görüntülendi. Elde edilen görüntülerden Image J programı ile eksozomların çapı ölçülerek ortalama eksozom büyüklüğü hesaplandı.

3.4.2. Eksozom Partikül Boyut Analizi

Eksozomların karakterizasyonunu belirlemek için kullanılan bir diğer yöntemde partikül boyut analizi yapmaktır. Burada cihaz küvet içerisindeki örneğin tamamını birkaç dakika içinde tarayarak örnek varlığında ışıma yapmaktadır.

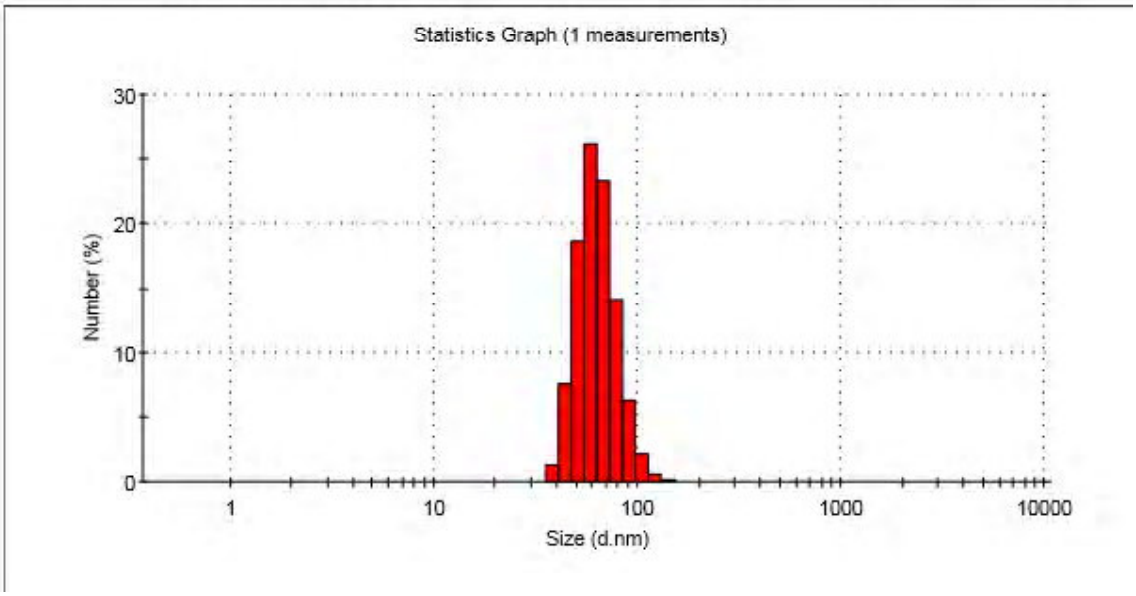
Analiz için Erciyes Üniversitesi Ernam Merkezi bünyesinde bulunan ZetaSizer (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak yapıldı. Ölçümde kolloidal yapıda ve birbirine yapışma eğilimi gösteren eksozomlar 1: 1000 oranında seyreltilerek tamamen birbirinden ayrılması sağlandı. Cihaza 1ml eksozom örneği konuldu, refraktif indeks ve örnek çözücüsü ayarlanarak cihazda bulunan lazer ışıma ile ölçüm tamamlandı. Cihaz otomatize sistem olduğu için numune içerisinde bulunan partikülleri okuyarak nm boyutunda ortalama yüzde oranda değerler verdi. Ancak standart sapma değerleri vermedi. Eksozomlara ait kısımlarda nm boyutunda sonuç veren pikler gözlendi.

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0	
0,4632	0,0	
0,5365	0,0	
0,6213	0,0	
0,7196	0,0	
0,8332	0,0	
0,9649	0,0	
1,117	0,0	
1,294	0,0	
1,499	0,0	
1,736	0,0	
2,010	0,0	
2,328	0,0	
2,696	0,0	
3,122	0,0	
3,615	0,0	
4,187	0,0	
4,849	0,0	

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
5,615	0,0	
6,503	0,0	
7,531	0,0	
8,721	0,0	
10,10	0,0	
11,70	0,0	
13,54	0,0	
15,69	0,0	
18,17	0,0	
21,04	0,0	
24,36	0,0	
28,21	0,0	
32,67	0,0	
37,84	1,3	
43,82	7,5	
50,75	18,6	
58,77	26,2	
68,06	23,3	

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
78,82	14,1	
91,28	6,2	
105,7	2,1	
122,4	0,5	
141,8	0,1	
164,2	0,0	
190,1	0,0	
220,2	0,0	
255,0	0,0	
295,3	0,0	
342,0	0,0	
396,1	0,0	
458,7	0,0	
531,2	0,0	
615,1	0,0	
712,4	0,0	
825,0	0,0	
955,4	0,0	

Size d.nm	Mean Number %	Std De Number
1106	0,0	
1281	0,0	
1484	0,0	
1718	0,0	
1990	0,0	
2305	0,0	
2669	0,0	
3091	0,0	
3580	0,0	
4145	0,0	
4801	0,0	
5560	0,0	
6439	0,0	
7456	0,0	
8635	0,0	
1,000e4	0,0	



Şekil 3. 8 Eksozom partikül boyut analizi ortalama yüzdeleri

Şekil 3. 9 Partikül boyut analiz cihazı (Zeta-sizer, Malvern, Almanya)

3.4.3. Western-blot Yöntemi ile Eksozom Belirteçlerinin Görüntülenmesi

3.4.3.1. Bradford ile Protein Miktarı Tayini

Eksozom belirteçlerinin varlığının doğrulanması için western-blot yöntemi uygulandı. Yüklenecek protein konsantrasyonunu hesaplamak için öncelikle eksozom örneklerinin protein konsantrasyonu ölçüldü. Bunun için Bradford yöntemi uygulandı. Bradford yönteminin uygulanmasında Quick Start Bradford Protein Test kiti (Bio-Rad, ABD) kullanıldı. Standartlar kit içindeki BSA kullanılarak oluşturuldu. Eksozom örnekleri ise 200 µl RIPA buffer (Sigma, ABD) ile resüspanse edilip ve 15 saniye vortekslendi. İstenilen oranda Bradford boyası koyularak 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbansı Glomax Multi ELISA (Promega, ABD) okuyucuda 450 nm' de ölçülerek hesaplandı.

3.4.3.2. Western-Blot Analizi

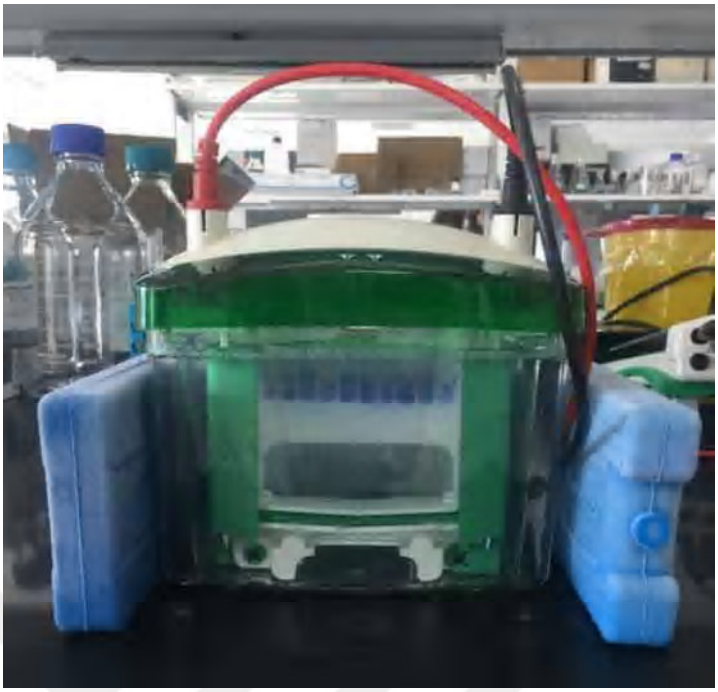
Western-blot, elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metodlarla gösterilmesi esasına dayanır. Proteinlerin elektroforezleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) gerçekleştirilmektedir. SDS-PAGE proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden biridir (177).

Elektroforez işlemi, SDS-polipeptit komplekslerini, poliakrilamid jele yükleyip elektrik akımına maruz bırakıldıkları zaman proteinin moleküler ağırlığıyla orantılı olarak, artı

kutuba doğru göç etmesi ve jelde bulundukları yerde bantlar halinde yığılım göstermesi işlemidir.

Western blot tekniği elektroforez işlemini takip eden 4 adımda gerçekleştirilir. Bunlar jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan protein bağlanmalarını engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamalarıdır. Bu işlemlerin sonunda Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonları belirlendi. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi işleminin ardından örnekler SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırıldı ve ıslak (wet) western blot sistemi ile PVDF membranlara aktarıldı. Bu işlemler için Bio-Rad firmasının "Mini Protean Gel" sistemi kullanıldı. Ardından SystemBioSciences firmasına ait ALIX, HSP70, CD9, CD63 ve CD81 eksozom spesifik antikorlar kullanılarak eksozomlar tanımlandı. Bu işlemler için uygulanan protokol şu şekildedir:

1. %12'lik poliakrilamid jel hazırlandı ve örneklerden 20µg/ml her bir kuyucuğa yüklendi.
2. Jeldeki örneklerin koşturulmasının ardından ayrıştırılan proteinler PVDF membrana ıslak western blot sistemiyle aktarıldı.
3. Membran TBS-t tamponu içinde hazırlanan %2'lik I Block Tropix (Thermo Fisher Scientific, ABD) bloklama solüsyonuyla bir saat boyunca oda ısısında inkübe edildi.
4. Bloklama işleminin hemen ardından membran, bloklama solüsyonu içinde 1:1000 olacak şekilde hazırlanmış Anti-CD9, Anti-CD63, Anti-CD81, ALIX ve HSP-70 antikorları ile bir gece boyunca +4ºC'de inkübe edildi.
5. Ertesi gün membran üzerindeki fazla antikorların ve spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırılması amacıyla 3x5 dakika TBS-t tamponunda yıkandı. Ardından yine SystemBiosciences firmasına ait primer antikora uygun HRP-konjuge anti-rabbit sekonder antikor ile bir saat boyunca oda ısısında inkübe edildi.
6. Sekonder antikor ile inkübasyonunun tamamlanmasının ardından membranlar yine 3x5 dakika TBS-t tamponunda yıkandı ve ardından ECL solüsyonu (ECL Femto, Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenerek ChemiDoc MP (Bio-Rad, ABD) görüntüleme cihazında görüntülendi.



Şekil 3. 10 Proteinlerin koşturulması

3.4.4. Eksozom Miktar Tayini

Bu işlem için System Bio sciences firmasına ait ExoCet kiti kullanıldı. Örnekler kit protokolüne göre çalışıldı ve Glomax Multi ELISA (Promega, ABD) okutularak absorbans değerinde eksozom miktarları hesaplandı. Elde edilen eksozomların miktarı mikrovezikül ölçüm kiti (EXOCET Exosome Quantitation Assay- EXOCET96A-1 SBI, Amerika) ile belirlendi.

Çalışmada kullanılan kit protokolü şu şekildedir;

1. Kit içerisinde çıkan protokole uygun olarak standartlar hazırlandı.
2. Daha sonra örnekler için reaksiyon buffer (A Buffer+B Buffer) hazırlandı.
3. 10µl eksozom örneği için 40µl kit içinden çıkan lizis buffer eklendi ve 37^{o} C de 5 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda 15 saniye vortekslendi ve 1500xg de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Supernatant alınıp, Üzerine 50ul reaksiyon buffer eklenerek 96 kuyucuklu pleyte alındı.
6. 10-20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.
7. Süre sonunda 450 nm de örneklerin absorbansı ölçüldü.
8. Standartlara göre eksozom miktarı belirlendi.

Şekil 3. 11 Eksozom miktar tayin kiti

3.5. Eksozom Etkinlik Analizi

Tez çalışmasında izole edilen eksozomların etkinlik testi lenfosit proliferasyon testi ile yapıldı. Lenfositler vücudun ana bağışıklık hücreleri tiplerinden biri olan beyaz kan hücreleridir. Kemik iliğinde üretilir, kan ve lenf dokusunda bulunurlar. Bağışıklık sistemi, lenfositleri içeren bağışıklık hücreleri olarak bilinen karmaşık bir hücre ağıdır. Lenfosit proliferasyonu bazı bening (reaktif hiperplazi ve lenfadenit) veya malign lenfoma durumlarında artış göstermektedir. MKH' lerinn literatürde lenfosit proliferasyonunu baskıladığı bilinmektedir (178).

Lenfosit proliferasyon testi için tam kandan PBMC (periferik kan mononükleer hücre) izolasyonu yapıldı. Sağlıklı ve olur formları alınmış gönüllülerden heparinli tüpe kan alınarak miktarı ölçülür. Kan miktarının yarısı kadar Lymphoprep (Stemcell, Norvay) ayrı bir tüpe alındı. Üzerine kan yavaşça sızdırılarak eklendi ve 800 xg de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası bulutumsu kısım toplanarak 75 cm^2 flasklara RPMI 1640 besiyeri (Gibgo, ABD) ve %1 glutamin, %1 antibiyotik, %10 FBS (Gibgo, ABD) içeren ortamda ekim yapılarak %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı.

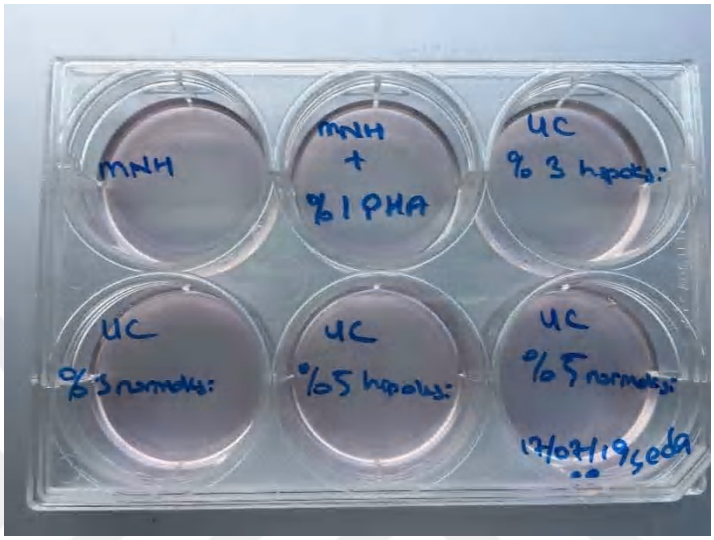
Şekil 3. 12 Tam kandan elde edilen PBMC

3.5.1. Kİ-67 Eksozom Etkinlik Testi

İzole edilen PBMC hücreler 1 gün süreyle inkübe olduktan sonra 6 kuyucuklu pleytlere ekim yapıldı. Kontrol grubuna eksozom uygulanmadan, diğer gruba %1 PHA (Fitohemaglutinin, BI, ABD) eklenerek deney planlandı. Sonrasında üzerine daha önce izole edilmiş olan eksozomlar (%3 hipoksi h-UK eksozomu, %5 hipoksi h-UK eksozomu, %21 normoksik h-UK eksozomu) uygulandı. 1 gün %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. Kİ67 prolifere olan hücreleri gösterebilen bir antikordur ve prolifere olan hücrelerin yüzeylerinde bulunur ve ilk defa 1983'de Gerdes ve arkadaşları tarafından tanımlanmış, tonsil germinal merkez hücreleri, epitelyum bazal hücreleri ve intestinal epitelin kript hücreleri gibi prolifere hücrelerde gösterilmiştir. Ki67, hücre siklusunun Go fazı dışında tüm fazlarında bulunan nonhiston nükleer proteindir (7).

Ki67 proliferasyon testi (MilliporeMerck, Almanya) ticari kit ile yapıldı. İnkübasyon sonrasında kit protokolüne göre hücreler pleyt tabanından çekilerek ve 2 kere PBS ile yıkandı. 300xg de 5 dakika santrifüj edildi. 50 µl 1x fiksasyon buffer (Millipore, Merck) eklendi. 1 kere vortekslenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. 150µl 1x assaybuffer (Millipore, Merck) eklendi 300xg de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilerek 100µl permeabl solution (Millipore, Merck) eklendi. 1 kere vortekslenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 100 µl 1x assay buffer eklendi 300 xg de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilerek tekrar 50µl 1x assay buffer eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 10µl Ki67 antibody (KiPE

Millipore, Merck) eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. 150µl assay buffer eklenerek Muse Cell Analyzer (Millipore, Merck) cihazında ölçüm yapıldı. Cihaz akım sitometri mantığında çalışan bir cihazdır ve mikrokapiller yardımıyla hücre içeriğini tarayarak işaretli antikorlar düzeyinde ışıma yapar ve aynı zamanda mobilize ekranda sonuçlar verir.



Şekil 3. 13 h-UK-MKH eksozomları için Ki-67 deney planı

Şekil 3. 14 Muse hücre analiz cihazı ve Ki67- proliferasyon kiti

3.5.2. XTT Eksozom Etkinlik Testi

İzole edilen PBMC hücreler 1 gün süreyle inkübe olduktan sonra 96 kuyucuklu pleytlere ekim yapıldı. Kontrol grubuna eksozom uygulanmadan, diğer gruba %1 PHA

(Fitohemaglutinin, BI, ABD) eklenerek deney planlandı. Sonrasında üzerine daha önce izole edilmiş olan eksozomlar (%3 hipoksi h-UK eksozomu, %5 hipoksi h-UK eksozomu, %21 normoksik h-UK eksozomu) uygulandı (Şekil 15). 1 gün %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. Proliferasyon testi tetrazolyum tuzları içeren test olan XTT metoduna göre yapıldı.

Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri, formazan denilen yapıya dönüşmelerini sağlayarak, renk değişikliğini beraberinde getirir. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilirler. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybeder ve herhangi bir renk değişimine neden olmazlar. Bu değişimin, *in vitro* ortamda yalnızca canlı hücreler tarafından yapılabilmesi, tetrazolyum bileşiklerini biyolojik anlamda oldukça önemli kılmıştır. Tetrazolyum tuzları MTT, XTT, MTS olarak farklı gruplara ayrılır. Biz çalışmamızda XTT testini kullandık, bunun sebebi; PMSC hücrelerini pleyt tabanın yapışmayıp askıda kalan hücre olmasıydı. Tetrazolyum bileşikleri ile yapılan proliferasyon testleri, üç aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada hücreler belirli bir süre araştırılan sitotoksik maddeye maruz bırakılırlar. İkinci aşamada toksik madde uzaklaştırılıp tetrazolyum bileşiği hücrelere eklenir ve ortalama 1-4 saat boyunca inkübe edilir. Bu esnada canlı hücreler ilgili bileşikler indirgenip renk değişimini gerçekleştirir. Son aşamada ise renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir. Çalışmamızda kullanılan proliferasyon testi, XTT proliferasyon testi kit (BI, ABD) protokolüne göre yapıldı. Protokole göre kit içeriğinde çıkan reagent solüsyondan, 5 ml olan XTT tuzu üzerine 100µl eklenerek solüsyon oluşturuldu. Bu solüsyondan her kuyucuğa 50µl eklendi ve 2-3 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örneklerin absorbansı Glomax Multi ELISA (Promega, ABD) 450nm de okundu.

Şekil 3. 15 XTT proliferasyon kiti ve Promega absorbans okuyucu

3.6. İstatiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizleri Turcosa istatistik programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama±stadart sapma olarak verildi. İkili karşılaştırmalarda Student t testi, üçlü karşılaştırmalarda ise varyans analizi yapıldı. P <0.05' in altındaki değerler anlamlı olarak kabul edildi.

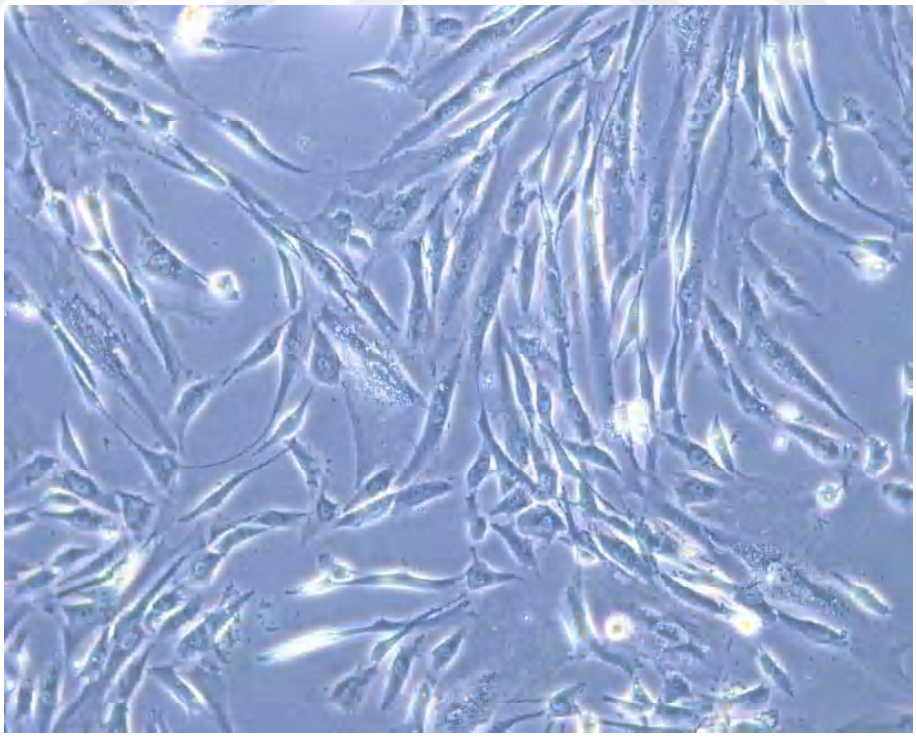
4. BÖLÜM

BULGULAR

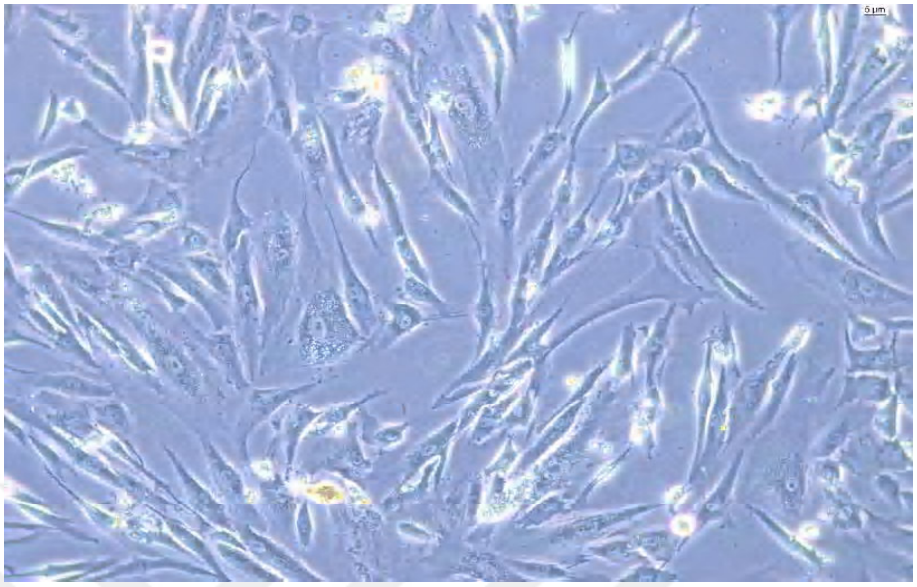
4.1. hUK-MKH ve Nötrofil Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültür Bulguları

Dondurup- çözme yöntemi ile kültüre alınan h-UK mezenkimal kök hücrelerinin morfolojileri fibroblast benzeri bir yapıda olup iğ şeklindedir. Hücrelerin çeperleri belirgin ve birbiri içerisine geçmiş şekilde olduğu gözlendi. Hipoksi (%3-%5 O_2) ve normoksi (%21 O_2) ortamlarında hücrelerin fenotipi, flask tabanına tutunması ve çoğalması açısından bir farklılık gözlenmedi.

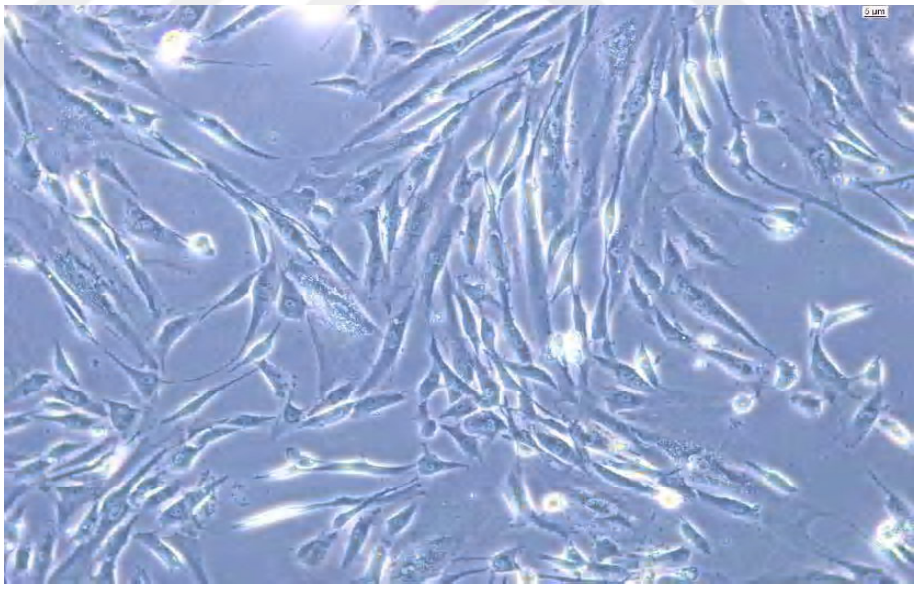
Primer kültürü yapılan nötrofil hücrelerinin şekilleri ise yuvarlak, çeperleri belli ve parlak görünümlü olup çoğalma açısından gruplar arası fark gözlenmedi.



Şekil 4. 1 h-UK normoksik (%21 O_2) ortamda üretilen hücreler, 10x büyütme, Invert mikroskop (Leica, Almanya)

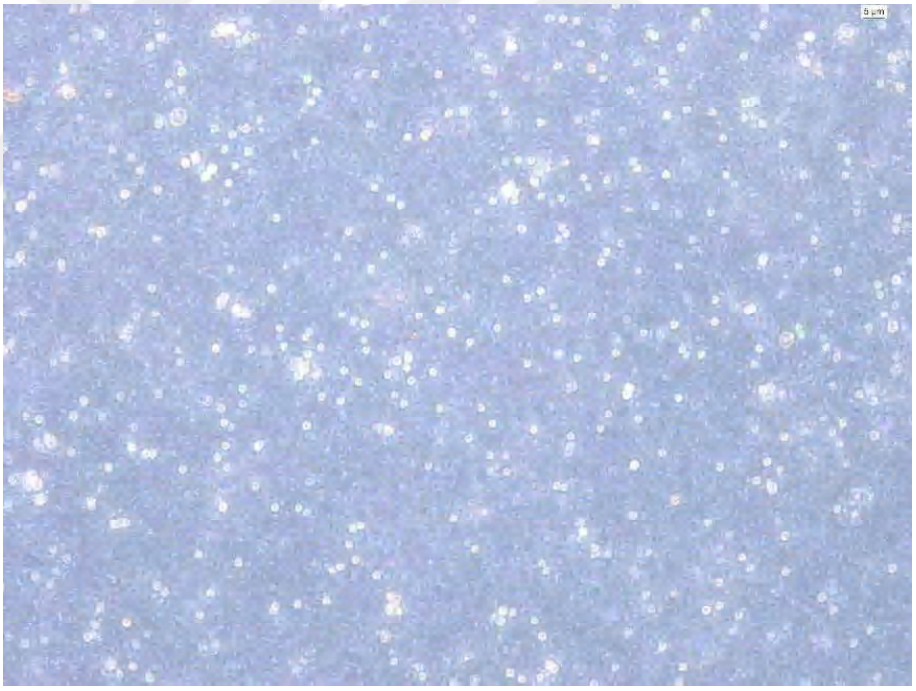


Şekil 4. 2 h-UK hipoksik (%5 O_2) ortamda üretilen hücreler 10x büyütme, Invert mikroskop (Leica, Almanya)

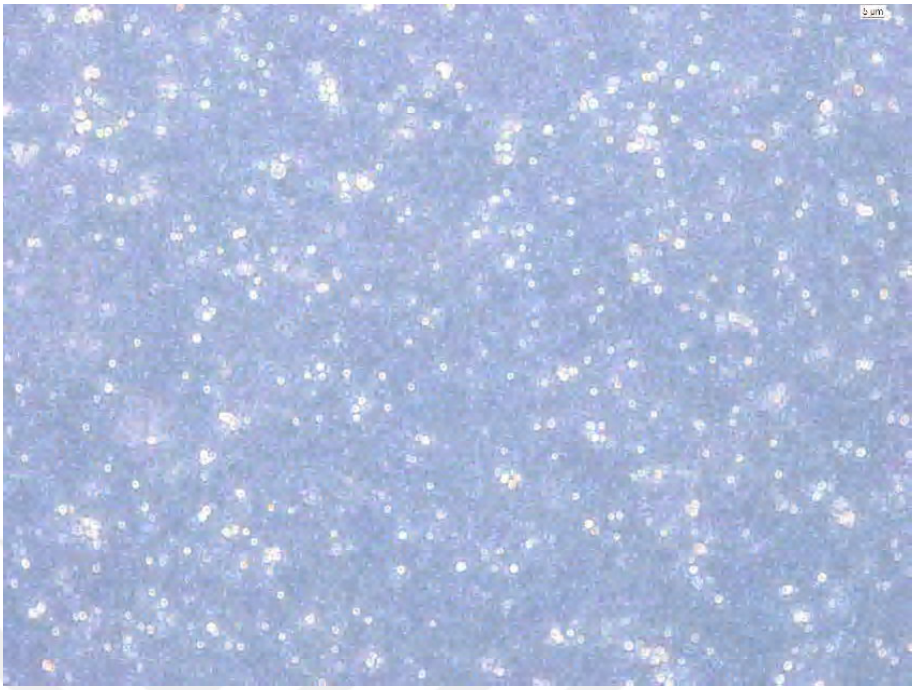


Şekil 4. 3 h-UK hipoksik (%3 O_2) ortamda üretilen hücreler, 10x büyütme, Invert mikroskop (Leica, Almanya)

Şekil 4. 4 Nötrofil normoksik (%21 O_2) ortamda üretilen hücreler, 10x büyütme, Invert mikroskop (Leica, Almanya)



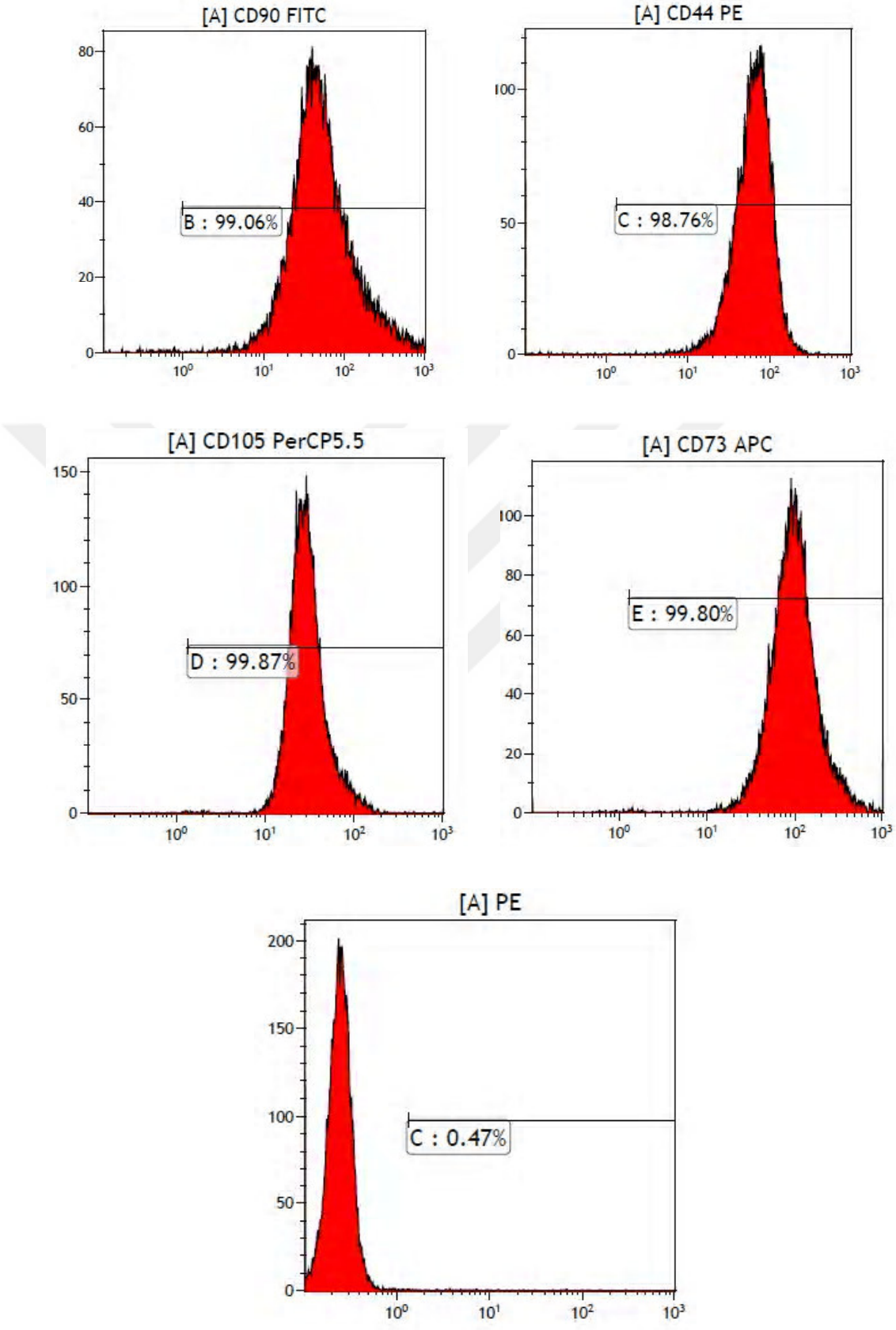
Şekil 4. 5 Nötrofil hipoksik (%5 O_2) ortamda üretilen hücreler, 10x büyütme, Invert mikroskop (Leica, Almanya)



Şekil 4. 6 Nötrofil hipoksik (%3 O_2) ortamda üretilen hücreler, 10x büyütme, Invert mikroskop (Leica, Almanya)

4.2. h-UK Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin çözülerek kültüre alınmasının immünfenotipik karakterini değiştirmediği tespit edildi. Yapılan akım sitometri ile karakterizasyon sonucu CD19, CD34, CD45, CD11b, HLA-DR 'yi ekprese etmezken (%0.47); CD44 (%98,76), CD73 (%99,80), CD90 (99,06), CD105 (99,87) yüzey belirteçlerini eksprese ettiği belirlendi (Şekil 4. 7).

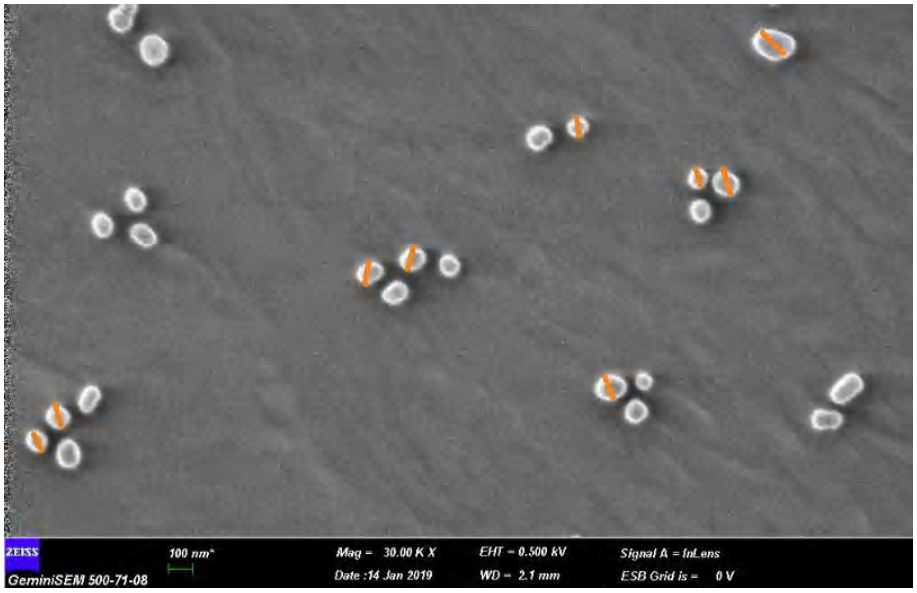


Şekil 4. 8 h-UK mezenkimal kök hücre karakterizasyonu ve negatif yüzey belirteçleri

4.3. Eksozomların Karakterizasyon Bulguları

4.3.1. SEM Bulguları

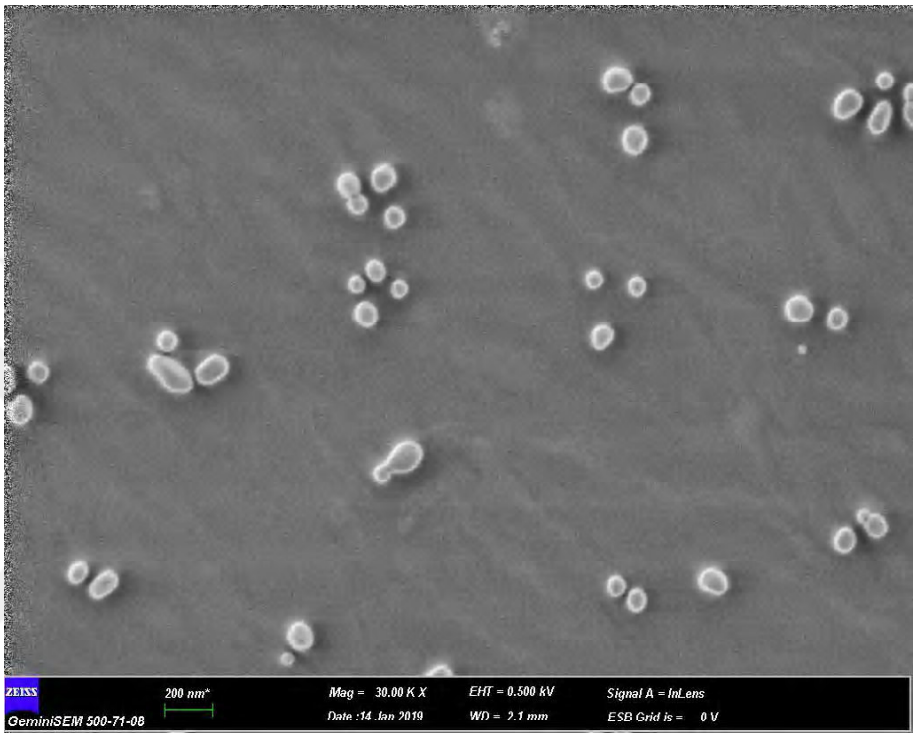
Eksozomlar, Erciyes Üniversitesi TAUM (Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi) bünyesinde bulunan taramalı elektron mikroskobu ile 30.000X kat büyütülerek görüntülendi. Yapılan görüntüleme sonucunda eksozomların boyut ve yapısal olarak homojen bir dağılım gösterdiği, düzgün bir hücre çeperine sahip olduğu gözlendi. ImageJ programı kullanılarak toplam 40 fotoğraf karesinde 150 tane ölçüm yapılarak özgün eksozomların çapları h-UK-MKH örneklerinde ortalama 66.07±15.33 olarak ölçülürken, nötrofil hücrelerinde ortalama 63.66±5.38 olarak ölçüldü (Şekil 4. 9, Tablo 4. 1). Ayrıca gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için her gruba ait 5 fotoğraf karesinde 20 eksozom çapı ölçümü (n=20) yapılarak istatistiksel olarak değerlendirildi ve $p<0.05$ altındaki değerler anlamlı olarak kabul edildi. Turcosa varyans analiz testi kullanılarak yapılan analize göre SEM ölçümünde h-UK %3 hipoksi, h-UK %5 hipoksi, h-UK %21 normoksi (kontrol) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.823$). Nötrofil %3 hipoksi, nötrofil %5 hipoksi, nötrofil %21 normoksi (kontrol) gruplar arası karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ve %3 hipoksi grubunda daha büyük boyutta eksozom izole edildiği gösterildi. Nötrofil %3 hipoksi - nötrofil %5 hipoksi ve Nötrofil %3 hipoksi - nötrofil %21 normoksi (kontrol) grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).



Şekil 4. 10 Eksozomların Image J programı ile boyutlarının ölçümü

Tablo 4. 2 Image J kullanılarak yapılan eksozom çapı ölçüm sonucu

Eksozom Ölçüm sayısı	**Eksozom çapı**
75 Adet h-UK MKH Eksozomu	66.07±15.33
75 Adet nötrofil eksozomu	63.66±5.38

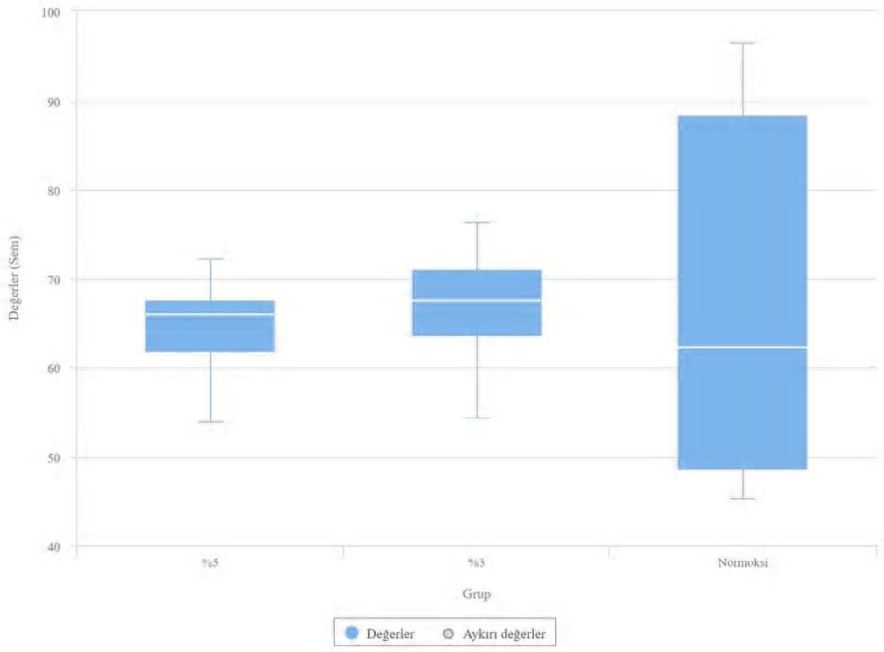


Şekil 4. 11 Eksozomların taramalı elektron mikroskobu görüntüsü

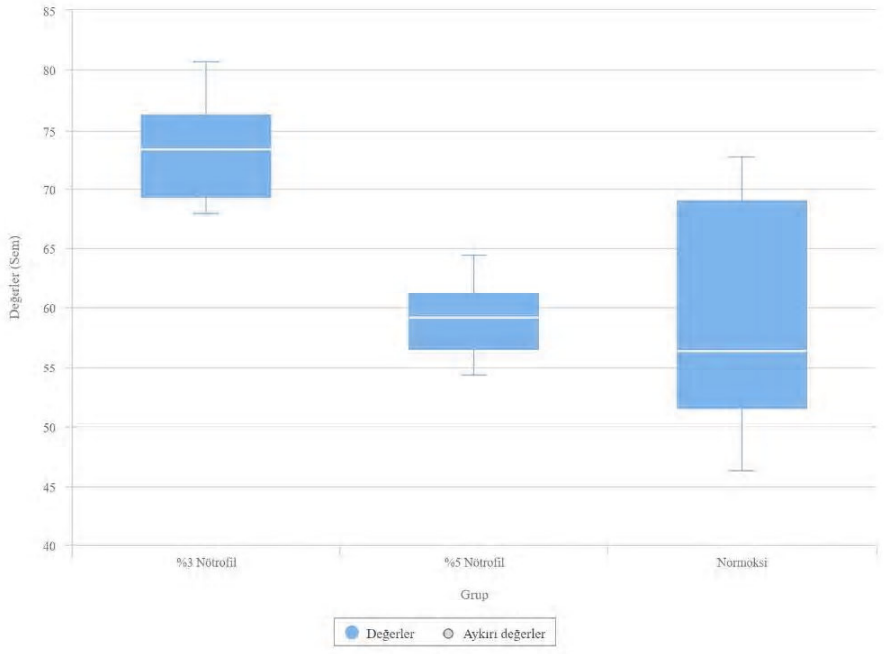
Tablo 4. 3 Eksozom boyut SEM analizi

Örnekler	**Ort ± SS**	**P**
h-UK %3 Hipoksi (n=20)	64.74±4.38	0.823
h-UK %5 Hipoksi (n=20)	66.73±5.64	
h-UK %21 Normoksi (Kontrol) (n=20)	66.76±4.24	
Nötrofil %3 Hipoksi (n=20)	73.37±3.21	0.001*
Nötrofil %5 Hipoksi (n=20)	58.82±2.83	
Nötrofil %21 Normoksi (Kontrol) (n=20)	58.81±9.51	

Değerler ortalama± standart sapma olarak verilmiş olup, * anlamlı olarak kabul edilmiştir (n=20 $p<0.001$)



Şekil 4. 12 h-UK eksozomların SEM analizi gruplar arası karşılaştırılması



Şekil 4. 13 Nötrofil eksozomlarının SEM analizi gruplar arası karşılaştırılması

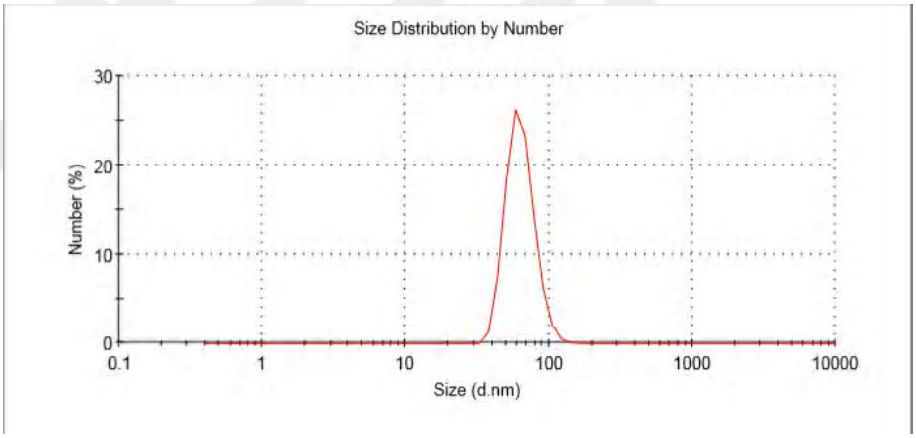
4.3.2. Eksozomların Partikül Boyut Analizi Bulguları

İzole edilen eksozomların partikül boyut analizi Erciyes Üniversitesi ERNAM bünyesinde bulunan zeta-sizer cihazı ile yapıldı. Cihazda yapılan ölçüm ile elde edilen sonuçlarda h-UK kaynaklı eksozomların boyutu ortalama 68.98 nm olarak hesaplanırken, nötrofil eksozomları ortalama 53.35 nm olarak hesaplandı. Otomatize

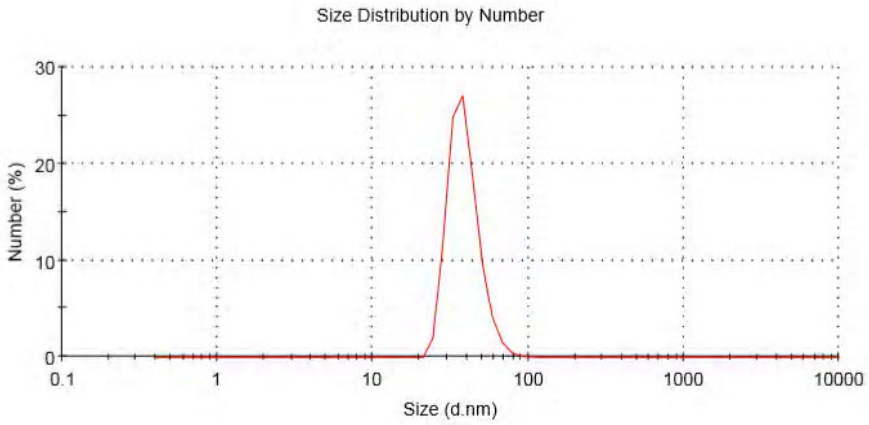
sisteme sahip olan cihazın, numune içeriğinin tamamını tarayarak kendi içerisinde bir ölçüm ile her örnek için ortalama bir pik değeri verdiği gözlendi (Şekil 4. 14).

Tablo 4. 4 Eksozom partikül boyut analizi

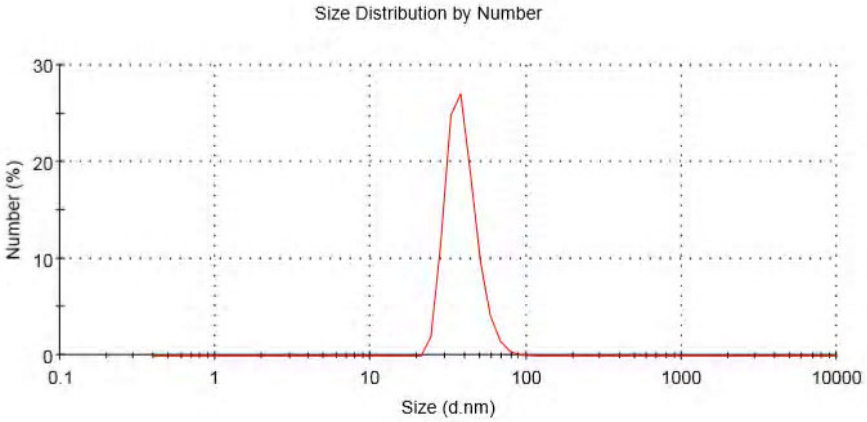
Örnek Adı	**Eksozom Boyutu**
h-UK %3 Hipoksi	64.36 nm
h-UK %3 Normoksi	39.12 nm
h-UK %5 Hipoksi	53.75 nm
h-UK %5 Normoksi	118.7 nm
Nötrofil %3 Hipoksi	70.37 nm
Nötrofil %3 Normoksi	52.3 nm
Nötrofil %5 Hipoksi	52.78 nm
Nötrofil %5 Normoksi	37.95 nm



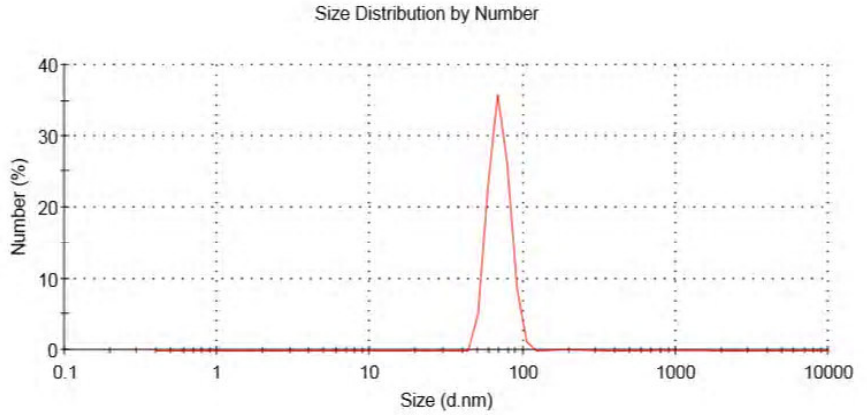
Şekil 4. 15 %3 hipoksi h-UK kaynalı eksozomların dağılımı



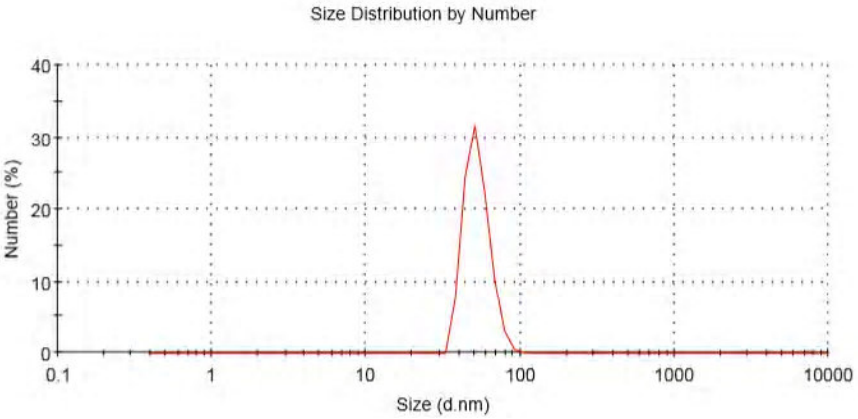
Şekil 4. 16 %21 normoksi h-UK kaynaklı eksozomların dağılımı



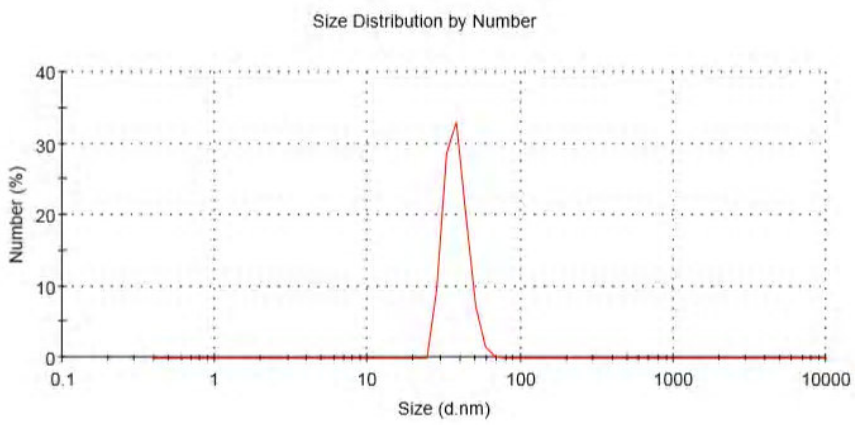
Şekil 4. 17 %5 hipoksi h-UK kaynaklı eksozomların dağılımı



Şekil 4. 18 %3 Hipoksi nötrofil kaynaklı eksozomların dağılımı



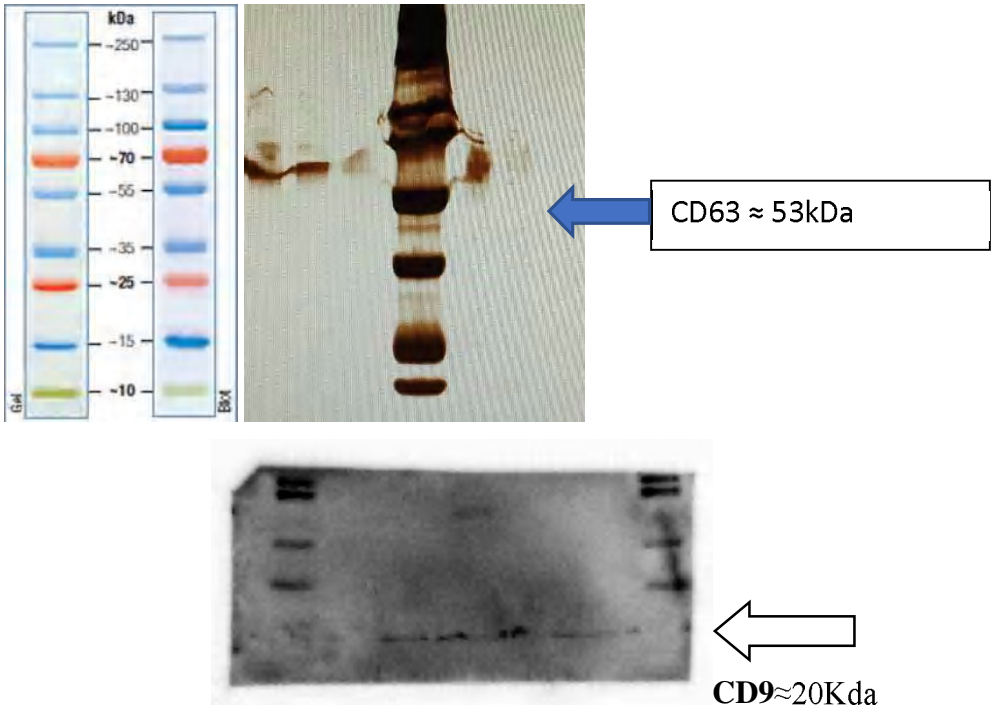
Şekil 4. 19 %5 hipoksi nötrofil kaynaklı eksozomların dağılımı



Şekil 4. 20 %21 normoksi nötrofil kaynaklı eksozomların dağılımı

4.3.3. Western-Blot ile Eksozom Karakterizasyonu

Western-blot yöntemi kullanılarak yapılan fenotiplendirmede Alix, HSP70, CD63, CD81 ve CD9 eksozom yüzey belirteçleri açısından değerlendirildi. Yapılan western blot analizlerinde %3 O_2 h-UK MKH, %3 O_2 nötrofil, %21 O_2 h-UK MKH ve %21 O_2 nötrofil hücrelerinde 53 kDA molekül ağırlığında CD63 yüzey belirtecini eksprese eden, %3 O_2 h-UK MKH, %3 O_2 nötrofil, %21 O_2 h-UK MKH, %5 O_2 h-UK MKH, %5 O_2 nötrofil, ve %21 O_2 nötrofil hücrelerinde ise 20kDA molekül ağırlığında CD9 yüzey belirtecini eksprese eden protein bantları gözlendi (Şekil 4. 21).



Şekil 4. 22 Prestained Dual Color Protein Moleküler Ağırlık belirteci (10-250 kDa), CD63 ve CD9 ekspresyon bantları

4.4. Eksozom Miktar Tayini

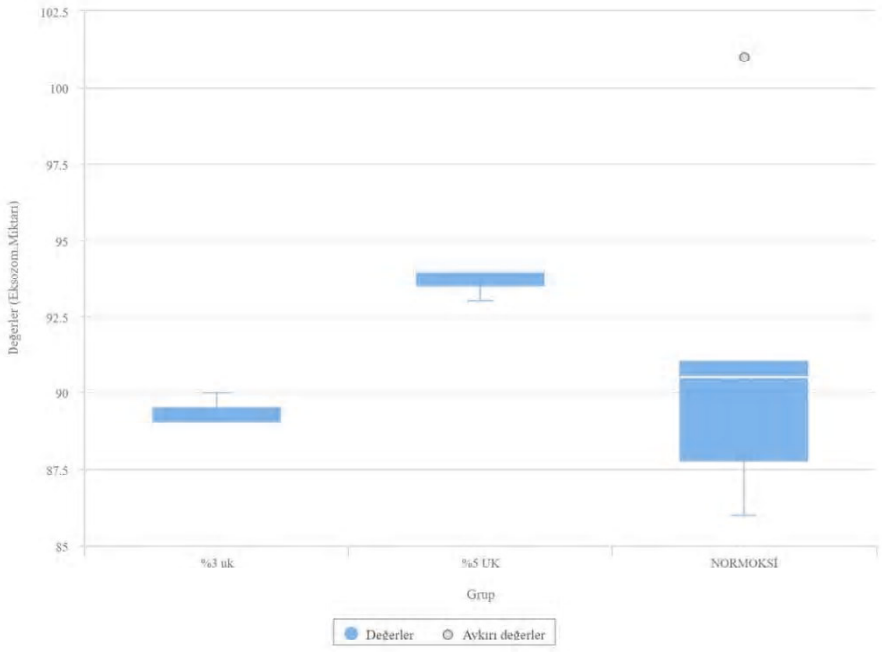
Eksozom miktarının belirlenmesi için System BioSciences firmasına ait ExoCet kiti kullanıldı. Miktar tayini kit protokolüne uygun olarak çalışılarak Promega absorbans okuyucuda absorbans değerleri okundu ve kit içerisinde hazırlanan standartlara göre miktarları belirlendi. 3 tekrarlı olarak gerçekteştirilen miktar tayininde hipoksik ve normoksik ortamda tutulan h h-UK %3 Hipoksi ortamında 89.33±0.57eksozom elde edilirken, %5 Hipoksi ile 93.66±0.57 elde edilmiştir normokside ise 91.00±5.32'dir. h-UK için hipoksi gruplar arası istatistiksel bir farka yol açmadı (Tablo 4. 5) (p=0.43). Aynı durum nötrofil eksozomları için de geçerli idi (Tablo 4.5) (p=0.22). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ancak her iki hücre hattında da %5 hpoksi gruplarında miktar artışı gözlendi.

Tablo 4. 6 Çalışmada kullanılan h-UK kaynaklı eksozomların miktar tayini

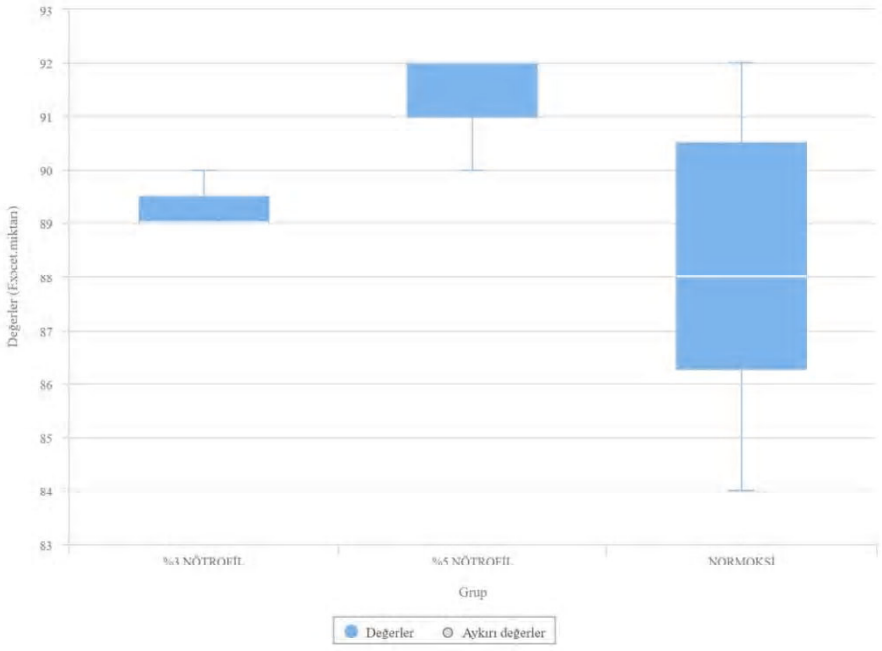
Gruplar	**Ort±SS**	**P Değeri**
h-UK %3 Hipoksi (n=3)	89.33±0.57	P=0.43
h-UK %5 Hipoksi (n=3)	93.66±0.57	
h-UK %21 Normoksi (Kontrol) (n=6)	91.00±5.32	

Tablo 4. 7 Çalışmada kullanılan nötrofil kaynaklı eksozomların miktar tayini

Gruplar	**Ort±SS**	**P Değeri**
Nötrofil %3 Hipoksi (n=3)	89.33±0.57	P=0.22
Nötrofil %5 Hipoksi (n=3)	91.33±1.15	
Nötrofil %21 Normoksi (Kontrol) (n=3)	88.16±3.06	



Şekil 4. 23 Çalışmada kullanılan h-UK kaynaklı eksozomların gruplar arası karşılaştırılması



Şekil 4. 24 Çalışmada kullanılan nötrofil kaynaklı eksozomların miktar tayini

4.5. Eksozomların Etkinlik Analiz Bulguları

Proliferasyon testi indükleyici bir ajan ve mononükleer hücre kullanılarak eksozomların etkinliğinin yapıldığı bir testtir. Eksozomlar MKH' lerin lenfosit proliferasyonunu

baskıladığı gibi baskılayarak benzer etkiyi gösterdi. Çalışmamızda iki ayrı (XTT, Ki-67) etkinlik testi yapılmış olup istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi.

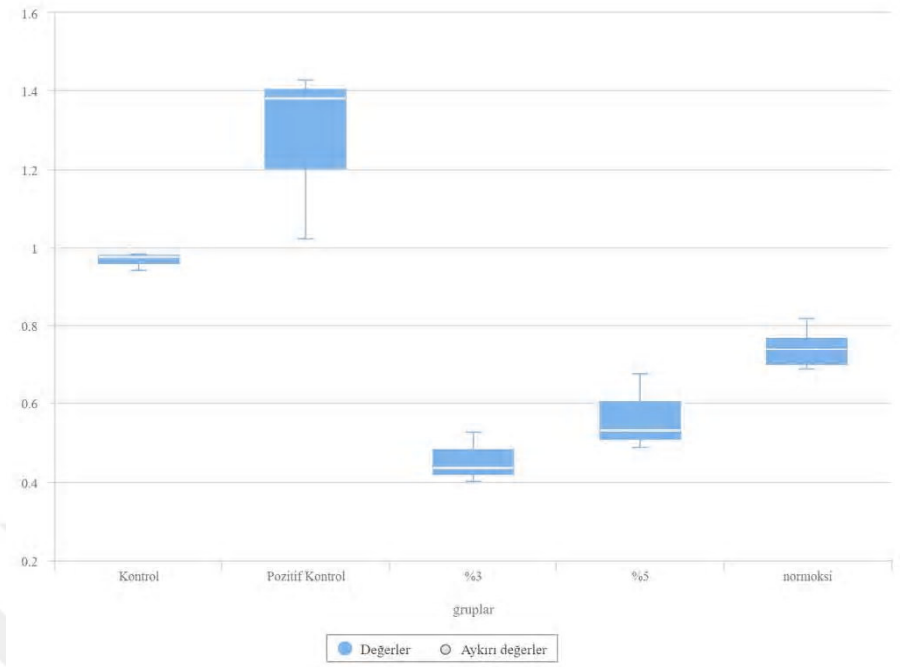
4.5.1. XTT Etkinlik Testi

Elde edilen XTT sonuçlarına göre pozitif kontrol (indükleyici ajan-PHA) ile kontrol (mononükleer hücre) arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Bu farkın olması testin başarılı olduğu olarak çalıştığını gösterdi. %21 h-UK normoksi ile kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. %21 normoksi h-UK kaynaklı eksozomlar lenfosit proliferasyonunu inhibe eder. %3 h-UK hipoksi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$) ve %3 hipoksi grubunun lenfosit proliferasyonunu daha fazla baskıladığını gösterdi (Şekil 4. 25). % 5 h-UK hipoksi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Bu fark %5 hipoksi grubunun lenfosit proliferasyonunu daha fazla baskılandığını gösterdi. Bu fark h-UK kaynaklı eksozomun lenfosit proliferasyonunu baskıladığını gösterdi. Aynı şekilde %3 h-UK hipoksi, %5 h-UK hipoksi ve %21 h-UK normoksi grupları ile pozitif kontrol arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). %3 h-UK hipoksi, %5 h-UK hipoksi anlamlı fark bulunmadı ($p=0.705$). %3 h-UK hipoksi, %5 h-UK hipoksi grupları ile %21 h-UK normoksi arasında anlamlı fark bulundu.

Şekil 4. 26 Çalışmada kullanılan h-UK kaynaklı eksozomların lenfosit proliferasyonu XTT etkinlik analizi

Gruplar	**Ort±SS**	**P Değeri**
Kontrol (n=3)	0.966±0.02	P<0.001*
Pozitif Kontrol (n=3)	1.276±0.22	
h-UK %3 Hipoksi (n=3)	0.455±0.06	
h-UK %5 Hipoksi (n=3)	0.563±0.09	
h-UK %21 Normoksi (Kontrol) (n=6)	0.739±0.05	

Değerler ortalama± standart sapma olarak verilmiş olup, * anlamlı olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$)



Şekil 4. 27 h-UK kaynaklı eksozomların XTT etkinlik analizi gruplararası karşılaştırılması

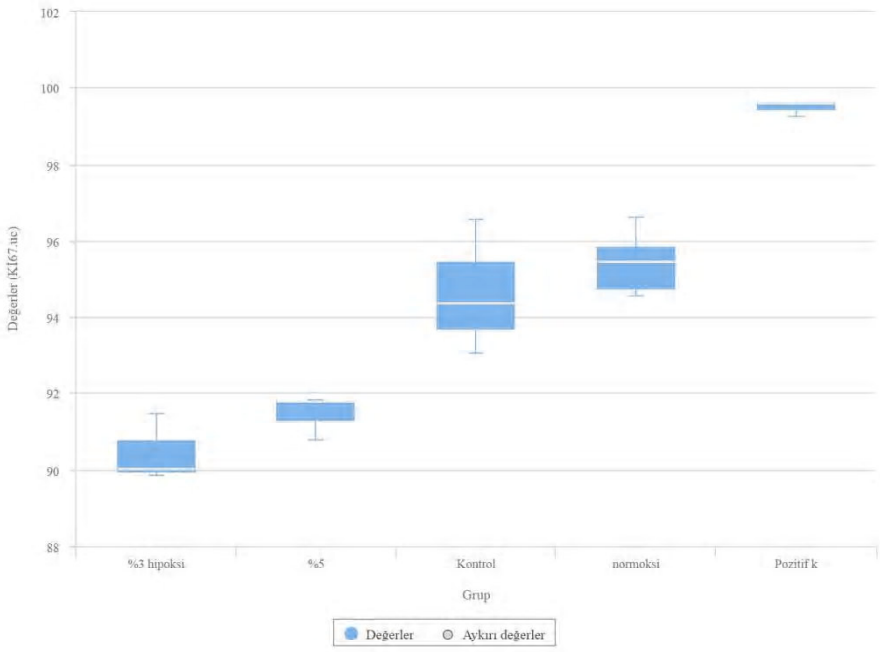
4.5.2. Ki-67 Etkinlik Testi

Elde edilen Ki-67 testi sonuçlarına göre pozitif kontrol (indükleyici ajan-PHA) ile kontrol (mononükleer hücre) arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Bu farkın olması testin başarılı olduğu olarak çalıştığını gösterdi. %21 h-UK kaynaklı eksozomlar ile konrol grubu ve %5 hipoksi h-UK kaynaklı eksozomlar ile %3 h-UK hipoksi kaynaklı eksozomlar karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmeyip, diğer grupların her biri kendi içerisinde karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlendi ($p<0.001$). Lenfosit proliferasyonunu daha düşük hipoksi grubunun (%3) daha çok inhibe ettiği sonucuna varıldı.

Tablo 4. 8 Çalışmada kullanılan h-UK kaynaklı eksozomların lenfosit proliferasyonu Ki-67 etkinlik analizi

Gruplar	**Ort±SS**	**P Değeri**
Kontrol (n=3)	94.65±1.77	P<0.001*
Pozitif Kontrol (n=3)	99.48±0.19	
h-UK %3 Hipoksi (n=3)	91.45±0.58	
h-UK %5 Hipoksi (n=3)	90.44±0.87	
h-UK %21 Normoksi (Kontrol) (n=6)	95.41±0.79	

Değerler ortalama± standart sapma olarak verilmiş olup, * anlamlı olarak kabul edilmiştir (p<0.001)



Şekil 4. 28 h-UK MKH eksozomu Kİ-67 testi gruplar arası karşılaştırılması

5. BÖLÜM

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikrovezikül sekresyonu, sinyalleşme ve iletişim mekanizması, hücreler arasında bilgi alışverişinde bulunmak için oldukça verimli bir mekanizmadır. Dolayısıyla, eksozomların kendileri, terapötik amaçlar için kullanılabilecek yüklü bir ilaç olmasa bile, benzersiz biyolojik aktivite sergilemektedir. Ligandları (antikor) ve reseptörleri (antijen) taşıyan eksozomlar, tümör antijenlerini immün hücrelere sunarak bir anti-tümör yanıtını tetikleyebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, uzun mesafeli hücreler arası iletişimde, protein hücrelerinin transferini kolaylaştırıcı ve hedef hücrelerde sonraki protein ekspresyonu için fonksiyonel eksosomların mRNA' lar ve mikroRNA larda uzmanlaştığını göstermiştir (180,181). İlk olarak, antijen taşıyan tümör kaynaklı eksozomların, tümörlere karşı immün yanıt için spesifik bir uyarı kaynağı olarak önerildiği ileri sürülmüştür (182). Bu eksozomların, ışınlanmış tümör hücrelerine, apoptotik hücrelere veya tümör hücresi lizatlarına göre daha etkili bir şekilde anti-tümör tepkilerini indüklediği gösterilmiştir. Örneğin, fare B lenfoma hücrelerinin, T hücrelerinde önemli anti-tümör immün yanıtlarını indükleyebilen bir dizi ısı şoku proteini (HSP) taşıyan eksozom salgıladıkları bildirilmiştir (183). Daha sonra tümör kaynaklı eksozomların aynı zamanda immün baskılayıcı özelliklere sahip olabileceği onkogenez, metastaz ve ilaç direnci gelişiminin olabileceği gösterilmiştir (184-187).

MKH türevli eksozomların domuz ve fare modellerinde miyokard iskemisi / reperfüzyon hasarına karşı önemli kardiyo-koruyucu parakrin etkileri ürettiği bildirilmiştir. Ayrıca bu eksozomların pulmoner hipertansiyonda (HP) etkili olduğu düşünülmektedir. HP, pulmoner arter basıncındaki artışla karakterize, kalp yetmezliğine ve hatta ölüme neden olabilecek bir tür malign pulmoner vasküler hastalıktır (188,189). Ayrıca, ilaca bağlı karaciğer hasarı modellerinde MKH türevli eksozomların kullanılmasıyla hepatik bir rejenerasyon gösterilmiştir (190). Alzheimer hastalığının (AD) tedavisi için insan adipoz doku türevli MKH' lerden türetilen eksozomların

terapötik etkileri de bildirilmiştir. Bu eksozomların, beyindeki β-amiloid (Aβ) peptid tıkaçlarını parçalayan en önemli enzim olan aktif neprilisin (NEP) taşıdığı gösterilmiştir (191).

Genellikle çocuk doğum döneminde atılan göbek kordonu, invaziv olmayan şekilde elde edilen, EKH' lerden daha az etik kısıtlamalara sahip olan ve aynı zamanda muazzam rejenerasyon potansiyeli olan zengin kök hücre kaynağıdır (179). Biz de çalışmamızda umbilikal kord kaynaklı hücrelerden eksozom elde ettik.

MKH 'lerin hipoksi veya enflamatuar şartlandırmasının mikroveziküllerde protein paketlemesini düzenlediği ve fonksiyonel özelliklerini etkilediği gösterilmiştir (192). MKH 'lerin bulunduğu mikro çevre ile ilgili olabilecek birkaç sinyal yolunun mikroveziküllerin biyolojik oluşumunu ve salgılanmasını düzenlediği bildirilmiştir. Örneğin, tümör baskılayıcı-aktifleştirilmiş yolun mikrovezikül oluşumunu düzenlediği ve böylece mikrovezikül üretimini arttırdığı bulunmuştur (193,194). Baietti ve arkadaşları tarafından alternatif bir hücreler arası iletişim yolu önerilmiştir. Bu öneride sindekanların CD63 ve ALIX içeren endozomal membran alanlarının intralüminal tomurcuklanmasını düzenlemek için syntenin ile etkileşime girdiğini tarif edilmiştir (195).

Lai ve arkadaşları doğrudan MKH türevli kardiyo miyosit hücrelerinin aktif, kardiyo-koruyucu bileşeninin aslında mikroveziküller olduğunu gösterdi. Bu çalışmada, saflaştırılmış MKH mikroveziküllerinin uygulanması, enfarktüs boyutunu ~%40 azaltmıştır (196).

h-UK MKH' lerin bir çalışmasında, Salomon ve arkadaşları, hipoksik koşullar altında, %8 O_2' de tutulan h-UK MKH' lere kıyasla, %1 O_2 ve %3 O_2 ESV salımında 3.3 ve 6.7 kat artış gözlemledi. Hipoksik koşullar altında türetilen h-UK MKH' lerin artan pro-anjiyogenik etkisinin, hipoksi ile indüklenebilir faktör protein ailesinin transkripsiyonel aktiviteleri ile sağlanabileceği tahmin edildi (197). Salomon ve ark rapor ettiği çalışmaya benzer şekilde tez çalışmamızda %3 hipoksik ortamda üretilmiş UK-eksozomlarının etkinliğinde artış ve %5 hipoksi koşullarında her iki hücre hattından izole edilen eksozom miktarında artış gözlendi ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Literatürde, hipoksik eksozomlar ve normoksik eksozomlar arasındaki ilişkiyi gösteren stromal hücreler ile gerçekleştirilen çalışmalarda hipoksinin hücreleri daha fazla eksozom salması için uyarabildiği gösterilmiştir (152). Bizim çalışmamızda da hem

MKH hem nötrofil eksozomları %5 hipoksi ortamında sayıca daha fazla eksozom izole edildiği gösterildi. Pulmoner arter endotel hücreleri (PAEH), adiposit, epitel hücreleri ve kalp progenitör hücrelerinin (KPH) de hipoksik koşullar altında daha fazla eksozom saldığı tespit edilmiştir (153-156). Son araştırmalar bu artışın sebebinin HIF-1A' ya bağlı olduğunu göstermektedir (157). Örneğin, Yu ve arkadaşları, kardiyomiyositlerde hücresel HIF-lA ekspresyonunun uyarılmasının, eksozom salınımına katkıda bulunduğunu belirtti (158). Ayrıca, King ve arkadaşları hipoksi sırasında meme kanseri hücrelerinde eksozom salımının artmasının HIF' lere bağlı olduğunu gösterdi (157). Benzer şekilde, sıçan böbrek proksimal tübüler hücrelerinde, HIF-1' in bir HIF hidroksilaz inhibitörü olan dimetil oksalil glisin (DMOG) ile indüksiyonu, HIF-1' in baskılanmasının, eksozomların salınımını hipoksi ile arttırdığını belirtti (159). Bu nedenle, yukarıda tartışılan üç çalışma, HIF-la' nın hipoksi sırasındaki eksozom salınımında önemli bir rol oynadığını tam olarak göstermektedir. İleri çalışmalar, stromal hücrelerde saptanan bu artışın kök hücreler ve nötrofiller açısından, HIF 1a 'nın miktar ile olan korelasyonunu değerlendirmek yönünde tasarlanabilir.

Hipoksik ortamın kök hücrelerin farklılaşması üzerine de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (144). Bununla birlikte, hipoksinin embriyonik kök hücre (EKH) farklılaşması üzerindeki etkisi konusunda çeşitli raporlar vardır. Raporlar, hipoksinin kendini yenilemeyi sürdürdüğünü ve EKH' lerin farklılaşmasını önlediğini ayrıca hipoksinin insan EKH' lerinin kardiyomiyositlere ve kondrositlere farklılaşmasını desteklediğini göstermektedir (145-147). Hipoksi, Oct4 promotör bölgesine HIF1A' nın doğrudan bağlanması yoluyla Oct4 ekspresyonunu baskılayarak vaskülerizasyonun artmasını sağlamıştır (148). Yapılan bir araştırmada hipoksi altında (%3 O_2) fare kemiği iliği ve insan kordon kanı HKH' lerinin çoğaltılması ve işlenmesinin, normoksik ortam hücrelerine kıyasla, 2-5 kat artışla sonuçlandığını bildirilmiştir (149,150). Biz de çalışmamızda %3 hipoksik ortamda üretilmiş eksozomların daha etkin olduğunu tespit ettik. Hem domuz hem insan MKH kullanılarak yapılan bir araştırmada kısa süreli (48 saat) %2 hipoksik ortamın, normoksik ortama kıyasla proliferasyon, kendini yenileme kapasitesi ve enflamatuar sitokinlerin modülasyonu gibi MKH' lerin tedavi edici özelliklerini artırdığı gösterilmiştir. Bu artış klinik uygulamalar için MKH oluşturulması konusunda önem teşkil etmektedir (151).

Akut böbrek hasarı (AKI) hastanede yatan hastalar arasında önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir ve nefrotoksik bileşiklere maruz kalma ile idrar akışında ciddi hacim

kaybı veya tıkanma nedeniyle oluşur. İnsan mezenkimal kök hücre mikroveziküllerinin etkileri, kemoterapötik ajan sisplatin tarafından indüklenen AKI ile şiddetli kombine immün yetmezliği (SCID) olan farelerde de incelenmiştir. Bu çalışmada, mezenkimal kök hücre mikroveziküllerinin, böbrek fonksiyonu ve morfolojisini geliştirerek sağ kalımı önemli ölçüde iyileştirdiği ancak (21. Günde %40), ancak kronik tübüler hasarı önleyemediği gözlendi (198). Benzer şekilde Bruno ve arkadaşları, insan kemik iliğinden türetilmiş mikroveziküllerin, tübüler hücrelerin çoğalmasını indükleyerek immün yetmezliği olan farelerde gliserol ile indüklenen AKI' da renal morfolojik ve fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığını bildirdi. Bu çalışmada ayrıca, mezenkimal kök hücre mikroveziküllerinin AKI' nın iyileşmesi üzerindeki etkisinin insan mezenkimal kök hücrelerine benzer bir etkide olduğunu da bildirmişlerdir (199). Zhu ve arkadaşları, mezenkimal kök hücre eksozomlarının uygulanmasının, toplam enflamatuar hücrelerin akciğere akışını %36, nötrofillerin akışını %73 oranında azalttığını göstermiştir. Çalışmanın sonucunda akciğer inflamasyonunun baskılanmasının, pulmoner ödem oluşumunu önlediği ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (200).

Zhang ve arkadaşları lokal olarak enjekte edilen h-UK MKH ve h-UK MKH eksozom etkilerini, sıçan derin ikinci derece yanık hasarı modelinde incelemiştir. Bir dizi histolojik ve moleküler iyileşme indeksi yelpazesi kullanan araştırmacılar, h-UK MKH ve h-UK MKH eksozom enjeksiyonunu, normal klinik tedavi edilen yanık yaraları ile karşılaştırdıklarında yeniden epitelizasyonda eksozom grubunda önemli bir artışa yol açtığını bildirmişlerdir (201).

Wu ve arkadaşları, insan umblikal kord MKH' leri tarafından türetilmiş eksozomların, T24 mesane karsinomu hücrelerinin büyümesini *in vitro* ve *in vivo* olarak azalttığını gösterdi. Araştırmacılar, T24 hücrelerinin çeşitli konsantrasyonda (0, 50, 100, 200 µg/ ml protein) h-UK mezenkimal kök hücre eksozomuyla inkübasyonunun, hücre döngüsünü durması ve tümör hücresinin apoptozisi ile sonuçlandığını bildirdi (202).

Mezenkimal kök hücrelerde ilk 24 saat boyunca artan bir eksozom salınımı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca eksozomların toplandığı ortam da önemli bir faktördür. Birçok hücre hattı, doğal eksozom içeren FBS serumu varlığında büyütülür ve bu nedenle sonuçları etkileyebilir. Bu problemden kaçınmak için, eksozomlar, eğer hücreler buna tolerans gösterebiliyorsa, serumsuz ortamda toplanırlar (203). Literatürde eksozom biyogenezi ve salınımını incelendiğinde uygun yöntem ve koşullar konusunda fikir birliği yoktur. MKH eksozom preparasyonlarının saflığını ve miktarını arttırmaya

yönelik, ultrafiltrasyon ve ultrasantrifüj yoğunluk gradyantı, immünafinite, çeşitli biyo-reaktörler ve presipitasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar biyo-reaktör sistemleri içinde kültürlenen hücrelerden alınan eksozomların veriminde önemli bir artış ortaya koymuştur. Bununla birlikte, biyo-reaktör kültürü koşullarının, terapötik etkinliği etkileyebilecek eksozom proteini ve RNA içeriği üzerinde değişikliklere yol açıp açmadığının belirlenmesi de önemli olacaktır. Oksijen kaynağının yeterliliği, metabolik yan ürünler birikmesi ve pH dengesi gibi biyo-reaktör kültürü ile ilgili birçok zorluk bulunmaktadır. Araştırmacı bu tür parametrelerin etkilerinin farklı hücre tipleri için farklı olacağına dikkat etmelidir (204).

Eksozom izolasyon çalışmalarında sık olarak sıralı ultrasanrifüj yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem; hücreleri, hücre atıklarını ve mikro-veziküllerı ayırmak için düşük hızlarda 2-3 saat santrifüjlemeyi, ardından 1-2 saat boyunca yaklaşık 100.000 x g' de ultrasantrifüjlemeyi ve bir PBS yıkamasını içerir. Bu yöntemin saf bir eksozom popülasyonu vermesi beklenemez, çünkü eksozomların ve mikro-veziküllerin boyutu belli bir dereceye kadar örtüşür, ancak son izolatın eksozomlarca zengin olduğu belirlenmiştir (205).

Diferansiyel santrifüjleme, eksozom izolasyonu için kullanılan en yaygın yöntem olmasına rağmen, eksozom bakımından zenginleştirilmiş numuneler elde etmek için başka yöntemlerde kullanılabilir. Yoğunluk gradyanlı santrifüjlemenin, ultrasantrifüj ve çökeltmeye dayalı yöntemlerle karşılaştırıldığında en saf eksozom popülasyonunu sağladığı gösterilmiştir (206). Ancak bu yöntem nispeten düşük bir verim sağlar ve zaman alıcıdır. Kowal ve arkadaşları 100,000 xg peletlerin yoğunluk gradyanlı santrifüjlemesinin mikrovezikülerin alt popülasyonlarını açıkça ayırt edemediğini bildirmiştir (207). Eksozomal zardaki spesifik proteinlere dayanan eksozomların immünoizolasyonu nispeten saf eksosom popülasyonları ile sonuçlanacak bir yöntemdir (207,208). Ancak seçilen zar proteininin dikkatlice seçilmesi ve immünoizolasyon protokolünün optimize edilmesi gereklidir. Tauro ve arkadaşları immün afinite yakalama yönteminin, kolon kanseri hücre hattından eksozomları izole etmek için ultrasantrifüj ve yoğunluk gradyan izolasyonundan daha etkili bir yönten olduğunu bildirmiştir (209). Yüzey plazmon rezonansı (SPR) ayrıca spesifik eksozom popülasyonlarının analiz edilmesini sağlar. SPR bazlı eksozomların miktar tayini, immün-fonksiyonelleştirilmiş bir yüzeyde eksozomların yakalanması ve kırılma endeksinde meydana gelen değişimin ölçümlerine dayanır. Bu yöntem, CD63 gibi

spesifik eksozomal belirteçleri ve ayrıca kansere özgü proteinleri içeren eksozomları tespit etmede ümit verici sonuçlar göstermiştir (210,211).

Başka bir izolasyon tekniği, eksozomların polietilen glikol (PEG) gibi polimerler ile çökeltilmesine dayanır. Bu hızlı bir yöntemdir, ancak bu durum muhtemelen eksozomların benzer büyüklükteki diğer yapılarla eşleştirilmesine yol açar. Mikrovezikül izolasyonu alanında popülerlik kazanan bir diğer yöntem ise, boyut dışlama kromatografisidir (SEC). Bu yöntem, eksozomları proteinlerden ayırabilir, fakat mikro-veziküllerden ve lipopartiküllerden ayıramadığı gösterilmiştir (212). Eksozom izolasyonunda biyolojik numunelerin karmaşıklığı, diğer mikroveziküllerin komplikasyonları, fizikokimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin ciddi bir şekilde üst üste binmesi nedeniyle, zor olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, diferansiyel ultrasantrifüjleme şu anda eksozom izolasyonun altın standardı olarak kabul edilmesine rağmen, yüksek iş yüklerine ek olarak, izole edilen eksosomlar sıklıkla proteinler ve lipoproteinler içermektedir. Aynı şekilde, ultrafiltrasyon, oldukça popüler bir eksozom izolasyon tekniği olmasına rağmen sınırlı numune izolayonu sağlar. Örneğin, ultrafiltrasyon filtre tıkanmasına sebep olabilir ve vezikül yakalama güçleşebillir böylece membranların ömrünü ve izolasyon verimini düşürür. Düşük verim ve bazen test sonuçlarının hatalı yorumlanmasıyla sonuçlanabilir (213). SEC potansiyel olarak yüksek oranda saflaştırılmış eksozomlar verebilir, ancak özel ekipman gereklidir SEC tipik olarak yerçekimi kullanılarak gerçekleştirildiğinden, vezikül yapısı ve bütünlüğü büyük ölçüde bozulmadan kalır ve eksozomların biyolojik aktivitesi korunur. Dahası, SEC mükemmel tekrarlanabilirliğe sahiptir. Ancak, uzun çalışma süresi gerektir (214).

İmmünoafinite yakalama, belirli bir orijinli eksozomu veya hatta eksozomun alt popülasyonlarını seçici olarak izole etmek için mükemmel bir platformdur. Bununla birlikte, genç bir alan olarak, en iyi eksozomal etiketler halen oluşturulmaktadır. Yalnızca antikor tanınmış proteini eksprese eden bir eksozom alt kümesi yakalandığından, genellikle daha düşük hacimde verim elde edilir fakat eksozomların fiziksel özelliklerine göre izole edilmiş olanlardan çok daha yüksek saflığa sahiptir (215).

Her ne kadar eksozom çökeltme (presipitasyon) yöntemi basit ve eksozomların izolasyonu bir adımda gerçekleştirilebilse de çeşitli avantajları dışında, numune hazırlama ve temizlik prosedürleri ve uygun bir seçici izolasyon mekanizmasının bulunmaması kaçınılmaz bir şekilde, izole edilen eksozomların saflığını tehlikeye

atmaktadır. Örneğin, eksozomların diğer hücre bileşenleri, özellikle diğer hücre dışı veziküllerin, protein agregatları ile birlikte çökeltilmesi, plazma ve serum gibi çeşitli biyo-sıvılarda gözlenmiştir. Üstelik, çeşitli viskozite ve numune matrisi protokollerin standardizasyonunu etkileyebilir (213,216). Bizim çalışmamızda da presipitasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde eksozom izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen eksozomların miktarı, miktar tayin kiti ile belirlendi ve çalışılan grupların miktarları hesaplandı ve ortalama miktar 88-93x10^7 olarak ölçüldü. Sonuç olarak %5 hipoksi grubunda daha fazla miktarda eksozom izole edildi ancak gruplar arası yapılan karşılatırmada miktar olarak bir fark gözlenmedi ($p_{nötrofil}$= 0,22, $p_{h\text{-}UK}$=0.43).

Hipoksik ortam birçok mezenkimal kök hücre türünde araştırılmış olsada; optimum koşullar hakkında net bir bilgi yoktur. Rejeneratif tıpta daha başarılı uygulama için mezenkimal kök hücre kültür koşullarının optimizasyonu büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, hipoksi ön koşullanmasının MKH 'lerin klinik uygulaması için standart tedavi olması gerekip gerekmediği sorusu hala cevaplanmamıştır (217). Ahmed, NE-MB ve arkadaşları, DPKH 'lerin farklı oksijen gerilimlerinde (%20, %3 ve %5) kültürü ve çoğalması üzerine için hangi fizyolojik koşulların etkili olacağını belirlemek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada hücrelere ideal hipoksik bir durum sağlamak için iyi kontrol edilmiş hipoksi haznesi kurulu bir odayı hücrelerin içindeki fenotipik değişiklikleri en aza indirmek için kullanımı kolay, sağlam ve sızdırmaz hale getirilmiştir. Çalışmada elde edilen veriler hipokside kültürlenen eksozomların normokside kültürlenenlerden daha iyi morfoloji ve daha küçük boyutta olduğunu göstermiştir. Ayrıca, hipoksik ortamın, kök hücre belirteçleri CXCR4 ve G-CSFR ekspresyonunu normoksiden daha yüksek oranda indüklediğini buldular (217).

Kültürlenmiş DPKH 'lerin proliferasyon oranı değerlendirildiğinde, hipoksik koşullara adaptasyonun başlangıç dönemi olarak kabul edilebilecek ilk 4 günlük kültürde normoksi altında benzer şekilde hipoksi altında da büyüdüğü gösterilmiştir. Proliferasyon hızı, sonraki günlerde hipokside daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, hipoksik ortam koşullarının Oct4, Nanog ve Sox2 gibi pluripotens belirteçleri gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Çalışmanın sonucu toparlandığında %5 hipoksi DPKH kültürlerinin daha iyi morfoloji sergilediği, kök hücre belirteçlerinin daha yüksek oranlarda eksprese edildiği, daha güçlü migrasyon yeteneğine ve daha iyi proliferasyon oranına sahip olduğu bulunmuştur (217). Ayrıca, daha önce yapılan

çalışmalar değerlendirildiğinde hipoksik koşulların yüksek proliferasyon yeteneği ve *in vitro* MKH migrasyon kapasitesini artırdığı gösterilmiştir (218).

SEM altında, normal hücrelerden izole edilen hücre dışı veziküller yuvarlak bir morfoloji sergilerler ve homojen bir dağılım gösterirler. Eksozomların aksine, apoptotik veziküller ve nekrotik cisimler, SEM ile gözlemlendiğinde düzensiz şekiller ve heterojen bir boyut dağılımı sergilemiştir. Wu ve arkadaşları; her iki EM yöntemini de kullanarak, silikon substrat üzerinde bir tek tabaka halinde hücre dışı vezikül içeren numunelerin dağılmasının görüntü kalitesini önemli ölçüde iyileştirdiğini belirtmiştir. Özetle, eksozom çaplarının iki EM metodu arasında anlamlı farklılık göstermediğini belirtmişlerdir (P değeri> 0.05). Buna karşılık, apoptotik ve nekrotik cisim hücreleri, eksozomlarda gözlendiği gibi tekdüze dağılımlar sergilememiştir (219). Biz de çalışmamızın sonunda %3 hipoksi nötrofil kaynaklı eksozom grubunda daha büyük boyutta eksozom izole ettik.

MKH'ların NK hücrelerinin proliferasyon kapasitesini önemli ölçüde önleyebildiğini, NK hücrelerinin apoptoz potansiyelini artırabildiğini veT hücrelerinin proliferasyonunu *in vitro* ve *in vivo* inhibe ettiği gösterilmiştir (220).

Kardiyak yağ dokusundan türetilmiş insan yetişkin mezenkimal benzeri progenitör hücreler, T hücrelerinin doza bağımlı bir şekilde allo-proliferasyonunu baskılayabilir ve proinflamatuar sitokinlerin (IL - 6, TNFa ve IFN - γ) salgılanmasını modüle edebilir. Aynı zamanda, mezenkimal kök hücreler, kültürdeki allojenik T lenfositlerin proliferasyonunu inhibe eder. Bu etki mekanizmalarının, hücre temasının varlığına göre değişebileceği düşünülmektedir (220).

Di Nicola ve arkadaşları, MKH aracılı T hücre proliferasyonunun inhibisyonunun, hücre temasının mümkün olup olmadığına yani standart veya transwell karışık lenfosit kültürlerinin (MLC) kullanılıp kullanılmadığına bağlı olarak önemli ölçüde farklı olduğunu bildirmiştir (220).

Djouad ve arkadaşları, diğer taraftan, her iki kültür türünde de eşit inhibisyon olduğunu bildirmişlerdir. Krampera ve arkadaşları ise hücre teması olmayan kültürlerde hiçbir şekilde inhibe edici etki bulunmadığını ve MKH' nin bu tür kültürlerde lenfosit sitotoksisitesini inhibe ettiğini gözlemlemiştir. MKH aracılı immün yanıtın inhibisyonu, antijen sunan hücrelerin ve sitokin sekresyon profillerindeki olgunlaşma

değişikliklerinin yanı sıra dendritik hücrelere monosit farklılaşmasının baskılanmasını içeren karmaşık bir mekanizmadır (220).

MKH'nin allojenik kordon kanı (CB) lenfositleri tarafından proliferatif bir yanıtı inhibe edip edemediğini test etmek için CB lenfositleri, çeşitli dozlarda allojenik MKH ile kültürlendi. MKH 'nin immün yanıttaki CB lenfositleri üzerindeki etkisi, çeşitli uyaranların varlığında MKH ve CB lenfositlerinin karıştırılmasıyla değerlendirildiği çalışmada, Işınlanmış allojenik periferik kan lenfositleri (1: 1 oranı) ile uyarılmış karışık CB lenfosit kültürleri, ışınlanmış allojenik MKH mono katmanı varlığında gerçekleştirildiğinde, CB lenfositlerin çoğalmasında önemli bir azalma olmuştur. Benzer şekilde, CB lenfosit proliferasyonu, PHA gibi spesifik poliklonal aktivatörler vasıtasıyla ortaya çıktığında, allojenik MKH mono-katmanı ilavesi, CB lenfosit proliferasyonunu kuvvetle inhibe ettiği gözlenmiştir (221). Mezenkimal kök hücrelere benzer şekilde eksozomlarında lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği bizim çalışmamızda da benzer bir şekilde bulunmuştur.

Bu çalışmaya göre baş ve boyun kanserleri (HNC), immün sistemi baskılayan insan maligniteleri arasındadır. Bu tümörler, anti-tümör immün tepkilerine müdahale eden çeşitli inhibitör faktörler üretir. İmmün anormallikler hastalık aktivitesi ile ilişkilidir ve aktif hastalık (AD) olan hastalarda tedaviyi takiben, belirgin bir hastalığı olmayan (NED) hastalardan daha belirgindir. Daha yakın zamanlarda, HNC'li hastalarda immün fonksiyon bozukluğu hastalığın ilerlemesi ve sonucu ile de ilişkilendirilmiştir (222). Bu nedenle, anti-tümör immün yanıtlarının bütünlüğü, hastaların hastalıkla başa çıkma ve tedavilere cevap verebilme açısından kritik öneme sahiptir. Plazma kaynaklı eksozomların insan immün hücrelerinin çeşitli fonksiyonları üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışmada hastaların eksozomları, normal donörlerin kanından izole edilen tam fonksiyonel immün hücrelere titre edildi. Sonuca göre, AD hastalarında eksozomlar, CD8 + T hücrelerinin belirgin şekilde daha güçlü apoptozunu, NK hücrelerinde T-hücre proliferasyonunun veya NKG2D ekspresyonunun daha fazla inhibe edilmesini ve CD4 + CD39 + Treg'de baskılayıcı fonksiyonlarının NED'lere kıyasla daha iyi düzenlenmesiyle indüklemiştir (222). Bu sonuçlar, birçok fakat birkaç farklı inhibitör yolun, çoklu inhibitör ligandları taşıyan ekzomlarla etkileşime giren immün hücrelerde aktive edildiğini gösterdi. HNC plazmasından eksozomların Western blot profilleri, bu veziküllerin en az 9 farklı immünsüpresif molekül taşıdığını ve bunları

immün alıcı hücrelere, apoptozu indükleyebilen veya diğer işlevleri inhibe edebilen "demetler" olarak gösterilmektedir (222).

Eksozomların salınımı, gen transferi ve terapötik ajanların spesifik hücrelere hedeflenmesi gibi olaylar için esastır. Eksozomların salınımı, bileşimi ve içeriği, kaynaklandıkları hücrelerin durumuna bağlıdır. Birkaç yeni teknoloji geliştirilse de eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu için mevcut yöntemler sıklıkla prognostik ve tanı amaçlı kullanılır. Eksozom biyogenezi hücre tipine ve hücresel homeostaza bağlı olarak, çeşitli proteinleri ve lipitleri içeren birkaç hücre makinesini kullanır. Elektron mikroskobu, eksozomların yapısal özelliklerini analiz etmek için en iyi tekniktir; Bununla birlikte, ideal bir yöntem, yapısal ve biyolojik özellikleri analiz edebilecektir. Bu nedenle, eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu için daha geleneksel teknikler gereklidir. Bununla birlikte, eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu için uygun yöntemlerin seçilmesi, izole edilen eksozomların kalitesini ve kullanım sonuçlarının geçerliliğini arttırmak için gereklidir (223).

Yapılan proliferasyon çalışmalarında trombosit kaynaklı eksozomların, tümör kemotaksisini, proliferasyonunu ve anjiyojenik faktörlerin ekspresyonunu indüklediği ve ayrıca trombüs oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (224, 225). Benzer şekilde tümör kaynaklı eksozomların, tümör hücresi proliferasyonunu indükleyebileceği bildirilmiştir. Örneğin, kronik miyeloid lösemide ve insan mide kanserinde fosfatidilinositol 3-kinaz / protein kinaz B PI3K / AKT ve MAPK / ERK sinyal yollarında hücresel proliferasyonun otokrin indüksiyonu gözlenmiştir (226-228). T24 tümör hücresi türevli eksozomlar, AKT ve ERK yollarının aktivasyonu yoluyla insan mesane kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu indükler (229). Hipoksik prostat kanseri hücrelerinden türetilen eksozomlar ise, saf insan prostat kanseri hücrelerinin invazivliğini ve hareketliliğini arttırmıştır (230). Bizim çalışmamızda ise h-UK kaynaklı MKH eksozomlarının lenfosit proliferasyonuna etkisi değerlendirildi ve %3 h-UK kaynaklı hipoksi eksozom grubunda daha etkin olduğu görüldü. %3 h-UK eksozomları, %5 ve %21 h-UK eksozomlarına göre daha inhibe edici etkiye sahip oldu.

Yaptığımız bu tez çalışması sonucunda farklı oksijen konsantrasyonlarında (%21, %5, %3) h-UK mezenkimal kök hücreleri ve tam kandan izole edilen nötrofil hücrelerinin kültürü yapıldı ve mezenkimal kök hücre karakterizasyonu akım sitometri yöntemi ile belirlendi. Bizim çalışmamızda da presipitasyon yöntemi farklı oksijen koşulları ve farklı kaynaklardan başarılı bir şekilde eksozom izolasyonu yapıldı ve izole edilen eksozomların miktarları exoCet miktar tayin kiti (System Bio sciences, ABD) ile ortalama 88-93x10^7 olarak ölçüldü. Sonuç olarak %5 hipoksi grubunda daha fazla miktarda eksozom izole edildi ancak gruplar arasında istatistiksel bir fark gözlenmedi. Eksozomların karakterizayonu SEM, partikül boyut analizi ve western blot yöntemi ile belirlendi. Sonuç olarak %3 hipoksi nötrofil kaynaklı eksozom grubunda daha büyük boyutta eksozom izole edildiği gösterildi ($p<0.001$). Partikül boyut analizinde yapılan ölçüm ile elde edilen sonuçlarda h-UK kaynaklı eksozomların boyutu ortalama 68.98 nm olarak hesaplanırken, nötrofil eksozomları ortalama 53.35 nm olarak hesaplandı ve otomatize cihaz eksozomların bulunma yüzdelerini verdi.

Eksozomların lenfosit proliferasyonuna olan etkisi Kİ67 ve XTT proliferasyon testleri ile belirlenmiş olup proliferasyonun %3 h-UK kaynaklı hipoksi eksozom grubunda daha etkin olduğu görüldü. %3 h-UK eksozomları, %5 ve %21 h-UK eksozomlarına göre daha inhibe edici etkiye sahip oldu ($p<0.001$). Dolayısıyla %3 h-UK eksozomları lenfosit inhibisyonunda daha etkindir. Bu sonuç ile eksozomların, lenfosit proliferasyonu üzerine MKH ile benzer etkinlik gösterebileceği düşünüldü.

Terapötik uygulamalarda eksozom üretimindeki zorluk, hücrelerden türetilen eksozomların miktarının terapotik dozlara ulaşamıyor olmasıdır. Başka bir zorluk, eksozomların doğal heterojenliği ve optimize edilmiş bir izolasyon protokolünün olmayışıdır. Bu gibi sınırlamaların üstesinden gelindiğinde, eksozomların biyolojik oluşumunu, izolasyonunu, bileşimini, salgılanmasını ve etkileşimini manipüle etmek için yeni yöntemler işlevlerini anlamamızı ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır. Eksozomların klinik kullanıma ilerlemesi için, karakterizasyonu, standardizasyonu, maliyeti, etkin üretimi, optimal dozajı ve en önemlisi güvenlik ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Bununla birlikte, eksozom araştırma alanındaki önemli ve etkili keşif ancak yüksek düzeyde eksozom izolasyon tekniklerinin geliştirilmesi ile mümkün olacaktır. Eksozomların kodlarının tamamen çözülmesi ve işlevsellikleri, yakın zamanda özellikle klinik pratikte daha önemli yol katetmeyi sağlayacaktır.

Öneriler

1. Belirli biyolojik örneklere ve kargo türlerine yönelik özenli bir izolasyon tekniği seçimi, izole edilen eksozomların kalitesini ve sonuçlarının geçerliliğini artıracaktır.
2. Eksozom izolasyonu ve miktarının artırılması konusunda optimum protokoller geliştirilmelidir.
3. Eksozom miktarı ciddi oranda arttığında çeşitli hastalıklarda tedavi ajanı olarak düşünülebilir.
4. Yapılacak faz çalışmaları ile biyogüvenilik-biyoeşdeğerlik seviyeleri ve optimal dozu belirlenmelidir.
5. Kullanılabilecek oksijen konsantrasyonu ve MKH' lerin terapötik etkinliği bakımından en büyük yararı sağlayacak olan uygun inkübasyon süresini belirlemek olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy Stem Cells. 2017;35(4):851-858.
2. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol 2013;18;200(4):373-383.
3. Surman M, Stępień E, Hoja-Łukowicz, D, et al. Deciphering the role of ectosomes in cancer development and progression: focus on the proteome. Clin Exp Metastasis 2017;34(3-4):273-289.
4. Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: ıntroducing the next small big thing. Int J Mol Sci 2016;17(2):170.
5. Jong AY, Wu C, Li J, et al. Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells. J of Exs Vesic 2017;6(1);1294368.
6. Mohyeldin AN, Garzo´ n-Muvdi T, Hinojosa AQA. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the Stem Cell niche. Cell Stem Cell 2010;7(2):150-161.
7. Lina JL, Wangb MJ, Leec D, et al. Hypoxia-inducible factor-1a regulates matrix metalloproteinase-1 activity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. FEBS Lett 2008;582(17):2615–2619.
8. Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V, et al. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? Mitochondrion 2014;19;105–112.
9. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. Reg Med 2008;3(1):1–5.
10. Wenlin L, Ke L, Wanguo W, et al. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. Cell Stem Cell 2013;13(3):270–283.
11. Petersdorf EW, Malkki M, Gooley TA, et al. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. PLoS Med 2007;4(1):e8.

12. Thompson PA, Perera T, Marin D. Double umbilical cord blood transplant is effective therapy for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. Leu & Lymp 2016;57(7):1607–1615.

13. Nathamgari SS, Dong B, Zhou F. Isolating single cells in a neurosphere assay using inertial microfluidics. Lab on a Chip 2015;15(24):4591–4597.

14. Ning B, Cheuk DK, Chiang AK, et al. Autologous cord blood transplantation for metastatic neuroblastoma. Pediatric Transplantation 2015;20(2): 290–296.

15. Yoon DS, Choi Y, Lee JW. Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53-SIRT1 axis. Cell Death Dis 2016;7(2):e2093.

16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy 2006;8(4): 315–317.

17. Furtado MB, Nim HT, Gould JA, et al. Microarray profiling to analyse adult cardiac fibroblast identity. Genom Data 2014;2:345–350.

18. Uccelli A, Prockop DJ. Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases? Curr Opin Immunol. 2010;22(6):768–774.

19. Sahoo AK, Das JK, Nayak S. Isolation, culture, characterization, and osteogenic differentiation of canine endometrial mesenchymal stem cell. Vet World 2017;10(12):1533–1541.

20. Zanetta M, Quirici N, Demarosi F, et al. Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of mscs into osteoblasts. Acta Biomater 2009;5(4):1126–1136.

21. Sekine W, Haraguchi Y, Shimizu T, et al. Chondrocyte differentiation of human endometrial gland-derived mscs in layered cell sheets. ScientificWorld Journal 2013;2013:359109.

22. Yannarelli G, Tsoporis JN, Desjardins JF, et al. Donor mesenchymal stromal cells (MSCs) undergo variable cardiac reprogramming in vivo and predominantly co-express cardiac and stromal determinants after experimental acute myocardial infarction. Stem Cell Rev 2014;10(2):304–315.

23. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms. Mol Ther 2009;17(6):939–946.

24. Kim YJ, Kim HJ, Im GI. PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs. Biochem Biophys Res Commun 2008;373(1):104–108.

25. Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, et al. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). J Cell Mol Med 2010;14(9):2190–2199.

26. Miranda JP, Filipe E, Fernandes AS, et al. The human umbilical cord tissue-derived MSC population UCX(®) promotes Early motogenic effects on keratinocytes and fibroblasts and G-CSF-mediated mobilization of BM-MSCs when transplanted in vivo. Cell Transplantation 2015;24(5):865–877.

27. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8(4):315–317.

28. Pendleton C, Li Q, Chesler DA, et al. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: In vitro comparison of their tropism towards gliomas. PLoS One 2013;8(3):581-598.

29. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. Organogenesis 2009;5(3):143–154.

30. Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, et al. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. FASEB J 2009;23(10):3494–3505.

31. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumundan: İnsan Doku Ve Hücre Ürünlerinin Ruhsatlandırılması Ve Bu Ürünlerin Üretim, İthalat, İhracat, Depolama Ve Dağıtım Faaliyetlerini Yürüten Merkezler Hakkında Tebliğ 4 Nisan 2014 Resmi gazete sayı: 28962.

32. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989;321(17):1174-1178.

33. Yokuş O, Albayrak M. Early and late endocrinologic complications of the hematopoetic stem cell transplantation performed for hematologic malignancies. J Clinical Experimental Investigations 2012;3(1):149-156.

34. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86(10):3828-3832.

35. Berk Ö. High dose cemotherapy in solid tumours and otolog bone marrow transplantation treatment. Doğa Tr Tıp ve Ecz DC 1986;10:104-109.

36. Akan H, Beksaç M, Koç H. Autologous peripheral blood stem cell transplantation: An alternative. Turkish Journal of Hematology and Oncology 1992;2:159- 161.

37. Tomblyn MB, Arora M, Baker KS, et al. Myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia: analysis of graft sources and longterm outcome. J Clin Oncol 2009;27(22):3634–3641.

38. Locatelli F, Rocha V, Reed W, et al. Eurocord Transplant Group. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. Blood 2003;101(6):2137–2143.

39. Frassoni F, Gualandi F, Podestà M, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. The Lancet Oncology 2008;9(9):831-839.

40. Doral MN, Atay ÖA, Bilge O, et al. Current surgical treatment options for cartilage repair. Turkish Journal of Geriatrics 2011;Özel sayı 1: 95-100.

41. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, et al. The use of chondrogide membrane in autologous chondrocyte implantation. Knee 2004;11(1): 51-55.

42. Stosich MS, Mao JJ. Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery. Plast Reconstr Surg 2007;119(1): 71-85.

43. Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, et al. Bone regeneration and stem cells. J Cell Mol Med 2011; 15(4):718-746.

44. Binnet MS, Başarır K, Emin N, et al. Recent applications of cellular therapy in orthopedic surgery. J Cell Therapy Reg Med 2010;1:17-22.

45. Ulmer FL, Winkel A, Kohorst P, et al. Stem cells Prospects in dentistry. Schweiz Monatsschr Zahnmed 2010;120(10):860-872.

46. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. Archives of Oral Biology 1992;37(12):1045-1055.

47. Buchaille R, Couble ML, Magloire H, et al. A substractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells. Matrix Biol 2000;19(5):421-430.

48. Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, et al. Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. Calcif Tissue Int 2000;66(2):139-144.

49. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cell from human exfoliated deciduous teeth, Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(10):5807-5812.

50. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet 2008;371(9624):1579-1586.

51. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant, graftversus- host disease. Transplantation 2006;81(10):1390-1397

52. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284(5411):143–147.

53. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003;114(6):763–776.

54. Siepe M, Heilmann C, Patrick S, et al. Stem cell research and cell transplantation for myocardial regeneration. Eur J Cardiothorac Surg 2005;28(2):318-324.

55. Özbaran M, Omay SB, Nalbantgil S, et al. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. Eur J Cardiothorac Surg 2004;25(3):342-350.

56. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM. Matrix cells from wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells 2003;21(1):50-60.

57. https://www.losemilenfomamiyelom.org/yazdir?DD009E9B316D57834B966429D71DD3CC (Erişim tarihi 25 Ocak 2019).

58. Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. Cancer Microenviron 2015;8(3):125–158.

59. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, et al. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. J Leukoc Biol 2005;78(5):1025–1042.

60. Segal AW, Dorling J, Coade S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. J Cell Biol 1980;85(1):42–59.

61. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat. Rev Immunol 2011;11(8):519-531

62. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim, J.J. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. Trends Immunol 2009;30(11):531–537.

63. Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. PLoS Pathog 2010;6(2):e1000755.

64. Alfaro C, Suarez N, Oñate, C, et al. Dendritic cells take up and present antigens from viable and apoptotic polymorphonuclear leukocytes. PLoS ONE 2011;6(12):e29300.

65. Boudaly S. Activation of dendritic cells by polymorphonuclear neutrophils. Front Biosci 2009;14:1589–1595.

66. van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, et al. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. J Exp Med 2005;201(8):1281–1292.

67. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. Sci Transl Med 2011;3(73):73ra19.

68. Diana J, Simoni Y, Furio L, et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. Nat Med 2013;19(1):65–73.

69. Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foefi. Carcinogenesis 2012;33(5):949–955.

70. Granot Z, Henke E, Comen EA, et al. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. Cancer Cell 2011;20(3):300–314.

71. Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. Blood 1989;74(5):1844–1851.

72. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol 2009;19(2):43–51.

73. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol 2015;25(6):364–372.

74. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. J. Cell Biol 1983;97(2):329–339.

75. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. Cell 1983;33(3):967–978.

76. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. J Extracell Vesicles 2015;4(1):27031.

77. Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, et al. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization, Biochem. J 2004;380(1):161–171.

78. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, et al. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function, Immunol Lett 2006;107(2):102–108.

79. Cooper JM, Wiklander PB, Nordin JZ, et al. Systemic exosome siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic Mmice. Movement Disord 2014;29(12):1476–1485.

80. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nat Biotechnol 2011;29(4):341–345.

81. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. J Proteome Res 2008;7(12):5157–5166.

82. Subra C, Grand D, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. J Lipid Res 2010;51(8):2105–2120.

83. Jenjaroenpun P, Kremenska Y, Nair VM, et al. Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. Peer J 2013;1:e201.

84. Lasser C, Eldh M, Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. JoVE 2012;59:e3037.

85. Huang X, Yuan T, Tschannen M, et al. Characterization of human plasma-derived exosome RNAs by deep sequencing. BMC genomics 2013;14(1):319.

86. Khatun Z, Bhat A, Sharma S, et al. Elucidating diversity of exosomes: biophysical and molecular characterization methods. Nanomedicine 2016;11(17):2359–2377

87. Garrett HR, Grisham CM. Biochemistry, 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning; 2013. p. 111.

88. Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. Methods 2015;87:46–58.

89. Rechavi O, Erlich Y, Amram H, et al. Cell contact-dependent acquisition of cellular and viral nonautonomously encoded small RNAs. Genes Dev 2009;23(16):1971–1979.

90. Yamashita T, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation. Eur J Pharm 2016;98:1–8.

91. Thery C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol 2006;30(1):3–22.

92. Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, et al. Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. PloS ONE 2014;9(5):e96094.

93. Grapp M, Wrede A, Schweizer M, et al. Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. Nat Commun 2013;4:2123.

94. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. J Cell Biol 2006;172(6):932–935.

95. Quintana JF, Makepeace BL, Babayan SA, et al. Extracellular Onchocerca-derived small RNAs in host nodules and blood. Parasit Vectors 2015;8(1):58.

96. Zeringer E, Barta T, Li M, et al. Strategies for isolation of exosomes. Cold Spring Harb Protoc 2015; 2015(4):319–323.

97. Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. J Control Release. 2015;219:396–405.

98. Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. Rapid isolation of urinary exosome biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. Am J Physiol Renal Physiol 2007;292(5):1657–1661.

99. Bioo Scientific Corporation, ExoMir™ Kit, 2016. http://www.biooscientific.com/exosome-analysis/exomir-kit. (Erişim tarihi 27 Haziran 2019).

100. Channavajjhala SK, Rossato M, Morandini F, et al. Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes, Clin Chem Lab Med 2014; 52(3):345–354.

101. Escudier B, Dorval T, Chaput N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. J Transl Med 2005;3(1):10.

102. Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. J Transl Med 2005;3(1):9

103. Heinemann ML, Ilmer M, Silva LP, et al. Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration, J Chromatogr A 2014;1371:125–135.

104. Feng Y, Huang W, Wani M, et al. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. PloS ONE 2014;9(2):e88685.

105. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res 2010;4(3):214–222.

106. Kang D, Oh S, Ahn SM, et al. Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation, nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Proteome Res 2008;7(8):3475–3480.

107. Petersen KE, Manangon E, Hood JL, et al. A review of exosome separation techniques and characterization of B16-F10 mouse melanoma exosomes with AF4-UV-MALS-DLS-TEM. Anal Bioanal Chem 2014;406(30):7855–7866.

108. Musante L, Tataruch D, Gu DF, et al. A Simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications, and sample banking. Sci Rep 2014;4:7532.

109. Kim D, Nishida H, An SY, et al. Chromatographically isolated CD63+CD81+ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. Proc Natl Acad Sci USA 2016;113(1):170–175.

110. Yanez-Mo M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, et al. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. Trends Cell Biol 2009;19(9):435–446.

111. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10606D. (Erişim tarihi 4 Temmuz 2019).

112. Hong CS, Muller L, Boyiadzis M, et al. Isolation and characterization of CD34+ blast-derived exosomes in acute myeloid leukemia. PloS ONE 2014;9(8):e103310.

113. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. Methods 2012;56(2):293–304.

114. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. Mol Cell Proteomics 2010;9(2):197–208.

115. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes Potential implications for their function and multivesicular body formation. J Biol Chem 2003;278(13):10963–10972.

116. ExoQuick overview. System Biosciences Inc; https://www.systembio.com/microrna-research/exoquick-exosomes/overview. (Erişim tarihi 4 Temmuz 2019).

117. Total exosome isolation. Thermo Fisher Scientific Inc; https://www.thermofisher.com/sg/en/home/life-science/cell analysis/exosomes.html (Erişim tarihi 4 Temmuz 2019).

118. Lee K, Shao H, Weissleder R, et al. Acoustic purification of extracellular microvesicles. ACS Nano 2015;9(3):2321–2327.

119. Davies RT, Kim J, Jang SC, et al. Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. Lab Chip 2012;12(24):5202–5210.

120. Wang Z, Wu HJ, Fine D, et al. Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. Lab Chip 2013;13(15):2879–2882.

121. Che C, Skog J, Hsu CH, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. Lab Chip 2010;10(4):505–511.

122. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, et al. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. Lab Chip 2014;14(11):1891–1900.

123. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. J Cell Physiol 2009;219(2):271-275.

124. Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. J Cell Physiol 2009;220(3):562-568.

125. Kimura H, Braun RD, Ong ET, et al. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. Cancer research 1996;56(23):5522-5528.

126. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. J Nati Cancer Inst 2001;93(4):266-276.

127. Huang X, Trinh T, Aljoufi A, et al. Hypoxia signaling pathway in stem cell regulation: Good and evil. Curr Stem Cell Rep 2018;4(2):149–157.

128. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stres. Mol Cell 2010;40(2):294–309.

129. Kaelin WG, Jr Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Mol Cell 2008;30(4):393–402.

130. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. Int J Biochem Cell Biol 2004;36(2):189–204.

131. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem1995;270(3):1230–1237.

132. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxiainducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(12):5510–5514.

133. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, et al. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. J Biol Chem 2002;277(36):32405–32408.

134. Maynard MA, Qi H, Chung J, et al. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. J Biol Chem 2003;278(13):11032–11040.

135. Keith B, Adelman DM, Simon MC. Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(12):6692–6697.

136. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, et al. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF2alpha in hypoxic gene regulation. Mol Cell Biol 2003;23(24): 9361–9374.

137. Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al. Genome-wide association of hypoxiainducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts, J Biol Chem 2009;284(25):16767–16775.

138. Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, et al. High-resolution genome-wide mapping of HIFbinding sites by ChIP-seq. Blood 2011;117(23):207–217.

139. Dames SA, Martinez-Yamout M, De Guzman RN, et al. Structural basis for Hif-1 alpha /CBP recognition in the cellular hypoxic response. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(8):5271–5276.

140. Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, et al. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxiainducible factor-1 alpha. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(8):5367–5372.

141. Richard DE, Berra E, Gothie E, et al. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxiainducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem 1999;274(46):32631–32637.

142. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. Cell 2002;111(5):709–720.

143. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. Cell 2007;131(2):309–323.

144. Davy P, Allsopp R. Hypoxia: are stem cells in it for the long run? Cell Cycle 2011;10(2):206–211.

145. Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(13):4783–4788.

146. Seewald MJ, Ellinghaus P, Kassner A, et al. Genomic profiling of developing cardiomyocytes from recombinant murine embryonic stem cells reveals regulation of transcription factor clusters. Physiol Genomics 2009;38(1):7–15.

147. Koay EJ, Athanasiou KA. Hypoxic chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells enhances cartilage protein synthesis and biomechanical functionality. Osteoarthr Cartil 2008;16(12):1450–1456.

148. Lee SW, Jeong HK, Lee JY, et al. Hypoxic priming of mESCs accelerates vascular-lineage differentiation through HIF1-mediated inverse regulation of Oct4 and VEGF. EMBO Mol Med 2012;4(9):924–938.

149. Mantel CR, O'Leary HA, Chitteti BR, et al. Enhancing hematopoietic stem cell transplantation efficacy by mitigating oxygen shock. Cell 2015;161(7): 1553–1565.

150. Broxmeyer HE, O'Leary HA, Huang X, et al. The importance of hypoxia and extra physiologic oxygen shock/stress for collection and processing of stem and progenitor cells to understand true physiology/pathology of these cells ex vivo. Curr Opin Hematol 2015;22(4):273–278.

151. Antebi B, Rodriguez LA, Walker KP, et al. Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells. Stem Cell Research & Therapy 2018;9(1):265.

152. King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. BMC Cancer 2012;12(1):421

153. Zhao L, Luo H, Li X, et al. Exosomes derived from human pulmonary artery endothelial cells shift the balance between proliferation and apoptosis of smooth muscle cells. Cardiology 2017;137(1):43–53.

154. Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, et al. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. Biochem Biophys Res Commun 2014;445(2):327–333.

155. Borges FT, Melo SA, Ozdemir BC, et al. TGF-beta1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. J Am Soc Nephrol 2013;24(3):385–392.

156. Agarwal U, George A, Bhutani S, et al. Experimental, systems, and computational approaches to understanding the MicroRNA-mediated reparative potential of cardiac progenitor cell-derived exosomes from pediatric patients. Circ Res 2017;120(4):701–712.

157. King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. BMC Cancer 2012;12(1):421.

158. Yu X, Deng L, Wang D, et al. Mechanism of TNF-alpha autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: initiated by hypoxia inducible factor 1alpha, presented by exosomes. J Mol Cell Cardiol 2012;53(6):848–857.

159. Zhang W, Zhou X, Yao Q, et al. HIF-1-mediated production of exosomes during hypoxia is protective in renal tubular cells. Am J Physiol Renal Physiol 2017;313(4):F906–F913.

160. da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev 2009;20 (5-6):419-427.

161. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. J. Am. Soc. Nephrol 2009;20(5):1053-1067.

162. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res 2010;4(3):214-222.

163. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J Extracelluler Vesicles 2015;4(1):27066.

164. Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, et al. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. J Endocrinol 2016;228(2):57-71

165. Kato T, Miyaki S, Ishitobi H et al. Exosomes from IL-1β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. Arthritis Res Ther 2014;16(4):R163.

166. Qi X, Zhang J, Yuan H, et al. Exosomes secreted by human-Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats. Int J Biol Sci 2016;12(7):836-849.

167. Lai RC, Arslan F, Tan SS, et al. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. J Mol Cell Cardiol 2010;48;(6):1215-1224.

168. Zhou Y, Xu H, Xu Z, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. Stem Cell Res Ther 2013;4(2):34.

169. Qin Y, Wang L, Gao Z, et al. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. Sci Rep 2016;6:21961.

170. Nakano M, Nagaishi K, Konari N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. Sci Rep 2016;6:24805.

171. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. Sci Rep 2016;6:34842.

172. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. Stem Cell Res Ther 2015;6(1):127.

173. Chen T, Yeo R, Arslan F, et al. TanEfficiency of exosome production correlates inversely with the developmental maturity of MSC donor. J Stem Cell Res Ther 2013; (3) p. 2.

174. Yeo RW, Lai RC, Tan KH, et al. Exosome: a novel and safer therapeutic refinement of mesenchymal stem cell. J Circ Biomark 2013;1:7.

175. Li C, Chaung W, Mozayan C, et al. A New Approach for On-Demand Generation of Various Oxygen Tensions for In Vitro HypoxiaModels. PLoS One; 2016;11(5):e0155921.

176. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy 2006;8(4):315–317.

177. Mol EA, Goumans MJ, Doevendans PA, et al. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. Nanomedicine 2017;13(6):2061-2065.

178. Thery C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol 2006;30(1):3-22.

179. Rezk M, Hussein A, Atypical lymphoid proliferations: the pathologist's viewpoint, Expert Review of Hematology 2013;6(2):139-153.

180. Shahrokhi S., Menaa F., Alimoghaddam K., McGuckin C., Ebtekar M. Insights and hopes in umbilical cord blood stem cell transplantations. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012;2012:11.

181. Johnstone RM. The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. Biochem. Cell Biol 1992;70(3):179–190.

182. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. Proteomics 2009;9(21):4997–5000.

183. Wolfers J, Lozier A, Raposo Get al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. Nat Med 2001;7(3):297–303.

184. Chen W, Wang J, Shao C, et al. Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. Eur J Immunol 2006;36(6):1598–1607.

185. Le MT, Hamar P, Guo C, et al. miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. J Clin Invest 2014;124(12):5109–5128.

186. Harris DA, Patel SH, Gucek M, et al. Westbroek W, Taraska JW. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. PLoS One 2015;10(3):e0117495.

187. Lv MM, Zhu XY, Chen WX, et al. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. Tumour Biol 2014;35(11):10773–10779.

188. Zhao L, Liu W, Xiao J et al. The role of exosomes and “exosomal shuttle microRNA” in tumorigenesis and drug resistance. Cancer Lett 2015;356(2):339–346.

189. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res 2010;4(3):214–222.

190. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res 2013;10(3):301–312.

191. Tan CY, Lai RC, Wong W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. Stem Cell Res Ther 2014;5(3):76.

192. Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. Sci Rep 2013;3:1197.

193. Lespagnol A, Duflaut D, Beekman C, et al. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. Cell Death Differ 2008;15(11):1723–1733.

194. Feng Z. p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2(2):a001057.

195. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. Cancer Res 2006;66(9):4795–4801.

196. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. Nat Cell Biol 2012;14(7):677–685.

197. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res 2010;4(3):214–222.

198. Salomon C, Ryan J, Sobrevia L, et al. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. PLoS One 2013;8(7):e68451.

199. Bruno S, Grange C, Collino F, et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. PLoS One 2012;7(3):e33115.

200. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. J Am Soc Nephrol 2009;20(5):1053–1067.

201. Zhu YG, Feng XM, Abbott J, et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of *Escherichia coli* endotoxin-induced acute lung injury in mice. Stem Cells 2014;32(1):116–125.

202. Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. Stem Cells 2014;33(7):2158-2168.

203. Wu S, Ju GQ, Du T, et al. Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. PLoS One 2013;8(4):e61366.

204. Thery C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol 2006;3(1):3-22.

205. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, et al. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. Moleculer Therapy 2015;23(5):812–823.

206. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol. 2006;Chapter 3:Unit 3 22.

207. Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandesompele J, Bracke M, De Wever O, Hendrix A. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. J Extracell Vesicles. 2014.

208. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Thery C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113(8):E968–E977.

209. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. Mol Cell Proteom 2010;9(2):197–208.

210. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. Methods 2012;56(2):293–304.

211. Rupert DL, Shelke GV, Emilsson G, et al. Dual-wavelength surface plasmon resonance for determining the size and concentration of sub-populations of extracellular vesicles. Anal Chem 2016;88(20):9980-9988.

212. Grasso L, Wyss R, Weidenauer L, et al. Molecular screening of cancer-derived exosomes by surface plasmon resonance spectroscopy. Anal Bioanal Chem 2015;407(18):5425–5432.

213. Sina AA, Vaidyanathan R, Dey S, et al. Real time and label free profiling of clinically relevant exosomes. Sci Rep 2016;6:30460.

214. Xin H, Li Y, Buller B, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. Stem Cells 2012;30(7):1556–1564.

215. Quintana JF, Makepeace BL, Babayan SA, et al. Extracellular Onchocerca-derived small RNAs in host nodules and blood. Parasit Vectors 2015;8(1):58.

216. Zeringer E, Barta T, Li M, et al. Strategies for isolation of exosomes. Cold Spring Harb Protoc 2015; (4):319–323.

217. Gyorgy B, Modos K, Pallinger E, et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. Blood. 2011;117(4):39–48.

218. Ahmed NEMB, Murakami M, Kaneko S, et al. The effects of hypoxia on the stemness properties of human dental pulp stem cells (DPSCs). Scientific Reports. 2016; (6)**:**35476.

219. Hung J, Ho H, Shih YR, et al. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. J Orthop Res 2012; 30(2):260–266.

220. Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, Sensebé L, Zhang Y, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. Gene Expr. 2007;13(4-5):217-226.

221. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang PH, Mao N.Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic um bilical cord blood lymphocyte proliferation. Cell Res. 2005; 15(7):539-47.

222. Ludwig S, Floros T, Theodoraki MN, Hong CS, Jackson EK, Lang S, Whiteside TL. Suppression of Lymphocyte Functions by Plasma Exosomes Correlates with Disease Activity in Patients with Head and Neck Cancer. Clin Cancer Res. 2017; 23(16):4843-4854.

223. Li P, Kaslan M, Lee S.H, Yao J, Gao Z.
Progress in Exosome Isolation Techniques Theranostics. 2017; 7(3): 789–804

224. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak M.Z. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. Int. J. Cancer. 2005; 113:752–760.

225. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D. Clotting mechanisms and cancer: Implications in thrombus formation and tumor progression. Clin. Adv. Hematol. Oncol. 2003; 1:673–678.

226. Raimondo S, Saieva L, Corrado C, Fontana S, Flugy A, Rizzo A, De Leo G., Alessandro R. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism. Cell Commun. Signal. 2015; 13:8.

227. Qu J.L, Qu X.J, Zhao M.F, Teng Y.E, Zhang Y, Hou K.Z, Jiang Y.H, Yang X.H, Liu Y.P. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. Dig. Liver Dis. 2009; 41:875–880.

228. Pan L, Liang W, Fu M, Huang Z.H, Li X, Zhang W, Zhang P, Qian H, Jiang P.C, Xu W.R. Exosomes-mediated transfer of long noncoding RNA ZFAS1 promotes gastric cancer progression. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2017; 143:991–1004.

229. Yang L, Wu X.H, Wang D, Luo C.L, Chen L.X. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. Mol. Med. Rep. 2013; 8:1272–1278.

230. Ramteke A, Ting H, Agarwal C, Mateen S, Somasagara R, Hussain A, Graner M, Frederick B, Agarwal R, Deep G. Exosomes secreted under hypoxia enhance

invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. Mol. Carcinog. 2015; 54:554–565.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hipoksik Ortamın Mikroveziküllere Etkisinin Değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI		Açıklama
SİGORTA	☐	
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
İLAN	☐	
YILLIK BİLDİRİM	☐	
SONUÇ RAPORU	☐	
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
DİĞER	☐	

ASLI Giriniz

T.C. ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI 1923

Funda Hoşgüzmeci
Etik Kurul Sekreteri

KARAR BİLGİLERİ

Karar No : 2018/185 Tarih : 04.04.2018

Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Sami Aydoğan

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma İle İlişki		Katılım (*)		İmza
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı.	E.Ü. Tıp Fak.	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Prof.Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E x	K ☐	E ☐	H x	E ☐	H x	
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü.Tıp Fak.	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatolojii	Kayseri Eğitim Hast.	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek.Fak.	E x	K ☐	E ☐	H x	E ☐	H x	
Doç. Dr. Cihangir BİÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak..	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak..	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Serpil TAHERİ	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak..	E ☐	K x	E ☐	H x	E x	H ☐	
Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E x	K ☐	E ☐	H x	E x	H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐	K x	E ☐	H x	E x	H ☐	
Sevtap Koçer	Sivil Üye	Serbest	E ☐	K x	E ☐	H x	E x	H ☐	

*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hipoksik Ortamın Mikroveziküllere Etkisinin Değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ETİK KURULUN ADI	ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	0 352 437 49 10 - 11
FAKS	0 352 437 52 85
E-POSTA	sukriye@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ					
KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Dr.Öğr.Üyesi Zeyhep Burçin Gönen				
KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Ağız Diş ve Çene Cerrahisi				
KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Genom Kök ve Hücre Merkezi, Kayseri				
VARSA İDARİ SORUMLU ÜNVANI/ ADI SOYADI					
DESTEKLEYİCİ					
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)					
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ					
ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1				
	FAZ 2				
	FAZ 3				
	FAZ 4				
	Gözlemsel ilaç çalışması				
	Tıbbi cihaz klinik araştırması				
	İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları				
	İlaç dışı klinik araştırma	x			
	Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ x	ÇOKMERKEZ	ULUSAL x	ULUSLARARASI	

ASLI GİBİDİR

T.C. ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI 1923

Funda HASÇELMECİ
Etik Kurul Sekreteri

tik Kurul Başkanının
nvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN
ıza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

HİPOKSİK ORTAMIN MİKROVEZİKÜLLERE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%9	%8	%5	%3
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	jceionline.org İnternet Kaynağı	%3
2	www.losemilenfomamiyelom.org İnternet Kaynağı	%1
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
5	toraks.dergisi.org İnternet Kaynağı	<%1
6	adumilas.adu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1

Tegnep Burcun GÖNEN

Nur Seda YAMAN

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı **:** Nur Seda ŞAHİN

İletişim Bilgileri

Adres :Mevlâna Mah. Hamurculu sok. Akgün Apt. 21/4 Kocasinan/KAYSERİ

Mail : n.sda.shn@gmail.com

2. Doğum Tarihi : 01.07.1992

3. Unvanı : Biyolog

4.ÖğrenimDurumu : Yüksek Lisans

Derece	**Alan**	**Üniversite**	**Yıl**
Lisans	Biyoloji A.B.D.	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi	2011-2015
Yüksek Lisans	Tarımsal Biyoteknoloji A.B.D.	Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2016-2018
Yüksek Lisans	Kök Hücre Bilimleri A.B.D.	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Genom ve Kök Hücre Merkezi	2017-Devam ediyor

5. Akademik Unvanlar

6. Yüksek Lisans Tezleri

1) Farklı Çözücülerle Hazırlanan Propolis Özütleri ile Propolis Ticari Ürünlerinin Biyoaktivitesinin Belirlenmesi Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2016
2) Hipoksik Ortamın Mikroveziküllere Etkisinin Değerlendirilmesi Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genom ve Kök Hücre Merkezi, 2017

7. Yayınlar

1. Silici S, Şahin N.S 'Fonksiyonel Bir Gıda: Arı Sütü '5. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çambalı Kongresi Kasım 2016, Muğla Poster

2.Atayoğlu T, Silici S, Özkök D, Şahin N.S, Ülgen N 'Farklı Çözücüler Kullanılarak Hazırlanan Propolis Örneklerinin Biyoaktif Özellikleri 13.Türkiye Eczacılık Kongresi Aralık 2016, İstanbul Sözlü Bildiri

3. Gönen Z.B, Şahin N.S ''Klinik Kullanım İçin Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması'' Akdeniz MedicalJournal 2018 DOI: 10.17954/amj.2018.1204

4. Bahar D, Gönen Z.B, Gümüşderelioğlu M, Önger M.E, Konuk E, Özkan B.B, Şahin N.S,Çetin M.Repair of RatCalvarial Bone Defectby Using Exosomes of UmbilicalCordDerivedMesenchymalStemCells Embedded in Chitosan/HydroxyapatiteScaffolds 6th International BAU Drug Desing Congress Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery&Patended Drug Development 13-15 Dec 2018, İstanbul Sözlü bildiri

5. Gönen Z.B, Şahin N.S, Eken A. Dondurulmuş Mezenkimal Kök Hücrelerin EnflamatuarSitokin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin Değerlendirilmesi. 3. Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi 12-14 Nisan 2019 İstanbul Tematik Sunum, Gazi Nasuh Tuğlu Özel Öğrenci Proje Ödülü İkinciliği

8. Projeler

1) Farklı Çözücülerle Hazırlanan Propolis Özütleri İle Propolis Ticari Ürünlerinin Biyoaktivitesinin Belirlenmesi Erciyes Üniversitesi BAP Projesi (FYL-2016-6958)

2) Hipoksik Ortamın Mikroveziküllere Etkisinin Değerlendirilmesi Erciyes Üniversitesi Bap Projesi (TLY-2017-7712)

9. Sertifika ve Kurslar

1) Eppendorf New Brunswick Semineri 29 Nisan 2014, Kayseri
2) 1.Hematogenetik Kursu 28-30 Kasım 2014, Kayseri
3) 2. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi 16-19 Nisan 2015, Kayseri
4) 3. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi 5-8 Mayıs 2015, Kayseri
5) 2. Ulusal ERKÖK Kök Hücre Sempozyumu 14 Mayıs 2016, Kayseri
6) Tüba 3. Uluslararası Kök Hücre Kursu: ‘‘Hematolojik Onkolojide İnovatif Hücresel Tedaviler’’ 19-22 Mayıs 2016, Antalya
7) KOSGEB Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi 12-15 Temmuz 2016, Kayseri
8) Araştırıcılar İçin Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 2016, Erciyes Üniversitesi İyi Klinik Uygulamalar Merkezi
9) Tübitak-2237 Proje Eğitimi Etkinlikleri Destekleme Programı 20-22 Ekim 2016, Kayseri
10) Türkiye Nükleer Tıp Derneği Uygulamalı Hücre Kültürü ve Kök Hücre İşaretlemeleri Kursu 21-23 Ocak 2017, Kayseri
11) AGÜ 2. Yaşam Bilimleri Kongresi 23-25 Şubat 2017, Kayseri
12) 4. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi 28-30 Nisan 2017, Gaziantep
13) GCP (Good Clinical Practices) Sertifikası NIDA ClinicalTrials Network 2017, Ankara
14) IATA (İnsanları Etkileyen Kategori B, Biyolojik ve Enfeksiyoz Madde Taşınımı) Sertifikası Mayo ClinicMedicalLaboratory 2017 Ankara
15) Advanced Workshop in NanomedicineandNanoscopy\ Advenced Cellular andMolecular Workshop February 12-15 2018, Kayseri
16) IPSEN EuropenİnnovationMeeting 16-19 April 2018, LisbonPortugal
17) GMP (GoodManufacturingPractices) Sertifikası Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi, Ağustos 2018, Kayseri

18) GCLP (Good Clinical Laboratory Practices) The Global Health Network Temmuz 2018, Ankara

19) Introductıon Reviewing to Genomic Research The Global Health Network Temmuz 2018, Ankara

20) GCP (Good Clinical Practices) Sertifikası The Global Health Network Temmuz 2018, Ankara

21) Calliditias Therapeutics İnvestigator Meeting 05-07 November 2018 Roma, İtaly

22) 3. Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi 12-14 Nisan 2019, İstanbul

10. Yabancı Diller

İngilizce, Orta

11. Bilgisayar Programları

Microsoft Office Programları, iyi

12. İş Deneyimi

Quadro-Cro Klinik Araştırma Kalite Güvence Danışmanlığı Eğitim ve Bilişim Hizmetleri Ltd. Şti. (Eylül 2017-halen)

13. Görev Alınan Klinik Araştırma Projeleri

1. Saha Koordinatörü, Yakın zamanda Akut Koroner Sendrom (AKS) geçiren genetik olarak tanımlanmış bir popülasyonda, kardiyovasküler (KV) risk üzerinde Dalcetrapib'in etkilerinin değerlendirilmesi için faz III, çift kör, randomize, plasebo kontrollü çalışma: dal-GenE araştırması, Erciyes Üniversitesi Kardiyoloji Bölümü
2. Saha Koordinatörü, Son-Evre Böbrek Hastalığı Gelişme Riski bulunan PrimerIgANefropatisi Hastalarında Nefecon'un Etkililiğinin ve Güvenliliğinin Değerlendirildiği Randomize, Çift-Kör, Plasebo Kontrollü Bir Çalışma, Erciyes Üniversitesi Nefroloji Bölümü
3. Saha Koordinatörü, Anemi ile iliskili kronik böbrek hastalığı olan diyaliz hastalarında, eritropoetin-uyarıcı ajanın geliştirilmesini takiben, rekombinant insan eritropoetininekarsidaprodustatın güvenlilik ve etkililiğinin değerlendirildiği, faz 3, randomize, açık-etiketli (destekleyicisi-körlenmiş), aktif-kontrollü, paralel-gruplu, cok merkezli, olaya dayali bir çalışma, Erciyes Üniversitesi Nefroloji Bölümü
4. Saha Koordinatörü, Anemi ile iliskili kronik böbrek hastalığı olan diyalize girmeyen hastalarda, darbepoetin alfaya karşı daprodustatın güvenlilik ve etkililiğinin değerlendirildiği, faz 3, randomize, açık-etiketli (destekleyicisi-körlenmiş), aktif-kontrollü, paralel-gruplu, cok merkezli, olaya dayali bir çalışma Erciyes Üniversitesi Nefroloji Bölümü
5. Saha Koordinatörü, SpinalKord Yaralanması veya Multıpl Skleroz Sebepli NörojenikDetrüsör Aşırı Aktivitesi Olan Gönüllülerde ÜrinerİnkontinansınTedavisinde Bir veya Daha Fazla İntradetrüsör 600 veya 800 Ünite DYSPORT Tedavisinin Etkinliğini ve Güvenilirliğini Değerlendirmeye Yönelik Faz III, Çok merkezli, Randomize, Çift Kör, Paralel Gruplu, Plasebo Kontrollü Çalışma, Erciyes Üniversitesi Üroloji Bölümü