T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAN PLAZMASINDAN EKSOZOM İZOLASYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

Yeliz ALTINOK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Eş Danışman

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

Aralık, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAN PLAZMASINDAN EKSOZOM İZOLASYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

Yeliz ALTINOK tarafından hazırlanan tez çalışması 30.12.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Uludağ Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL, Üye
Ahi Evran Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Kan Plazmasından Eksozom İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Analizi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Yeliz ALTINOK

Anneme

TEŞEKKÜR

Akademik yolculuğumun başlangıcında, bana destek olan birçok değerli kişi ve kuruma teşekkür etmek isterim. Öncelikle, tez konum ile ilgili çalışmalarda rehberlik eden danışman hocam Doç. Dr. Şenay Vural Korkut'a, minnettarım.

Motivasyonumu her yitirişimde beni ayağa kaldıran ve eylemde olmamı sağlayan; bana başarabilme potansiyelimin olduğunu kanıtlayan saygıdeğer eş-danışmanım Prof. Dr. Gülşah Çeçener'e;

Tez deneylerimi gerçekleştirme fırsatı sunan Bursa Uludağ Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ve desteklerinden dolayı Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ünal Egeli'ye;

Tez çalışmamın istatistiksel analizleri aşamasında benden deneyimini ve bilgisini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Güven Özkaya'ya;

Bu süreçte, gerekli hizmetlere ulaşmamı sağlayarak çalışmalarıma katkıda bulunan BioDNAtech Biyoteknoloji A.Ş.'ye;

Hem zihinsel inşa sürecime katkıda bulunan hem de akademik hayatımdaki her kararımda beni destekleyen sevgili abim Yusuf Altınok'a;

Ayrıca, deneysel süreçte ve laboratuvar çalışmaları sırasında desteklerini esirgemeyen Yüksek Tıbbi Biyolog Rumeysa Balaban'a;

Bu çalışma sırasında aldığım TÜBİTAK 2210-A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı desteği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Son olarak, beni her zaman destekleyen ve bu süreçte sabır ve anlayış gösteren aileme ve sevdiklerime en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmayı, emeklerinin ve sevgilerinin bir ürünü olarak onlara ithaf ediyorum.

Yeliz Altınok

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ xi
TABLO LİSTESİ xiii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1 GİRİŞ 1
2 EKSOZOMLARIN TEMEL MEKANİZMALARI 4
2.1 Eksozomların Biyogenezi ve Salınımı 4
2.2 Endozomal sorting kompleks request for transport (ESCRT) ve eksozom biyogenezindeki rolü 5
2.3 Eksozom Biyogenezinin ESCRT'den Bağımsız Mekanizması 8
2.4 MVB'lerin Membrana Taşınımı ve Eksozomların Hücre Dışına Salınımı 10
2.5 Eksozomların Bazal Kompozisyonu ve Kargosu 12
2.5.1 Eksozomal Kargo: Proteinler 13
2.5.2 Eksozomal Kargo: Nükleik Asitler 15
2.6 Eksozomların Etki Mekanizması 19
3 EKSOZOM İZOLASYON VE KARAKTERİZASYON YÖNTEMLERİ 27
3.1 Eksozom İzolasyon ve Karakterizasyon Yöntemlerine Genel Bakış 27
3.2 Eksozom İzolasyon Yöntemleri 28
3.2.1 Diferansiyel Santrifüj 28
3.2.2 Filtrasyon ve Ultrasantrifüjleme 29
3.2.3 Yoğunluk gradyanlı santrifüjleme 29
3.2.4 Çöktürme 31
3.2.5 İmmünoafinite yakalama tabanlı izolasyon 31

3.2.6 Boyut- Dışlama Kromatografisi (Size- Exclusion Chromotography; SEC) 31

3.2.7 Eksozom İzolasyon Yöntemlerinin Geri Kazanım, Saflık, Zaman ve İş Gücü Maliyeti Açısından Değerlendirilmesi 32

3.3 Eksozom Karakterizasyon Yöntemleri 34

3.3.1 Ultrayapısal Analizler 34

3.3.2 Nanopartikül İzleme Analizi (Nanoparticle Tracking Assay; NTA) 36

3.3.3 Asimetrik Akış Alan Akış Fraksiyonlama (Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation; AF4) 38

3.3.4 Direnç Darbesi Algılama (Resistive Pulse Sensing; RPS) 38

3.3.5 Akış sitometrisi (Flow cytometri) 38

3.3.6 ExoView Karakterizasyon Platformu 39

3.3.7 *In-vivo* Eksozom İzleme 39

3.4 Eksozom Kargosunun Karakterizasyonu 40

3.4.1 Eksozomal Protein Karakterizasyonu 41

3.4.2 Eksozomal microRNA 43

4 MATERYAL VE METOT **44**

4.1 Kullanılan Materyaller 44

4.2 Tez Metodu 44

4.3.1 Etik Onam ve İnsan Kan Plazmasının Eldesi 45

4.3.2 Filtrasyon ve Ultrasantrifüjleme 45

4.3.3 Boyut Dışlama Kromatografisi 46

4.3.3 Protein İzolasyonu 47

4.3.4 Protein Miktarlarının Florometrik ve Spektrofotometrik Yöntemle Ölçümü 48

4.3.4 Western Blot 49

4.3.5 Nanopartikül İzleme Analizi (Nanoparticle Tracking Assay; NTA) 52

4.3.6 TEM 52

4.3.7 İstatistiksel Analiz 52

5 BULGULAR **54**
5.1 TEM Görüntülemeleri 54
5.2 NTA Sonuçları 56
5.3 BCA Sonuçları 68
5.4 Western Blot Sonuçları 72
5.5 İstatistiksel Analiz 74
6 SONUÇ **86**
KAYNAKÇA **94**
A TAMAMLAYICI VERİLER **116**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **130**

SİMGE LİSTESİ

dH_2O	Distile Su
H_2O	Su
kDa	Kilodalton
L	Litre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
α	Alfa
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

KISALTMA LİSTESİ

AF4	Asimetrik Akış Alan Akış Fraksiyonlama (Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation)
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopisi (Atomic Force Microscopy)
Ago2	Argonat 2
APC	Antijen Sunan Hücre (Antigen Presenting Cell)
AREG	Amfiregulin
circRNA	Sirküler RNA
DGKα	Diaçilgliserol Kinaz α
dsDNA	Çift Sarmallı DNA
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ESCRT	Taşıma İçin Gerekli Endozomal Sıralama Kompleksi (Endosomal Sorting Complex Request for Transport)
EV	Ekstraselüler Vezikül
ExoDNA	Eksozomal DNA
FC	Akış Sitometrisi (Flow Cytometri)
HSP	Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins)
ILV	İntraluminal Vezikül
ITG	TDE Integrinleri
Kriyo-EM	Kriyojenik Elektron Mikroskopisi
lncRNA	Uzun Kodlamayan RNA (Long Non-Coding RNA)
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
miRNA	MikroRNA
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
mRNA	Mesajcı RNA
MS	Kütle Spektrofotometrisi (Mass Spectrometry)
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MVB	Multiveziküler Cisim (Multivesicular Body)
nSMase 2	Nötral Sfingomiyelinaz 2
NTA	Nanopartikül İzleme Analizi (Nanoparticle Tracking Assay)

PA	Fosfatidik Asit (Phosphatidic Acid)
PBS	Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)
PD-L1	Programlanmış Ölüm-Ligandı (Programmed Death-Ligand)
PEG	Polyetilene Glikol
PLD 2	Fosfolipaz D2 (Phospholipase D2)
PTM	Post-Translasyonel Modifikasyon
RPS	Direnç Darbesi Algılama (Resistive Pulse Sensing)
rRNA	Ribozomal RNA
S1P	Sfingozin 1-Fosfat
sEV	Küçük Ekstraselüler Vezikül
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sUC	Sükroz Tamponlu Ultrasantrifüjleme
UF	Ultrafiltrasyon
SEC	Boyut Dışlama Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
SMazlar	Nötr Sfingomiyelinazlar (Neutral Sphingomyelinases)
ss DNA	Tek Sarmallı
SWATH	Tüm Teorik Kütle Spektrumlarının Sıralı Alımı (Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Mass Spectra)
TDE	Tümör Kaynaklı Eksozomlar (Tumor-Derived Exosomes)
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TEM alanı	Tetraspanin Bakımından Zenginleştirilmiş Alan (Tetraspanin-enriched domain)
VAMP7	Vezikül İlişkili Membran Proteini (Vesicle Associated Membrane Protein 7)
YBX1	Y-Box Protein 1
αBC	αB-Kristalin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Eksozom biyogenezi **6**

Şekil 2.2: Eksozomların etki mekanizmaları **21**

Şekil 3.1: Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme işlemlerinin şematik gösterimi **30**

Şekil 3.2: TEM görüntüsü **34**

Şekil 3.3: İnsan vitrözündeki eksozomların AFM görüntüleri **36**

Şekil 3.4: ARPE-19 hücrelerinden türetilen eksozomların temsili NTA dağılım profilleri **37**

Şekil 4.1: Ultrasantrifüjle eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu iş akış şeması **46**

Şekil 4.2: Kolon kromatografisiyle eksozom izolasyonu **47**

Şekil 4.3: Western blot deneyinin temel basamakları **51**

Şekil 5.1: Eksozomların TEM görüntülemeleri **55**

Şekil 5.2: 100.000xg ile izole edilmiş plazma eksozomların NTA sonuçları **57**

Şekil 5.3: 125.000xg ile izole edilmiş plazma eksozomların NTA sonuçları **58**

Şekil 5.4: 150.000xg ile izole edilmiş plazma eksozomların NTA sonuçları **59**

Şekil 5.5: SEC ile izole edilmiş plazma eksozomların NTA sonuçları **60**

Şekil 5.6: Birinci örneğe ait mikrovezikül izolasyonu NTA sonuçları **61**

Şekil 5.7: İkinci örneğe ait mikrovezikül izolasyonu NTA sonuçları **62**

Şekil 5.8: Üçüncü örneğe ait mikrovezikül izolasyonu NTA sonuçları **64**

Şekil 5.9: Farklı klinik örneklerde D10 (nm) değerlerinin karşılaştırılması **68**

Şekil 5.10: BCA standartlarından oluşturulan eğri ve hesaplanan R^2 değeri **69**

Şekil 5.11: Western blot sonuçları **74**

Şekil A.1: Birinci klinik örneğe ait 100.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali **116**

Şekil A.2: Birinci klinik örneğe ait 125.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali **117**

Şekil A.3: Birinci klinik örneğe ait 150.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali **117**

Şekil A.4: Birinci klinik örneğe ait SEC ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali **118**

Şekil A.5: İkinci klinik örneğe ait 100.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali **118**

Şekil A.6: İkinci klinik örneğe ait 125.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali **119**

Şekil A.7: İkinci klinik örneğe ait 150.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali **119**

Şekil A.8: İkinci klinik örneğe ait SEC ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali..... **120**

Şekil A.9: Üçüncü klinik örneğe ait 100.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali..... **120**

Şekil A.10: Üçüncü klinik örneğe ait 125.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali..... **121**

Şekil A.11: Üçüncü klinik örneğe ait 150.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali..... **121**

Şekil A.12: Üçüncü klinik örneğe ait SEC ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali **122**

Şekil A.13: Western blot deneyi membran ponceu boyama ve immünofloresan görüntüleme sonuçları..... **123**

Şekil A.14: NTA sonuçlarının üç boyutlu grafikleri - 1..... **126**

Şekil A.15: NTA sonuçlarının üç boyutlu grafikleri - 2..... **127**

Şekil A.16: NTA sonuçlarının üç boyutlu grafikleri – 3..... **128**

TABLO LİSTESİ

Tablo 5.1: NTA sonuçlarının mod, mean, standart sapma, konsantrasyon, D10, D50 ve D90 değerleri **65**

Tablo 5.2: NTA sonuçlarının çeşitli boyut aralıklarındaki konsantrasyon ölçüleri **66**

Tablo 5.3: Tüm örnekler için BCA analizinin sonuçları **71**

Tablo 5.4: Tüm yöntemler için konsantrasyon parametresi bağlamında tanımlayıcı istatistik tablosu **75**

Tablo 5.5: Konsantrasyon (partikül/mL) için ANOVA analizi. **76**

Tablo 5.6: Konsantrasyon (partikül/mL) bağımlı değişkeni için Bonferroni testi **76**

Tablo 5.7: Tüm UC grupları ve SEC için grup istatistiği **77**

Tablo 5.8: UC'lerin tamamı ve SEC için bağımsız örnek testi **78**

Tablo 5.9: Eksozom ve mikrovezikül örneklerinin eşleştirilmiş örneklem istatistiği **80**

Tablo 5.10: Eşleştirilmiş örneklem istatistiği ve p değerleri **81**

Tablo 5.11: Tüm parametreler ve tüm yöntemler için ANOVA analizi **83**

Tablo 5.12: Eksozomların span değerleri **85**

Tablo 5.13: Mikroveziküllerin span değerleri **85**

Tablo A.1: Tanımlayıcı istatistikler **124**

Tablo A.2: BCA standart dilüsyonların iki tekrarlı absorbans değerleri **128**

Tablo A.3: BCA standart dilüsyonlarının absorbans değerlerinin ortalaması ve karşılık geldikleri konsantrasyon değerleri **129**

ÖZET

Kan Plazmasından Eksozom İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Analizi

Yeliz ALTINOK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Eş-Danışman: Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

Eksozomlar, hücreler arası iletişimde önemli rol oynayan ve birçok biyolojik süreçte yer alan ekstraselüler veziküllerdir. Son yıllarda, eksozomların biyobelirteç olarak kullanımı ve terapötik potansiyelleri üzerine yapılan çalışmalar büyük ilgi görmüştür. Ancak, eksozom izolasyonu için kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması ve bu yöntemlerin etkinliğinin değerlendirilmesi üzerine literatürde sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, eksozom izolasyonunda kullanılan çeşitli yöntemlerin verimlilik, saflık ve biyolojik işlev açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında, sağlıklı bireylerden alınan kan plazması örnekleri kullanılarak farklı son hızlarda ultrasantrifüj (UC) ve boyut dışlama kromatografisi (SEC) izolasyon teknikleri uygulanmıştır. İzole edilen eksozomlar, nanoparçacık izleme analizi (NTA), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve Western blot yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Ayrıca, izolasyon yöntemlerinin eksozomların

biyomoleküler özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, boyut dışlama kromatografisinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek saflık ve verim sağladığını ortaya çıkarmıştır *(*p<0,05)*. Bu bulgular, eksozom izolasyonunun standardizasyonu ve uygulama alanlarına uygun yöntemin seçimi konusunda önemli bilgiler sunmaktadır.

Bu çalışma, eksozom biyolojisi ve uygulama alanlarına yönelik temel bir katkı sağlamayı hedeflemektedir. Mevcut tez, eksozom izolasyonunda ultrasantrifüjün farklı hızlarıyla kromatografik izolasyon yöntemini kıyaslayan ilk çalışmadır. Mevcut tez çalışmasının sonuçları, izolasyon protokollerinin optimizasyonu ile daha güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesine olanak tanıyarak literatüre katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Eksozom, eksozom izolasyon yöntemleri, boyut dışlama kromatografisi, ultrasantrifüj, biyomoleküler karakterizasyon

ABSTRACT

A Comparative Analysis of Exosome Isolation Methods from Blood Plasma

Yeliz ALTINOK

Department of Molecular Biology and Genetics
Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Co-supervisor: Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

Exosomes are extracellular vesicles that play an important role in intercellular communication and are involved in many biological processes. In recent years, studies on the use of exosomes as biomarkers and their therapeutic potential have attracted great interest. However, there is limited information in the literature on the comparison of the methods used for exosome isolation and evaluation of the efficiency of these methods.

In this thesis, it was aimed to compare various methods used in exosome isolation in terms of efficiency, purity and biological function. Within the scope of the study, ultracentrifugation and size exclusion chromatography isolation techniques were applied at different final speeds using blood plasma samples taken from healthy individuals. The isolated exosomes were characterised using nanoparticle tracking analysis (NTA), transmission electron microscopy (TEM) and Western blot methods. In addition, the effect of isolation methods on the biomolecular properties of exosomes was analysed and the results were statistically evaluated.

The results revealed that column chromatography provided statistically significant high purity and yield (*$p<0.05$). These findings offer crucial insights for the

standardisation of exosome isolation and the selection of the most suitable method for various applications. This study aims to make a fundamental contribution to exosome biology and its applications. The present thesis is the first study comparing the chromatographic isolation method with different speeds of ultracentrifugation for exosome isolation. The results of the present thesis allow for more reliable and reproducible results by optimising the isolation protocols.

Keywords: Exosomes, exosome isolation methods, size exclusion chromatography, ultracentrifugation, biomolecular characterization

1
GİRİŞ

Bakterilerden bitkilere ve *Homo sapiens'*e dek bütün hücreler çevrelerinden gelen sinyalleri çeşitli mekanizmalarla alır, sinyal üretir ve bunlara yanıt verir. Çevresel koşulların anlaşılmasında ve böylece canlılığın sürdürülmesinde, sonlandırılmasında veya yanıt oluşturmada canlı hücreler iletişime muhtaçtır [1]. Hücreler arası iletişimi sağlama yollarından biri ekstraselüler veziküllerdir. Mikroveziküller -veya bir diğer ismiyle ektozomlar-, apoptotik cisimler, onkozomlar ve eksozomlar; ekstraselüler vezikül tipleridir ve bu vezikül tiplerinin boyutları, biyogenezleri ve içerikleri dolayısıyla taşıdıkları bilgi birbirlerinden farklıdır [2]. Eksozomlar DNA, protein, lipid ve RNA tiplerini kargo olarak barındırabilirler ve alıcı hücreye iletebilirler. Böylece alıcı hücrenin işlevini etkileyebilirler. Bu durum hücrenin normal fizyolojisini devam ettirirken gerçekleşebileceği gibi hastalık durumunda da patolojik durumu destekleyebilecek türde bir iletişimle sonuçlanır.

Eksozomlar, hücreler arası iletişimde önemli bir rol oynayan ve biyobelirteç, ilaç taşıyıcı ve terapötik ajan olarak potansiyel kullanım alanları sunan nano membranlı veziküllerdir. Özellikle kan plazması gibi biyolojik sıvılardan eksozomların izole edilmesi hem temel biyolojik araştırmalarda hem de klinik uygulamalarda giderek artan bir öneme sahiptir. Ancak, eksozomların etkili bir şekilde izole edilmesi, mevcut yöntemlerin verimlilik, saflık ve tekrarlanabilirlik açısından farklılıklar göstermesi nedeniyle hala önemli bir sorundur.

Bu bağlamda, eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu, bu nano veziküllerin biyolojik işlevlerini anlamak ve potansiyel klinik uygulamalar için optimize etmek açısından temel bir araştırma alanıdır. Bu tez çalışmasında, eksozom izolasyonu ve karakterizasyon süreçlerinde kullanılan yöntemlerin tanıtılması ve karşılaştırmalı analizinin yapılması, bu alandaki bilgi boşluğunu doldurmayı amaçlamaktadır.

Eksozom izolasyonu için biyolojik sıvıların seçimi, çalışmanın hedefleri ve uygulama alanları açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada yöntem karşılaştırması için kan plazmasının tercih edilme sebeplerinden biri hem bol miktarda hem de köken bakımından heterojen bir eksozom popülasyonu sunmasıdır. Kan plazması, vücut genelinde birçok hücre tipinden salınan eksozomları içerir. Bu durum, plazmanın hem biyolojik çeşitlilik hem de eksozom zenginliği açısından değerli bir örneklem materyali olmasını sağlar. Ayrıca, eksozomların plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunması, izolasyon verimliliğini karşılaştırmak için elverişli bir başlangıç materyali sağlamaktadır.

Kan plazması, klinik tanı ve tedavi uygulamalarında sıkça kullanılan bir biyolojik sıvıdır. Plazmadan elde edilen eksozomlar, biyobelirteç keşfi, hastalık tanısı ve terapötik taşıyıcılar gibi birçok uygulamada kritik rol oynar. Bu nedenle, bu çalışmada plazmadan eksozom izolasyonu yöntemlerinin karşılaştırılması, klinik uygulamalara yönelik önemli bilgiler sunmaktadır.

Ayrıca, kan plazması minimal invaziv yöntemlerle kolayca elde edilebilen, stabil bir biyolojik sıvıdır ve farklı prensiplere dayanan izolasyon yöntemleriyle uyumludur. Plazmanın, vücut genelindeki hücresel durumları yansıtabilme özelliği sayesinde özellikle nörolojik, kardiyovasküler ve onkolojik hastalıkların araştırılmasında sıkça kullanılması, bu çalışmanın seçimini destekleyen önemli bir etkendir.

Bu nedenlerle, çalışmada kan plazmasının kullanılması hem biyolojik hem de uygulamalı olarak eksozom izolasyonu için ideal bir model oluşturmuştur. Bu yaklaşım hem yöntemlerin karşılaştırılmasında hem de eksozomların klinik uygulamalara entegrasyonunda makul bir zemin sağlamaktadır.

Bu tez çalışması, kan plazmasından eksozom izolasyonu için kullanılan farklı yöntemlerin karşılaştırmalı bir analizini sunmaktadır. Çalışmada ultrasantrifüjle (UC) izolasyon yönteminin 100.000xg, 125.000xg ve 150.000xg hızları ile boyut dışlama kromatografisi temelli eksozom izolasyon yöntemi karşılaştırılmıştır. Çalışmanın temel motivasyonu, bu yöntemlerin partikül boyutu, konsantrasyonu ve dağılımı gibi parametreler üzerindeki etkilerini değerlendirerek sıklıkla kullanılan bu yöntemlerden en uygun izolasyon yöntemini belirlemektir. Elde edilen bulgular,

literatürde sınırlı sayıda ele alınan bu yöntemlerin avantajlarını ve dezavantajlarını ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, her bir yöntemin bireyler arası biyolojik değişkenliklere nasıl yanıt verdiği de araştırılmıştır. Bu tez literatürdeki eksozom izolasyon ve karakterizasyon yöntemlerini tartışarak eksozom araştırmalarında yöntem seçiminin klinik ve biyolojik anlamını vurgulamakta ve farklı prensiplere dayanan eksozom izolasyon yöntemlerinin verimliliğini kıyaslayarak gelecekteki eksozom izolasyonu standartlaştırma çalışmalarına katkıda bulunmayı hedeflemektedir.

2
EKSOZOMLARIN TEMEL MEKANİZMALARI

Eksozomlar, hücrelerin hem yakın hem de uzak ortamlara biyokimyasal mesajlar iletmesini sağlayan önemli nanoveziküller olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç, eksozomların oluşumunu, taşıdığı moleküler kargonun seçilmesini ve hücre dışına salınımını kapsayan karmaşık biyolojik mekanizmaları içermektedir. Eksozom biyogenezi, endozomal yolaklar üzerinden gerçekleşir ve ESCRT kompleksi, lipid salları ve tetraspaninler gibi faktörlerin bu süreçte önemli roller oynadığı bilinmektedir.

Eksozomların taşıdığı proteinler, lipidler ve nükleik asitler, hücreler arası iletişimde temel rol oynar ve alıcı hücrelerin fenotipini etkileyebilir. Bu biyomoleküllerin seçimi, taşıma mekanizmaları ve alıcı hücrelerdeki etkileri hem fizyolojik hem de patolojik durumları anlamak için değerli ipuçları sunmaktadır. Ayrıca, eksozom biyogenezi yalnızca ESCRT bağımlı mekanizmalarla sınırlı olmayıp, ESCRT'den bağımsız yollara da başvurabilmektedir. Bu durum, hücresel homeostaz, çevresel faktörler ve hücre tipine bağlı olarak farklılaşan süreçlerin varlığına işaret etmektedir.

Bu bölümde, eksozom biyogenezi ve salınımına dair temel mekanizmalar, ESCRT kompleksinin rolü, ESCRT'den bağımsız biyogenez yolakları, eksozomların moleküler içeriği ve kargo seçimi ile eksozomların hücre dışı salınım süreçleri detaylı bir şekilde ele alınacaktır. Ayrıca, eksozomların hücreler arası iletişimdeki etkileri ve biyomedikal uygulamalardaki potansiyelleri üzerine mevcut literatürdeki bulgular incelenecektir.

2.1 Eksozomların Biyogenezi ve Salınımı

Eksozom biyogenezi, intraluminal veziküllerin (ILV'ler) oluşumu ile başlar ve bu süreç, plazma membranının ilk invajinasyonu sonucu iç membran yüzeyine yakın, düşük yoğunluklu veziküller olan erken endozomların oluşumunu içerir. Hücreye

alınan maddeler, endositoz ve reseptör aracılı endositoz yoluyla taşınır ve bu maddelerin ayrıştırılmasından erken endozomlar sorumludur. Hücre yüzeyindeki reseptör-ligand etkileşiminin ardından, ligand reseptörden ayrılarak erken endozomun içine yerleşir ve buradan endozomal taşıma vezikülleri aracılığıyla geç endozoma taşınır.

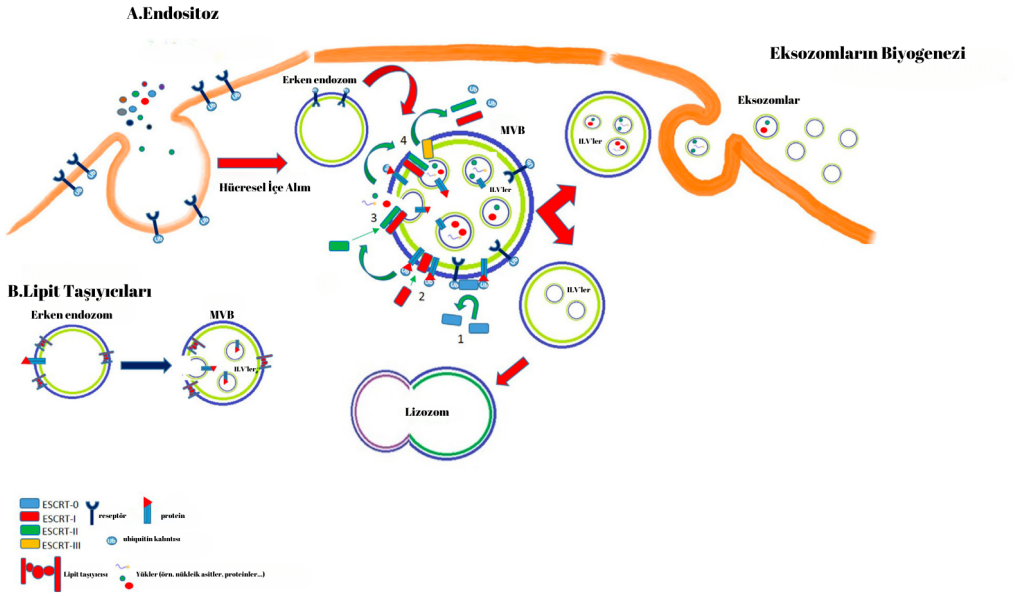
Alternatif olarak, reseptör membran yüzeyine geri dönüştürülebilir ya da sinyalin sonlandırılması ve yüzeydeki reseptör konsantrasyonunun azaltılması amacıyla geç endozom-lizozom yolu üzerinden kısmen parçalanabilir. Mikrotübüller aracılığıyla ilerleyen bu yolak boyunca, erken endozomlar çeşitli modifikasyonlara uğrar; birbirleriyle ya da asit hidrolazlar içeren veziküllerle kaynaşarak, multivesiküler cisim (MVB) olarak adlandırılan ve ILV'leri içeren ara yapıları oluşturur. ILV'lerin oluşumu, endozomal membranın invajinasyonu ile gerçekleşen ikinci bir olaydır.

MVB'ler iki farklı mekanizma ile ortaya çıkar: ilk olarak, ESCRT, MVB oluşumundan sorumludur; alternatif olarak, MVB'ler membranlarında lipid salları olarak bilinen spesifik domainler içeren endozomlardan kaynaklanabilir (Şekil 2.1). Bu noktada, ILV'leri içeren MVB iki farklı kaderi takip edebilir. MVB diğer MVB'lerle veya geç endozomlarla kaynaşabilir ve trans-Golgi'den kaynaklanan ve lizozomal enzimler içeren vezikülleri alabilir. Bu durumda, olgunlaşma süreci sırasında pH daha asidik hale gelir ve böylece MVB içindeki molekülleri sindiren ve ökaryotik hücrelerde lizozomlara dönüşümü sağlayan hidrolazları aktive eder. Bu yol, transmembran proteinlerinin ve lipidlerin hızlı ve tutarlı bir şekilde dönüştürülmesini sağlar. Alternatif olarak, MVB'ler membrana doğru göç eder, plazma membranı ile kaynaşır ve ILV'leri eksozomlar olarak hücre dışına bırakır. Eksozomlar bu nedenle iç zarlardan üretilen endolizozomal kökenli olarak salgılanan tek veziküldür [3]**.**

2.2 Endozomal sorting kompleks request for transport (ESCRT) ve eksozom biyogenezindeki rolü

ESCRT'nin eksozom biyogenezindeki rolü, farklı hücre tiplerinden veya biyolojik sıvılardan elde edilen eksozom preparatlarında çok sayıda ESCRT proteininin keşfedildiğine dair kanıtlarla ortaya çıkmaktadır, bu nedenle birçok bileşen bilim camiasında eksozomal belirteçler olarak kabul edilmektedir. ESCRT yolağı, şimdiye kadar ILV'leri ve MVB oluşumunu açıklamak için iyi tanımlanmış bir

mekanizmadır. ESCRT beş multimerik sitozolik kompleksten oluşur: ESCRT 0, I, II, III ve Vps4 [4] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Eksozom biyogenezi

Şekil 2.1, [3] çalışmasından alınarak değiştirilmiş ve yeniden düzenlenmiştir.

Eksozom biyogenezi farklı mekanizmalara göre gerçekleşebilir. Şekil 2.1 içerisinde "A" ile gösterildiği gibi endositoz mekanizmasıyla, hücre yüzeyinde reseptör-ligand etkileşiminden sonra ligand reseptöründen ayrılır ve erken endozomun içine yerleşir. Bunun yerine reseptör, membran yüzeyinde geri dönüştürülebilir veya geç endozom-lizozom yolu ile kısmen parçalanabilir. Erken endozom daha sonra intraluminal veziküller içeren multiveziküler cisimleri oluşturur. MVB oluşumundan ESCRT sorumludur. ESCRT0 (Şekil 2.1-1) ubikitin kalıntılarını bağlayarak ESCRTI'nin bağlanmasını sağlar ve bu da ESCRT0'ın bağını zayıflatır (Şekil 2.1-2). (Şekil 2.1-3) ESCRTII endozomun membran invajinasyonunu başlatır ve ESCRTIII'ü bağlar (4), bu da ubikitin kalıntılarını proteinden ayırır ve membranın tamamen invajinasyonuna (membran tomurcuklanması) izin verir, böylece ILV oluşur. MVB'ler membrana doğru göç eder, plazma membranı ile kaynaşır ve ILV'ler eksozom olarak salınır. Alternatif olarak, MVB diğer MVB'lerle veya geç endozomlarla kaynaşabilir, trans-Golgi'den lizozomlarda dönüşüme izin veren lizozomal enzimler içeren bir dizi vezikül alabilir.

Eksozom biyogenezinin bir diğer mekanizması lipid salları aracılığıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.1-B). MVB'ler ayrıca membranlarında lipid salları olarak bilinen belirli bir alan içeren endozomlardan da kaynaklanabilir.

Erken endozomlarda bulunan spesifik ubikitinlenmiş proteinler, ubikitinasyon bölgelerinde, onları fosfatidil inositol monofosfat (PI3P) bakımından zenginleştirilmiş spesifik endozom alanlarına yerleştiren ESCRT-0 tarafından tanınır. ESCRT-0, HRS (hepatosit büyüme faktörü ile düzenlenen tirozin kinaz substratı) ve STAM1/2 (sinyal ileten adaptör molekül 1/2) olarak adlandırılan ve birbirlerine bağlanarak ubikitin ve PI3P ile zenginleştirilmiş alanları tanıyabilen iki alt birimden oluşur. Bu, Tsg101 (tümör duyarlılık geni 101), Vps28, Vps37 ve Mvb12'den oluşan heteromerik bir kompleks olan ESCRT-I'in katılımını sağlar.

ESCRT-I, ESCRT-0'ın yerini alır ve şu dört alt birimden oluşan ESCRTII'nin katılımını sağlar: Vps22-EAP30, Vps36-EAP45 ve Vps25-EAP20'nin iki alt birimi. ESCRTI-II endozomun membran invajinasyonunu başlatabilir, böylece nükleik asitler veya proteinler gibi farklı moleküllerin/kargoların internalizasyonuna izin verir.

ESCRT-III başka bir heterotetramerik komplekstir (Vps20-CHMP6; Snf7-CHMP4; Vps24-CHMP3; Vps2-CHMP2); aktivasyonu ve ardından endozoma alınmasına ESCRT-II alt birimi Vps25'in Vps20 ile bağlanması aracılık eder. ESCRT-III, ubikitin kalıntılarını proteinden ayırma ve membranın tamamen invajinasyonuna izin verme, böylece ILV'leri oluşturma rolüne sahiptir. Kargo deubikitinasyonuna, Snf7'ye bağlandıktan sonra kargo deubikitinasyonunu tamamlamak için Doa4 (alfa 4'ün bozulması) enziminin katılımını sağlayan Bro1/Alix (ozmotik şok protein-1/apoptozla bağlantılı gen 2 etkileşimli protein X'e BCK1 benzeri direnç) gibi ESCRT-III tarafından işe alınan aksesuar proteinler de aracılık eder [5]. Son olarak, diğer adaptör proteinler Vps4-ESCRT III etkileşimine yardımcı olur ve son membran tomurcuklanması ve sıyrılması, ESCRT alt birimlerinin çıkarılması ve geri dönüşüm ve kargo teslimi için gerekli olan Vps4 ATPaz aktivitesine izin verir.

Özetle, ESCRT kompleksi ILV tomurcuklanmasından kargo seçimine, membran remodellenmesine ve ILV'lerin MVB'ye dahil edilmesine kadar tüm süreci kontrol eder. ESCRT kompleksinin 23 bileşeni üzerinde yapılan ilginç bir RNAi çalışması,

bunlardan sadece birkaçının eksozom biyogenezinde gerekli olduğunu açıklığa kavuşturmuştur. Bu alt birimler arasında aslında Hrs, Tsg101 ve STAM1'in eş zamanlı olarak susturulması (ESCRT0/I kompleksi) eksozom salgılanmasını azaltabilir; aksine, CHMP4C, VPS4B, VTA1 ve Alix'in (ESCRT III kompleksi) inhibisyonu aynı eksozom salgılanması sürecini artırır [6]. Son araştırmalar, VPS4'ün az önce belirtilen rolüne karşıt olarak, inhibisyonunun eksozom salınımını azalttığını göstermiştir [7]. Buna ek olarak, Alix, Tsg101 veya CHMP4 gibi çeşitli ESCRT proteinleriyle etkileşimi yoluyla, protein kompozisyonunda kargo yüklemesinde, ILV'lerin tomurcuklanması ve MVB'lere dahil edilmesinde rol oynar.

Son yıllarda geç endozom trafiği ve sintenin-eksozom üretimi ile ilgili olarak, bir GTP bağlayıcı proteinin rolü ortaya çıkmıştır: ADP-ribozilasyon faktörü 6 (ARF6). ARF6, PIP2 sentezinde rol alan fosfatidil-inozitol (4)-fosfat 5-kinazı (PIPK) aktive edebilmektedir. PIP2 sentezi, sintenin-sindekanın perinükleer kompartmandan plazma membranına alınmasını destekler [8]. ARF6'nın yolağının üst kısmında bulunan başka bir kinaz, sintenin/sindekan aktivitesini düzenler: onkoprotein Src. Src, syntenin/syndecan tirozin kalıntılarının fosforilasyonu yoluyla endozomal trafiğe etki eder, böylece endozomal tomurcuklanmayı ve spesifik sintenin bağımlı eksozomların biyogenezini uyarır [9]. Isı şok proteinleri (HSP'ler) genellikle protein agregasyonu ve katlanmasının kontrolünde rol oynayan şaperonlardır. Bu proteinler başlangıçta bu hücre içi yoldaki rolleri için incelenmiş, daha sonraki gözlemler hücre dışındaki varlıklarını göstermiştir. Artık HSP'lerin klasik olmayan bir yolla ve çoğu eksozomlar tarafından salgılanan proteinler olduğu iyi bilinmektedir. İlginç bir şekilde, HSP'ler ESCRT proteinleri ile iş birliği yaparak ve etkileşime girerek eksozom biyogenezinde de yer almaktadır [10].

2.3 Eksozom Biyogenezinin ESCRT'den Bağımsız Mekanizması

Kritik ESCRT proteinlerinin eş zamanlı olarak deplesyonu, MVB biyogenezi ve ILV oluşumunun ESCRT'den bağımsız mekanizmalarla da sağlandığını göstermiş, böylece bu sürecin düzenlenmesinin beklenenden daha karmaşık olduğunu düşündürmüştür. Gerçekten de ESCRT kompleksinin eksikliği, erken ve geç endozom farklılaşması korunsa bile MVB'lerin genişlemiş görünen derin bir morfolojik modifikasyonuna neden olur. Bu durumda ILV'lerin varlığı, sayıları ve

boyutları farklı olsa da, oluşumlarının ESCRT'den bağımsız bir endositik ayırma mekanizması yoluyla gerçekleşebileceğini düşündürmekte ve yüksek ökaryotlarda her iki eksozom biyogenez mekanizmasının birlikte var olabileceği ve işleyebileceği hipotezini ortaya koymaktadır. Hücre tipi ve hücresel homeostaz, iki biyogenez mekanizmasından biri yoluyla eksozomların farklı alt popülasyonlarını yönlendiren unsurlar olabilir.

ESCRT'ler için mutasyona uğramış hücreler, membranlarının lipid bileşimi nedeniyle hala ILV'ler oluşturabilmektedir. Baş grubunun boyutu, açil zincirlerinin uzunluğu ve doygunluğu gibi tek bir membran lipidinin biyofiziksel özelliklerinin membran eğriliği için temel olduğu iyi bilinmektedir. Kolesterol ve sfingolipidlerce zenginleştirilmiş belirli alanlara sahip endozomlar, lipid salları, içe doğru kıvrılır ve membran boyunca pH gradyanının yardımıyla MVB oluşumunu belirleyebilir. Bu durumda ve ESCRT'lerin yardımı olmadan, endozom membran invajinasyonu, sfingolipidlerden seramidlerin fosfolipazların aracılık ettiği sentezine bağlıdır. Seramidler tek başlarına, koni şekilleri nedeniyle veya kolesterol ile birlikte membran deformasyonunu ve ILV tomurcuklanmasını destekleyen özel alanlar oluşturur. Ayrıca seramid, MVB'lerin membranındaki reseptörünü bağlayan sfingozin 1-fosfata (S1P) dönüşümü yoluyla eksozomal biyogenezi indükler [10].

Seramidde sfingomiyelin dönüşümüne katılan enzimler olan Nötr Sfingomiyelinazlar (SMazlar) tercihen Golgi-ER'de bulunur, ancak plazma membranında da bulunur ve böylece eksozom biyogenezine katılır. Belirli hücre tiplerinde SMazların inhibisyonu, belirli proteinlerin eksozomal salınımını azaltarak seramidin membran tomurcuklanmasını destekleyen mikro alanlar oluşturmak için gerekli olduğunu göstermektedir [11]. Diğer lipid modifiye edici enzimler, fosfolipaz D2 (PLD2) ve diaçilgliserol kinaz α α (DGKα), seramidin yanı sıra membran invajinasyonunu destekleyen fosfatidik asit (PA) üretimi yoluyla eksozom biyogenezinde rol oynar [8], [12]. Öte yandan, sfingomiyelin membrandaki kolesterole yüksek bir afiniteye sahiptir; hidrolizi PM'den hücre içi membrana kolesterol göçünü ve sonuç olarak membran akışkanlığını artırır. Kolesterol moleküllerinin lipid alanlarında kümelendiği ve böylece plazma membran lipid düzenini ve nihayetinde vezikül dökülmesini etkilediği iyi bilinmektedir.

Çok sayıda protein, eksozom biyogenezinin ESCRT'den bağımsız mekanizmasına aracılık eder. CD9, CD63 ve CD81 gibi tetraspaninler, ilk olarak B lenfositlerde tanımlanan ve genellikle hücre füzyonu, göçü ve hücre yapışmasında rol oynayan transmembran proteinlerdir [13]. Ayrıca, tetraspaninler eksozomlarda bol miktarda bulunur ve bu nedenle yaygın olarak eksozom belirteçleri olarak kabul edilir. Özellikle tetraspaninler, diğer birçok protein, kolesterol ve gangliosid ile etkileşime girdikleri ve böylece TEM alanını (tetraspanin bakımından zenginleştirilmiş alan) oluşturdukları dört transmembran alanına sahiptir. TEM alanı son olarak membran bükülmesini ve aktin polimerizasyonunu etkileyebilir. Buna ek olarak, tetraspaninler kargo sıralamasına ve ILV oluşumuna aracılık eder, örneğin CD9 plazma membran füzyonuna katılır, CD63 ise sindekanlara benzer şekilde sinteninin PDZ alanı ile etkileşime girer [14].

2.4 MVB'lerin Membrana Taşınımı ve Eksozomların Hücre Dışına Salınımı

MVB'lerin lizozomlarla kaynaşmak yerine eksozom salınımı için plazma membranına doğru hareket etmeye karar verdiği mekanizma iyi anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, hücre dışında hücre dışı mikro ortamda eksozom salınımının, MVB'lerin plazma membranı ile füzyonu sırasında spesifik protein-protein ve protein-lipid etkileşimlerine bağlı olduğu açıktır. Bu membran füzyonu olayında rol oynayan proteinler, SNARE proteinleri, bağlama faktörleri ve birçok küçük GTPaz'dır. SNARE proteinleri genel olarak veziküllerin hedef membranına füzyonuyla ilgilenir ve bu da üç-dört alt birimden oluşan bir kompleksin oluşmasıyla gerçekleşir; vezikülde bir R-SNARE ve hedef membranda iki-üç Q-SNARE. R-SNARE VAMP7'nin (vezikül ilişkili membran proteini 7) aşırı ekspresyonu hücre periferinde genişlemiş MVB'lerin oluşumuna neden olarak eksozom salınımını inhibe eder[15]. Buna paralel olarak, başka bir R-SNARE olan YKT6'nın susturulması, eksozomlarda salgılanan Tsg101 proteininin seviyesini azaltır [16]

Aktin ve bağlayıcı proteinler gibi mikrotübüller ve hücre iskeleti proteinleri MVB'lerin membrana taşınmasına aracılık eder. Aktin bağlayıcı protein kortaktinin MVB trafiğindeki rolü, kortaktinin eksozom salınımını azalttığı/artırdığı baskılanması veya yüksek eksprese edilerek gösterilmiştir [17]. Küçük GTPazların

RAB ailesi endozomal trafiğe katılır ve son zamanlarda membran trafiğinde, hücre iskeleti boyunca veziküllerin taşınmasında, MVB'lerin plazma membranına kenetlenmesinde ve eksozomların salınmasında da rol oynamıştır. RAB27 ve RAB35'in MVB'lerin plazma membranına kenetlenmesindeki ana rolü çok sayıda çalışmada gösterilmiştir [18], [19], [20]. İlginç bir şekilde, geç endozom trafiğinde yer alan RAB7'nin ekspresyonunun azaltılması ve büyük endozom oluşumundan sorumlu RAB5'in aşırı ekspresyonu, SDC/ sintenin ile temas eden eksozomların salınımını engeller [21], [22]. Rho/Rac/cdc42 ailesi gibi diğer küçük GTPaz grupları da eksozom salınımında rol oynar [23]. Daha önce eksozom biyogenezindeki rollerinden bahsedilen tetraspaninler de ESCRT'den bağımsız eksozom salınımında rol oynar. Tetraspaninler plazma membranında TEM alanında bulunabilir, ancak diğer proteinler aracılığıyla hücre iskeleti ile de etkileşime girebilir ve böylece eksozomlar yoluyla salınımlarını etkileyebilirler.

Yukarıda membran lipidlerinin membran eğriliği için önemli olduğunu ve böylece MVB'lerin oluşumunu modüle ettiğini belirtmiştik; ayrıca lipidler MVB'lerin plazma membranına füzyonunda kilit rol oynayarak eksozom salgılanmasını artırır.

Hücresel lipidleri arttıran bir eter lipid öncüsünün eklenmesi eksozomal salınımı arttırabilmektedir; bu deneysel gözlem doğrultusunda, kolesterol eklenmesi Alix veya CD63 gibi tipik eksozomal proteinleri arttırmaktadır [24], [25]. Aksine, başka bir hücre modelinde kolesterol sentezinin metabolik olarak engellenmesi birkaç eksozomal proteinin salgılanmasını arttırmıştır[26].

Eksozom salınımı kalsiyum gibi diğer bileşenlerden veya farklı mekanizmalardan da etkilenir. Kalsiyum, translokazlar veya lipid skramblazlar gibi plazma membran simetrisini düzenleyen enzimlerin aktivitesine müdahale edebilir. Fosfatidilserin ve fosfatidiletanolaminin plazma zarının dış katmanından iç katmanına ters çevrilmesini sağlayan translokazlar veya lipidlerin zar boyunca hareketini teşvik eden lipid skramblazlar eksozom salınımını etkiler. Hücre içi kalsiyum seviyesini artıran bir kalsiyum iyonoforu ile muamele, eksozom salınımını arttırır [27]. Ayrıca, genel olarak veziküler taşımada rol oynayan kalsiyum sensör proteinleri sinaptotagminler, eksozom salgılanmasını düzenleyebilmektedir [28]

Son kanıtlar ISGilasyonu, protein agregasyonunu teşvik ederek ve otofagozom-lizozom kompartımanı tarafından MVB degradasyonunu artırarak eksozom

salınımını kontrol edebilen yeni bir ubikitin benzeri modifikasyon olarak tanımlamaktadır. Özellikle, TSG101'in ISGilasyonu ve sonuç olarak bozunması, eksozom salınımını etkilemek için yeterlidir [29]. Işınlama, kemoterapi oksidatif stres veya hipoksi gibi hücresel stresler eksozom salınımını artıran sinyallerdir. İlginç bir şekilde, stres durumundan elde edilen son kanıtlar, MVB kaderinde varsayılan "denge iğnesi" olarak yeni aktörlerin tanımlanmasına ve bunların eksozomlara veya endolizozomal yola ayrılmasına izin vermiştir. Örnek olarak hücre dışı küçük ısı şok proteini αB-Kristalin (αBC) verilebilir. Oksidatif stres koşullarında salınan eksozomlar αBC açısından zenginleşir; ilginç bir şekilde Gangalum ve çalışma arkadaşları αBC inhibisyonunun lizozom belirteci LAMP1 ve geç endozom belirteci RAB7'nin ekspresyonunda artışa yol açtığını ve bunun da endolizozomal yolun aktivasyonuna işaret ettiğini göstermiştir [30]. Bu veriler, αBC'nin eksozom salınımında önemli bir rolü olduğunu varsaymamızı sağlamaktadır.

2.5 Eksozomların Bazal Kompozisyonu ve Kargosu

Son on yılda gerçekleştirilen çok sayıda -omik çalışması, eksozomların hedef hücrelere iletildiğinde tüm aktivitelerini koruyan çok sayıda biyolojik makro molekül türünü içerdiğini ve taşıdığını açıkça göstermiştir. Nükleik asitler (hem DNA hem de her tür RNA) lipidler ve çözünür ya da membrana bağlı proteinleri içeren bu biyoaktif kargo, içeriklerinin özdeş bir alt kümesi olmasa da, köken alınan hücrelerin türü ve işlevsel durumuyla sıkı sıkıya ilişkilidir. Son yıllarda artan kanıtlar, makromoleküllerin eksozomlara internalizasyonunun rastgele bir süreç olmadığını açıkça göstermektedir, ancak bu süreci yönlendiren biyolojik ve moleküler mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır [31]. Eksozomların hücreler arası iletişim aracıları olarak işlevsel özellikleri ve hedef hücrelerinin davranışlarını değiştirme kabiliyetleri özellikle kargolarıyla ilgili olduğundan, moleküler bileşenlerinin derinlemesine karakterizasyonu ve internalizasyon sürecine yol açan yolların anlaşılması şu anda eksozom araştırmaları alanında çok önemli hedefleri temsil etmektedir [32]. Dahası, eksozomun kargosu ve biyomolekül internalizasyon mekanizması özellikle hastalık durumlarıyla ilişkili olduğundan, eksozomlar yeni biyobelirteçlerin keşfi için umut verici potansiyel kaynaklar olarak kabul edilmektedir.

Eksozomun moleküler bileşimi incelendiğinde protein, lipid, DNA ve RNA içerdiği görülmektedir. Bu moleküllerin eksozomlara paketlenmesiyle ilgili bilinen mekanizmalar bulunmaktadır.

2.5.1 Eksozomal Kargo: Proteinler

Eksozomlar köken aldıkları hücrelerden türetilen karmaşık bir dizi protein (sitozolik, nükleer, mitokondriyal, ribozomal ve membrana bağlı proteinler) içerir. Çok sayıda proteomik çalışmasından elde edilen veriler, bu eksozom proteinleri arasında bazılarının hücre kökeninden bağımsız olduğunu ve bu nedenle "eksozomal belirteçler" olarak kabul edilebileceğini, diğerlerinin ise eksozom özelliklerini ve faaliyetlerini belirleyen, özellikle üretici hücreyle ilgili benzersiz bir eksozom imzasını tanımladığını açıkça göstermiştir. Özellikle, sıklıkla işaretleyici olarak kullanılan veziküle özgü proteinler arasında 14-3-3 proteinleri ve spesifik HSP'ler gibi sitozolik proteinlerin yanı sıra tetraspaninler (CD9, CD63, CD81), lektinler, GTPazlar, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) molekülleri ve ESCRT komplekslerinin proteinleri (Alix ve TSG101) gibi EV'lerin (ekstraselüler vezikül) biyogenez süreciyle ilgili çeşitli proteinler bulunmaktadır [33], [34]

Eksozomlar, bu iyi korunmuş proteinleri içermenin ötesinde, proksimal ve distal alıcı hücrelerin özelliklerini farklı şekilde yeniden programlayabildikleri, özellikle kaynak hücrenin fenotipiyle ilgili ayrı bir protein alt kümesi içerir. Tümör kaynaklı eksozomlar (TDE'ler) üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtların birikmesi, protein içeriklerine bağlı olarak bu nanoveziküllerin hücre sağkalımını, tümör ilerlemesini, metastazı ve kemorezistansı düzenlemede kendine özgü bir rolü olduğunu göstermektedir [32]. Lyden ve ark., integrin bileşimindeki değişikliklerin TDE'leri dokuya özgü bir kolonizasyona yönlendirerek organa özgü bir metastatik öncesi niş oluşumuna neden olduğunu göstermiştir [35]. SWATH tabanlı kantitatif proteomik analiz, metastatik kolon kanseri hücreleri tarafından salınan eksozomların, daha az agresif tümör hücreleri tarafından salınanlara kıyasla, RacGAP1 ve trombin gibi RhoA/ROCK sinyali ile ilgili proteinlerin yanı sıra çeşitli hücre iskeleti ile ilişkili proteinlerde önemli ölçüde zenginleştiğini vurgulamıştır. Metastatik tümör hücresi kaynaklı eksozomların, hem tümör hücresi plastisitesini hem de endotelyal hücre davranışını etkileyerek tümör mikro ortamında malign özellikleri yayabildiği ve bu yeteneğin özellikle protein imzalarıyla ilişkili olduğu

gösterilmiştir. RacGAP1 ve trombin gerçekten de metastatik eksozomlar tarafından hedef hücrelerde indüklenen etkilerin kilit aracıları olarak tanımlanmıştır [36].

Kanser hücrelerinin anti-tümör bileşiklerle muamele edilmesinin TDE'lerin bazal protein bileşimini değiştirerek tümör yanlısı eylemlerini tersine çevirebileceği de çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Taverna ve arkadaşları, Kronik Miyeloid Lösemi hücreleri (KML) tarafından salınan eksozomların, antikanser etkileriyle iyi bilinen bitki kaynaklı bir bileşik olan kurcumin (kurkumin/KML-eksozomları) ile muamele edildikten sonra protein kargolarında önemli değişiklikler olduğunu bildirmiştir. Özellikle, kurkumin/KML-eksozomları pro-anjiyojenik proteinler bakımından tükenmiş ve tedavi edilmemiş KML hücreleri tarafından salınan eksozomlara kıyasla anti-anjiyojenik aktiviteye sahip proteinler bakımından zenginleşmiştir. Bu değişiklikler, KML-eksozomunun anjiyojenik fenotipi teşvik etme ve endotelyal bariyer organizasyonunu değiştirme yeteneğinin kaybını belirlemiştir [37].

Biriken çalışmalar, hücre tipine bağlı olduğunu ve farklı hücresel koşullar veya tedavilerden de etkilenebileceğini açıkça gösteren eksozomların protein bileşimi hakkında birçok ayrıntı sağlamış olsa da protein yükleme mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Eksozomal protein ayırmada en çok tanımlanan ve karakterize edilen sistem ESCRT ailesi üyelerinin aracılık ettiği sistemdir, ancak artan kanıtlar ESCRT'den bağımsız çeşitli yolların da dahil olabileceğini göstermektedir [38]. Dahası, eksozomlarda seçilmiş protein kümelerinin zenginleşmesi, bunların sıralanmasının belirli mekanizmalar tarafından yönlendirilebileceğini düşündürmektedir. Eksozomlarda tespit edilen birçok proteinin glikozilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon veya SUMOilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları (PTM'ler) vardır. Bu gözlem, PTM'lerin proteinlerin eksozomlara ayrılmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan proteinlere spesifik özellikler kazandırabileceğini göstermektedir [39]. Ayrıca, eksozomlara yüklenen proteinlerin ESCRT'den bağımsız mekanizmaları arasında, lipid sal ve seramid aracılı olanlar da tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, bazı proteinlerin lipid sallarının bozulmasının ardından (kemokinler, αB-kristallin, kök hücre yüzey belirteçleri) veya seramidin metabolik yolu bloke edildiğinde (CD63) eksozom lokalizasyonlarını kaybettikleri bildirilmiştir [38].

2.5.2 Eksozomal Kargo: Nükleik Asitler

Eksozomlar tek sarmallı (ssDNA) ve çift sarmallı DNA (dsDNA), mitokondriyal DNA (mtDNA), mRNA, mikro RNA (miRNA) ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA) gibi farklı nükleik asit türleri içerir [32].

2.5.2.1 Eksozom Kargosu Olarak DNA

Eksozomlarda (eksoDNA) DNA moleküllerinin varlığı yaygın olarak raporlanmıştır [40]. Hem mitokondriyal hem de genomik DNA, hücre kültürü süpernatantlarının yanı sıra insan ve fare biyolojik sıvılarından izole edilen eksozomlarda bulunmuştur ve DNAz işlemi, ds-DNA'nın (ss-DNA ve RNA'ların aksine) çoğunlukla dışarıdan ziyade eksozomların içinde bulunduğunu ortaya koymuştur [41], [42], [43]. Eksozomların DNA'nın yatay transferine aracılık etme kabiliyeti, K562 hücrelerinden türetilen BCR/ABL hibrid genini içeren eksoDNA'nın normal alıcı insan nötrofillerinde tespit edilmesiyle desteklenmiştir [44]. Eksozom aracılı DNA transferinin fizyolojik önemi henüz tam olarak açık olmasa da alıcı hücrelerde eksoDNA'nın transkript edildiği nükleusa lokalize olabileceğini gösteren kanıtlar vardır [45] Dahası, genomik DNA parçalarının eksozom yoluyla salgılanmasının, hücresel yaşlanmayı veya apoptozu ortaya çıkarabilecek DNA'nın sitoplazmik birikimini önleyerek hücresel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynayabileceği yakın zamanda öne sürülmüştür [46]. Eksozomlarda P53, KRAS ve EGFR gibi genler için ebeveyn tümör hücrelerinin mutasyonel durumunu yansıtan genomik DNA'nın varlığı, eksoDNA'nın tanısal değerini ve klinikteki potansiyel rolünü güçlü bir şekilde desteklemektedir [41], [43], [47]. DNA'nın eksozomlardaki varlığı iyi belgelenmiş ve özellikleri geniş çapta tanımlanmış olsa da DNA'nın eksozomlara yüklenmesine yol açan mekanizmalar hakkında çok sayıda şüphe devam etmektedir. Eksozomların köken aldıkları hücreye bağlı olarak farklı DNA türleri içerebildikleri bildirildiğinden (örneğin astrosit ve glioblastomdan türetilen eksozomlarda mtDNA bulunurken diğerlerinde bulunmamıştır) [43], [48], DNA'nın eksozomlara paketlenmesinin hücre tipine özgü mekanizmalarla dinamik olarak düzenlenebileceği varsayılmıştır. Diğer taraftan, DNA parçalarının eksozomlar içinde belirli bölgelere eğilim göstermeden tüm genom üzerinde eşit olarak dağılmış olması, eksozomlarda DNA sıralamasının rastgele bir süreç olduğunu gösterebilir [41], [43].

2.5.2.2 Eksozom Kargosu Olarak RNA'lar

Tüm hücre tipleri hem kodlayıcı mRNA'lar hem de mikro RNA'lar (miRNA'lar), uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), ribozomal RNA (rRNA) ve sirküler RNA'lar (circRNA'lar) gibi kodlamayan RNA'lar bakımından zengin eksozomlar salgılar [38], [49]. Son birkaç yılda, eksozomlar içindeki RNA moleküllerinin seçici paketi hakkında birkaç ilginç veri ortaya çıkmaktadır [49], [50], [51]. Hücre fenotipini yönlendirebilen gen ifadesinin kilit düzenleyicileri olarak miRNA'lardaki artan etkileşim nedeniyle, şimdi özellikle dikkat bu küçük RNA'ların sıralama mekanizmalarına odaklanmıştır. Salgılanan eksozomların miRNA profillerinin köken hücrelerinkinden farklı olduğuna dair kanıtlar, bunların eksozomlara ayrılmasının rastgele gerçekleşemeyeceğini güçlü bir şekilde göstermiştir [52], [53]. Bugüne kadar miRNA'ların eksozomlarda sıralanmasında çeşitli yolların ve moleküllerin rol oynadığı bildirilmiştir, ancak bu karmaşık sistemin birçok yönü daha fazla araştırılmaya devam etmektedir.

Mevcut araştırmalardan elde edilen veriler, miRNA'nın eksozomlara dahil edilmesinin belirli miRNA'larda bulunan spesifik diziler ve bunların bazı enzimler veya diğer proteinlerle etkileşimi tarafından yönlendirilebileceğini göstermektedir [32], [54]. RNA-bağlayıcı proteinler, eksozomal miRNA içeriğinin düzenlenmesinde başlıca rol oynayan proteinler arasındadır. Y-box protein I (YBX1), hepatositlerde eksozomal miRNA sıralama mekanizmasının önemli bir bileşeni olan miRNA ekso-motifini (GGAG) veya protein SYNCRIP'i bağlayan her yerde bulunan heterojen nükleer ribo nükleoprotein A2B1'in (hnRNPA2B1) yanı sıra eksozomlarda spesifik miRNA'nın sıralanması için gerekli görünmektedir [32], [38], [55], [56].

RNA-bağlayıcı proteinlerin yanı sıra, diğer proteinlerin de eksozomlarda miRNA paketlenmesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Argonaute 2 (Ago2), Alix ve Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase 2) gibi proteinler için gen susturma deneyleri, bunların eksozomal miRNA seviyelerinin düzenlenmesine doğrudan dahil olduklarını göstermiştir [30]. Transkripsiyon sonrası modifikasyonların da miRNA'nın EV'lere ayrılmasını sağladığı tanımlanmıştır. Koppers-Lalic ve arkadaşları, şablona bağlı olmadan nükleotid ilavelerinin miRNA'ların EV'lerde zenginleşmesi (3′-uridilasyon) veya köken hücre içinde tutulması (3′-adenilasyon) ile ilişkili olduğunu göstermiştir [57]. Ayrıca,

miRNA'nın hedef transkriptinin ekspresyon seviyeleri yüksek olduğunda sitoplazmada tutulduğu bildirilmiştir, bu da mRNA-miRNA etkileşiminin EV'lere dahil olmayı modüle edebileceğini göstermektedir [58]. MVB'nin sal benzeri bölgelerin miRNA'lar için bir hedef olarak rolü de öne sürülmüştür [59]. Son olarak, Melo ve arkadaşları meme kanseri ile ilişkili eksozomların RISC-Yükleme Kompleksi ile ilişkili ön miRNA'lar içerdiğini ve böylece öncül miRNA'ları olgun miRNA'lara dönüştürmek için hücreden bağımsız kapasiteyi gösterdiğini bildirmiştir [60].

miRNA'ların eksozomlara paketlenmesi, onları enzimatik bozulmadan fiziksel olarak korur ve farklı fizyolojik ve patolojik süreçlerin aktivasyonunu indükleyebilecekleri diğer hücrelere etkili yatay transferlerini sağlar. Son on yılda yapılan birçok çalışma, eksozomal miRNA'nın tümör mikroçevresini modüle etmedeki rolüne odaklanmıştır. miR-9, miR-105 veya miR-21 gibi birkaç eksozomal miRNA, tümör proliferasyonu, vaskülarizasyon, bağışıklık sistemi aktivitesi, metastaz ve kanser progresyonunu destekleyen diğer biyolojik özelliklerin düzenlenmesindeki önemli işlevleri nedeniyle yaygın olarak tanımlanmıştır [32], [54].

Eksozomlar, miRNA'ların taşınmasına ek olarak, translasyonel inhibisyon yoluyla veya rekabetçi endojen RNA olarak hareket ederek gen ifadesini modüle ettiği bilinen çok çeşitli lncRNA'lar taşır [32]. Diğer biyomoleküller gibi, lncRNA'lar da muhtemelen eksozomlarda seçici olarak ayrılır, çünkü bazılarının eksozomlarda zenginleştiği, diğerlerinin ise daha az bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda da eksozomal lncRNA içeriğini belirleyen mekanizmalar iyi bilinmemektedir. Spesifik proteinler, lncRNA'ların eksozomlara paketlenmesini sağlayan taşıyıcılar olarak çalışıyor gibi görünmektedir, ancak hala net veriler mevcut değildir. Eksozom türevli uzun kodlamayan RNA'ların tümör ilerlemesinin çeşitli adımlarının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir [54].

Son olarak, dikkate alınması gereken ilginç bir husus, eksozomların kan, idrar ve hastaların diğer vücut sıvılarındaki aşırı stabiliteleri nedeniyle miRNA'ların ve lncRNA'ların hastalık biyobelirteçleri olarak tespiti için tutarlı bir kaynak sağlamasıdır. Çok sayıda çalışma, hastalıklı hastalar ve sağlıklı bireyler arasında eksozomal miRNA'ların ve lncRNA'ların farklı miktarı ve bileşimi hakkında ilginç veriler bildirmiştir; bu da dolaşımdaki eksozomal miRNA'ların ve lncRNA'ların

hastaların erken teşhisi, teşhisi ve klinik yönetimi için sıvı biyopsileri ve noninvaziv biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir [49], [54], [55], [56].

2.5.2.3 Eksozomal Kargo: Lipidler

Eksozomal lipidlere ilişkin eksiksiz bir veri seti henüz mevcut değildir, ancak eksozomların lipid çift katmanının ebeveyn hücrelere göre özel bir lipid bileşimine sahip olduğu açıktır. Sfingomyelinler kolesterol, fosfatidilserin, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin ve gangliosid GM3'te seçici zenginleşme ile karakterize edilir [32]. Eksozomal lipidler çift tabakanın her iki tarafına asimetrik olarak dağılır ve eksozom yapısı ve oluşumunda spesifik bir role sahip gibi görünen lipid sal benzeri alanlar oluşturmak üzere düzenlenir [32], [61].

Hepatokarsinoma hücrelerinden (Huh7) ve Mezenkimal Kök Hücrelerden elde edilen eksozomların kardiyolipinlerde zenginleştiği, glioblastoma hücrelerinden (U87) elde edilen eksozomların ise sfingomiyelinlerde zenginleştiği gözlemlenmiştir, bu da eksozomal lipid kompozisyonunun köken hücre tipine bağlı olabileceğini göstermektedir [62]. Eksozomlar ayrıca, eksozomların multiveziküler cisimlerin lümenine tomurcuklanmasında rol oynayan seramid bakımından da zenginleşmiştir ve bir seramid öncüsü olan nötr sfingomiyelin sentezinin inhibisyonunun, eksozom salınımında önemli bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Veziküler lipidler eksozom biyogenezi, salınımı ve hedef hücrelerle etkileşim için gerekli değildir, ancak patofizyolojik yolları düzenleyebilen biyoaktif bileşenler olarak da düşünülmelidir. Eksozomlar ayrıca GTP ile aktive edilebilen fosfolipazları ve prostaglandinleri aktive olmuş hücrelerden dinlenme halindeki hücrelere taşıyan hücreler arası sinyalozomlar olarak da tanımlanmıştır [63].

Son zamanlarda, prostat kanseri hastalarından ve sağlıklı gönüllülerden toplanan idrar eksozomları üzerinde yapılan lipidomik çalışmalar, eksozomal lipidlerin biyobelirteç olarak kullanımını destekleyen ön ancak ilginç sonuçlar sağlamıştır [61]. Eksozom bileşiminin ve kargo sıralamasının daha fazla karakterize edilmesi, bu doğal nanotaşıyıcıların biyolojik önemini daha iyi anlamamızı sağlayacak ve yenilikçi teşhis ve tedavi stratejileri geliştirmek için yeni bilgiler sağlayacaktır.

2.6 Eksozomların Etki Mekanizması

İlk olarak çöp öğütücüsü olarak tanımlanan eksozomlarla ilgili çok sayıda bilimsel yayın, eksozomların yatay bir şekilde bilgi aktararak fizyolojik ve patolojik durumları düzenlemedeki önemli rolünü ortaya koymuştur. Bu fosfolipidik kürelerin içinde paketlenen makromoleküller ve biyoaktif bileşikler, eksozom üreten hücrelerden, yakınında veya uzağında bulunan uyumlu alıcı hücrelere aktarılır. Eksozomlar, hücrelerin birbirleriyle iletişim kurmak için seçtikleri stratejiler arasında yer almakta olup, homeostazın sürdürülmesinde dikkate değer bir rol oynamaktadır ve bu nedenle çalışmaları "yeni endokrinoloji" olarak tanımlanmıştır [63]. Dahası, bu veziküllerin semen, kan, idrar, beyin omurilik sıvısı ve süt gibi farklı vücut sıvılarında tanımlanması da bu tanımı desteklemektedir. Giderek artan sayıda araştırma grubu, iletişim stratejilerini anlamak ve bu dağıtım sisteminden avantajlar elde etmek için şu anda eksozomların dünyasını daha derinlemesine araştırmaktadır. Ne yazık ki, alıcı hücrelerle etkileşimi takiben eksozomların nihai etkileri, hücre/eksozom etkileşimini etkileyen birçok faktör olduğundan, kolay tahmin edilebilir değildir.

İlk olarak, eksozomlar, uyumun gerekli olduğu belirli hücre tiplerine tercihli olarak bağlanan seçici taşıyıcılardır. Eksozomlar ve kanser metastazları arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlayan ilginç bir çalışma, dokuda yerleşik stromal hücreler arasında sadece birkaçının tümör eksozomlarını aldığını ve bu yeteneğin eksozom integrinlerine bağlı olduğunu göstermiştir [34]. Histolojik kökenleri farklı olsa da hedefli metastaz bölgesini paylaşan tümörlerden salınan eksozomları karakterize etmek için proteomik bir yaklaşım benimsenmiştir. Bu çalışma sayesinde Hoshino ve arkadaşları, TDE'lerin integrinleri (ITG'ler) tarafından yönlendirilen, belirli organları hedefleyen ve dokuların içindeki stromal hücreleri seçen metastatik bölgeyi seçtiklerini göstermiştir. ITGα6β4 ve ITGα6β1'i eksprese eden eksozomların S100A4-pozitif hücreler tarafından internalize edildiği, ITGαvβ5'in ekspresyonunun ise eksozomun F4/80+ makrofajlar tarafından alımına izin verdiği görülmüştür [34].

Eksozomlar, doğru bölgeye ulaşıp alıcı sitotipleri tanıdıktan sonra, hücre-eksozom temaslarına fiziksel olarak aracılık eden moleküler etkileşimcilere bağlı olarak alıcı hücreleri dönüştürmek için farklı stratejiler benimseyebilir. Hücre reseptörlerinin ve sinyal yolaklarının alt basamaklarının aktivasyonu, membranların füzyonu,

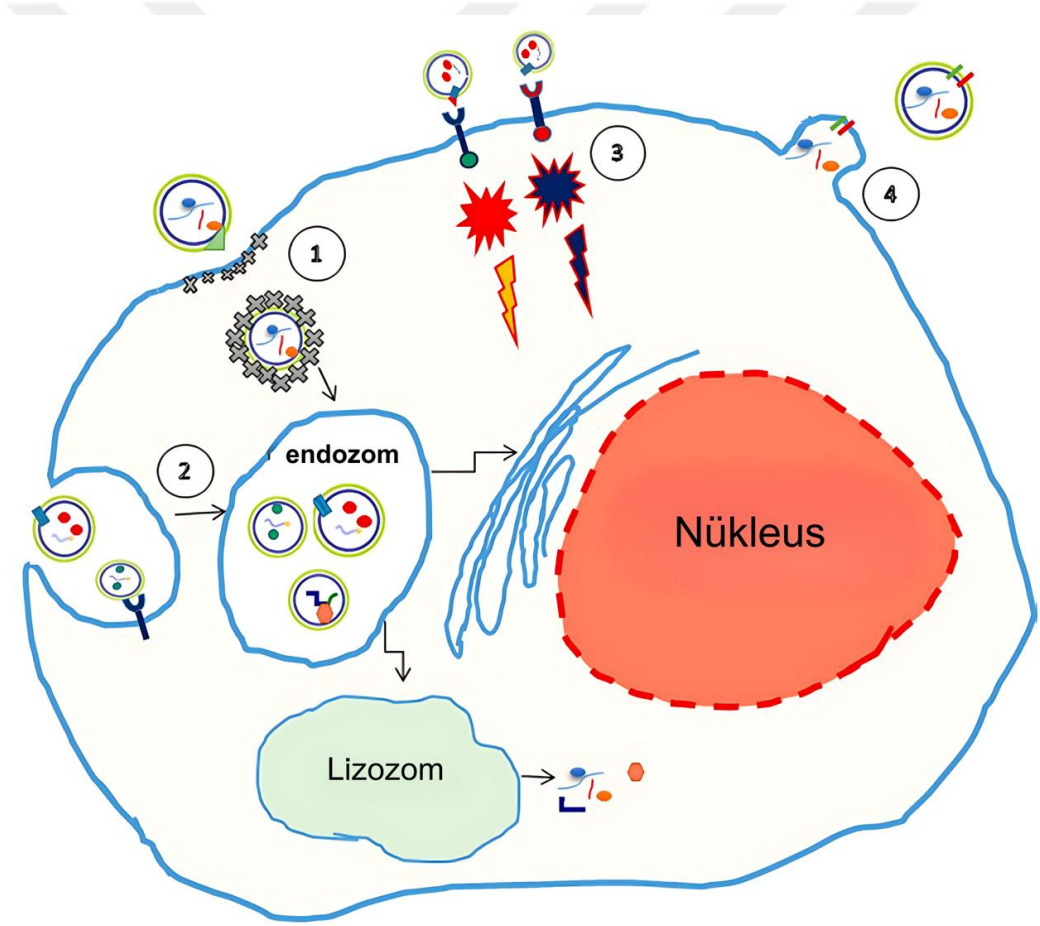
eksozomların internalizasyonu ve nükleer translokasyon, eksozomların mesajlarını ilettiği moleküler mekanizmalar arasındadır. Dışarıdan bakıldığında, bir eksozom-alıcı hücre etkileşiminin ilk adımı ligand/reseptör bağlanması olabilir.

Eksozom yüzeyinde açığa çıkan ligandlar, alıcı hücrelerdeki spesifik membran reseptörlerini bağlayarak, sinyal iletim yollarını açarak onları aktive edebilir. En iyi çalışılmış örnek, eksozom aracılı hücre ölümüdür; bu, bağışıklık toleransını artırmak için çeşitli kanser hücreleri tarafından kullanılan bir stratejidir. Tümör kaynaklı eksozomlar, PDL1 (programlanmış ölüm ligandı 1) veya Fas ligand gibi ölüm sinyallerinin yüzey ekspresyonu yoluyla, alıcı T hücreleri ve NK hücrelerinde apoptozu indükleyerek bağışıklık sisteminin sistemik olarak baskılanmasını teşvik eder [64], [65]. Ayrıca fizyolojik durumda eksozomlar, bağışıklık düzenleyici sinyallerin aracıları olarak APC (antijen sunan hücre) ile işbirliği yapmaktadır; örneğin ilginç bir makale, bağışıklık kazandırılmış farelerin dendritik hücrelerinin, Fas aktivasyonu yoluyla antijene özgü bir şekilde bağışıklık yanıtını baskılayabilen MHCII+/FasL+ eksozomlarını plazmaya saldığını göstermiştir [66]. Toplanan veriler doğrultusunda, TRAIL'i (TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand) açığa çıkaran tasarlanmış eksozomlar artık tümör hücrelerine pro-apoptotik sinyallerin iletilmesi için bir strateji olarak önerilmektedir [67].

Hücre zarı ligandları ve reseptörleri ile yüklü olan eksozomlar, gelişim, organogenez ve doku homeostazı gibi genellikle hücreler arası temaslarının aracılık ettiği süreçlerde yer alır [68]. Örneğin endotel hücreleri, Notch ligandı Dll4'ü açığa çıkaran eksozomlar üretir ve bu eksozomlar alıcı hücrelerin yüzeyine ulaştığında Notch-kavramasını ve aktivasyonunu teşvik ederek hücrelerin vasküler dallanmaya ve *in vitro* vasküler yoğunluğunun artmasına neden olur. Dahası, veziküller aktive edilmiş reseptöre yeniden bağlandığından, bunlar internalizasyon fazı sırasında reseptörle birlikte hücre içine taşınır [69]. Buna ek olarak, hem Hedgehog hem de WNT ailelerinin salgılanan proteinlerinin, doğrudan eksozom çift katmanına yüklenen veya eksozomla ilişkili proteinler olarak taşınan morfogenetik sinyalleri arttırabildiği, membranla ilişkili bir TGF-β1 içeren eksozomların ise alıcı hücrelerde TGF-β reseptörünü aktive edebildiği bulunmuştur [70], [71].

Sinyal iletimini aktive eden diğer eksozom örnekleri, çeşitli tümör hücrelerinden izole edilen, alıcı hücrelerde EGFR'yi (epidermal büyüme faktörü reseptörü) aktive eden ve böylece kemik iliği mikro çevresini etkileyen [72] veya kemik

metastazlarını teşvik eden [73] amphiregulin (AREG) eksprese eden eksozomlar gibi tümör kaynaklı eksozomlar arasında bulunabilir. Eksozomlar dışarıdan hücre içi yolları açabilse de çoğu durumda hücre zarı proteinleriyle etkileşim, alıcı hücrelerde veziküllerin internalizasyonunu sağlar. İnternalizasyon sürecinin açık kanıtları, fare eksozomları ile önceden muamele edilmiş insan mast hücrelerinin içinde murin proteinlerinin tanımlanmasından gelmektedir. Montecalvo ve arkadaşları [74] tarafından gerçekleştirilen ve lusiferin yüklü eksozomlarla muamelenin lusiferaz eksprese eden hücrelerde lüminesansı indükleyebildiği deney de aynı derecede önemlidir. Bugüne kadar, eksozomların internalizasyonunda rol oynayan çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır [75], [76] ve muhtemelen başkaları da tanımlanacaktır (Şekil 2-2).



Şekil 2.2: Eksozomların etki mekanizmaları

Şekil 2.2, [3] çalışmasından alınarak değiştirilmiş ve yeniden düzenlenmiştir.

Şekil 2.2 içerisinde gösterildiği gibi internalizasyon; klatrin bağımlı (Şekil 2.2-1) veya klatrin bağımsız (Şekil 2.2-2) endositik veziküller aracılığıyla gerçekleşebilmektedir. Hücre içi yolak aktivasyonu (Şekil 2.2-3) ligand/reseptör etkileşimi sinyal iletimini aktive eder. Eksozomların etki mekanizması membranın füzyonundan sonra biyoaktif moleküllerin salınımı ile füzyon mekanizmasıyla da gerçekleşebilmektedir (Şekil 2.2-4).

Proteolitik işlem veya eksozom internalizasyonunu engelleyen spesifik antikorların kullanılması, endositik bir yolun aktivasyonunda yer alan bazı protein-protein etkileşimlerinin tanımlanmasına izin vermiştir.

Reseptör aracılı endositoz, dış materyalin internalizasyonunda rol oynayan mekanizmalardan biridir ve böylece tezin önceki bölümde anlatıldığı gibi eksozom biyogenezinin ilk adımı olan erken endozomları oluşturur. Diğer taraftan, reseptör aracılı endositoz, sırasıyla eksozom yüzeyinde ve hücresel plazma membranında açığa çıkan bir ligand ile spesifik reseptörü arasında bağlanmayı gerektirir. Bu bağlanma, örtü proteinlerinin hücre zarının iç yüzeyinde toplanmasını teşvik etmek için yeterlidir, böylece büyük bir GTPaz dinamin sarmal yakası sayesinde hücre zarından ayrılan, klatrin aracılı endositoz yolundan ilerleyecek olan klatrin kaplı veziküller oluşur [77]. Klatrin bağımlı endositoz yoluyla eksozom alımının kanıtı, hücrelerin katyonik amfipatik bir ilaçla muamele edilmesiyle indüklenen klatrin kaybının eksozomların internalizasyonunu güçlü bir şekilde engellediğini gösteren Tian ve ark. tarafından elde edilmiştir [78].

Buna ek olarak, eksozomlar hücrelere lipid sallar, kolesterol ve plazma zarındaki sfingolipid zengini mikro alanların aracılık ettiği klasik olmayan endositoz yollarıyla da girebilir. Lipid sallar, membran boyunca hareket eder ve kaveolar veya nonkaveolar yollarla bunun düzgün invajinasyonlarını düzenler; ilginç bir şekilde, membran kolesterolünün tükenmesi veya kolesterol biyosentezinin inhibe edilmesiyle yapılan deneyler, HUVEC'de eksozom alımında %60'a varan doza bağlı bir azalma olduğunu göstermiştir [79]. Eksozomların fagositozu profesyonel fagositlerde ve diğer bağışıklık hücrelerinde (yani makrofajlar, dendritik hücreler ve γδ T hücreleri) meydana gelir ve aktin hücre iskeletine, fosfatidilinositol 3-kinaza (PI3K) ve dinamin 2'ye bağlıdır. Ayrıca, hücre dışı veziküllerde ortak olan

bir özellik de dış membranda fosfatidil serinin açığa çıkmasıdır; bu, apoptotik cisimlerin yutulmasında rol oynayan ve eksozomların internalizasyonuna aracılık eden çok sayıda plazma membran reseptörü tarafından tanınır.

Bu noktada, fizyolojik olarak hem endositoz hem de fagositozun internalize olmuş kargoyu endozomal-lizozomal yıkım yoluna yönlendirdiğini belirtmek ilginçtir, ancak toplanan çok sayıda kanıt, bazı kargoların alıcı hücrelerde biyoaktif olduğunu göstermektedir. İnternalize olmuş eksozomun lizozomal bozunmadan nasıl kaçtığı henüz araştırılmamıştır. Yakın zamanda Lorico'nun grubu tarafından mezenkimal stromal hücrelerde ve meme kanseri hücrelerinde, endositlenmiş EV'lerin veya bunların bir kısmının (örneğin CD9/CD133 protein kompleksleri) doğrudan alıcı hücrenin çekirdeğine iletilmesi için bir ara bölme tanımlayan olası bir strateji önerilmiştir. Özellikle, ER proteini VAPA ve geç endozom proteinleri ORP1L ve Rab7 tarafından oluşturulan ve geç endozomu nükleer porun yakınına ve oradan da nükleoplazmaya götüren VOR adlı üçlü bir kompleks tanımlamışlardır [80]. Bununla birlikte, farklı internalizasyon mekanizmaları daha yüksek eksozomal kargo verimliliğine sahip olabilir.

Alıcı hücrelerin yüzeyindeki eksozom proteinlerinin karakterizasyonu, kargo iletimi için eksozomlar tarafından benimsenen mekanizmalar arasında membran füzyonunu tanımlamıştır. Örneğin tetraspaninler; proteinler, lipidler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere çeşitli moleküllerle etkileşime girerek, daha önce açıklandığı gibi, hücre zarı füzyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlevlerde yer alan TEM alanlarını düzenler. Daha sonra, bugüne kadar sadece birkaç kanıt bu hipotezi desteklese bile, TEM alanlarının eksozom içselleştirmesindeki rolü büyük ölçüde önerilmiştir [32]. Buna ek olarak, integrinler de membran füzyonuna katılır ve örneğin CD61, CD51 ve CD54'ü maskeleyen spesifik antikorların kullanımı, dendritik hücreler tarafından eksozom alımında önemli rol oynadıklarını göstermiştir.

Yukarıda açıklandığı üzere, eksozomlar biyoaktif bileşikleri toplayan ve ileten kaplar gibi işlev görürler. Eksozomlar, alıcı hücreleri dönüştürebilir ve farklı kargo moleküllerinin komşu ve uzak dokulara iletilmesi yoluyla dokuya özgü ve/veya tüm vücut metabolizmasını düzenleyebilir; fosfolipidik yapılar, eksozomların kargosunu bozucu saldırılara karşı korur ve biyolojik aktivitesini muhafaza eder. Eksozomların alıcı hücreleri etkilediği çoklu mekanizmalar daha sonra eksozom

kargosuyla sıkı bir şekilde ilişkilendirilir. Örneğin, daha önce açıklandığı gibi, eksozomlar dış zardaki hücre reseptörünün aktivasyonu yoluyla hücre içi bir sinyali aktive edebilir, aynı zamanda aktive edilmiş bir reseptörün eksozom aracılı olarak hücre içine iletilmesiyle de aktive olabilir. Song ve çalışma arkadaşları, kanser hücresinden türetilmiş eksozomların, fosforile epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2) gibi fosforile reseptör tirosin kinazlar bakımından zengin olduğunu ve tümörle ilişkili monositlere girdikten sonra MAPK yolunu aktive ederek sağkalım oranını artırdığını göstermiştir [81] Dahası, eksozomlar işlevsel multiprotein kompleksleri taşıyabilir ve böylece transkriptomun tamamen yeniden düzenlenmesine neden olabilir. Kanser hücresi kaynaklı eksozomların, pre-miRNA'ları olgun miRNA'lara dönüştüren ve hedef hücrelerde Dicer bağımlı mRNA degradasyonunu indükleyen Dicer, TRBP ve AGO2 dahil RISC-Yükleme Kompleksi (RLC) ile ilişkili miRNA'lar içerdiği gösterilmiştir [59].

Eksozomlar, hormon sinyalini güçlendirme yetenekleri nedeniyle endokrinologlar tarafından büyük ölçüde incelenmektedir. Örneğin endometriyal hücreler, trofoblast hücreleri tarafından internalize edilen eksozom proteinlerini yükleyerek adezyon, migrasyon, invazyon ve hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesini etkiler ve böylece başarılı implantasyonu teşvik eder ve gebelik oluşumunu kolaylaştırır [82]. Crewe ve arkadaşlarının [83] son verileri, eksozomların metabolik sinyallerdeki rolünü kanıtlamıştır. Yazarlar, eksozomların hareketini *in vivo* olarak izlemelerine olanak tanıyan yeni bir fare modelinden yola çıkarak, endotel hücrelerinin yağ dokusuna sistemik enerji dengesinin "gerçek zamanlı bir güncellemesini" ilettiğini göstermiştir. Özellikle, yağ dokusundaki endotel hücrelerinin kandan gelen sinyal moleküllerini, yani çözünür veya albümine bağlı besinleri ve hormonları yakaladığını ve bunları tercihen komşu adipositlere gönderen eksozomlar içinde paketlediğini gösterdiler.

Eksozomlar (özellikle mezenkimal kök hücrelerden (MKH) türetilen eksozomlar) ayrıca doku homeostazının korunmasına da katılmaktadır. Bu veziküller, reperfüze miyokardiyumdaki glikolitik açığı ve ATP üretimini düzeltebilen enzimler, doku onarımında güçlü bir şekilde rol oynayan büyüme faktörleri (örn. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü, Epidermal Büyüme Faktörü, Fibroblast Büyüme Faktörü) ve anti-enflamatuar role sahip biyoaktif moleküller taşımaktadır. İlginç bir

şekilde, toplanan veriler, MSC kaynaklı eksozomların, yaralanmış doku modellerinde çeşitli organların rejenerasyonunda ebeveyn kök hücreler kadar güçlü olduğunu ortaya koymuştur, bu nedenle MSC salgılanan eksozomları yeni bir hücresiz tedavi olarak önermek mümkündür [84].

Eksozomlar tarafından taşınan çok sayıda biyoaktif makromolekül alıcı hücreleri modüle edebilmesine rağmen, deneysel kanıtların çoğu eksozom tarafından taşınan RNA ve özellikle de kodlamayan RNA'nın neden olduğu etkilere atıfta bulunmaktadır. Alıcı hücre davranışını değiştirmek için eksozomlar tarafından benimsenen en iyi çalışılmış mekanizma kesinlikle miRNA iletimidir. Bugün, farklı yolların ve moleküllerin, hücre ve doku özgüllüğü ile eksozom içinde seçici bir miRNA sıralamasına dahil olduğunu bilinmektedir [31]. RNaz bozunmasından korunan eksozom yüklemesi sayesinde, olgun miRNA vücut boyunca taşınabilir ve ilk olarak Pegtel ve arkadaşları [85] tarafından gösterildiği gibi, yeniden alıcı hücre sitoplazmasında serbest bırakılabilir ve spesifik hedeflerini tanıyarak konağın mRNA bozunmasını indükleyebilir. İlginç bir şekilde, eksozomlara yüklenen nükleik asitlerin daha derin bir analizi, 25 ila 700 nükleotid arasında boyut dağılımına sahip büyük miktarda RNA parçasını tanımıştır ve bunlar arasında miRNA'lar küçük bir kısmı temsil ederken, hem tRNA parçaları hem de Y-RNA'lar en bol miktarda görünmektedir, ancak alıcı hücrelerdeki rolleri tanımlanmalıdır [86]. Buna ek olarak, giderek artan sayıda kanıt, hedef hücrenin fenotipinin modülasyonunda eksozomla iletilen uzun kodlanmayan RNA'ya (lncRNA) bir rol atfetmiştir. Bunlar 200 nükleotidden uzun tek iplikçikli RNA parçalarıdır ve eksozomların içinde küçük RNA'lara göre daha az bulunmalarına rağmen gen ifadesinin kontrolünde pleiotropik rol oynarlar. Örneğin, hipoksik mesane kanseri hücreleri tarafından salınan eksozomlar, tümör büyümesini kolaylaştırmak için tümör mikroçevresinin yeniden şekillenmesini indükleyebilen onkojenik lncRNA-UCA1 bakımından zenginleştirilmiştir [61]. Benzer şekilde, glioma hücreleri ve karaciğer kanseri kök hücreleri, sırasıyla lncRNA POU3F3 ve lncRNA H19 içeren eksozomların salınımı yoluyla anjiyogenezi teşvik eder [62], [87]. LncRNA'lar epigenetik düzenlemeye, multiprotein kompleksini belirli lokuslara toplayarak ve yönlendirerek, alternatif splicing ve protein translasyonunu kontrol ederek ve son olarak, tamamlayıcı bölgeler aracılığıyla, çeşitli miRNA'ları süngerleştirerek ve böylece sitoplazmik modellerini sıfırlayarak katılırlar. Bugüne kadar toplanan tüm

veriler, eksozomların etkileri hakkındaki bilgilerimizin buzdağının sadece görünen kısmı olduğunu ve “hücre çöpü” olmaktan çıkıp “hücre hazinesi” haline gelmekte olduklarını varsaymamızı sağlamaktadır [3].

3
EKSOZOM İZOLASYON VE KARAKTERİZASYON YÖNTEMLERİ

3.1 Eksozom İzolasyon ve Karakterizasyon Yöntemlerine Genel Bakış

Hücre dışı veziküller hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında neredeyse tüm hücre tiplerinden salınır [88]. Eksozomlar, 30-150 nm çapında olan ve multivesiküler cisimler (MVB'ler) içinde intraluminal veziküller olarak ortaya çıkan bir hücre dışı vezikül sınıfıdır. Eksozomlar kan, idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS), vitreus, asit ve anne sütü dahil olmak üzere çok sayıda vücut sıvısında bulunur [89], [90], [91], [92], [93], [94], [95]. Eksozom oluşum mekanizmaları tartışmalıdır. Yaygın bir teori, eksozomların taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (ESCRT) bağımlı bir yolla oluştuğudur [96]. MVB oluşumu ve eksozom biyogenezine ilişkin bir başka teori de seramid bağımlı yoldur [97]. Bir lipid olan seramidin MVB membranının invajinasyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Küçük GTPazların Rab ailesinin bir üyesi olan Rab27'nin de eksozom salgılama yolunu kontrol ettiği, özellikle plazma membranında MVB kenetlenmesinde işlev gördüğü gösterilmiştir [98], [99]. Heterojenlikleri nedeniyle, bu küçük veziküllerin izolasyonu ve tespiti için uygun bir yöntem seçmek kritik önem taşımaktadır.

Çok sayıda kanıt, ekzosomların hücreler arası iletişimde kritik bir rol oynadığını göstermiştir, çünkü bu veziküller proteinler, lipitler ve nükleik asitler de dahil olmak üzere biyomoleküller biçiminde ebeveyn hücrelerinden gelen 'mesajları' kapsüllemektedir. Bu mesajlar çeşitli fizyolojik ve patolojik bağlamlarda ortaya çıkar. Örneğin, dendritik hücrelerden ve T hücrelerinden türetilen ekzosomların sitokinleri alıcı hücrelerine taşıdığı gösterilmiştir [100]. Kanser hücrelerinden türetilen ekzosomlar tümör hücresi çoğalması, tümör hücresi göçü, bağışıklık kaçışı ve anjiyogenez dahil olmak üzere tümör oluşumunda ve tümör metastazında birden fazla adımda yer alır [101]. Ek olarak, çeşitli çalışmalar ekzosomların sinirsel

toksisiteyi yayarak Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde yer aldığını göstermiştir [102], [103].

Hücre-hücre iletişimindeki rollerine ek olarak, ekzosomlar yararlı klinik uygulamalara da sahip olabilir; tanı için biyobelirteç kaynakları ve terapötik uygulamalar için ilaç taşıma vektörleri olarak giderek daha fazla araştırılmaktadır [104], [105]. Bir biyoteknoloji şirketi olan Exosome Diagnostics, akciğer ve prostat kanseri için birkaç çığır açıcı ekzosom tabanlı tanı aracı geliştirdi. Kamerkar ve arkadaşları, ekzosomların pankreas kanserinde onkojenik KRAS'ın terapötik hedeflenmesini kolaylaştırdığını buldu. Lipozomlarla karşılaştırıldığında, tasarlanmış ekzosomlar, belirli hedeflere RNA interferansı (RNAi) ileterek kanser baskılamanın gelişmiş etkinliğini gösterdi [106].

Hem temel bilim hem de klinik bağlamlarda eksozom araştırmalarını ilerletmek için uygun hazırlama ve karakterizasyon teknikleri kritik öneme sahiptir. Eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu için mevcut teknikler çeşitli deneysel sınırlamalara sahiptir. Tezin bu bölümünde izolasyon tekniklerine ilişkin tartışma farklı santrifüjleme, ultrafiltrasyon, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme, çöktürme ve immünoafinite yakalama tabanlı izolasyonu içermektedir. Eksozom karakterizasyonu için, transmisyon elektron mikroskobu tekniklerine (TEM) odaklanılarak eksozom görselleştirmesi için yaygın yöntemler tartışılmıştır. Ayrıca bu bölüm nanopartikül izleme analizi (NTA), asimetrik akış alanı-akış fraksiyonlaması (AF4) ve direnç darbesi algılaması (RPS) dahil olmak üzere eksozom miktar tayini için çeşitli teknikleri de içermektedir. Eksozom yüzey işaretleyici tespiti ve alt küme karakterizasyonu için araçlar olarak ise akış sitometrisi ve ExoView (NanoView Biosciences, Boston, MA) platformu ele alınmıştır. Son olarak, proteomik ve mikroRNA dizileme teknikleri de dahil olmak üzere eksozomları izleme ve eksozom kargosunu tanımlama yöntemleri tartışılmaktadır.

3.2 Eksozom İzolasyon Yöntemleri

3.2.1 Diferansiyel Santrifüj

Diferansiyel santrifüjleme ilk olarak retikülositlerden eksozomları izole etmek için geliştirilmiştir ve şu anda eksozom izolasyonu için en yaygın kullanılan yöntemdir [107]. Bu yöntemin temeli hücrelerin, hücre artıklarının ve büyük veziküllerin

ardışık santrifüj adımlarıyla uzaklaştırılmasıdır. Kısaca, deney numuneleri hücreleri, ölü hücreleri ve hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için sırasıyla 300, 2000 ve 10.000×g'de santrifüjlenir. Eksozomlar 100.000×g'de santrifüjleme ile elde edilir. Bu yöntem, işlem sırasında oldukça önemli sayıda vezikül kaybolduğundan, büyük hacimli ilk numuneyi içeren deneyler için uygundur. Kowal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre, bu yöntemle elde edilen eksozom fraksiyonunun %70'i 50-150 nm çapındaki veziküllerden oluşmakta, geri kalan veziküller ise >150 nm (%20) veya <50 nm (%10) çapa sahip olmaktadır [108].

3.2.2 Filtrasyon ve Ultrasantrifüjleme

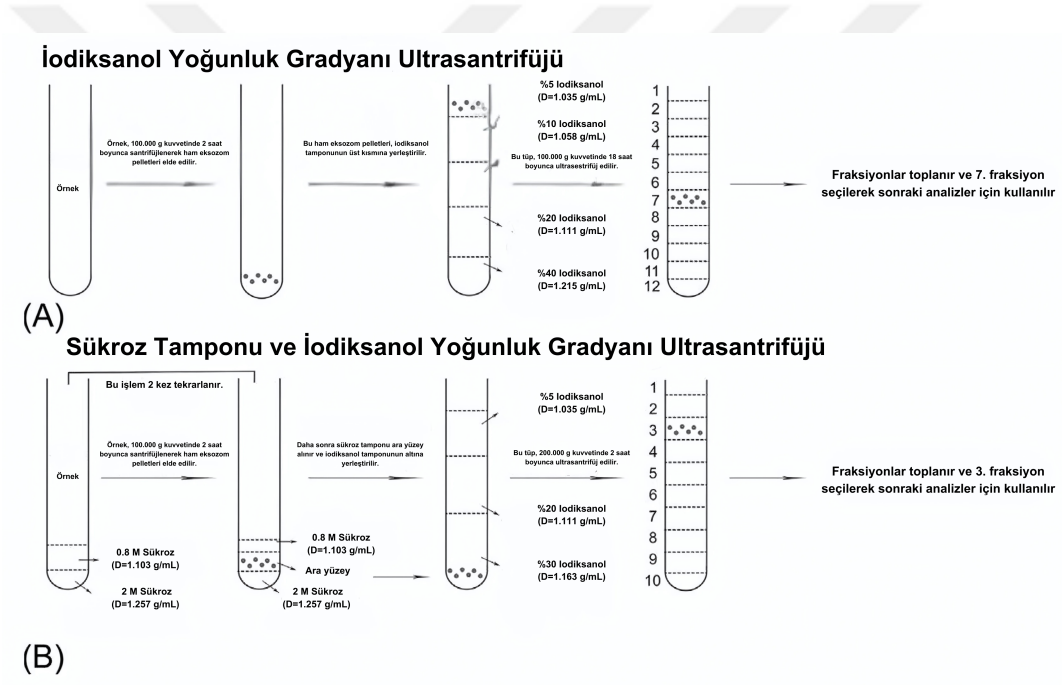
Filtrasyon, eksozom izolasyonu için kullanılan bir diğer yaygın yöntemdir. Bu yöntemin temelinde yatan prensip, membranöz filtrelerin kullanılmasının eksozomların moleküler ağırlıklarına ve boyutlarına göre diğer numune bileşenlerinden ayrılmasını sağlamasıdır. Bu yöntemin iki ana adımı vardır: (1) 0,1-0,22 μm gözenek çapına sahip membran filtreler kullanılarak eksozomların hücreler, hücre debrisi ve mikropartiküller gibi daha büyük partiküllerden ayrılması ve (2) 3-100 kDa moleküler ağırlık kesme değerine sahip filtreler kullanılarak eksozomların çözünür proteinler ve protein agregatları gibi daha küçük partiküllerden ayrılması. Örneğin 500 mL hacme ve 0,22 μm gözenek boyutuna sahip Corning Tek Kullanımlık Şişe Üstü Filtre ve 3 ila 100 kDa arasında değişen proteinler için Amicon Santrifüj Filtre Ultra gibi çeşitli ticari membran filtreler geliştirilmiştir. İlave hacim azaltımı gerekiyorsa, eksozom içeren numuneler eksozomları peletlemek için 100.000xg-200.000×g'de santrifüjlenebilir.

3.2.3 Yoğunluk gradyanlı santrifüjleme

Yoğunluk gradyanı santrifüjleme, süreksiz bir yoğunluk gradyanı oluşturarak eksozomları izole etmek için vezikül boyutları ve kütle yoğunluklarındaki farklılıklardan yararlanır. Santrifüjleme adımı sırasında partiküller, yoğunluklarının çevreleyen çözeltinin yoğunluğuyla eşleştiği noktaya ulaşana kadar gradyan boyunca ilerler. Sükroz ve iyodiksanol, gradiyent oluşturmak için kullanılan iki yaygın ortamdır. İyodiksanol sükroza göre daha kararlı ve daha az viskozdur [109]. Örnekleri yüklemenin iki yolu vardır: üstten yükleme ve alttan yükleme. Çözünebilir proteinler ultrasantrifüjleme sırasında altta kalacağı için alttan

yüklemenin üstten yüklemeye göre bir avantajı vardır, oysa örnek üstten yüklenirse çözünebilir proteinler gradyan boyunca çökelecektir.

Greening ve arkadaşları, OptiPrep'ten (MilliporeSigma, ABD) iyodiksanol kullanarak numunenin üstten yüklenmesini kullanan yoğunluğa dayalı bir ayırma yöntemi bildirmiştir [110]. Bu yöntemde, deney numunesi önce 2 saat boyunca 100.000×g'de ultrasantrifüj edilir. Ham eksozom peletleri daha sonra fosfat tamponlu salin (PBS) içinde yeniden süspanse edilir ve bir iyodiksanol gradyan tamponuna üstten yüklenir. 100,000×g'de 18 saat boyunca ultrasantrifüj işleminden sonra tüpte 12 fraksiyon kalır ve en üstteki yedinci fraksiyonda eksozomlar bulunur. Daha sonra 12 fraksiyon toplanır ve downstream analizlerine tabi tutulur (Şekil 3.1-A).



Şekil 3.1: Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme işlemlerinin şematik gösterimi *(A) İyodiksanol (B) sükroz tamponu ve iyodiksanol*

Şekil 3.1, [3] çalışmasından alınarak değiştirilmiş ve yeniden düzenlenmiştir.

Buna karşılık, Choi ve arkadaşları bunun yerine örnek alttan yüklemeyi kullanarak ek**s**ozom izolasyonu ve aşağı akış proteomik profilleme için bir yöntem bildirmiştir [111]. Bu yöntemde, deney numuneleri 0,8 ve 2 M sukroz yastıklarına eklenir ve ultrasantrifüjleme yapılır. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra, iki sükroz yastığı tampon katmanı arasındaki arayüzeyde ekzo somlar bulunabilir. Ara yüzey çözeltisi toplanır ve bir iyodiksanol gradyan tamponunun altına yerleştirilir. Ek bir ultrasantrifüjleme, üstten üçüncü fraksiyonda eksozomlar olmak üzere kalan 10

fraksiyonu verir. Daha sonra 10 fraksiyon toplanır ve aşağı akış analizlerine tabi tutulabilir (Şekil 3.1-B).

3.2.4 Çöktürme

Eksozom çöktürme, yukarıda açıklananlara kıyasla eksozom izolasyonu için daha hızlı ve daha verimli bir yöntemdir. Bu yöntemin amacı eksozomları polimerlerle inkübe ederek yakalamaktır; bu da eksozomların polimerlerle birlikte düşük santrifüj hızlarında elde edilmesini sağlar. Bu amaçla en yaygın kullanılan polimer polietilen glikoldür (PEG). ExoQuick Eksozom Çöktürme Solüsyonu (System Biosciences, Palo Alto, CA) ve Invitrogen Total Eksozom İzolasyon Reaktifi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) eksozom çöktürme için iki popüler ticari üründür. ExoQuick kullanım kılavuzuna göre, deney numuneleri hücreleri ve hücresel kalıntıları gidermek için önceden temizlenir. Temizlenen çözelti daha sonra uygun hacimde ExoQuick ile 0,5-12 saat inkübe edilir, bu süre numune türüne bağlıdır. Son olarak, eksozomlar 30 dakika boyunca 1500 ×g'de santrifüjlenerek toplanır.

3.2.5 İmmünoafinite yakalama tabanlı izolasyon

Ne ultrasantrifüjleme ne de çöktürme eksozom alt tipleri için zenginleştirmeye izin verir. Bugüne kadar, immünoafinite yakalama, eksozom alt gruplarının izolasyonu için tek yöntem olmaya devam etmektedir. Manyetik boncukların spesifik antikorlarla kaplanmasıyla, bu yüzey antijenlerine sahip eksozomlar elde edilebilmektedir. CD9, CD63 ve CD81 en yaygın belirteçlerdir ve neredeyse tüm eksozomlarda ifade edilirler [112]. Belirli bir hücre tipinden türetilen eksozomları izole etmek için ek belirteçler kullanılabilir. Örneğin, kondrotin sülfat peptidoglikan 4 antikor kaplı boncuklar melanom hücresi türevli eksozomları yakalamak için kullanılırken [113], CD56 veya CD171 antikorları ile kaplı manyetik boncuklar nöronal hücre türevli eksozomları yakalamak için kullanılmıştır [114], [115].

3.2.6 Boyut- Dışlama Kromatografisi (Size- Exclusion Chromotography; SEC)

Eksozom izolasyonunda boyut dışlama kromatografisinin (SEC) kullanımı, hücre dışı veziküllere verilen hasarı en aza indirirken saflığı ve verimi artırma yeteneği nedeniyle önem kazanmıştır. SEC, EV'leri boyuta göre etkili bir şekilde ayırarak, genellikle ultrasantrifüjleme gibi geleneksel yöntemler kullanılarak birlikte

saflaştırılan çözünür proteinler ve lipoproteinler gibi kirleticilerin uzaklaştırılmasına izin verir. Bu teknik, çeşitli çalışmalarda optimize edilmiştir ve yüksek kaliteli eksozomları farklı biyolojik kaynaklardan izole etmedeki çok yönlülüğünü ve etkinliğini göstermektedir.

SEC, kas dokusu ve plazma örneklerini içeren çalışmalarda gösterildiği gibi, daha yüksek bir saf eksozom verimi sağlayarak ultrasantrifüjlemeden daha iyi performans gösterir[116][117]. Diğer yöntemlerden farklı olarak SEC, EV'lerin yapısal bütünlüğünü tehlikeye atmaz, bu da onları downstream uygulamalar için uygun hale getirir [117], [118].

SEC, koşullandırılmış ortamlar ve biyoakışkanlar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik numuneler için uyarlanabilir ve klinik ortamlarda uygulanabilirliğini artırır. SEC sürecini optimize etmek ve eksozom izolasyonunun verimliliğini artırmak için farklı seforoz kolonları test edilmiştir. SEC, saflığı daha da artırmak ve kirleticileri azaltmak için genellikle ultrafiltrasyon veya ön arıtma yöntemleriyle birleştirilir [117], [118], [119]

SEC önemli avantajlar sunarken, izolasyon yöntemi seçiminin belirli araştırma hedeflerine ve örnek türlerine bağlı olabileceğini düşünmek önemlidir. Bazı araştırmacılar hala belirli bağlamlarda geleneksel yöntemleri savunsa da eksozom izolasyonunda özel bir yaklaşıma ihtiyaç duyulmaktadır.

3.2.7 Eksozom İzolasyon Yöntemlerinin Geri Kazanım, Saflık, Zaman ve İş Gücü Maliyeti Açısından Değerlendirilmesi

Uygun eksozom izolasyon yönteminin seçimi genellikle numunelerin hacmine ve kaynağına ve ayrıca downstream analizlerinin hedeflerine bağlıdır. Belirli bir çalışma için en iyi eksozom izolasyon yöntemini seçerken göz önünde bulundurulması gereken en önemli özellikler şunlardır: (1) yöntemin eksozom geri kazanım oranı veya verimi, (2) elde edilen eksozom örneğinin saflığı ve (3) yöntemin zaman ve iş gücü açısından verimliliği.

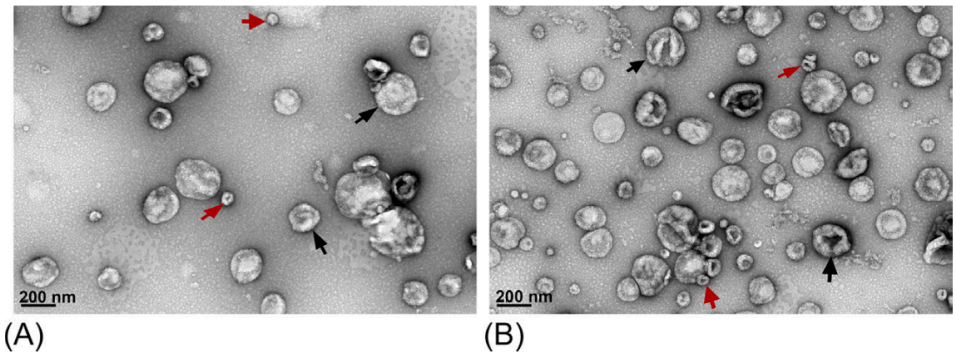
3.2.7.1 Geri Kazanım Oranı

Çeşitli çalışmalar, PEG bazlı çöktürmenin diğer yöntemlere kıyasla %80-90 civarında en yüksek geri kazanım oranına sahip olduğunu göstermiştir [120], [121], [122]. Diferansiyel **santrifüjleme** ve ultrafiltrasyon nispeten düşük-orta verime sahiptir. Çok sayıda çalışma, diferansiyel santrifüjlemenin, işlem sırasında

eksozomların büyük bir kısmının kaybı nedeniyle yalnızca %20-40'lık bir geri kazanım oranına sahip olduğunu göstermiştir [121], [123], [124]. Ultrafiltrasyon, diferansiyel santrifüjlemeye göre %60 civarında daha yüksek bir geri kazanım oranına sahiptir [124]. Hem diferansiyel santrifüjleme hem de ultrafiltrasyon deneylerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu iki yöntemin seçimi bireysel laboratuvar alışkanlıklarına dayanma eğilimindedir. Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme sadece %10 ile en düşük eksozom geri kazanım oranına sahiptir [120]. PEG bazlı çöktürme en yüksek eksozom geri kazanım oranına sahip olduğundan, bu yöntem genellikle klinik biyo-sıvı örneklerini (örn. plazma, idrar, amniyotik sıvı, vitreus ve BOS) içerenler gibi küçük bir başlangıç örnek hacmine sahip deneylerde kullanılır. Diferansiyel santrifüjleme ve ultrafiltrasyon genellikle hücre kültürü ortamından eksozomların izolasyonu için kullanılır, çünkü bu çalışmalar büyük bir başlangıç numune hacmi içerme eğilimindedir.

3.2.7.2 Saflık

Yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme, veziküllerden spesifik olmayan bağlı proteinleri uzaklaştırdığı için şu anda en yüksek saflıktaki ekzosom örneklerini elde etmek için altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (Şekil 3.1) [120]. Bu nedenle, yoğunluk gradyanlı ultra santrifüjleme, ekzosomal proteomik ve RNA dizileme çalışmaları için ekzosomları izole etmek için yaygın olarak kullanılır [111]. Diferansiyel santrifüjleme ve ultrafiltrasyon nispeten yüksek örnek saflıkları elde edebilmesine rağmen, ek**s**o**zo**m agregatları bu yöntemlerde önemli bir eserdir. Bu nedenle, ekzosom peletlerinin kuvvetli bir şekilde yeniden süspanse edilmesi önerilir. PEG tabanlı çöktürme, en düşük saflıktaki ekzosom örneklerini verme eğilimindedir. Şekil AB'de Wild-type fibulin-3 eksprese eden retina pigment epitel hücrelerinden (Şekil 3.4-A) ve R345W-fibulin-3 eksprese eden retina pigment epitel hücrelerinden sükroz tamponu ve iyodiksanol yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme kullanılarak izole edilen iki eksozom alt popülasyonu (Şekil 3.4-B) göstermektedir (küçük veziküller kırmızı okla ve büyük veziküller siyah okla işaretlenerek gösterilmiştir). Ekzosomları ilişkili polimerlerden ayırmak zordur. Protein kontaminantları deneysel sonuçları çarpıtabileceğinden, downstream çalışmalardaki veri yorumlaması dikkatli yapılmalıdır.



Şekil 3.2: TEM görüntüsü

Eksozom (kırmızı oklar) ve büyük vezikülleri (siyah oklar).

Şekil 3.2, [3] çalışmasından alınarak değiştirilmiş ve yeniden düzenlenmiştir.

3.2.7.3 Zaman ve İşgücü Maliyeti

Bu yöntemler arasında yoğunluk gradyanlı santrifüjleme en fazla zaman ve işgücü gerektiren yöntemdir ve işlemin tamamının gerçekleştirilmesi için 2-3 gün gerekmektedir. Diferansiyel santrifüjleme ultrafiltrasyondan daha fazla zaman gerektirse de, membran fil- ters ve diğer ultrafiltrasyon ekipmanı, temel laboratuvar ekipmanı zaten elde edilmişse, diferansiyel santrifüjleme için gereken malzemelerden daha pahalıdır. PEG bazlı çöktürme hem işçilik hem de zaman açısından bu yöntemler arasında en az maliyetli olanıdır.

3.3 Eksozom Karakterizasyon Yöntemleri

3.3.1 Ultrayapısal Analizler

3.3.1.1 TEM

Eksozomların küçük boyutları ve numune hazırlama kolaylığı nedeniyle TEM, eksozom morfolojisini incelemek için altın standart yöntemdir. TEM için çözünürlük yaklaşık 1 nm'dir ve negatif boyama prosedürü basit ve hızlıdır, sadece 2-3 saat sürer. Kısaca, eksozomlar %2 paraformaldehit içinde sabitlenir, Formvar karbon kaplı TEM ızgaralarına yatırılır ve 20 dakika inkübe edilir. Izgaralar daha sonra PBS ile yıkanır, glutaraldehit ile inkübe edilir ve su ile yıkanır. Veziküller daha sonra uranil asetat çözeltisi ile boyanır ve havada kurutulur [125]. Konvansiyonel TEM aşağıdakiler için kullanılabilir: (1) çözeltideki eksozomların varlığını doğrulamak, (2) eksozomların kalitesini değerlendirmek ve (3) eksozomların morfolojisini incelemek. TEM, sınırlı tekrarlanabilirlik ve

verimsizlik nedeniyle eksozom miktar tayini için nadiren kullanılır. İmmüno-EM, eksozom yüzey belirteçlerini araştırmak için kullanılmıştır ve eksozomların 5-40 nm altın partiküllere bağlı birincil antikorlar ve ikincil antikorlarla inkübe edilmesini içerir.

3.3.1.2 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

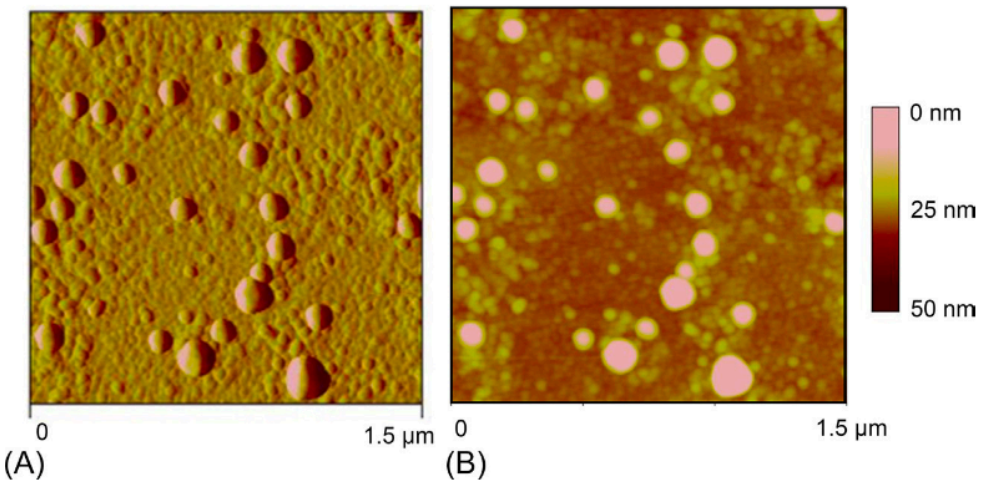
TEM'de olduğu gibi geniş bir ışın kullanmak yerine, SEM örnekleri satır satır tarayan ince bir nokta ışını kullanır. Bu nedenle, TEM tarafından oluşturulan iki boyutlu görüntü yerine SEM, eksozomların üç boyutlu bir görüntüsünü sağlamak için örneklerin yüzeyine odaklanır. Kısaca, eksozomlar glutaraldehit ile sabitlenir ve artan etanol dizisi ile dehidre edilir. Numuneler oda sıcaklığında hava ile kurutulduktan sonra, mezozomlar SEM analizi için hazır hale gelir [126]. Sharma ve arkadaşları, TEM altında gözlemlenen fincan şeklindeki morfolojinin aksine, SEM'in merkezi bir çöküntü olmadan yuvarlak, şişkin eksozomlar gösterdiğini bildirmiştir [127].

3.3.1.3 Kriyojenik elektron mikroskopisi (Kriyo-EM)

Kriyo-EM bir TEM türüdür. TEM ve SEM için yapıldığı gibi numunelerin havada kurutulmasının aksine, kriyo-EM numunelerin kendi doğal sulu ortamlarında kalmasını sağlar. Kriyo-EM analizi için, askıya alınmış eksozomlar bir ızgara üzerine yerleştirilir ve daha sonra numunenin vitrifikasyonunu sağlamak için hızla sıvı etana daldırılır. Örnekler vitrifiye edildikten sonra kriyo-EM altında analiz edilebilir veya saklanmak üzere sıvı nitrojene aktarılabilir [128]. Yuana ve arkadaşları kriyo EM altında eksozomların net bir çift katmanlı yapıya sahip olduğunu ve bazen daha küçük veziküllerle çevrili olduğunu göstermiştir [129].

3.3.1.4 Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)

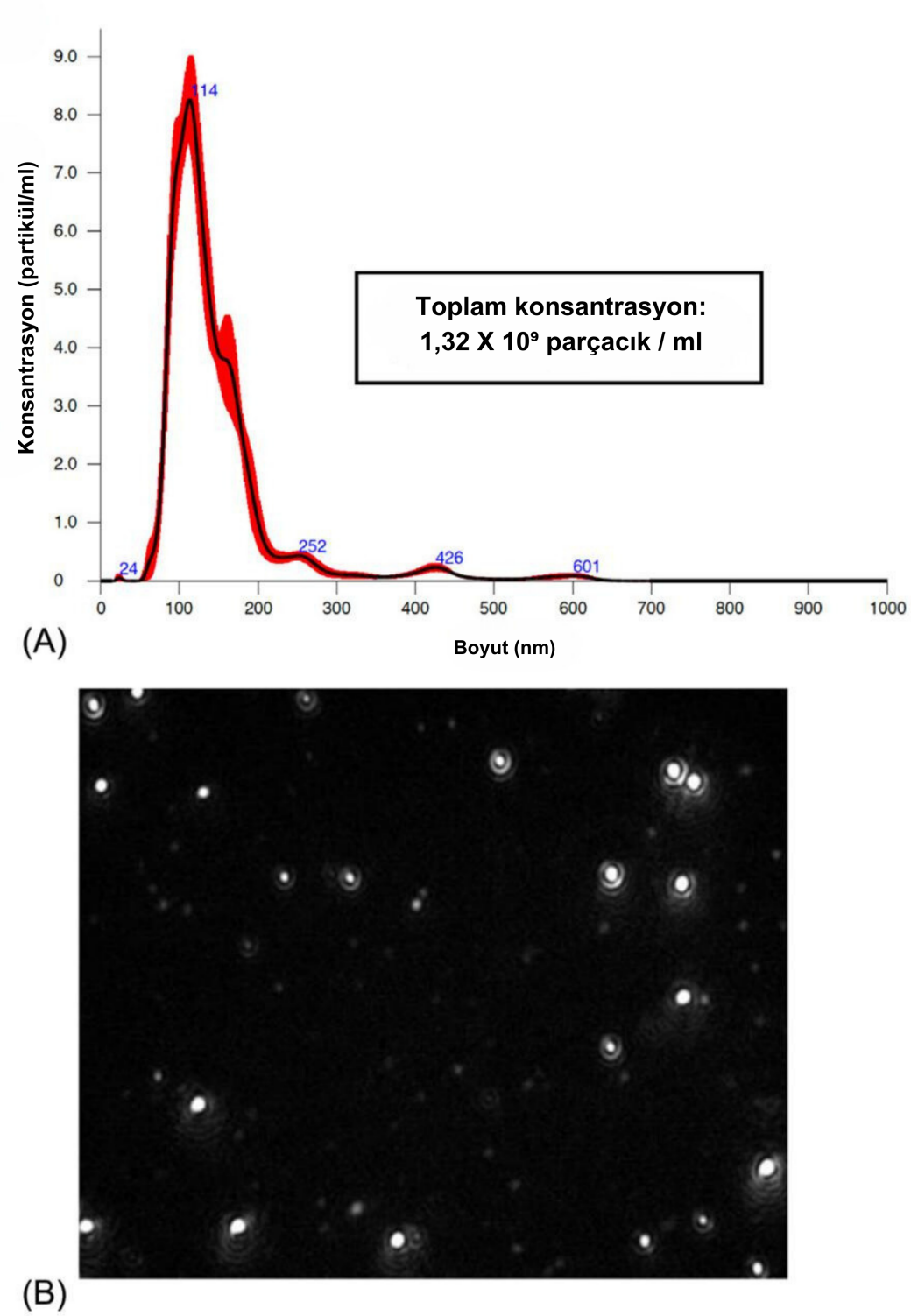
AFM yaklaşık 1 nm'lik yüksek bir çözünürlüğe sahiptir ve eksozom topografisi çalışmaları için uygundur. Sharma ve arkadaşları AFM immünogold görüntüleme kullanarak eksozomlar üzerinde çoklu CD63 reseptör bölgeleri tespit etmiştir [127]. Kısaca, eksozom süspansiyonu bir mika substrat üzerine yerleştirilir ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Örnekler daha sonra ultra saf su ile yıkanır ve azot gazı ile kurutulur. Örnekler silikon problarla AFM kullanılarak görüntülenir ve AFM yazılımı ile analiz edilir (Şekil 3.3) [95].



Şekil 3.3: İnsan vitrözündeki eksozomların AFM görüntüleri
(A) AFM görüntüsü (B) AFM yükseklik görüntüsü.
Şekil, [3] çalışmasından alınarak değiştirilmiş ve yeniden düzenlenmiştir.

3.3.2 Nanopartikül İzleme Analizi (Nanoparticle Tracking Assay; NTA)

NTA, eksozom konsantrasyonu ve boyut dağılımının ölçümü için gelişmiş bir yöntemdir. Akış sitometrisi ve TEM ile karşılaştırıldığında, NTA daha iyi tekrarlanabilirliğe sahiptir. NTA yüksek çözünürlüğe sahiptir ve 30-1000 nm çapındaki vezikülleri tespit edebilir. Bu teknik, parçacık boyutunu ve konsantrasyonunu ölçmek için dinamik ışık saçılımından ve Stokes-Einstein denkleminden yararlanır. NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) kullanım kılavuzuna göre, dağınık ayar altında, her numune şırınga pompası ile makineye yüklenir ve beş adet 60 saniyelik video oluşturulur. Tüm numune ölçüm süreci yaklaşık 15 dakika sürer. Şekil 3.4, filtrasyon ve ultrasantrifüj kullanılarak izole edilen bir insan retina pigment epitel hücre hattı olan ARPE-19 hücrelerinden türetilen eksozomların NTA okumalarını göstermektedir.



Şekil 3.4: ARPE-19 hücrelerinden türetilen eksozomların temsili NTA dağılım profilleri

(A) Boyut dağılım grafiği (B) ilgili videonun ekran görüntüsü

Şekil, [3] çalışmasından alınarak değiştirilmiş ve yeniden düzenlenmiştir.

3.3.3 Asimetrik Akış Alan Akış Fraksiyonlama (Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation; AF4)

AF4, hücre dışı veziküllerin farklı alt kümelerini ayırabilen birkaç yöntemden biridir. Bu teknikte, eksozomlar yoğunluklarına ve hidrodinamik özelliklerine göre ayrılır. Eksozomlar ileri laminer bir kanaldan akar ve Brownian hareketlerine bağlı olarak farklı popülasyonlara ayrılır. Daha küçük partiküller daha yüksek difüzyon oranlarına sahiptir ve daha hızlı hareket etme eğilimindedir; bunun aksine, daha büyük partiküller daha düşük difüzyon oranlarına sahiptir ve daha yavaş hareket etme eğilimindedir. Şu anda AF4 sistemleri üreten iki büyük şirket bulunmaktadır: Wyatt Technology ve Postnova. Birçok çalışma eksozom miktar tayini için AF4 ve NTA'yı karşılaştırmıştır. Önceki çalışmalarda 50 ila 150 nm arasında yalnızca tek ve geniş bir piki çözen NTA'nın aksine, AF4 iki ayrı eksozom alt popülasyonunu, 90 ila 150 nm arasında boyutlara sahip büyük eksozom veziküllerini ve 30 nm civarında boyutlara sahip küçük eksozom veziküllerini ayırt edebilmiştir [130], [131], [132]. Bu nedenle AF4, eksozom örneklerinin boyut heterojenliğini daha iyi ele alabilir ve eksozom alt küme karakterizasyonu için gelişmiş bir analitik teknik olarak kabul edilebilir.

3.3.4 Direnç Darbesi Algılama (Resistive Pulse Sensing; RPS)

RPS, veziküllerin boyutunu küçük bir delikten geçerken gösterdikleri elektrik direncine göre ölçer. RPS, 50-1000 nm çapındaki vezikülleri tespit edebilmektedir. Spectradyne, LLC nanopartiküllerin mikroakışkan ölçümünde lider bir şirkettir. Dinamik ışık saçılımı ve NTA ile karşılaştırıldığında, RPS partikül boyutu dağılımını ölçmede hem daha yüksek boyut çözünürlüğüne hem de daha iyi doğruluğa sahiptir. NTA'ya göre, RPS ile elde edilen eksozom konsantrasyonları TEM'den elde edilen sayıya daha yakındır. Grabarek ve arkadaşları, NTA ile ölçülen eksozomların RPS'den 5 ila 10 kat daha yüksek konsantrasyon gösterdiğini, çünkü eksozomları protein agregatlarından**,** lipozomlardan ve bakterilerden ayırt edemediğini bildirmiştir [133].

3.3.5 Akış sitometrisi (Flow cytometri)

Eksozomlar, standart akış sitometrelerinin 300 ila 500 nm arasında olan çözünürlük sınırının altında kaldığından, bu yöntemle doğrudan tespit edilemez. Birkaç çalışma, yüzeylerindeki spesifik membran belirteçlerini tespit ederek eksozom alt

gruplarını yarı kantitatif olarak ölçmek için yöntemler bildirmiştir [134], [135]. Kısaca, eksozomlar sürekli rotasyonla 15 dakikalık bir inkübasyon yoluyla aldehit/sülfat-lateks boncuklara bağlanır. Reaksiyon glisin ve sığır serum albümini (BSA) çözeltisi eklenerek durdurulur. Eksozom bağlı boncuklar PBS ile yıkanır ve BSA ile bloke edilir. Spesifik membran işaretleyici tespiti için birincil antikorlar ve floresan etiketli ikincil antikorlar sırayla eklenir. Eksozoma bağlı boncukların bir izotip kontrol ve ardından bir ikincil antikorla veya birincil antikor yokluğunda inkübe edilmesiyle negatif bir kontrol elde edilir. Melo ve arkadaşları bu yöntemi kullanarak pankreas kanseri hücrelerinden türetilen eksozomların tümörijenik olmayan hücrelerden türetilen eksozomlara kıyasla daha fazla glikan-1 taşıdığını bulmuştur [134].

3.3.6 ExoView Karakterizasyon Platformu

Son zamanlarda, NanoView Biosciences tarafından antikor bazlı eksozom dizileri geliştirilmiştir. Bu yöntem, çok küçük bir örnek hacmiyle eksozom alt popülasyonlarının fraksiyonlanmasını sağlar. Kısaca, eksozom yüzey belirteçlerine karşı antikorlar silikon çipler üzerine dizilir. Eksozom süspansiyonları veya eksozom içeren biyoakışkanlar gece boyunca çiplerle inkübe edilir. İnkübasyondan sonra çipler bir çalkalayıcı üzerinde PBS ile yıkanır ve havada kurutulur. Yakalanan eksozomlar Tek Parçacık İnterferometrik Yansıma Görüntüleme Sensörü teknolojisi kullanılarak tespit edilir. Bu teknik, partiküllerden gelen sinyalde gelişmiş kontrast sağlar. Daaboul ve arkadaşları bu yöntemi insan embriyonik böbrek hücre hattından elde edilen CD63-, CD8- ve CD9-pozitif eksozomları ve insan beyin omurilik sıvısından elde edilen CD171-pozitif eksozomları başarılı bir şekilde tespit etmek için kullanmıştır [136]. Akış sitometrisi ile karşılaştırıldığında, bu yöntem daha küçük bir örnek hacmi gerektirir ve daha az zaman alır.

3.3.7 *In-vivo* Eksozom İzleme

Eksozomların, mikroRNA kargolarını hücreden hücreye taşıyarak kısmen hücreler arası iletişime aracılık ettiğine inanılmaktadır. Bununla birlikte, eksozomların bu işlevi nasıl yerine getirdiğinin ayrıntıları büyük ölçüde bilinmemektedir. Eksozomların ebeveyn hücrelerinden ayrıldıktan sonraki akıbetini analiz etmek için şu anda iki yöntem mevcuttur. Bu eksozom etiketleme ve izleme yöntemleri şunları içerir: (1) 3 eksozomun PKH67 (yeşil) ve PKH26 (kırmızı) (Millipore Sigma,

ABD) gibi lipofilik karbosiyanin boyalarla boyanması; ve (2) CD63 gibi eksozomal işaretleyicilerin hücrelerde yeşil floresan protein (GFP) veya mCherry ile ifade edilmesi [46]. Eksozomların endositoz mekanizmalarını incelemek için konfokal mikroskopi, floresan etiketli eksozomlar ile plazma membranı arasındaki etkileşimin yanı sıra eksozomların ve alıcı hücrenin organellerinin birlikte lokalizasyonunun gözlemlenmesine olanak tanır. Dolaşımdaki eksozomların akıbetini *in vivo* olarak izlemek için, floresan etiketli eksozomlar farelere kuyruk veninden enjekte edilmiş ve IVIS Spectrum sistemi kullanılarak tespit edilmiştir [137]. GFP-CD63 genetik sıçanlar, GFP-CD63 füzyon proteininin sıçan embriyo-onik kök hücrelerine transfekte edilmesiyle üretilmiştir [137]. Bu transgenik sıçanlarda GFP-CD63 ile işaretlenmiş hücre dışı veziküller kan serumunda, anne sütünde ve amniyotik sıvıda bulunmuştur.

3.4 Eksozom Kargosunun Karakterizasyonu

Son yıllarda eksozom araştırmaları, hücresel iletişimdeki önemli rolleri ve biyobelirteç keşfi potansiyelleri nedeniyle yoğun ilgi görmektedir. Eksozomlar, çeşitli hücre türleri tarafından salgılanan, biyoakışkanlarda bulunan ve hücresel yüklerini hedef hücrelere taşıyarak genetik ve proteomik bilgiyi ileten küçük membranöz veziküllerdir. Eksozomal proteinler ve miRNA'lar, özellikle hastalıkların tanı ve tedavisinde yeni nesil biyobelirteçler olarak dikkat çekmektedir. Bu kapsamda, kütle spektrometresi (MS) ve yeni nesil dizileme gibi ileri analiz teknikleri, eksozomların kapsamlı karakterizasyonunu mümkün kılmakta ve bu veziküllerin biyolojik işlevlerinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Eksozomal içeriğin hücresel polarite, salgılama yönü ve patolojik durumlara bağlı olarak değişiklik göstermesi, bu yapıları yalnızca temel bilim araştırmalarında değil, aynı zamanda klinik uygulamalarda da önemli bir araç haline getirmektedir. Bu bölümde, eksozomal proteinlerin ve miRNA'ların biyobelirteç potansiyelleri, analiz yöntemleri ve işlevsel rolleri detaylı olarak ele alınacaktır.

3.4.1 Eksozomal Protein Karakterizasyonu

3.4.1.1 Proteomik

Eksozomların heterojenliği nedeniyle, eksozomal proteinler, eksozomları daha iyi anlamak ve tanı için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılıp kullanılamayacaklarını araştırmak amacıyla çeşitli hücre türlerinde ve biyoakışkanlarda kütle spektrometresi (MS) ile analiz edilmiştir [89], [90], [138]. Eksozomal proteinler hakkında bilgi sağlayan bir platform olan ExoCarta'ya göre, eksozomlarla ilişkili 9769 protein tanımlanmıştır. Gelişmiş gen ontolojisi analizi, eksozomal proteinlerin hücre altı lokalizasyon, protein bağlama, moleküler aktarım ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlevlerde yer aldığını göstermiştir.

MS analizinde numune hazırlama için kullanılan iki yaygın yöntem vardır: jel içi sindirim ve çözelti içi sindirim. Çözelti içi sindirim ile karşılaştırıldığında, jel içi sindirim, elektroforez sırasında kirleticilerin örneklerden uzaklaştırılabilmesi avantajına sahiptir. Jel içi sindirim yöntemi için, eksozomal proteinler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılabilir. Elektroforezin ardından jel şeritleri çoklu, eşit büyüklükte segmentlere ayrılır ve trip- sin ile jel içi sindirim ile işlenir. Sindirilen peptitler daha sonra yüksek performanslı bir sıvı kromatografi sistemine bağlı MS ile analiz edilebilir. Yol analizi ve gen ontolojisi gibi biyoinformatik yaklaşımlar daha sonra eksozomal protein profilinin daha ileri analizi için uygulanabilir [139].

3.4.1.2 Apikal ve bazolateral Eksozomal Proteinler

Epitel hücrelerinin uygun işlevi büyük ölçüde polaritelerine bağlıdır. Çok sayıda çalışma, apikal ve bazolateral olarak salgılanan epitel hücre kaynaklı eksozomların kargosunu karşılaştırmıştır. Klingeborn ve arkadaşları retinal epitel hücrelerinden apikal olarak salgılanan eksozomlarda 299 benzersiz protein ve bazolateral olarak salgılanan eksozomlarda 94 benzersiz protein bulmuşlardır [140] Bağırsak epitel hücrelerinde, apikal eksozomların endozomal trafiğe dahil olan proteinleri taşıdığı, bazolateral eksozomların ise adezyon ve stimülasyonda işlev gören proteinleri içerdiği bulunmuştur [141]. Bu çalışmalar, epitelyal polaritenin eksozom kargosunu etkilediğini ve farklı yönlerden salgılanan eksozomların polariteye özgü işlevler yürüttüğünü göstermektedir. Altta yatan mekanizmaları araştırmak ve bu yönlü

salgılanan eksozom alt popülasyonlarının işlevsel rollerini netleştirmek için ek çalışmalara ihtiyaç duyulacaktır.

3.4.1.3 Eksozomların Biyobelirteç Olma Potansiyelleri

Eksozomal içerikler potansiyel hastalık biyobelirteçlerinin tanımlanması için sıklıkla sorgulanmaktadır. Prostat kanseri antijeni 3 ve transmembran proteaz serine 2 prostat kanseri teşhisi için kullanılan iki eksozomal proteindir [142], eksozomal epidermal büyüme faktörü reseptörü VIII'in ise glioblastoma hastalarında daha yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir [143]. Eksozomal glikan-1'in pankreas kanseri hastalarında yükseldiği gösterilmiştir [134] ve eksozomal CD26 ve CD10'un karaciğer hasarının potansiyel belirteçleri olduğu öne sürülmüştür [144]. Western blot veya enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) yoluyla doğrulama ile birlikte proteomik analiz, eksozomal biyobelirteçlerin keşfi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

3.4.1.4 Yüzeye Bağlı ve Kapsüllü Eksozomal Proteinler

Transmembran ve sitozolik proteinlerde olduğu gibi, yüzeye bağlı ve kapsüllenmiş eksozomal proteinler farklı biyogenez mekanizmalarına sahip olmalı ve farklı işlevler yerine getirmelidir. Fitzgerald ve arkadaşları, sitokinlerin eksozomlardaki konumlarını sistematik olarak ana- lize etmek için bir yöntem geliştirmiştir [145]. Triton X-100 ve sonikasyon eksozom membranını parçalayabilmektedir. Triton X-100 veya sonikasyon işleminden önce ve sonra protein konsantrasyonunu karşılaştırarak, Fitzgerald ve arkadaşları 33 sitokin ve eksozom arasındaki kesin ilişkiyi yeniden ortaya koymuşlardır. Ayrıca Skliar ve arkadaşları, yüzey proteinlerinin sindirimi nedeniyle proteinaz K veya tripsin ile muameleden sonra eksozom boyutlarının küçüldüğünü bulmuşlardır [146]. Mi Zhou ve ark. laboratuvarlarında düşük konsantrasyonlu tripsinin (0,1 g tripsin/1 g eksozomal protein) membrana yayılan veya kapsüllenmiş proteinleri bozmadan yalnızca eksozomların dış yüzeyinde bulunan proteinleri sindirdiğini bulmuşlardır. Buna karşılık, yüksek konsantrasyonlu tripsin (0,3-1 g tripsin/1 g eksozomal protein) eksozom membranını destabilize ederek vezikülün iç kısmına erişim ve hem dış hem de iç yönleriyle ilişkili proteinlerin sindirimini sağlayabilir (yayınlanmamış veriler). Bu yöntem, belirli bir proteinin eksozomlarla ilişkilendirilme şeklinin belirlenmesi için alternatif bir yaklaşım sağlar.

3.4.2 Eksozomal microRNA

Eksozomal proteinler gibi, eksozomal miRNA'lar da kanser, enflamasyon ve yaşa bağlı dejenerasyonlar dahil olmak üzere çeşitli patolojik bağlamlarda araştırılmıştır. ExRNA, eksozomal RNA'lar alanında yeni bilgiler, protokoller ve son yayınlar sağlayan açık erişimli bir platformdur. miR-21'in yumurtalık, akciğer, meme ve özofagus skuamöz hücre kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde tümör kaynaklı eksozomlarda arttığı bulunmuştur. Eksozomal miR-155'in enflamatuar yanıtları koordine ettiği gösterilmiştir [147]. Eksozomal miR-9, miR- 107 ve miR-124'ün nöronal farklılaşmada rol oynadığı ve downregülasyonlarının Alzheimer hastalığı patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [148].

Tang ve arkadaşları eksozomal RNA için farklı izolasyon yöntemlerini karşılaştırmış ve Invitrogen Total Exosome RNA and Protein Isolation kitinin (Thermo Fisher Scientific) SeraMir Exosome RNA Column Purification Kit (System Biosciences) ve Invitrogen TRIzol LS Reagent (Thermo Fisher Scientific) ile karşılaştırıldığında yüksek ekstraksiyon verimliliği ve saflığı ile sonuçlandığını bulmuştur [121]. Yeni nesil dizileme teknikleri, tüm eksozomal mikroRNA pozisyonlarını haritalayan global dizileme verileri üretebilir. miRNA dizileri, yüzlerce ila binlerce miRNA'yı aynı anda tespit etmek için hibridizasyon kullanır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve ticari miRNA ve anti-miRNA antikor ürünleri, sonuçları ve mekanistik çalışmaları doğrulamak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Özetle, ortaya çıkan kanıtlar eksozomların ve eksozomal kargonun hücreler arası iletişimine önemli katkıları olduğunu desteklemektedir. Eksozom araştırmaları yeni ve hızla ilerleyen bir alandır. Yeni metodolojiler sürekli olarak geliştirilmektedir ve eksozom araştırmalarının klinik uygulamalarda kullanılabilirliğini dönüştürülmesini kolaylaştıracaktır.

4
MATERYAL VE METOT

4.1 Kullanılan Materyaller

Bu tez deneyleri için yatay elektroforez (Biorad, Kaliforniya, ABD), -20°C derin dondurucu (Bosch, Türkiye), soğutmalı santrifüj (Nüve, Türkiye), soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter, ABD), orbital shaker (Cleaver Scientific, Birleşik Krallık), hassas terazi (Radwag, ABD), buz makinası (Scotsman, ABD), optima XPN-100 ultrasantrifüj (Beckman Coulter, ABD), -80°C derin dondurucu (Panosonic, Japonya), UV görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Almanya), TEM (Hitachi 7800, Japonya), Qubit 2.0 Flurometer (Invitrogen,ABD), Class II Laminar Flow Steril Kabin (Labogene, Danimarka), vorteks (VELP Scientifica, İtalya), thermo-shaker (Biosan, Letonya) cihazları kullanılmıştır. Kimyasal malzeme olarak ise PBS (Phosphate Buffered Saline) Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD), etanol (Sigma Aldrich, ABD), methanol (Sigma Aldrich, ABD), NaN3 (Sigma-Aldrich, ABD), NaOH (Sigma-Aldrich, ABD), Western blot application solution kit (Cell Signaling Technology, ABD), 4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-FreeTM Protein Gels (Bio-Rad, ABD), primer antikorlar (Cell Signaling Technology, ABD), sekonder antibodiler (Cell Signaling Technology, ABD), kolon kromatografisi (qEV, Izon) kullanıldı.

4.2 Tez Metodu

Mevcut tezde etik onamın alınması, insan kan plazmasının eldesi ve depolanması, SEC ile eksozom izolasyonu, eksozomal protein izolasyonu, florometrik yöntemle protein mikar tayini ve Western blot deneyleri Bursa Uludağ Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Bilim Dalı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Ultrasantrifüjle eksozom izolasyonu, eksozomal proteinlerin BCA ölçümü Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Birimi'nde (DENHAB) gerçekleştirildi. NTA ölçümleri hizmet alımı yoluyla Hillal Biyoteknoloji Biyomühendislik Ltd. Şti.'de gerçekleştirildi. TEM görüntülemeleri, hizmet alımı yoluyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARUM) gerçekleştirildi.

4.3.1 Etik Onam ve İnsan Kan Plazmasının Eldesi

Bu çalışma için Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul' unun 2024-13/ 30 sayılı kararına göre etik kurul onayı alındı. Ardından gönüllüler için onam formları imzalatıldı.

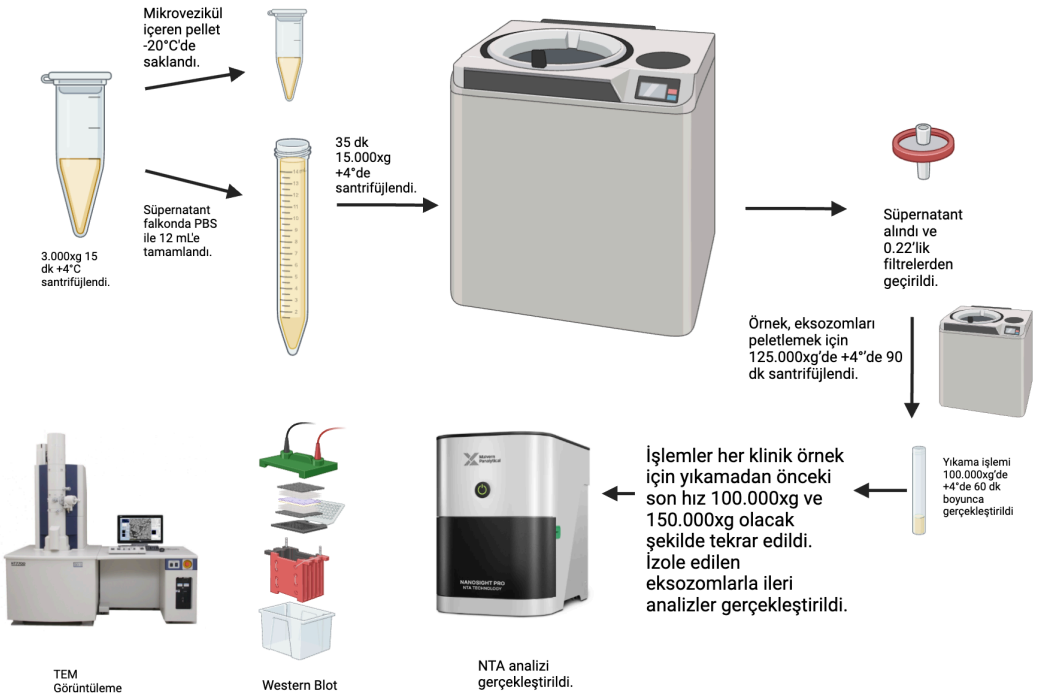
Bireylerden mor kapaklı EDTA'lı tüplere kan alındı. Alınan maksimum bir saat içinde 4000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Oluşan pelet hareketlendirilmeden üst faz alındı, 500'er uL olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine alikotlandı ve -80°C'de depolandı.

4.3.2 Filtrasyon ve Ultrasantrifüjleme

Elde edilen insan kan plazmaları eksozom izolasyonu aşamasına dek don- çöz döngüsüne uğratılmadı. Plazma materyali ultrasantrifüjle eksozom izolasyonunun hemen öncesinde çözdürüldü. 2 mL plazma örneği filtrelenmiş PBS ile 10 mL'e tamamlandı. Ardından depolama sırasında oluşmuş olabilecek protein agregatlarından kurtulmak için 3.000xg'de 15 dk +4C°de ön santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası oluşan pelet hareketlendirilmeden süpernatant kısmı alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı. Pelet kısmının mikrovezikül içerdiği varsayıldığı için yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve etiketlendi. Ardından süpernatant tüplerindeki örnekler steril ultrasantrifüj tüplerine aktarıldı. Aktarılan tüplerde örneklerin üzerine PBS eklenerek toplam hacim 12 mL'e getirildi. Steril ultrasantrifüj tüpleri denge tüpüyle birlikte ultrasantrifüjün çelik tüplerine takıldı. Çelik tüplerin kapakları vidalandı ve 35 dk 15.000xg +4°de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant alındı ve 0.22'lik filtrelerden geçirildi. Ardından filtrelenmiş örnekler aynı işlemlerle ultrasantrifüje kondu ve eksozomları peletlemek için 125.000xg'de +4°'de 90 dk santrifüjlendi.

Tüm işlemler aynı örneklerde aynı başlangıç miktarında farklı hız denemelerini gerçekleştirmek için tekrarlandı ve yıkamadan önceki son basamaktaki eksozomları peletleme hızı değiştirildi. Toplamda 3 farklı son hızda ultrasantrifüj gerçekleştirildi. Bu hızlar sırasıyla 100.000xg, 125.000xg ve 150.000xg idi. Bu üç hızda eksozomlar peletlendikten sonra yıkama adımı tüm koşullar için soğuk ve filtrelenmiş PBS ile 100.000xg'de +4°de 60 dk boyunca gerçekleştirildi.

Ultrasantrifüjde gerçekleştirilen izolasyon şematik gösterimle Şekil 4. içerisinde özetlenmiştir.



Şekil 4.1: Ultrasantrifüjle eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu iş akış şeması

Şekil 4.1, BioRender v.4, 2024 ile oluşturulmuştur.

4.3.3 Boyut Dışlama Kromatografisi

SEC yöntemi, farklı boyutlardaki partiküllerin ayrıştırılması için kullanılmaktadır. Bu yöntemde, örnekler bir porlu polisakkarit reçine ile dolu kolonlar aracılığıyla ayrıştırılır. Bu süreçte daha büyük partiküller, reçine gözeneklerine giremeyip daha hızlı bir şekilde kolonun alt kısmına ulaşırken, daha küçük partiküller gözeneklere girip daha uzun süre kolon içinde kalır. Böylece, partiküller büyüklüklerine göre sıralanır.

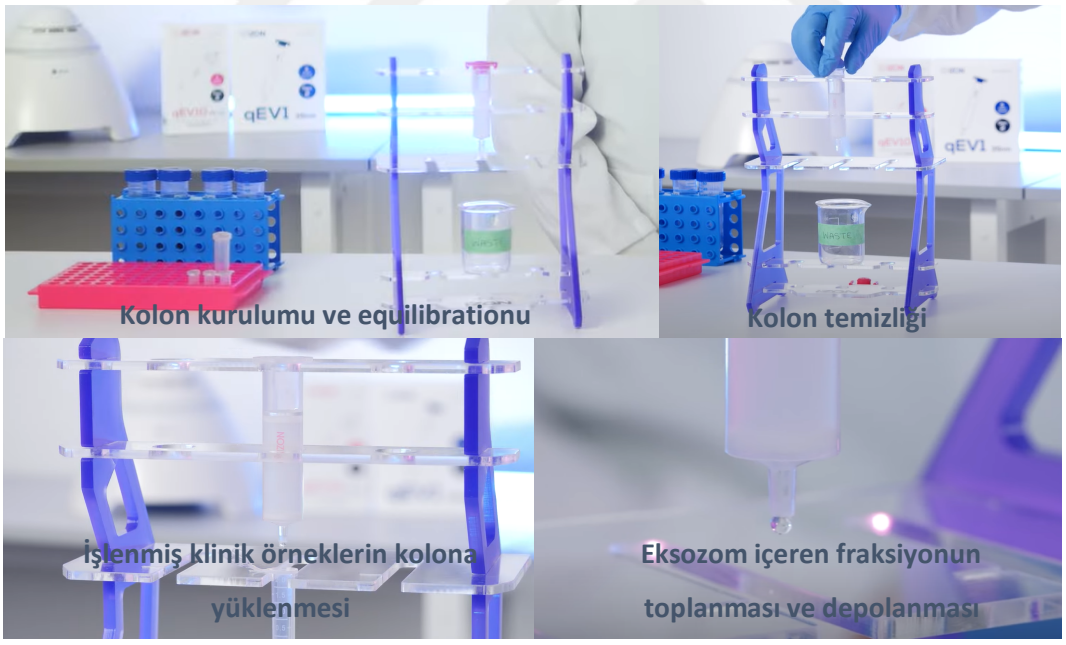
Plazma örneğinin ön hazırlık aşamasında, plazma örnekleri santrifüjlenerek büyük partiküllerden ve hücresel debristen arındırıldı. Santrifüj işlemi 1.500xg'de 10 dakika uygulandı, ardından süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak 10.000xg'de tekrar santrifüjlendi. Bu işlem, daha temiz bir başlangıç materyaliyle kolon tıkanıklığını önlemek amacıyla gerçekleştirildi.

Kolon, PBS ile doldurulduu ve işlem sıcaklığına (18-24°C) getirildi. Önceden filtrelenmiş PBS ile kolon yıkandı. Örnek, kolonun üst kısmına dikkatlice yüklendi

ve ardından kolon boyunca yerçekimi etkisiyle akıtıldı. Bu süreçte, kolonun altından çıkan sıvılar hacimsel olarak toplandı.

Toplanan hacimlerin analizi sonucunda, istenen partiküllerin bulunduğu saflaştırılmış toplama hacmi (Purified Collection Volume, PCV) belirlendi. Yapılan optimizasyonlarla plazma örneği yüklendikten 5 mL sonrasında elde edilen 2.1 mL fraksiyonun eksozom içerdiği belirlendi. Elde edilen partiküller, ileri analizler için depolandı.

Kolonun bir sonraki eksozom izolasyonuna hazır hale gelmesi için 0.22 um'lik filtreyle filtrelenmiş 0.5 M NaOH ile yıkandı, ardından PBS tamponuyla nötralize edilmesi sağlandı. Bu işlem, protein kalıntılarının uzaklaştırılması ve çapraz kontaminasyonun önlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Temizlenmiş kolonlar, %0.05 w/V NaN_3 bakteriosidal ajanıyla saklanır ve bir sonraki kullanım için hazır hale getirildi. Kolonun görüntüsü Şekil 4.2 içerisinde verilmiştir.



Şekil 4.2: Kolon kromatografisiyle eksozom izolasyonu

4.3.3 Protein İzolasyonu

Ultrasantrifüjle ve boyut dışlama kromatografisiyle izole edilen eksozomlardan protein izolasyonu yapıldı. Protein izolasyonunu gerçekleştirmek için RIPA

(Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer) tamponu hazırlandı. Bu amaçla 2 mL 1x cell lizis buffer, 18 mL dH2O, 7 mL %2'lik SDS, 20 µL NP40 ve ½ EDTA free proteaz inhibitör kokteyl tablet kullanıldı. Ultrasantrifüjle izole edilen eksozom örneklerinden 200 µL örneğin üzerine 100 µL RIPA Buffer eklendi. Boyut dışlama kromatografisiyle elde edilen eksozom örnekleri için 300 µL eksozom örneğine 250 µL RIPA buffer eklendi. Ardından tamponun eksozomlara homojen şekilde nüfuz etmesini sağlamak ve protein çözünmesini artırmak amacıyla karışım 3 dakika boyunca vortekslendi. Liziz esnasında proteinlerin bozulmasını önlemek ve proteaz aktivitesinin baskılanmasını sağlamak amacıyla karışım -20°C'de 15 dk bekletildi. Parçalanmış eksozomların membran kalıntılarının çöktürülmesi amacıyla karışım +4°C'de 20.000xg'de 15 dk santrifüjlendi. Oluşan pelet hareketlendirilmeden protein içeren süpernatant kısmı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve uygun şekilde etiketlendi.

4.3.4 Protein Miktarlarının Florometrik ve Spektrofotometrik Yöntemle Ölçümü

4.3.4.1 Spektorofotometrik yöntemle ölçüm: BCA

Pierce™ BCA Protein Assay kiti kullanılarak protein miktar tayini gerçekleştirildi. Standart çözeltiler, bilinmeyen örneklerin seyreltilmesinde kullanılan tampon veya seyreltiyle hazırlandı. Bovin Serum Albumin (BSA) standartları, 0 µg/mL ile 2000 µg/mL arasında değişen bir konsantrasyon aralığında oluşturuldu.

Çalışma reaktifi, Reaktif A'dan 50 ve Reaktif B'den 1 birim alınarak 50:1 birim oranında karıştırılarak hazırlandı. Bu karışımın berrak ve yeşil renkte olması sağlandı.

BSA standartları ve bilinmeyen örneklerden her biri uygun test tüplerine veya mikroplak kuyucuklarına pipetlenerek ekleme yapıldı. Test tüpü prosedürü kapsamında, her bir örneğe çalışma reaktifinden belirlenen miktar ilave edilerek karıştırıldı. Numuneler 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi ve ardından oda sıcaklığına getirildi. Absorbans ölçümleri, spektrofotometre kullanılarak 562 nm'de yapıldı.

Mikroplak prosedüründe ise her kuyucuğa çalışma reaktifinin eklenmesinin ardından plakalar 30 saniye boyunca çalkalandı. Mikroplaklar, 37°C'de 30 dakika

inkübe edildi ve ardından oda sıcaklığına soğutularak 562 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi.

Sonuçların analizinde, örnek tekrarlarının ortalama absorbans değeri tüm örneklerden çıkarılarak standart eğri oluşturuldu. Elde edilen eğri üzerinden, bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı. Dilüsyon faktörüne göre konsantrasyon değerleri belirlendi. Örnekler ve standartlar için aynı işlem adımları takip edildi ve ölçümler reaksiyon dengeye ulaştıktan sonraki 10 dakika içerisinde tamamlandı.

4.3.4.1 Florometrik yöntemle ölçüm: Qubit 2 Protein Ölçüm Kiti

Qubit Protein Assay yöntemi, protein konsantrasyonunu florometrik olarak belirlemek için kullanıldı. Ölçüme başlamadan önce, kalibrasyon standartları ve numuneler için eksozomal protein örneği sayısı kadar PCR tüpü hazırlandı ve her biri uygun şekilde etiketlendi. Çalışma solüsyonu hazırlanırken Qubit Protein Reaktifi, Qubit Protein Tamponu ile 1:200 oranında seyreltildi.

Standartların hazırlanmasında, her bir tüpe 190 µL çalışma solüsyonu eklendi ve ardından 10 µL standart çözeltisi ilave edildi. Numune tüplerinde ise, toplam hacim 200 µL olacak şekilde, çalışma solüsyonu ile birlikte uygun hacimde numune eklendi. Tüm tüplerin içerikleri, homojen bir karışım elde edilmesi için birkaç saniye boyunca ve köpük oluşumundan kaçınılarak nazikçe vortexlendi.

Hazırlanan tüpler, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpler Qubit Fluorometre cihazına yerleştirildi. Ölçümler, önce kalibrasyon standartlarından başlanarak gerçekleştirildi, ardından numunelerin ölçümleri tamamlandı. Elde edilen sonuçlar ileri analizler kaydedildi.

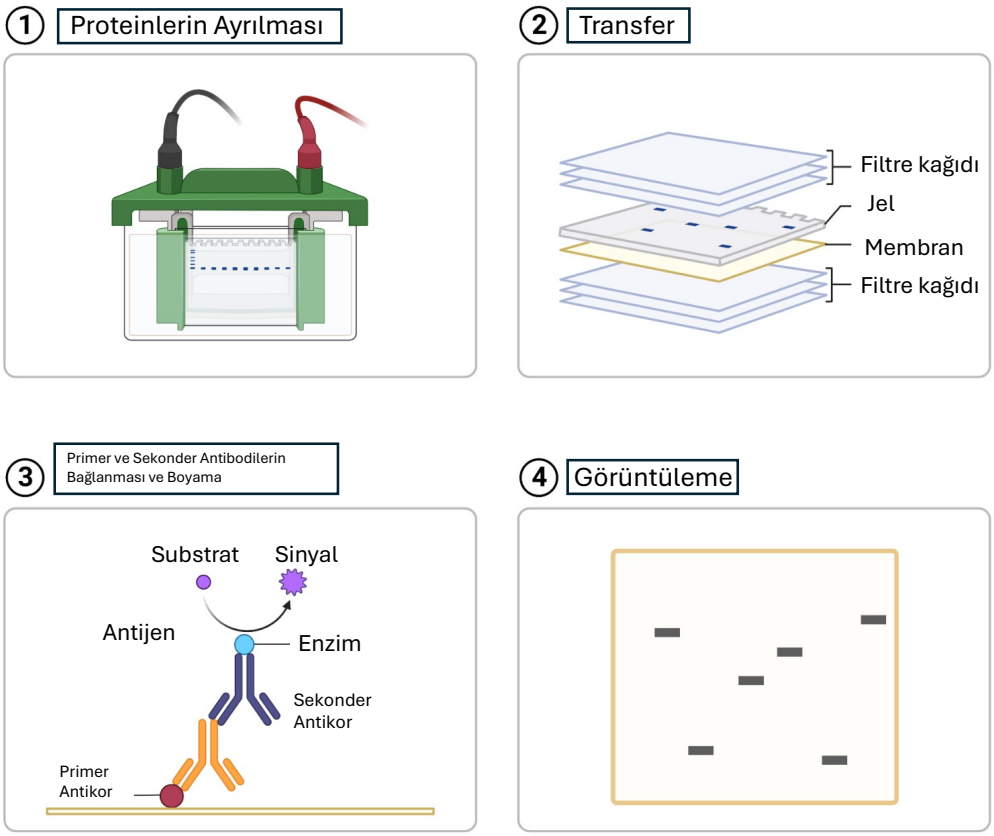
4.3.4 Western Blot

Ultrasantrifüjle ve boyut dışlama kromatografisiyle izole edilen eksozomların protein karakterizasyonu için Western blot deneyi gerçekleştirildi. CD63, CD81 ve CD9 primer antikorlarının tamamı TBST ile 1:750 oranında hazırlandı ve orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Tüm deneylerde kullanılan sekonder antikor 1:1000 oranında hazırlandı. Bu amaçla konsantrasyonu belirlenen proteinlerin tamamı için 20 µL protein örneğine 5 µL Loading Dye eklendi ve vortekslendi. Örnekler 100°C'ye getirilmiş ısıtıcı blokta 5 dk boyunca bekletildi. Ardından 1 dk boyunca buzda bekletilen örnekler elektroforez sisteminin içerisine yerleştirilen jele

yüklendi. Jelin kurumaması için tanka jelin tamamını kaplayacak yükseklikte yürütme tamponu -10x TGS 1X'e seyreltilerek- eklendi. Yükleme sırasında örneklerin kontrollü bir şekilde kuyulara girmesini sağlayabilmek için 25 µL örnek ilgili kuyuya 10 µL- 10 µL- 5 µL olacak şekilde yüklendi. Ardından elektroforez sistemi 100 V'ta 5 dk boyunca çalıştırıldı. Örnekler kuyulardan jel kısma inince sistem +4 °C'ye taşındı ve yürütme işlemi 300 W 100 V'ta 120 dk boyunca sürdürüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel sistemden çıkartıldı ve jelde sandviç işlemi sırasında kabarcık yaratabilecek düzensizlikler -kuyuların uzantısı gibi- kesildi. Transfer tamponu 100 mL tris glisin, 200 mL metanol ve 700 mL dH2O ile hazırlandı. Ardından jel transfer tamponunun içerisinde hazırlanan sandviç sistemine taşındı. Ardından jelin üzerine membran yerleştirildi ve jelden membrana transferin sağlıklı gerçekleşebilmesi için membranın üzerine konan kartona baskı uygulanarak membranla jel arasındaki hava kabarcıklarının çıkması sağlandı.

Elektroforez sisteminin parçaları distile su ile yıkandı. Sandviç sistemi elektroforez tankına yerleştirildi ve tank transfer tamponuyla dolduruldu. Sistemin ısısını kontrollü olması amacıyla tanka buz aküleri yerleştirildi. Elektroforez 250 mA ve150 V'a ayarlandı. Tank buzun içerisine gömüldü ve 120 dk boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer süresinin sonunda membran sistemden çıkartıldı ve ponceau ile muamele edilerek proteinlerin membrana geçtiği doğrulandı. Ardından ponceau gidene kadar membran suyla yıkandı. Daha sonra membran orbital çalkalayıcı üzerinde taze hazırlanmış %5 milkle 60 dk boyunca muamele edildi. 60 dakikanın sonunda milk döküldü ve membran 5 dk boyunca TBST ile yine orbital çalkalayıcıda yıkandı. TBST ile 5 dakikalık 2 yıkama işlemi daha gerçekleştirildi. BSA ile 1:750 oranında CD81 Primer antikoru hazırlandı. Bağlanmaya hazır hale getirilen membrana tüm yüzeyini kaplayacak kadar hazırlanan CD81 primer antikor eklendi. Orbital çalkalayıcı üzerinde antikorun membranın her yerine temas etmesi sağlandı. Sistem +4°C'de overnight bekletildi. Ertesi gün primer antikor membrandan uzaklaştırıldı ve 1:1000 oranında hazırlanan seconder antikor ile oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 90 dk muamele edildi. 90 dakikanın sonunda Seconder antikor, TBST ile 5 dk yıkandı, bu işlem üç kez tekrar edildi. Kemilüminesans pierce kitinin iki solüsyonu 1:1 oranında hazırlandı. TBST'den alınan membranın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde görüntüleme solüsyonu

eklendi. Ardından görüntüleme cihazında "High" seçeneğinde 12 dk boyunca okutuldu görüntüler elde edildi ve bantlar değerlendirildi. Western blot deneyinin temel basamakları Şekil 4.3 içerisinde verilmiştir. Western membrane görüntüleri ve Ponceu boyamaları Ek şekil A.32'de verilmiştir.



Şekil 4.3: Western blot deneyinin temel basamakları

Şekil 4.3, BioRender v.4, 2024 ile oluşturulmuştur.

4.3.4.1 Reblot Deneyleri

Reblot (stripping) solüsyonu manuel olarak hazırlandı. 10 mL %10 SDS, 0,8 mL merkaptoetanol, 67,5 mL dH2O ve 0,5 M Tris HCl hazırlandı. Karışım birleştirilmeden önce Tris HCl'in pH'ı 6.8'e getirildi. Ardından tüm kimyasallar çözünene dek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Solüsyon; western membranlarından primer ve sekonder antikorları sökmesi için oda sıcaklığında 30 dk boyunca orbital çalkalayıcıda çalkalandı. Ardından TBST ile 3 kez 10'ar dk yıkandı. Ardından ilgili primer antikorla bir gece boyunca muamele edildi.

Sekonder primerin bağlanması ve görüntüleme “Western blot” başlığında (4.3.4) tarif edildiği gibi gerçekleştirildi.

4.3.5 Nanopartikül İzleme Analizi (Nanoparticle Tracking Assay; NTA)

NTA tekniği, Brown hareketi sergileyen parçacıklardan saçılan ışığı yakalayarak, her bir parçacığın bireysel olarak izlenmesini ve analiz edilmesini sağlar. NanoSight Pro, hem ışık saçılımı hem de floresans modlarında çalışarak yüksek çözünürlükte büyüklük ve konsantrasyon verileri sağlar.

Floresans algılama yeteneği, numunelerdeki biyobelirteçlerin veya eksozomal kargonun doğrulanması ve ana materyalle kontaminantların ayrıştırılmasına olanak tanır. Cihaz, sürekli örnek akışı sağlayan bir şırınga pompası ile donatılmış olup, fotobleaching'e uğramış parçacıkların etkisini ortadan kaldırır ve ölçüm sırasında taze parçacıkların analize dahil edilmesini sağlar.

NTA ölçümleri Nanosight Pro (Malvern Panalytical) cihazı ile gerçekleştirildi. Eksozom ve mikrovezikül örnekleri 1:100 oranında dilüe edildi. Her ölçüm 5 kez tekrarlanmıştır. Tekrarlı ölçümlerin verdiği grafikler üst üste çakıştırılmış ve ortalama grafikleri çizilmiştir. Tekrarlı ölçümlerle elde edilen 5 grafik verisi eklerde yer almaktadır (Ek şekil l, A21, A21, A22, A23, A24, A25, A26, A27, A28, A29, A30, A31).

4.3.6 TEM

Eksozom örneği bakır grid üzerine yerleştirilmiş ve uranil asetat ile kontrast boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesitler, dijital görüntüleme özelliklerine sahip bir transmisyon elektron mikroskobu (Hitachi 7800) kullanılarak analiz edilmiş ve fotoğraflanmıştır. TEM analizi, eksozom yapılarının ayrıntılı bir şekilde incelenmesini ve hücresel değişikliklerin detaylı olarak değerlendirilmesini sağlamıştır [149].

4.3.7 İstatistiksel Analiz

Farklı yöntemler ve bireylerden elde edilen eksozomların boyut ve konsantrasyon parametreleri arasındaki farkları değerlendirmek için istatistiksel analiz yapılmıştır. Parametreler arasında Mode (nm), Mean (nm), Std. Dev. (nm), D10 (nm), D50 (nm)

ve D90 (nm) yer almıştır. Örneklem sayısı 30'dan küçük olması ($n = 3$), ve verilerin normal dağılıma uygun olmaması nedeniyle parametrik olmayan bir yöntem olan Kruskal-Wallis testi tercih edilmiştir [150]. Bu test, gruplar arasındaki medyan farklarını analiz etmek için uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir. Analizler Python programlama dili ile gerçekleştirilmiştir [151].

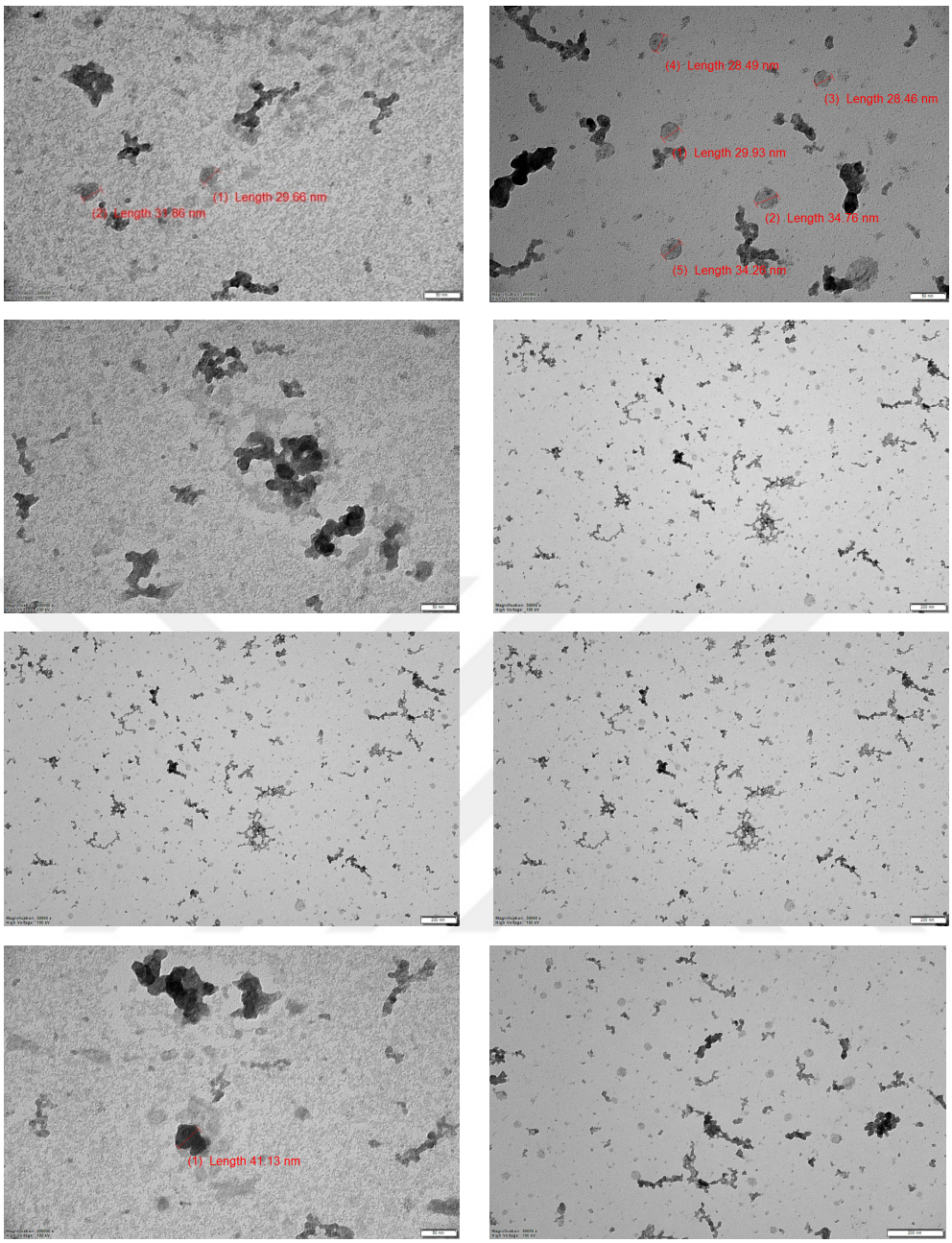
5
BULGULAR

5.1 TEM Görüntülemeleri

TEM analizi sonucunda, eksozomların morfolojik özellikleri ve boyutları detaylı bir şekilde incelenmiştir. Görsellerde, tipik eksozomal boyut aralığında (yaklaşık 30-150 nm) partiküller tespit edildi. Belirli partiküllerin ölçümleri kırmızı renk ile belirtilmiş olup, bunlar sırasıyla 29,66 nm, 28,49 nm, 28,46 nm, 29,93 nm, 34,76 nm, 34,49 nm ve 41,13 nm olarak kaydedildi. Bu boyutlar, izole edilen veziküllerin, eksozomlar için literatürde belirtilen karakteristik boyut aralığına uyum sağladığını göstermektedir (Şekil 5.).

Görsellerde ayrıca, eksozomlara özgü yuvarlak morfoloji net bir şekilde gözlendi. Ayrıca, eksozomların çevresinde daha büyük yapılar ve muhtemelen agregatlar da tespit edilmiştir, bu da izolasyon sürecinde olası protein ya da lipit birikimlerini işaret edebilir.

Elde edilen TEM verileri, kullanılan izolasyon yönteminin eksozomları başarıyla izole ettiğini doğrulamaktadır. Görseller, izole edilen eksozomların genel yapısını ve boyutlarını tanımlamak için yeterli kaliteye sahiptir ve çalışmanın diğer analizleriyle uyumlu sonuçlar sunmaktadır.



Şekil 5.1: Eksozomların TEM görüntülemeleri

5.2 NTA Sonuçları

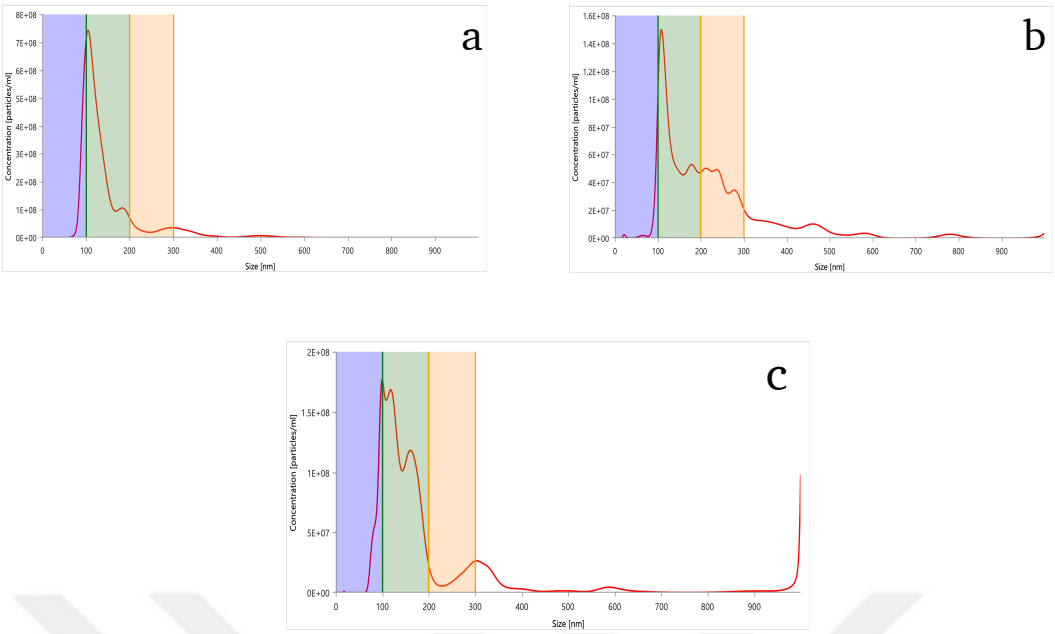
100.000xg santrifüjleme ile izole edilmiş eksozomlara ait NTA analiz sonuçları, üç farklı klinik örnek için değerlendirildi. Bu analizler, izole edilen eksozomların boyut dağılımı ve konsantrasyonu hakkında ayrıntılı bilgi sağlamaktadır.

Birinci klinik örnekten izole edilen eksozomların NTA analizinde, partikül boyutlarının ağırlıklı olarak 30-150 nm aralığında yoğunlaştığı gözlendi. Bu dağılım, eksozomların literatürde tanımlanan boyut aralığına uyumlu olduğunu göstermektedir. Konsantrasyon analizi, bu boyut aralığında yoğun bir partikül varlığını doğrulamıştır (Şekil 5.2-a).

İkinci klinik örneğe ait NTA sonuçları, partiküllerin yoğunluğunun 30-150 nm arasında yoğunlaştığını ve dağılımın homojen bir yapıya sahip olduğunu gösterdi. Özellikle 100 nm civarında bir yoğunlaşma dikkat çekmiştir, bu da eksozom izolasyonunun hedeflenen boyut aralığında başarılı olduğunu gösterdi (Şekil 5.2-b).

Üçüncü klinik örnekte, partikül boyut dağılımı 30-200 nm arasında değiştiği gözlemlendi. Bu örnek, diğer klinik örneklere kıyasla daha geniş bir boyut aralığında partikül yoğunluğu gösterdi. Bununla birlikte, 100-150 nm aralığında belirgin bir yoğunluk dikkat çekiciydi. Bu durum, izole edilen veziküllerin eksozom karakteristiği taşıdığını ortaya koymaktadır (Şekil 5.2-c).

Tüm klinik örneklerin NTA analizleri, eksozom boyut aralıkları ve konsantrasyonlarının uygun aralıkta olduğu ve kullanılan izolasyon yönteminin başarıyla hedeflenen eksozomları izole ettiği doğrulandı. Bu bulgular, çalışmanın diğer analizleriyle uyumlu sonuçlar gösterdi.



Şekil 5.2: 100.000xg ile izole edilmiş plazma eksozomların NTA sonuçları

Birinci (a), ikinci (b) ve üçüncü (c) klinik örneğe ait

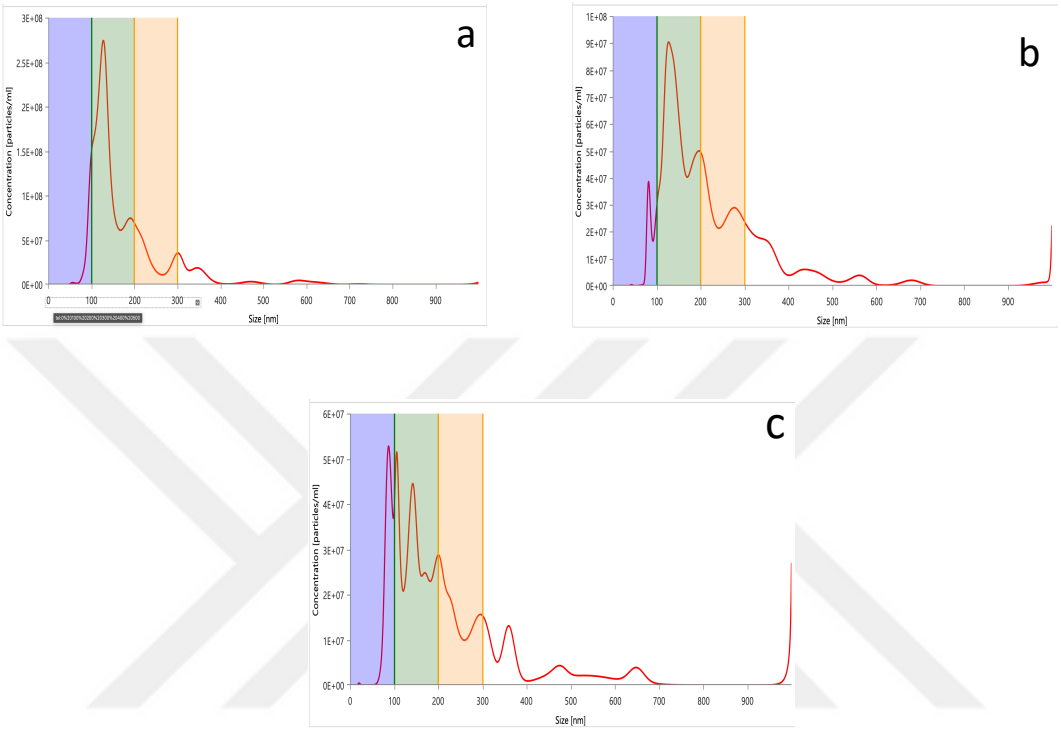
125.000xg santrifüjleme yöntemi ile izole edilen eksozomların NTA analiz sonuçları üç farklı klinik örnek için değerlendirildi.

Birinci klinik örneğe ait NTA analizinde, partiküllerin büyük çoğunluğunun 30-150 nm aralığında yoğunlaştığı görüldü. Bu aralık, eksozomların literatürde belirtilen boyut aralığı ile uyumludur. Ayrıca, 100 nm civarında belirgin bir pik gözlemlendi. Bu durum, ultrasantrifüjleme yöntemiyle eksozomların başarıyla izole edildiğini göstermektedir (Şekil 5.3-a).

İkinci klinik örnekte partikül boyutlarının ağırlıklı olarak 30-200 nm aralığında yoğunlaştığı ve 100-150 nm arasında belirgin bir artış olduğu tespit edildi. Konsantrasyon grafiği, bu boyut aralığında yüksek bir partikül yoğunluğuna işaret ettiği belirlendi. Bu bulgu, izole edilen veziküllerin eksozom olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 5.3-b).

Üçüncü klinik örnekteki NTA sonuçları, diğer örneklere göre daha geniş bir boyut dağılımına sahip olduğu gözlemlendi. Partiküllerin 30-200 nm aralığında yoğunlaştığı ve 100 nm civarında pik yaptığı gözlendi. Bu, eksozomların başarılı bir şekilde izole edildiğini ve homojen bir dağılıma sahip olduğunu işaret etmektedir (Şekil 5.3-c).

Genel olarak, tüm klinik örneklerde 125.000xg ile izole edilen eksozomların boyut ve konsantrasyon dağılımları literatür ile uyumlu bulundu, yöntemin hedeflenen eksozomları etkili bir şekilde izole ettiği doğrulandı.



Şekil 5.3: 125.000xg ile izole edilmiş plazma eksozomların NTA sonuçları
Birinci (a), ikinci (b) ve üçüncü (c) klinik örneğe ait

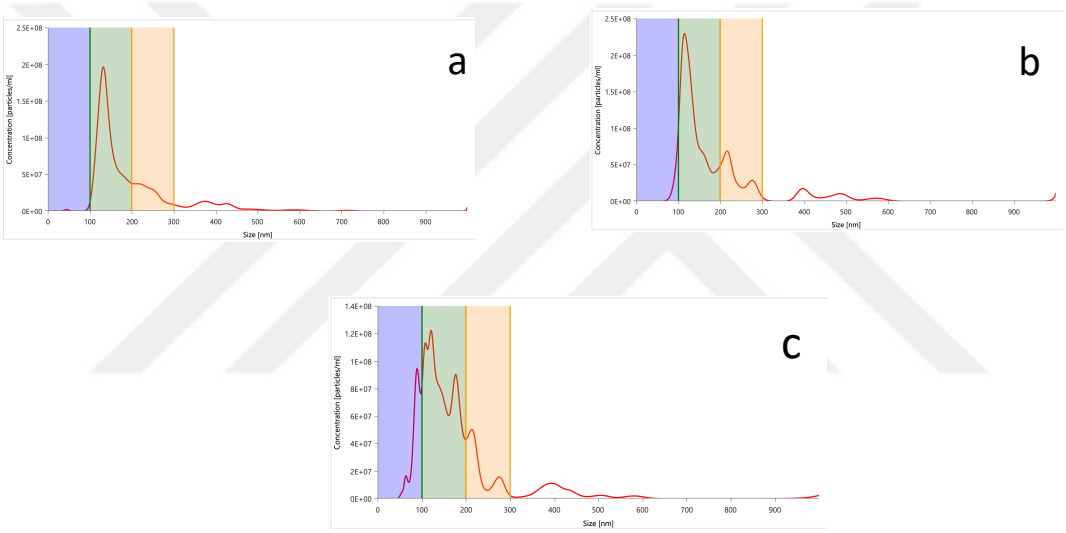
150.000xg santrifüjleme yöntemi kullanılarak izole edilen eksozomların NTA analiz sonuçları üç farklı klinik örnek için değerlendirildi.

Birinci klinik örnekte partiküllerin yoğunlaştığı boyut aralığı 30-150 nm olarak belirlendi. Bu aralık, literatürde eksozom boyutları için tanımlanan sınırlarla uyumludur. Özellikle 100 nm civarında bir pik gözlenmiş ve bu da izolasyon işleminin hedeflenen partikülleri içerdiği bulundu (Şekil 5.4-a).

İkinci klinik örneğin sonuçlarında partikül boyutlarının 50-200 nm arasında yoğunlaştığı ve 120-150 nm arasında belirgin bir artış sergilediği tespit edildi. Elde edilen grafik, bu aralığın yüksek bir partikül yoğunluğu gösterdiğini ve bu örnekte izole edilen veziküllerin başarılı bir şekilde eksozomlarla örtüştüğünü işaret etmektedir (Şekil 5.4-b).

Üçüncü klinik örnek için yapılan analizde, partiküllerin 50-200 nm aralığında dağılım gösterdiği ve özellikle 150 nm civarında yoğunlaştığı görüldü. Bu dağılım, diğer klinik örneklerle tutarlı bir şekilde, eksozom izolasyonunun etkili olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 5.4-c).

Genel olarak, 150.000xg ile yapılan santrifüjleme yöntemiyle izole edilen eksozomların boyut ve konsantrasyon dağılımları, literatürde belirtilen eksozom özelliklerine uygun olduğu bulundu. Tüm örneklerde izolasyonun başarılı olduğu ve hedef partikülleri içerdiği anlaşıldı.



Şekil 5.4: 150.000xg ile izole edilmiş plazma eksozomların NTA sonuçları
Birinci (a), ikinci (b) ve üçüncü (c) klinik örneğe ait

SEC yöntemi kullanılarak izole edilen eksozomların NTA analiz sonuçları, üç farklı klinik örnek için değerlendirildi.

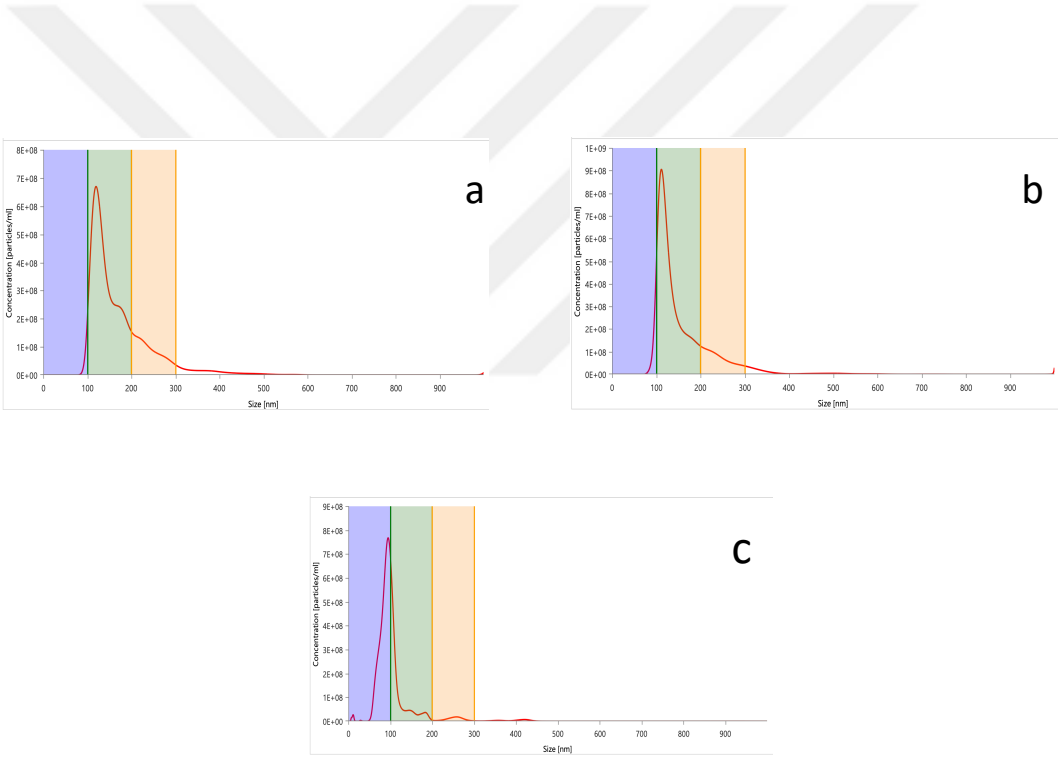
Birinci klinik örnekte eksozom partiküllerinin yoğunluğu, 50-150 nm aralığında belirgin bir pik ile gözlendi. Bu sonuç, SEC yöntemiyle hedeflenen boyutlarda eksozom izolasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir (Şekil 5.5-a).

İkinci klinik örneğin analizinde partiküllerin boyut aralığı 70-200 nm arasında yoğunluk gösterdi. Özellikle 120 nm civarında bir pik saptanmış olup, bu, izole

edilen partiküllerin büyük bir kısmının eksozomlarla örtüştüğünü işaret etmektedir (Şekil 5.5-b).

Üçüncü klinik örnekte, partiküllerin boyut dağılımının 60-180 nm arasında olduğu ve en yüksek yoğunluğun 110-140 nm aralığında görüldüğü tespit edildi. Bu analiz, SEC yönteminin farklı klinik örnekler için de başarılı izolasyon sağladığını doğrulamaktadır (Şekil 5.5-c).

Genel olarak, SEC yöntemi ile yapılan izolasyonda, izole edilen veziküllerin boyut ve konsantrasyon dağılımları literatürde tanımlanan eksozom özellikleri ile uyumludur. Elde edilen sonuçlar, yöntemlerin klinik örneklerde güvenilir bir şekilde uygulanabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.5: SEC ile izole edilmiş plazma eksozomların NTA sonuçları

Birinci (a), ikinci (b) ve üçüncü (c) klinik örneğe ait

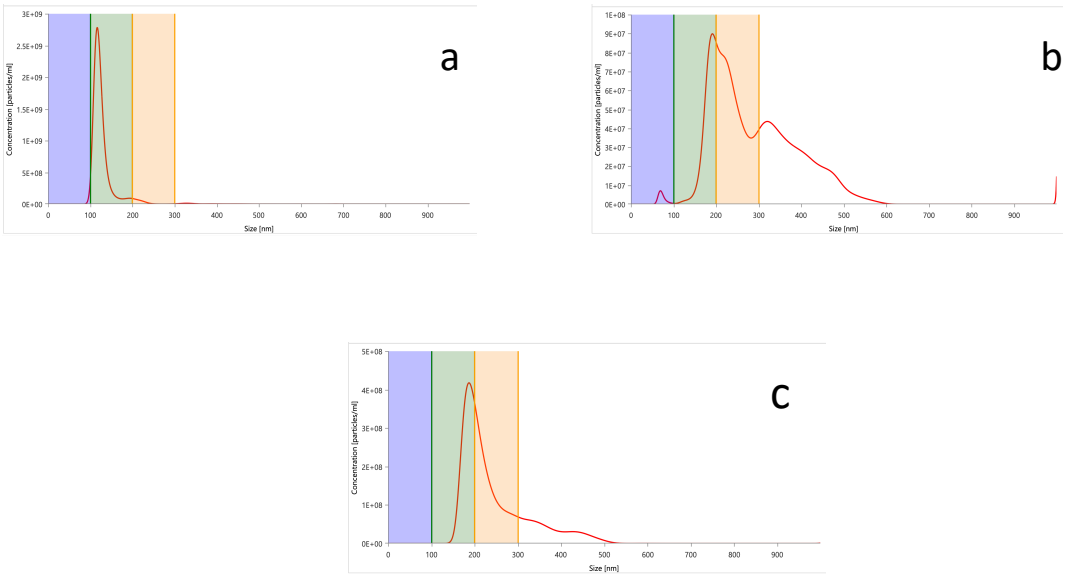
Şekil 5.6, birinci örneğe ait mikrovezikül izolasyonunun NTA analiz sonuçları, partikül boyut dağılımı ve konsantrasyon yoğunluğunu detaylı bir şekilde göstermektedir.

Partikül boyut dağılımı, 50-150 nm arasında yoğunlaştığı belirlendi. Özellikle 100 nm civarında belirgin bir pik gözlemlendi. Bu sonuç, mikrovezikül izolasyonunun hedeflenen boyut aralığında başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir (Şekil 5.6-a).

Bu grafikte partiküllerin boyut aralığı genişlemiş olup, 70-300 nm arasında yoğunlaşma gözlendi. Pik, 120-200 nm arasında belirginleştiği bulundu. Bu durum, mikrovezikül içeriğinin geniş bir boyut yelpazesinde olduğunu işaret etmektedir (Şekil 5.6-b).

Üçüncü grafikte partikül yoğunluğu, 100-250 nm aralığında daha yüksek konsantrasyon gösterdiği bulunmuştur. 150 nm civarında görülen yoğunlaşma, mikrovezikül izolasyonunda belirgin bir standart boyut aralığının korunduğunu ifade etmektedir (Şekil 5.6-c).

Genel olarak, analiz edilen mikroveziküller, literatürde tanımlanan boyut ve konsantrasyon özellikleriyle uyum göstermektedir. Elde edilen bu bulgular, mikrovezikül izolasyonunun etkinliğini ve elde edilen partiküllerin biyolojik araştırmalar için uygunluğunu doğrulamaktadır.



Şekil 5.6: Birinci örneğe ait mikrovezikül izolasyonu NTA sonuçları

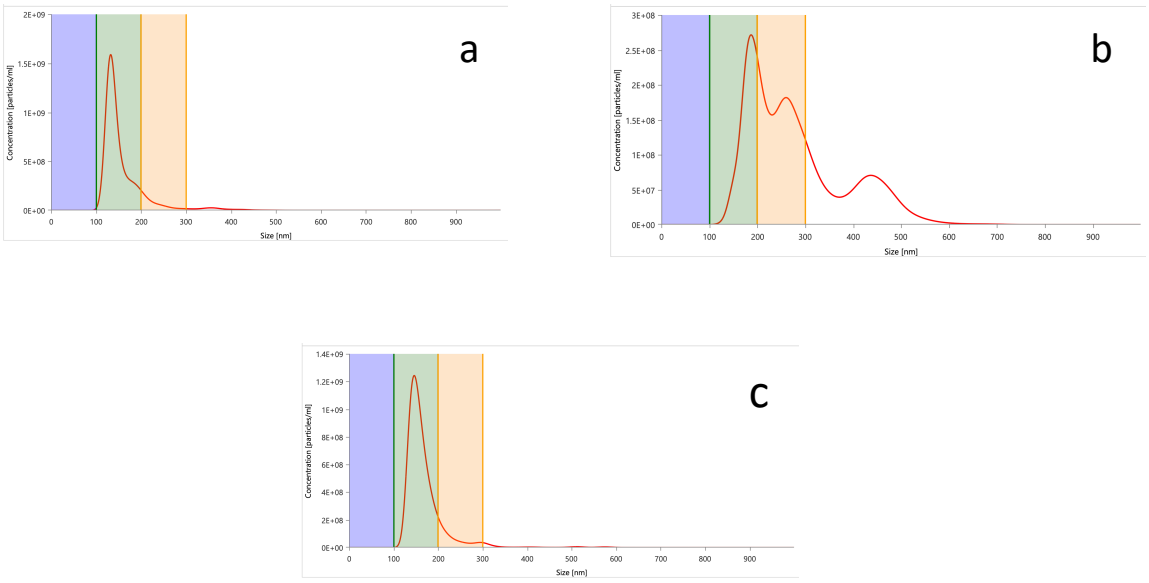
İkinci örneğe ait mikrovezikül izolasyonunun NTA analiz sonuçları, partikül boyut dağılımı ve konsantrasyon yoğunluğu açısından detaylı bir şekilde değerlendirildi. Analiz sonuçları, mikroveziküllerin hedeflenen boyut ve konsantrasyon özelliklerini sağlamada başarılı olduğunu göstermektedir.

Partiküllerin boyut aralığı 50-200 nm arasında yoğunlaşmış olup, özellikle 100-150 nm civarında belirgin bir pik gözlemlendi. Bu sonuç, mikrovezikül izolasyonunun hedeflenen boyut aralığında gerçekleştirildiğini göstermektedir (Şekil 5.7-a).

Şekil 5.16-b'de görüldüğü gibi partikül boyut dağılımı 70-300 nm arasında geniş bir yelpazeye yayılmıştır. Pik noktasının 150-200 nm civarında yoğunlaştığı gözlemlendi. Bu durum, mikroveziküllerin farklı boyutlarda olabileceğini, ancak genelde homojen bir dağılım sergilediğini ortaya koymaktadır (Şekil 5.7-b).

Şekil 5.7-c'de görüldüğü üzere partiküllerin konsantrasyonu 100-250 nm aralığında en yüksek yoğunluğa ulaştığı ve 150 nm civarında bir zirveye sahip olduğu gözlemlendi. Bu, izolasyonun tutarlılığını ve mikrovezikül popülasyonunun biyolojik analizler için uygunluğunu göstermektedir (Şekil 5.7-c).

Genel olarak, ikinci örnekteki mikroveziküller, literatürde tanımlanan özelliklere uyumlu boyut ve konsantrasyon değerleri sergilemiştir. Bu sonuçlar, mikrovezikül izolasyonunun etkinliğini doğrulamakta ve bu partiküllerin biyolojik araştırmalarda kullanılabilirliğini desteklemektedir.



Şekil 5.7: İkinci örneğe ait mikrovezikül izolasyonu NTA sonuçları

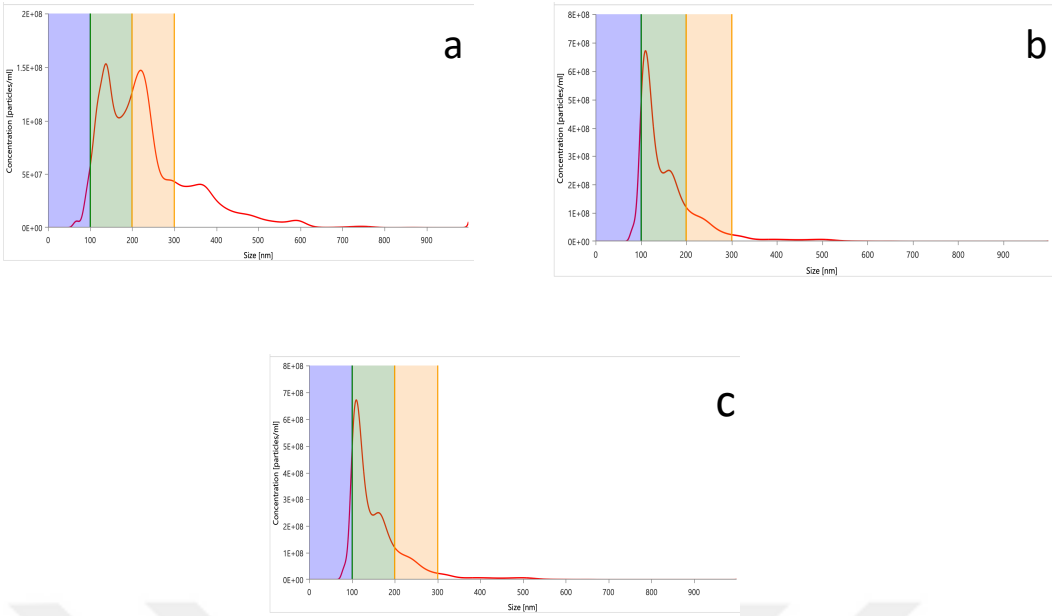
Üçüncü örneğe ait mikrovezikül izolasyonunun NTA sonuçları, partikül boyut dağılımı ve konsantrasyon yoğunluğu açısından detaylı bir şekilde incelendi. Analiz, mikrovezikül popülasyonunun genel özelliklerini değerlendirme açısından önemli bulgular sunmaktadır.

Analiz sonuçları, partikül boyutunun geniş bir aralıkta (50-300 nm) dağıldığını gösterdi. Özellikle 100-200 nm arasında belirgin bir yoğunlaşma gözlemlendi ve bu aralıkta bir pik oluştuğu belirlendi. Bu, mikroveziküllerin hedeflenen boyut aralığında yoğunlaştığını ve homojen bir dağılım gösterdiğini belirtmektedir (Şekil 5.8-a).

Partikül yoğunluğu 100-150 nm arasında zirve yapmış, ancak boyut dağılımı 50-250 nm arasında daha geniş bir aralığa yayıldığı gözlemlendi. Bu durum, mikroveziküllerin izolasyon sırasında farklı boyut popülasyonları oluşturabileceğini göstermektedir (Şekil 5.8-b).

Sonuçlar, 100-200 nm aralığında yoğun bir partikül konsantrasyonu olduğunu, ancak 200 nm'den sonra belirgin bir düşüş yaşandığını ortaya koymaktadır. Bu boyut aralığı, literatürde mikroveziküller için tanımlanan karakteristik özelliklere uyum sağlamaktadır (Şekil 5.8-c).

Genel olarak, üçüncü örnekteki mikroveziküller, literatürde belirtilen mikrovezikül özelliklerine uygun bir şekilde izole edilmiştir. Bu bulgular, mikrovezikül izolasyonunun etkinliğini ve biyolojik analizler için uygunluğunu desteklemektedir. Analiz edilen partikül popülasyonu, araştırmanın ilerleyen aşamalarında daha derin biyokimyasal ve biyolojik analizler için uygun bir temel oluşturmaktadır.



Şekil 5.8: Üçüncü örneğe ait mikrovezikül izolasyonu NTA sonuçları

Eksozomların ve mikroveziküllerin farklı santrifüj hızlarında (100.000xg, 125.000xg ve 150.000xg) ve SEC yöntemiyle izolasyonu sonucunda elde edilen NTA ölçüm sonuçları Tablo 5.1 içerisinde sunulmuştur. Tabloda, her bir birey için yapılan ölçümlerde, partiküllerin ortalama çapı (Mode ve Mean), standart sapması (Std. Dev.), partikül konsantrasyonu (Concentration) ve çap dağılımı (D10, D50, D90) değerleri verilmiştir.

Santrifüj hızına ve yönteme göre ölçülen değerlerde farklılıklar gözlenmiştir. Genel olarak SEC yöntemi, daha yüksek partikül konsantrasyonu ve daha dar bir çap dağılımı sağlarken, santrifüj yöntemleri partikül çaplarında daha geniş bir dağılıma neden olmuştur. Mode ve Mean değerlerinde artan santrifüj hızları ile birlikte hafif bir artış gözlenmiş, SEC yöntemi ise bu değerleri nispeten düşük ve homojen tutmuştur. Özellikle, 3. örnek için SEC yöntemi, en düşük standart sapma ile en dar çap aralığını (D10-D90) sunmuştur.

Elde edilen bu sonuçlar, her bir yöntemin farklı avantaj ve dezavantajlara sahip olduğunu ve spesifik uygulamalar için yöntemin dikkatlice seçilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular ışığında, SEC yönteminin daha homojen partikül popülasyonu sağladığı ve yüksek verimle çalıştığı söylenebilir. Ancak, santrifüj hızlarının partikül boyutları üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, özellikle büyük boyutlu partiküllerin analizinde bu yöntemin etkili olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 5.1: NTA sonuçlarının mod, mean, standart sapma, konsantrasyon, D10, D50 ve D90 değerleri

Kişi	Yöntem	Mode (nm)	Mean (nm)	Std. Dev. (nm)	Concentration (particles/mL)	D10 (nm)	D50 (nm)	D90 (nm)
1. Örnek	100.000xg UC	104.5	145	75	4,25E+10	94	119	234
1. Örnek	125.000xg UC	127.5	177	100	1,99E+10	103	139	303
1. Örnek	150.000xg UC	131.5	196	103	1,31E+10	119	154	354
1. Örnek	SEC	119.5	172	76	4,85E+10	110	146	262
2. Örnek	100.000xg UC	108.5	222	133	1,43E+10	105	188	391
2. Örnek	125.000xg UC	127.5	225	136	1,17E+10	113	188	366
2. Örnek	150.000xg UC	114.5	188	115	1,62E+10	106	142	303
2. Örnek	SEC	111.5	159	79	4,95E+10	103	129	247
3. Örnek	100.000xg UC	99.5	202	183	1,75E+10	96	143	330
3. Örnek	125.000xg UC	87.5	231	167	7,35E+09	91	181	442

Kişi	Yöntem	Mode (nm)	Mean (nm)	Std. Dev. (nm)	Concentration (particles/mL)	D10 (nm)	D50 (nm)	D90 (nm)
3. Örnek	150.000xg UC	120.5	176	106	1,34E+10	91	147	281
3. Örnek	SEC	94.5	106	55	3,06E+10	71	94	144

Tablo 5.2: NTA sonuçlarının çeşitli boyut aralıklarındaki konsantrasyon ölçüleri

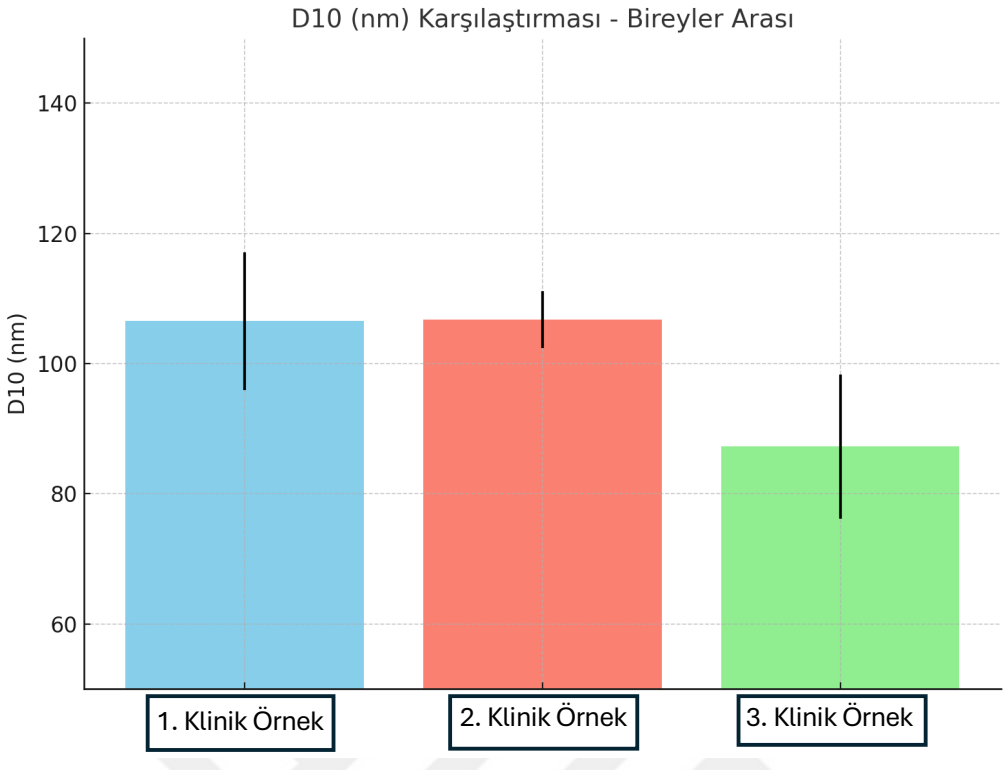
Kişi	Yöntem	Size range 1 (0-100 nm aralığı) [particles/ml]	Size range 1 (0-100 nm aralığı) [%]	Size range 2 (100-200 nm aralığı) [particles/ml]	Size range 2 (100-200 nm aralığı)[%]	Size range 3 (200-300 nm aralığı) [particles/ml]	Size range 3 (200-300 nm aralığı) [%]
1. Örnek	100.000xg UC	104.5	145	4,25E+10	94	119	234
2. Örnek	100.000xg UC	108.5	222	1,43E+10	105	188	391
3. Örnek	100.000xg UC	99.5	202	1,75E+10	96	143	330
1. Örnek	125.000xg UC	127.5	177	1,99E+10	103	139	303
2. Örnek	125.000xg UC	127.5	225	1,17E+10	113	188	366
3. Örnek	125.000xg UC	87.5	231	7,35E+09	91	181	442
1. Örnek	150.000xg UC	131.5	196	1,31E+10	119	154	354

Kişi	Yöntem	Size range 1 (0-100 nm aralığı) [particles/ml]	Size range 1 (0-100 nm aralığı) [%]	Size range 2 (100-200 nm aralığı) [particles/ml]	Size range 2 (100-200 nm aralığı)[%]	Size range 3 (200-300 nm aralığı) [particles/ml]	Size range 3 (200-300 nm aralığı) [%]
2. Örnek	150.000xg UC	114.5	188	1,62E+10	106	142	303
3. Örnek	150.000xg UC	120.5	176	1,34E+10	91	147	281
1. Örnek	SEC	119.5	172	4,85E+10	110	146	262
2. Örnek	SEC	111.5	159	4,95E+10	103	129	247
3. Örnek	SEC	94.5	106	3,06E+10	71	94	144

Tablo 5.2 içerisinde, 0-100 nm aralığındaki konsantrasyon [particles/ml], 0-100 nm aralığındaki yüzde, 100-200 nm aralığındaki konsantrasyon [particles/ml], 100-200 nm aralığındaki yüzde, 200-300 nm aralığındaki konsantrasyon [particles/ml] ve 200-300 nm aralığındaki yüzde değerleri görünmektedir.

Farklı yöntemler (100.000xg UC, 125.000xg UC, 150.000xg UC, qEV) kullanılarak izole edilen eksozomların partikül konsantrasyonları arasındaki farkları değerlendirmek için Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Analiz sonucunda, 1, 2 ve 3 bireyleri için elde edilen p-değerleri sırasıyla 0.392, 0.392 ve 0.392 olarak bulunmuştur.

Bu p-değerleri ($p > 0.05$), yöntemler arasında partikül konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını göstermektedir. Sonuçlar, her yöntemin benzer partikül konsantrasyonları ile sonuçlandığını veya mevcut verilerin yöntemler arasındaki potansiyel farklılıkları göstermek için yetersiz olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, yöntemlerin partikül konsantrasyonu açısından benzer performans gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 5.9: Farklı klinik örneklerde D10 (nm) değerlerinin karşılaştırılması

Farklı bireylerden (1, 2, 3) elde edilen eksozomların D10 (nm) değerleri görselleştirilmiştir (Şekil 5.9). Bar grafikte, her birey için D10 değerlerinin ortalaması ve standart sapma aralıkları gösterilmektedir. Kruskal-Wallis testi sonuçlarına göre, bireyler arasında D10 (nm) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (*$p < 0.05$).

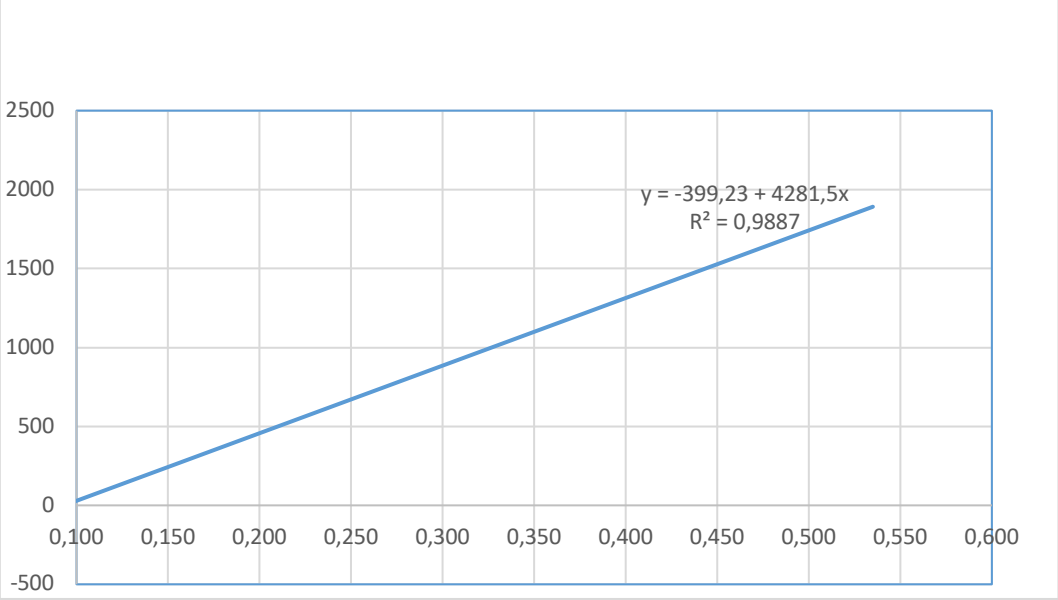
Bu durum, bireyler arasındaki biyolojik farklılıkların veya yöntemlerin bireylere özgü etkilerinin D10 değerinde farklılıklara yol açabileceğini göstermektedir. Ancak, sınırlı veri sayısı ve düşük tekrar sayısı göz önünde bulundurularak bu sonuçların dikkatle yorumlanması gerektiği unutulmamalıdır.

5.3 BCA Sonuçları

BCA protein tayininde kullanılan standart dilüsyonların iki tekrarlı ölçümleri gerçekleşterilmiştir (Ek Tablo A.2). Tablo, her standart çözeltinin iki farklı ölçüm sonucu ile birlikte optik yoğunluk (OD) değerlerini sunmaktadır. Veriler, standartların optik yoğunluklarının 0.559 ile 0.084 arasında değiştiğini göstermektedir. Her bir standart için iki ölçüm sonucu, teknik tekrarlanabilirliği

göstermek amacıyla tabloda verilmiştir. Örneğin, en yüksek optik yoğunluk değeri 0.559 olarak ölçülürken, diğer standartlarda daha düşük değerler kaydedilmiştir. Ölçüm sonuçlarının tutarlılığı, kullanılan metodun güvenilirliğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, standart eğri oluşturularak numunelerin protein konsantrasyonlarının tayini için temel veri olarak kullanılmıştır.

BCA protein tayini için oluşturulan standart eğriye ait optik yoğunluk (OD) değerlerinin ortalamaları ve bu değerlere karşılık gelen protein konsantrasyonları hesaplanmıştır (Ek Tablo A.3). Ölçümler sonucunda, 0.535 absorbans değeri en yüksek protein konsantrasyonu olan 2000 µg/ml'ye karşılık gelirken, 0.091 absorbans değeri boş (BLANK) ölçümü temsil etmektedir. Absorbans değerleri ile protein konsantrasyonları arasında belirgin bir doğrusal ilişki gözlemlenmiştir. Standart dilüsyonlar için elde edilen bu veriler, numunelerdeki protein miktarının belirlenmesinde kullanılacak standart eğrinin oluşturulması için temel veri seti olarak değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, 0.364 absorbans değeri 1000 µg/ml, 0.216 absorbans değeri 500 µg/ml ve 0.136 absorbans değeri 125 µg/ml protein konsantrasyonlarına karşılık gelmiştir. Bu sonuçlar, ölçüm yönteminin doğruluğunu ve hassasiyetini destekler niteliktedir.



Şekil 5.10: BCA standartlarından oluşturulan eğri ve hesaplanan R^2 değeri

BCA standart eğrisinin oluşturulması için kullanılan standart dilüsyonlara ait absorbans değerleri ve konsantrasyonlar, standart eğri grafiğinde doğrusal bir ilişki göstermektedir. Şekil 5.10, standart eğrinin eğimini ve doğruluk katsayısını (R^2) göstermektedir. Elde edilen doğrusal regresyon eşitliği

$$y = -399.23 + 4281.5x$$

olarak belirlenmiştir ve $R^2 = 0.9887$ olarak hesaplanmıştır. Bu yüksek R^2 değeri, ölçüm sonuçlarının yüksek doğruluğunu ve standart eğrinin güvenilirliğini desteklemektedir. Bu eğri, numunelerdeki protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

Tablo 5.3: Tüm örnekler için BCA analizinin sonuçları

	1- 125.000xg	2- 125.000xg	3-125.000xg	1-100.000xg	2-100.000xg	3-100.000xg	1-150.000xg	2-150.000xg	3-150.000xg	1- SEC	2- SEC	3- SEC
Absobans1	0,383	0,369	0,288	0,359	0,422	0,291	0,535	0,382	0,403	0,234	0,117	0,116
Absorbans2	0,418	0,366	0,331	0,378	0,422	0,296	0,520	0,397	0,381	0,230	0,117	0,117
Ort. Absorbans	0,4005	0,3675	0,3095	0,3685	0,422	0,2935	0,5275	0,3895	0,392	0,232	0,117	0,1165
KONS. 1	1240,5845	1180,6435	833,842	1137,829	1407,563	846,6865	1891,373	1236,303	1326,215	602,641	101,7055	97,424
KONS 2	1390,437	1167,799	1017,947	1219,177	1407,563	868,094	1827,15	1300,526	1232,022	585,515	101,7055	101,7055
ORT. KONS.	1315,51075	1174,22125	925,8943	1178,503	1407,563	857,3903	1859,261	1268,414	1279,118	594,078	101,7055	99,56475
DİLÜSYON	2631,0215	2348,4425	1851,789	2357,006	2815,126	1714,781	3718,523	2536,829	2558,236	1188,156	203,411	199,1295

BCA analizi sonuçları, farklı izolasyon yöntemleriyle elde edilen örneklerin protein konsantrasyonlarını ve dilüsyonlarını göstermektedir. Her örneğin farklı santrifüj hızları ve SEC yöntemine göre absorbans değerleri ölçülmüş ve konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır (Ek Tablo A.3).

125.000xg ile izole edilen örneklerde, birinci örneğin ortalama absorbans değeri 0,4005 iken, protein konsantrasyonu 1315,51 µg/ml olarak belirlenmiştir. İkinci ve üçüncü örneklerin ortalama absorbans değerleri sırasıyla 0,3675 ve 0,3095 olarak ölçülmüş ve protein konsantrasyonları 1174,22 µg/ml ve 925,89 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

100.000xg ile izole edilen örneklerde, ortalama absorbans değerleri sırasıyla 0,3685, 0,422 ve 0,2935 iken, protein konsantrasyonları 1178,50 µg/ml, 1407,56 µg/ml ve 857,39 µg/ml olarak bulunmuştur.

150.000xg ile izole edilen örneklerde, ortalama absorbans değerleri birinci, ikinci ve üçüncü örnekler için sırasıyla 0,5275, 0,3895 ve 0,392 olarak ölçülmüştür. Buna bağlı olarak, protein konsantrasyonları sırasıyla 1859,26 µg/ml, 1268,41 µg/ml ve 1279,12 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

SEC yöntemi ile izole edilen örneklerde, birinci örneğin absorbans değeri 0,232, ikinci ve üçüncü örneklerin absorbans değerleri ise 0,117 olarak ölçülmüştür. Protein konsantrasyonları birinci örnek için 594,08 µg/ml, ikinci ve üçüncü örnekler için sırasıyla 101,71 µg/ml ve 99,56 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Sonuçlar, santrifüj hızının ve izolasyon yönteminin protein konsantrasyonu üzerindeki etkisini açıkça göstermektedir. Özellikle yüksek hızda santrifüj edilen örneklerin protein konsantrasyonlarının, SEC yöntemi ile izole edilen örneklere kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

5.4 Western Blot Sonuçları

Western blot analizi, farklı izolasyon yöntemleri ve klinik örneklerden elde edilen eksozomların yüzey protein profillerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu analizde, eksozomların belirteç proteinleri olan CD63, CD9 ve CD81'in varlığı karşılaştırılmıştır.

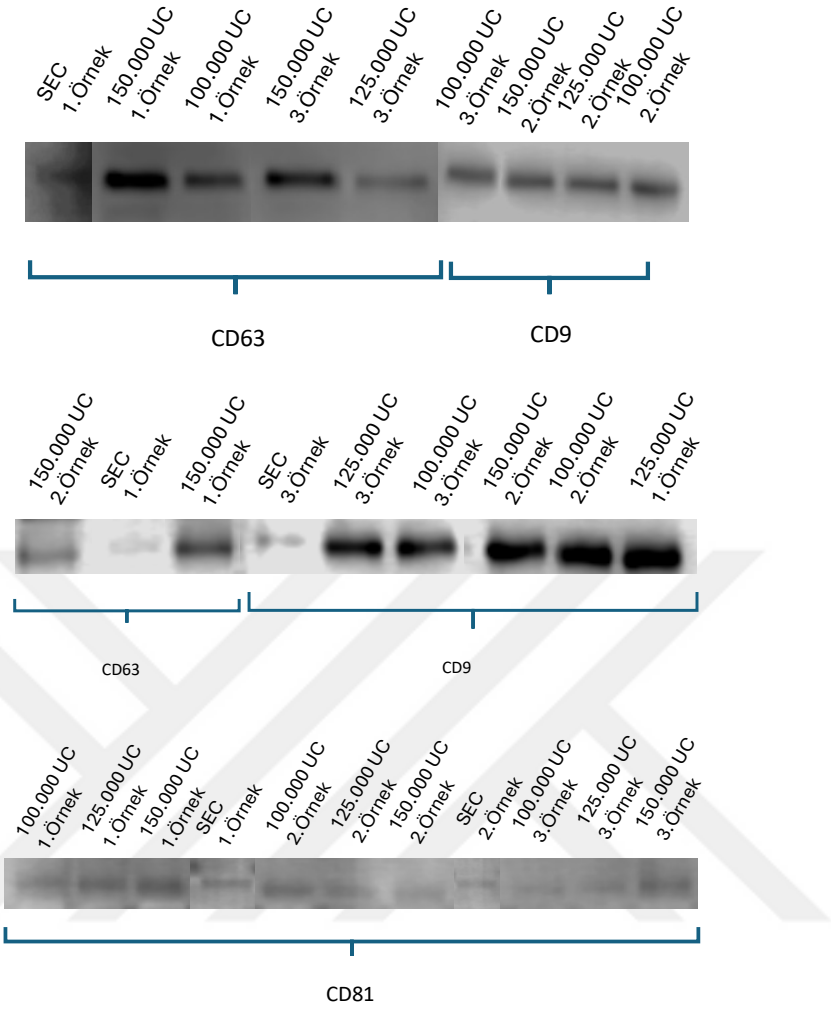
CD63 proteini, özellikle 150.000xg hızında ultrasontrifüj yöntemi ve SEC yöntemiyle izole edilen birinci örneklerde yoğun şekilde tespit edilmiştir. Üçüncü

örneklerde ise 125.000xg ve 100.000xg hızlarında ultrasontrifüjle elde edilen eksozomlarda CD63 sinyali daha güçlüdür. Bu durum, yüksek hızlarda uygulanan santrifüjleme yöntemlerinin CD63 proteini açısından zengin eksozomların izolasyonunda etkili olduğunu göstermektedir.

CD9 proteini, birinci örneklerde 150.000xg hızında ultrasontrifüj yöntemiyle izole edilen eksozomlarda en yoğun olarak gözlemlenmiştir. SEC yöntemiyle elde edilen eksozomlarda da CD9 tespit edilmiştir ancak sinyal yoğunluğu ultrasantrifüj yöntemine göre daha düşüktür. İkinci ve üçüncü örneklerde ise 100.000xg ve 125.000xg hızlarında ultrasantrifüjle izole edilen eksozomlarda CD9 proteini belirgin şekilde tespit edilmiştir.

CD81 proteini açısından değerlendirildiğinde, birinci örneklerde 100.000xg ve 125.000xg hızlarında ultrasantrifüjle izole edilen eksozomlarda yoğun sinyaller gözlemlenmiştir. Ancak SEC yöntemiyle izole edilen eksozomlarda CD81 proteininin oldukça düşük bir sinyalle temsil edildiği görülmüştür. Benzer şekilde, ikinci ve üçüncü örneklerde de yüksek hızda santrifüjleme yöntemleri CD81 proteini tespitinde daha başarılı bulunmuştur.

Genel olarak, ultrasontrifüjleme yöntemleri (özellikle 125.000xg ve 150.000xg hızlarında) CD63, CD9 ve CD81 proteinlerinin izolasyonunda SEC yöntemine göre daha etkili sonuçlar vermiştir. SEC yöntemi, CD63 ve CD9 açısından belirgin bir sinyal sağlarken, yüksek hızlarda uygulanan ultrasantrifüjleme yöntemlerinin eksozom izolasyonunda daha yüksek verimlilik sağladığını düşündürmektedir (Şekil 5.11).



Şekil 5.11: Western blot sonuçları

5.5 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 6.0 ve SPSS 20.0 yazılımları kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) yöntemi uygulandı. Farklılığın kaynağını belirlemek amacıyla Tukey post-hoc testi ve t-testleri kullanıldı. *$p<0,05$* değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm analizler SPSS vv.29.02 ile gerçekleştirildi.

Gruplar arasındaki farklılıklar konsantrasyon (partikül/mL) parametresi açısından One-Way ANOVA ile değerlendirildi ve *$p<0,05$* olduğu bulundu (Ek Tablo A.1).

Farklılıkların tanımlanması için Post-Hoc Tukey Testi gerçekleştirildi, bağımlı değişken olarak her grubun konsantrasyon ortalamaları alındı (partikül/mL) ve ortalama fark belirlendi. Sonuç olarak; SEC yöntemi ile 125.000xg UC arasında ve SEC yöntemi ile 150.000xg UC arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (*$p<0,05$). Buna göre SEC yönteminin UC 125.000xg ve UC 150.000xg hızlarına göre daha yüksek konsantrasyonda eksozom izole ettiği tespit edildi.

Eksozom ve mikroveziküller NTA sonuçlarına göre t-test ile değerlendirildiğinde; mode (nm), standart sapma (nm), D10 (nm), boyut aralığı 0-100 nm ve boyut aralığı 200-300 nm parametrelerinin tamamında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (*$p<0,05$)

Tablo 5.4: Tüm yöntemler için konsantrasyon parametresi bağlamında tanımlayıcı istatistik tablosu

Yöntem	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
UC 100.000xg	UC 150.000xg	2,48E+10	1,544E+10	8,915E+09	-1,36E+10	6,31E+10	1,E+10	4,E+10
UC 125.000xg	UC 150.000xg	1,30E+10	6,373E+09	3,679E+09	-2,85E+09	2,88E+10	7,E+09	2,E+10
UC 150.000xg	UC 150.000xg	1,42E+10	1,710E+09	9,871E+08	9,99E+09	1,85E+10	1,E+10	2,E+10
SEC	UC 150.000xg	4,29E+10	1,064E+10	6,140E+09	1,64E+10	6,93E+10	3,E+10	5,E+10
Total	12	2,37E+10	1,510E+10	4,360E+09	1,41E+10	3,33E+10	7,E+09	5,E+10

Tablo 5.5: Konsantrasyon (partikül/mL) için ANOVA analizi.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,72E+21	3	5,73E+20	5,801	0,021
Within Groups	7,90E+20	8	9,88E+19		
Total	2,51E+21	11			

Konsantrasyon bağımlı değişkeni için gruplar arasında ve grup içinde ANOVA analizi gerçekleştirildi ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu tespit edildi ($P < 0.05$). Ardından Post Hoc Testleriyle çoklu karşılaştırmalar yapıldı. Bu test sonucunda SEC ve 125.000xg UC; SEC ve 150.000xg UC yöntemleri arasında anlamlı fark olduğu belirlendi (Tablo 5.5)

Tablo 5.6: Konsantrasyon (partikül/mL) bağımlı değişkeni için Bonferroni testi

Bonferroni						
					95% Confidence Interval	
(I)	**(J)**	**Mean Difference (I-J)**	**Std. Error**	**Sig.**	**Lower Bound**	**Upper Bound**
100.000xg UC	2	1,178E+10	8,114E+09	1,000	-1,64E+10	4,00E+10
	3	1,053E+10	8,114E+09	1,000	-1,77E+10	3,88E+10
	4	-1,810E+10	8,114E+09	0,337	-4,63E+10	1,01E+10
125.000xg UC	1	-1,178E+10	8,114E+09	1,000	-4,00E+10	1,64E+10
	3	-1,250E+09	8,114E+09	1,000	-2,95E+10	2,70E+10
	4	-2.988E+010*	8,114E+09	0,037	-5,81E+10	-1,65E+09
150.000xg UC	1	-1,053E+10	8,114E+09	1,000	-3,88E+10	1,77E+10
	2	1,250E+09	8,114E+09	1,000	-2,70E+10	2,95E+10
	4	-2.863E+010*	8,114E+09	0,046	-5,69E+10	-4,05E+08
SEC	1	1,810E+10	8,114E+09	0,337	-1,01E+10	4,63E+10
	2	2.988E+010*	8,114E+09	0,037	1,65E+09	5,81E+10
	3	2.863E+010*	8,114E+09	0,046	4,05E+08	5,69E+10
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.						

Bonferonni testi ile grupla çoklu karşılaştırma gerçekleştirildiğinde farklılığın SEC yöntemi ile UC yöntemleri üzerinde toplandığı tespit edildi. Sonuç olarak konsantrasyon parametresi açısından UC 100.000xg, UC 125.000xg ve UC 150.000xg yöntemleri arasında anlamlı bir farklılık yokken; SEC yöntemi ile UC

125.000xg ve UC 150.000xg arasında konsantrasyon değişkeni istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı olduğu tespit edildi *(*p<0,05)*. Bu durum; SEC yöntemi ile UC yöntemleri arasında diğer parametreler açısından da farklılık olabileceği şüphesini uyandırdı. Bu sebeple SEC ile tüm UC yöntemleri; diğer parametreler açısından da test edildi. Bunu takiben yapılan grup istatistiği ve bağımsız örnek testi Tablo 5.7 ve Tablo 5.8 içerisinde verilmiştir.

Tablo 5.7: Tüm UC grupları ve SEC için grup istatistiği

Grup İstatistiği					
Grup 2		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mode (nm)	**UC'ler**	9	113,5000	14,76482	4,92161
	SEC	3	108,5000	12,76715	7,37111
Mean (nm)	**UC'ler**	9	195,78	27,847	9,282
	SEC	3	145,67	34,962	20,185
Std. Dev. (nm)	**UC'ler**	9	124,22	34,237	11,412
	SEC	3	70,00	13,077	7,550
Concentration (particles/mL)	**UC'ler**	9	1,73E+10	1,009E+10	3,365E+09
	SEC	3	4,29E+10	1,064E+10	6,140E+09
D10 (nm)	**UC'ler**	9	102,00	9,862	3,287
	SEC	3	94,67	20,793	12,005
D50 (nm)	**UC'ler**	9	155,67	24,444	8,148
	SEC	3	123,00	26,514	15,308
D90 (nm)	**UC'ler**	9	333,78	62,333	20,778
	SEC	3	217,67	64,237	37,087
Size range 1 (0-100 nm aralığı) [particles/ml]	**UC'ler**	9	2,18E+09	2,425E+09	8,083E+08
	SEC	3	7,68E+09	1,002E+10	5,783E+09
Size range 1 (0-100 nm aralığı) [%]	**UC'ler**	9	8,69E+00	5,799E+00	1,933E+00
	SEC	3	2,36E+01	3,411E+01	1,969E+01
Size range 2 (100-200 nm aralığı) [particles/ml]	**UC'ler**	9	14051111111,11	9769483666,556	3256494555,519
	SEC	3	27490000000,00	15186681665,196	8768034747,498
Size range 2 (100-200 nm aralığı)[%]	**UC'ler**	9	62,7211	8,18137	2,72712
	SEC	3	60,2367	23,92365	13,81232
Size range 3 (200-300 nm aralığı) [particles/ml]	**UC'ler**	9	3175555555,56	1463447224,118	487815741,373
	SEC	3	5824666666,67	4368915807,535	2522394717,547
Size range 3 (200-300 nm aralığı) [%]	**UC'ler**	9	16,8578	7,12859	2,37620
	SEC	3	12,2567	8,35097	4,82143

Tablo 5.8: UC'lerin tamamı ve SEC için bağımsız örnek testi

Independent Samples Test											
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
						Significance				95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	One-Sided p	Two-Sided p	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mode (nm)	Equal variances assumed	0,312	0,589	0,521	10	0,307	0,614	5,00000	9,59166	-16,37156	26,37156
	Equal variances not assumed			0,564	3,983	0,301	0,603	5,00000	8,86316	-19,64997	29,64997
Mean (nm)	Equal variances assumed	0,226	0,645	2,556	10	0,014	0,029	50,111	19,605	6,428	93,794
	Equal variances not assumed			2,256	2,903	0,056	0,112	50,111	22,217	-21,952	122,174
Std. Dev. (nm)	Equal variances assumed	2,366	0,155	2,609	10	0,013	0,026	54,222	20,784	7,912	100,532
	Equal variances not assumed			3,963	9,362	0,002	0,003	54,222	13,684	23,449	84,995
Concentration (particles/mL)	Equal variances assumed	0,177	0,683	-3,754	10	0,002	0,004	-2,554E+10	6,803E+09	-4,070E+10	-1,038E+10
	Equal variances not assumed			-3,648	3,307	0,015	0,030	-2,554E+10	7,002E+09	-4,670E+10	-4,383E+09
D10 (nm)	Equal variances assumed	4,255	0,066	0,858	10	0,205	0,411	7,333	8,544	-11,705	26,372
	Equal variances not assumed			0,589	2,308	0,304	0,608	7,333	12,447	-39,923	54,590
D50 (nm)	Equal variances assumed	0,007	0,936	1,970	10	0,039	0,077	32,667	16,581	-4,278	69,612
	Equal variances not			1,884	3,229	0,075	0,150	32,667	17,341	-20,372	85,705

Independent Samples Test											
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
						Significance				95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	One-Sided p	Two-Sided p	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
	assumed										
D90 (nm)	Equal variances assumed	0,001	0,976	2,777	10	0,010	0,020	116,111	41,812	22,947	209,275
	Equal variances not assumed			2,731	3,370	0,032	0,063	116,111	42,511	-11,159	243,381
Size range 1 (0-100 nm aralığı) [particles/ml]	Equal variances assumed	17,742	0,002	-1,658	10	0,064	0,128	-5,499E+09	3,318E+09	-1,289E+10	1,893E+09
	Equal variances not assumed			-0,942	2,079	0,221	0,442	-5,499E+09	5,839E+09	-2,973E+10	1,873E+10
Size range 1 (0-100 nm aralığı) [%]	Equal variances assumed	30,803	0,000	-1,385	10	0,098	0,196	-1,488E+01	1,074E+01	-3,881E+01	9,052E+00
	Equal variances not assumed			-0,752	2,039	0,265	0,529	-1,488E+01	1,979E+01	-9,848E+01	6,872E+01
Size range 2 (100-200 nm aralığı) [particles/ml]	Equal variances assumed	1,276	0,285	-1,821	10	0,049	0,099	-13438888888,889	7378084933,365	-29878286582,175	3000508804,397
	Equal variances not assumed			-1,437	2,578	0,130	0,260	-13438888888,889	9353244898,080	-46164567457,887	19286789680,109
Size range 2 (100-200 nm aralığı)[%]	Equal variances assumed	10,680	0,008	0,288	10	0,390	0,780	2,48444	8,64140	-16,76979	21,73868
	Equal variances not assumed			0,176	2,158	0,438	0,875	2,48444	14,07897	-54,03117	59,00006
Size range 3 (200-300 nm aralığı) [particles/ml]	Equal variances assumed	8,574	0,015	-1,690	10	0,061	0,122	-2649111111,111	1567847397,462	-6142492811,382	844270589,160
	Equal variances not			-1,031	2,152	0,202	0,404	-2649111111,111	2569132014,639	-12989151436,779	7690929214,557

Independent Samples Test											
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
						Significance				95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	One-Sided p	Two-Sided p	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
	assumed										
Size range 3 (200-300 nm aralığı) [%]	Equal variances assumed	0,062	0,808	0,934	10	0,186	0,372	4,60111	4,92618	-6,37509	15,57731
	Equal variances not assumed			0,856	3,045	0,227	0,454	4,60111	5,37518	-12,36404	21,56626

İstatistiksel analiz sonucunda UC yöntemleriyle (tüm alt tipleriyle birlikte) SEC arasında; D90 (nm), konsantrasyon (partikül/mL), Standart Sapma (nm), Mean (nm) parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı olduğu keşfedildi *(*p<0,05)*.

Ardından eksozomlarla mikroveziküller için eşleştirilmiş örneklem istatistiği (Tablo 5.9) ve eşleştirilmiş örneklem testi (Tablo 5.10) gerçekleştirildi.

Tablo 5.9: Eksozom ve mikrovezikül örneklerinin eşleştirilmiş örneklem istatistiği

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Mod (eksozom) (nm)	113,5000	9	14,76482	4,92161
	Mode (mikrovezikül) nm	148,1667	9	31,84729	10,61576
Pair 2	Mean (nm)	195,7778	9	27,84680	9,28227
	Mikro_Meannm	207,4444	9	57,59581	19,19860
Pair 3	Std. Dev. (nm)	124,2222	9	34,23733	11,41244
	Mikro_Std.Dev.nm	79,6667	9	27,24427	9,08142
Pair 4	Concentration (particles/mL)	1,7328E+10	9	1,00949E+10	3,36497E+09
	Mikro_ConcentrationparticlesmL	3,7356E+10	9	2,26770E+10	7,55899E+09

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 5	D10 (nm)	102,0000	9	9,86154	3,28718
	Mikro_D10nm	135,3333	9	32,15587	10,71862
Pair 6	D50 (nm)	155,6667	9	24,44381	8,14794
	Mikro_D50nm	186,0000	9	52,74941	17,58314
Pair 7	D90 (nm)	333,7778	9	62,33333	20,77778
	Mikro_D90nm	311,4444	9	108,97948	36,32649
Pair 8	Size range 1 (0-100 nm aralığı) [particles/ml]	2,1841E+09	9	2,42478E+09	8,08259E+08
	Mikro_Sizerange10100nmaralığıparticlesml	9,0119E+08	9	1,30857E+09	4,36191E+08
Pair 9	Size range 1 (0-100 nm aralığı) [%]	8,6933	9	5,79936	1,93312
	Mikro_Sizerange10100nmaralığı	2,2311	9	3,12169	1,04056
Pair 10	Size range 2 (100-200 nm aralığı) [particles/ml]	14051111111,1111	9	9769483666,55634	3256494555,51878
	Mikro_Sizerange2100200nmaralığıparticlesml	31870000000,0000	9	27075488915,25320	9025162971,75107
Pair 11	Size range 2 (100-200 nm aralığı)[%]	62,7211	9	8,18137	2,72712
	Mikro_Sizerange2100200nmaralığı	57,8400	9	28,40099	9,46700
Pair 12	Size range 3 (200-300 nm aralığı) [particles/ml]	3175555555,5556	9	1463447224,11769	487815741,37256
	Mikro_Sizerange3200300nmaralığıparticlesml	8478888888,8889	9	4664770745,82568	1554923581,94189
Pair 13	Size range 3 (200-300 nm aralığı) [%]	16,8578	9	7,12859	2,37620
	Mikro_Sizerange3200300nmaralığı	23,6800	9	15,17551	5,05850

Tablo 5.10: Eşleştirilmiş örneklem istatistiği ve p değerleri

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Mode (nm)	113,5000	9	14,76482	4,92161
	mikro_Modenm	148,1667	9	31,84729	10,61576
Pair 2	Mean (nm)	195,7778	9	27,84680	9,28227
	Mikro_Meannm	207,4444	9	57,59581	19,19860
Pair 3	Std. Dev. (nm)	124,2222	9	34,23733	11,41244
	Mikro_Std.Dev.nm	79,6667	9	27,24427	9,08142
Pair 4	Concentration (particles/mL)	1,7328E+10	9	1,00949E+10	3,36497E+09
	Mikro_ConcentrationparticlesmL	3,7356E+10	9	2,26770E+10	7,55899E+09
Pair 5	D10 (nm)	102,0000	9	9,86154	3,28718
	Mikro_D10nm	135,3333	9	32,15587	10,71862

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 6	D50 (nm)	155,6667	9	24,44381	8,14794
	Mikro_D50nm	186,0000	9	52,74941	17,58314
Pair 7	D90 (nm)	333,7778	9	62,33333	20,77778
	Mikro_D90nm	311,4444	9	108,97948	36,32649
Pair 8	Size range 1 (0-100 nm aralığı) [particles/ml]	2,1841E+09	9	2,42478E+09	8,08259E+08
	Mikro_Sizerange10100nmaralığıparticlesml	9,0119E+08	9	1,30857E+09	4,36191E+08
Pair 9	Size range 1 (0-100 nm aralığı) [%]	8,6933	9	5,79936	1,93312
	Mikro_Sizerange10100nmaralığı	2,2311	9	3,12169	1,04056
Pair 10	Size range 2 (100-200 nm aralığı) [particles/ml]	14051111111,1111	9	9769483666,55634	3256494555,51878
	Mikro_Sizerange2100200nmaralığıparticlesml	31870000000,0000	9	27075488915,25320	9025162971,75107
Pair 11	Size range 2 (100-200 nm aralığı)[%]	62,7211	9	8,18137	2,72712
	Mikro_Sizerange2100200nmaralığı	57,8400	9	28,40099	9,46700
Pair 12	Size range 3 (200-300 nm aralığı) [particles/ml]	3175555555,5556	9	1463447224,11769	487815741,37256
	Mikro_Sizerange3200300nmaralığıparticlesml	8478888888,8889	9	4664770745,82568	1554923581,94189
Pair 13	Size range 3 (200-300 nm aralığı) [%]	16,8578	9	7,12859	2,37620
	Mikro_Sizerange3200300nmaralığı	23,6800	9	15,17551	5,05850

Eksozom ve mikroveziküllerin karşılaştırılması sonucunda mod (nm), standart sapma (nm), D10 (nm), 1. Boyut aralığı (0-100 nm, %) ve üçüncü boyut aralığı (200-300 nm, %) parametreleri istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık bulundu *(*p<0,05)*.

Tüm yöntemler için (UC 100.000xg, UC 125.000xg, UC 150.000xg ve SEC) tanımlayıcı istatistik (Ek Tablo A) ve ANOVA analizi (Tablo 5.11) konsantrasyon parametresi dışında gerçekleştirildi. Bu durum, eksozom izolasyon yöntemlerinin tamamı arasında konsantrasyon parametresi dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir (tabloda kırmızı ile işaretlenmiştir).

Tablo 5.11: Tüm parametreler ve tüm yöntemler için ANOVA analizi

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Mode (nm)	Between Groups	544,250	3	181,417	0,917	0,475
	Within Groups	1582,000	8	197,750		
	Total	2126,250	11			
Mean (nm)	Between Groups	6706,250	3	2235,417	2,356	0,148
	Within Groups	7592,000	8	949,000		
	Total	14298,250	11			
Std. Dev. (nm)	Between Groups	7823,333	3	2607,778	2,451	0,138
	Within Groups	8511,333	8	1063,917		
	Total	16334,667	11			
D10 (nm)	Between Groups	195,000	3	65,000	0,331	0,803
	Within Groups	1568,667	8	196,083		
	Total	1763,667	11			
D50 (nm)	Between Groups	3249,667	3	1083,222	1,624	0,259
	Within Groups	5337,333	8	667,167		
	Total	8587,000	11			
D90 (nm)	Between Groups	36395,583	3	12131,861	2,917	0,100
	Within Groups	33274,667	8	4159,333		
	Total	69670,250	11			
Size range 1 (0-100 nm aralığı) [particles/ml]	Between Groups	79180876250000000000	3	26393625416666700000	0,893	0,486
	Within Groups	236523624666667000000	8	2956545308333330000		
	Total	315704500916667000000	11			
Size range 1 (0-100 nm aralığı) [%]	Between Groups	555,130	3	185,043	0,583	0,643
	Within Groups	2538,691	8	317,336		
	Total	3093,821	11			
Size range 2 (100-200 nm aralığı) [particles/ml]	Between Groups	515894158333333000000	3	171964719444444000000	1,234	0,359
	Within Groups	1115277333333330000000	8	139409666666667000000		
	Total	1631171491666670000000	11			
Size range 2 (100-200 nm aralığı)[%]	Between Groups	34,589	3	11,530	0,056	0,982
	Within Groups	1659,459	8	207,432		

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
	Total	1694,048	11			
Size range 3 (200-300 nm aralığı) [particles/ml]	Between Groups	1995971566666670000	3	6653238555555560000	1,041	0,425
	Within Groups	51138584000000000000	8	6392323000000000000		
	Total	71098299666666700000	11			
Size range 3 (200-300 nm aralığı) [%]	Between Groups	78,089	3	26,030	0,404	0,754
	Within Groups	515,556	8	64,444		
	Total	593,645	11			

NTA analizinde çıktı olarak gelen D10, D50 ve D90 değerleri, numunenin kümülatif hacminin sırasıyla %10, %50 ve %90'ının daha küçük olduğu parçacık çaplarını temsil eden bu analizde kritik parametrelerdir. Bu değerler, bir numune içindeki parçacık boyutlarının dağılımı ve homojenliği hakkında fikir verir. Span değeri (açıklık değeri), D10, D50 ve D90 değerleri kullanılarak hesaplanan parçacık boyutu dağılımının genişliğinin bir ölçüsüdür. Numunenin polidispersitesini değerlendirmek için önemli bir metriktir. D50 çedyan çap olarak da bilinmektedir ve parçacık boyutu dağılımının merkezi bir eğilimini göstermektedir [152].

Span değeri, parçacık boyutu dağılımının genişliğini ölçer. Daha düşük bir aralık değeri daha dar bir dağılımı gösterir ve bu da daha düzgün parçacık boyutları olduğunu göstermektedir. Span değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

$$Span\ Değeri = \frac{D90 - D10}{D50}$$

Bu formül, medyan parçacık boyutuna göre dağılım genişliğinin normalleştirilmiş bir ölçüsünü sağlar [153]. Tablo 5.12 içerisinde eksozom örneklerinin, Tablo 5.13 içerisinde mikrovezikül örneklerinin span değerleri verilmiştir. Ek şekil A.14, A.15 ve A.16'da tüm örneklerin homojenliklerinin anlaşılabileceği üç boyutlu grafikler verilmiştir.

Tablo 5.12: Eksozomların span değerleri

Kişi	Yöntem	Span
1. Örnek	100.000xg UC	1,18
2. Örnek	100.000xg UC	1,53
3. Örnek	100.000xg UC	1,64
1. Örnek	125.000xg UC	1,44
2. Örnek	125.000xg UC	1,35
3. Örnek	125.000xg UC	1,94
1. Örnek	150.000xg UC	1,53
2. Örnek	150.000xg UC	1,39
3. Örnek	150.000xg UC	1,30
1. Örnek	SEC	1,04
2. Örnek	SEC	1,12
3. Örnek	SEC	0,78

Tablo 5.13: Mikroveziküllerin span değerleri

Kişi	Yöntem	Span
1. Örnek	100.000xg UC	0,38
2. Örnek	100.000xg UC	0,63
3. Örnek	100.000xg UC	1,26
1. Örnek	125.000xg UC	0,95
2. Örnek	125.000xg UC	1,07
3. Örnek	125.000xg UC	1,06
1. Örnek	150.000xg UC	0,92
2. Örnek	150.000xg UC	0,49
3. Örnek	150.000xg UC	1,39

6
SONUÇ

Eksozomlar, hücreler arası iletişimi sağlamak ve biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamak açısından son derece önemlidir. Eksozomlar, hücrelerin çevrelerinden gelen sinyalleri almak, iletmek ve bunlara yanıt vermek için hücreler tarafından salgılanan nano membranlı veziküllerdir. Bu veziküller, hücreler arası iletişimde önemli bir rol oynamaktadır. Eksozomlar; DNA, protein, lipid ve RNA gibi moleküller taşıyarak alıcı hücrelere iletmektedir. Eksozomlar, hücrelerin normal işlevlerini sürdürebilmesinin yanı sıra, hastalık durumlarında patolojik durumları destekleyebilecek türde bir iletişimle sonuçlanmaktadır [1] [2].

Eksozomların biyolojik sıvılardan, özellikle kan plazmasından izole edilmesi, klinik uygulamalar ve biyoteknolojik araştırmalar için giderek önem kazanmaktadır. Bu izolasyon süreci, eksozomların içeriklerinin incelenmesi ve analiz edilmesi açısından kritik bir adımdır. Eksozomlar, biyomarkerler, ilaç taşıyıcılar ve terapötik ajanlar olarak kullanılabilecek potansiyel taşıyıcılar olduğundan, doğru izolasyon tekniklerinin seçilmesi, klinik uygulamalarda ve biyoteknolojik gelişmelerde önemli bir yer tutmaktadır [154].

Eksozom izolasyonunun zorluğu, mevcut yöntemlerin verimlilik, saflık ve tekrarlanabilirlik açısından farklılıklar göstermesinden kaynaklanmaktadır. Bu yüzden doğru ve etkili bir izolasyon yöntemi seçmek, çalışmanın amacına ve örnek türüne göre büyük önem taşımaktadır. Örneğin, kan plazmasından eksozom izolasyonu, bu sıvının geniş biyolojik çeşitliliği ve eksozom zenginliği nedeniyle avantajlıdır. Bu sayede, hücresel değişiklikler ve biyolojik süreçler hakkında değerli bilgiler elde edilebilmektedir [155] [154].

Sonuç olarak, eksozom izolasyonu sadece biyolojik araştırmalar için değil, aynı zamanda klinik tanı, tedavi ve biyoteknolojik uygulamalar için de büyük bir öneme sahiptir. Bu süreçlerin doğru bir şekilde yürütülmesi, eksozomların fonksiyonlarını ve potansiyel kullanım alanlarını daha iyi anlamamıza olanak tanıyacaktır [155] [156] [157].

Eksozom izolasyonu hem temel biyolojik araştırmalar hem de klinik uygulamalar açısından büyük öneme sahip olsa da izolasyonda çeşitli zorluklarla karşılaşılmaktadır. Bu zorluklar, kullanılan izolasyon yöntemlerinin verimlilik, saflık ve tekrarlanabilirlik açısından farklılıklar göstermesinden kaynaklanmaktadır [157].

Eksozomların etkin bir şekilde izole edilmesi, kullanılan yönteme bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir. Farklı izolasyon tekniklerinin— ultrasantrifüjleme, yoğunluk gradyanı santrifüjleme, çöktürme ve immünoafinite çöktürme— her biri farklı avantajlar ve sınırlamalara sahiptir. Örneğin, ultrasantrifüjleme**,** eksozomları izole etmek için yaygın bir yöntem olmakla birlikte, işlem sırasında önemli miktarda vezikül kaybına yol açabilmekte ve bu da verimliliği olumsuz etkileyebilmektedir. Diğer yöntemler, örneğin PEG bazlı çöktürme, yüksek geri kazanım oranlarına sahipken, genellikle saflık açısından zayıf sonuçlar verebilmektedir [158].

Eksozomlar, biyolojik sıvılarda bulunan diğer partiküllerle (örneğin, lipoproteinler, mikroveziküller) karışabilmektedir. Kan plazması gibi biyolojik sıvılar, çok sayıda hücre tipinden salınan eksozomları içerdiğinden, bu sıvıların kullanımı izolasyon için hem avantajlı hem de zorlayıcıdır. Biyolojik sıvıların heterojen yapısı, izole edilen eksozomların saflaştırılmasını zorlaştırabilmektedir. Bu nedenle, eksozom izolasyonunda saflık, izolasyonun verimliliği kadar önemli bir parametredir ve çoğu zaman bu iki faktör arasında bir denge kurmak gerekmektedir [159].

Sonuç olarak, eksozom izolasyonu hem temel araştırmalar hem de klinik uygulamalar için kritik bir adımdır. Ancak, bu süreçteki zorluklar, farklı yöntemlerin avantajları ve sınırlamalarıyla ilişkilidir. Bu zorlukların üstesinden gelmek için, standartlaştırılmış ve optimize edilmiş yöntemlere ihtiyaç vardır [160].

Mevcut tez çalışmasında eksozom izolasyonunda ultrasantrifüjleme için literatürde sıklıkla başvurulan üç hız denemesi (100.000xg, 125.000xg ve 150.000xg.) [161] [162] [163] ve boyut dışlama kromatografisi yöntemi [164] kullanılarak insan periferik kan plazmasından eksozom ve mikrovezikül izole edildi. Elde edilen eksozomlar TEM yöntemiyle görüntülendi, NTA'ya tabi tutuldu, spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle protein konsantrasyonları belirlendi. İzolasyon yöntemleri, partikül konsantrasyonları; CD63, CD9 ve CD81 proteinlerinin varlığı

ve sinyal yoğunluğu; protein konsantrasyonları; D10 (nm), D50 (nm) ve D90 (nm), ortalama partikül boyutu (nm) parametreleri açısından karşılaştırıldı.

Eksozom izolasyonunun başarısı, kullanılan örneğin biyolojik özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir. Çalışmalarda, eksozomların bireyler arası genetik faktörler [165], hücresel köken [166], yaşam tarzı ve diyet [167], vücuttaki enflamasyon ve patojenite gibi sebeplerden biyolojik farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir [168] [169]. Bu, örneğin aynı izolasyon yönteminin farklı bireylerde farklı sonuçlar vermesi anlamına gelmektedir. Böylece, bir yöntem belirli bir kişiden elde edilen eksozomlarda yüksek verimlilik sağlarken, başka bir bireyden elde edilen eksozomlarda düşük verimlilik ve saflıkla sonuçlanabilir. Bu da izolasyon protokollerinin standartlaştırılmasını ve biyolojik çeşitliliği dikkate alacak şekilde optimize edilmesini zorunlu kılmaktadır. Mevcut tez çalışmasında 125.000xg UC yöntemiyle ikinci klinik örnekten izole edilen eksozomların ortalama konsantrasyonu (partikül/mL) 1,17E+10 iken; üçüncü klinik örnekte yine aynı yöntemle izole edilen eksozomların ortalama konsantrasyonu (partikül/mL) 7,35E+09 olarak belirlendi (bkz. Tablo 5.1). Bu sonuçlara göre mevcut tez çalışmasında da partikül konsantrasyonlarının bireyler arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak aynı miktarda ve aynı türdeki (her birey için periferik kan plazması) başlangıç materyalinden aynı yöntemle yapılan eksozom izolasyonunun karakterizasyon deneyi sonuçları literatürü destekler niteliktedir.

Eksozom izolasyonu genellikle zaman alıcı ve maliyetli bir süreçtir. Özellikle yoğunluk gradyanı santrifüjleme gibi yöntemler, uzun süreli işlemler gerektirirken, bazı ticari yöntemler de yüksek maliyetlere sahiptir. Bu nedenle, çalışmanın bütçesi ve zaman çerçevesi, kullanılacak izolasyon yöntemlerini belirleyen önemli faktörlerdir. Eksozomların farklı biyolojik kaynaklardan (örneğin kan, idrar, beyin omurilik sıvısı) izole edilmesi de genellikle farklı yöntemler ve optimizasyon gerektirdiğinden, bu durum daha da karmaşıklaşmaktadır [170]. Eksozomların izole edilmesinde karşılaşılan önemli bir diğer zorluk, kontaminasyon sorunlarıdır. Eksozomlar, sıklıkla lipoproteinler ve diğer küçük hücresel partiküllerle karışabilmektedir. Bu kontaminasyon, analizlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini etkileyebilir, çünkü izole edilen eksozomlar, istenmeyen materyallerle karışabilir. Saflık açısından, bazı yöntemler (örneğin, SEC**)** yüksek verimlilik sağlayabilirken,

diğerleri genellikle düşük saflıkla sonuçlanabilir [171]. Mevcut tez çalışmasında ultrasantrifüj yöntemiyle izole edilen eksozomların TEM görüntülemelerinde kirliliğin olduğu saptandı. Ayrıca NTA analizinde SEC ile izole edilen eksozomların ortalama partikül konsanstrasyonları UC ile izole edilen eksozomların ortalama partikül konsanstrasyonlarından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olmasına rağmen bu eksozomların protein konsantrasyonları; eksozom konsantrasyonlarıyla parallelik göstermemekteydi *(*p<0,05)*. Bu durum, UC ile izole edilen eksozomlarda hücresel debrisin olabileceğini ve hücresel proteinlerin kontaminasyon yarattğını düşündürmektedir.

Grenhas ve arkadaşları EV izolasyonu için iki farklı yöntem—sukroz tamponlu ultrasantrifüjlemenin (sUC) ve ultrafiltrasyon ile boyut dışlama kromatografisi (UF-SEC)—karşılaştırmıştır [172]. Yazarlar, UF-SEC yönteminin sUC'ye kıyasla daha yüksek verim ve tekrarlanabilirlik sağladığını, ayrıca bu yöntemin hücre kültürü medyası ve insan plazmasından daha homojen ve saf EV'ler elde edilmesine olanak tanıdığını belirtmişlerdir. Çalışma, özellikle multiple myeloma hücre hatlarından türetilen EV'lerin bioymarker profillerini analiz etmiş ve hastalığın tanı ve tedavisinde potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Mevcut tez çalışmasında ise sağlıklı bireylerin kan plazmalarından izole edilen eksozomların karşılaştırmalı analizine odaklanılmaktadır. Bu bağlamda, SEC yöntemiyle UC yönteminin farklı hızları denenmiştir. Literatürde UC nin farklı hızlarıyla SEC yöntemini kıyaslayan bir çalışma bulunmamaktadır. Grenhas ve ark. [172] tarafından yapılan çalışmada sUC ve UF-SEC'in kıyaslanması sonucunda SEC ile kombinasyonda daha verimli bir şekilde eksozom izole edildiğini göstermişlerdir. Bu sonuç, mevcut tez çalışmasında literatürle paralel bir sonuç elde edildiğinin kanıtıdır.

Bir başka çalışmada sığır serumundan eksozom izolasyonu için üç farklı yöntem (ultrasantrifüj, ultrasantrifüj ve boyut dışlama kromatografisi kombinasyonu ve ExoEasy kiti) karşılaştırılmış ve elde edilen eksozomların saflığı, boyut dağılımı ve RNA profilleri analiz edilmiştir [173]. Literatürde yer alan benzer çalışmalar, eksozom izolasyon yöntemlerinin biyolojik matrisin yapısal karmaşıklığından etkilendiğini ve insan serumu gibi matrislerden elde edilen sonuçların hayvan serumlarına birebir uygulanamayacağını ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, bu çalışmada da ultrasantrifüj ve SEC kombinasyonunun albumin gibi serum

proteinlerinden arındırılmış, daha saf eksozomlar elde edilmesine olanak sağladığı görülmüştür. Ancak, small RNA profili analizinde, ExoEasy kitinin daha belirgin bir bant verdiği ve bu nedenle miRNA bazlı biyobelirteç keşfi için daha uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın SEC ile kombine yöntem kullanıldığında daha saf ve albümin gibi plazma kaynaklı kontaminantlardan arındırılmış eksozom üretmiş olması, mevcut tez çalışmasının bulgularıyla paralellik taşımaktadır.

Contreras ve arkadaşlarının çalışması, küçük ekstraselüler veziküllerin (sEV) izolasyonunu optimize etmek amacıyla, UF ve SEC iki farklı sabit faz (G200/40 ve G200/120 kolonları) ile birleştirerek gerçekleştirilmiştir [174]. Çalışma, plazma, idrar, tükürük ve hücre kondüsyonlu ortam gibi çeşitli biyolojik matrisler üzerinde bu yöntemlerin etkinliğini, zenginleştirme kapasitesini ve saflığını değerlendirmiştir. Sonuçlar, G200/40 kolonunun, daha yüksek bir vezikül-protein oranı ve daha az protein kontaminasyonu ile sEV zenginleştirmede G200/120 kolona kıyasla üstün olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, klinik ve araştırma uygulamalarında düşük maliyetli ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip sEV izolasyon yöntemleri geliştirmeye yönelik önemli bir katkı sunmaktadır. Ayrıca, SEC metodolojisini rafine ederek vezikül morfolojisinin korunmasını ve kirleticilerin eş izolasyonunun en aza indirilmesini sağlamış, proteomik ve fonksiyonel çalışmalar gibi sonraki analizler için sağlam bir temel oluşturmuştur. Bu çalışmanın hipotezi, SEC'in diğer yöntemlere tercih edilebilir bir yöntem olduğundan yola çıkılarak kurgulanmıştır. Mevcut tez çalışmasında da karşılaştırmalı analizlerle SEC'in UC yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha verimli bir yöntem olduğu keşfedildi.

Moccia ve arkadaşlarının 2023 yılında yayımladığı bir çalışmada, köpeklerin meme tümörü hücre hattından (CIPp) izole edilen EV'lerin farklı izolasyon teknikleriyle (UC- SEC) karşılaştırmasını yapılmaktadır [175]. Araştırma, EV'lerin büyüklük ve konsantrasyonlarının yanı sıra protein içeriklerini incelemiş ve bu iki tekniğin hem saflık hem de fonksiyonel etkiler bakımından farklılıklarını ortaya koymuştur. Ayrıca, EV'lerin hücre proliferasyonu, göç ve invazyon üzerindeki otokrin etkilerini değerlendiren işlevsel analizler de gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, ultrasantrifüj yönteminin daha yüksek EV konsantrasyonu sağladığını ancak SEC ile izole edilen EV'lerin biyolojik etkiler bakımından daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, farklı izolasyon tekniklerinin EV'lerin

biyolojik etkilerini nasıl etkileyebileceği konusundaki bilgi boşluğunu doldurmayı hedeflemiştir. Mevcut tez çalışmasının hedefiyle benzer bir motivasyonla tasarlanan bu çalışmada SEC ile izole edilen eksozomların daha saf bir topluluk olması bulgularımızı destekler niteliktedir. Fakat bu çalışmanın aksine, mevcut tez çalışmasında UC yöntemi daha az konsantrasyonda eksozom topluluğu izole edilmesiyle sonuçlanmıştır. Bunun sebebinin kullanılan biyolojik materyalin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Karim Sidhom ve ark., ekstraselüler veziküller ve özellikle eksozomların izolasyon yöntemlerine dair kapsamlı bir inceleme sunmaktadır [176]. Çalışmada, farklı izolasyon tekniklerinin etkinliği, saflığı ve verimliliği açısından karşılaştırmalar yapılmış, özellikle SEC'in avantajları vurgulanmıştır. Araştırma, SEC'in diğer yöntemlere kıyasla daha saf ve işlevsel eksozomlar elde edilmesine olanak tanıdığını, aynı zamanda tekrarlanabilir, ölçeklenebilir ve ekonomik bir yöntem olduğunu belirtmektedir. Bununla birlikte, SEC'in verim açısından kısıtlılıkları ve mikroveziküllerle eksozomları ayırt etme zorlukları gibi sınırlamaları da ele alınmıştır. Çalışma, eksozom araştırmalarındaki metodolojik standardizasyon eksikliğine dikkat çekerek, alanın ilerlemesi için yeni protokollerin geliştirilmesi gerektiğini önermektedir. Bu bağlamda, tez çalışmamızda kullanılan eksozom izolasyon yöntemleriyle Sidhom ve ark.'nın önerdiği tekniklerin potansiyel katkılarını tartışmak, literatürle uyumlu ve karşılaştırmalı bir değerlendirme sunmaktadır. Mevcut tez çalışmasında da eksozom izolasyon yöntemlerinin standardizasyonundaki eksikliklere dikkat çekilmiştir ve literatürdeki çalışmaların sonuçlarına paralel bir şekilde SEC'in boyut temelli ayrım prensibinden dolayı daha homojen bir eksozom topluluğunu izole edebildiği düşünülmektedir.

Guan ve arkadaşlarının (2020) çalışması, idrar örneklerinden eksozom izolasyonu için UC ve SEC yöntemlerini karşılaştırmıştır [177]. Çalışma, SEC yönteminin UC'ye kıyasla daha yüksek eksozom geri kazanımı ve protein saflığı sağladığını göstermiştir. UC yönteminde, yüksek santrifüj kuvveti nedeniyle eksozomların membran bütünlüğünün zarar gördüğü ve düşük bir geri kazanım oranıyla sonuçlandığı tespit edilmiştir. Buna karşın, SEC yöntemi, eksozomların biyolojik aktivitesini ve hücresel internalizasyon kapasitesini koruyarak daha verimli bir izolasyon sunmuştur. Çalışma, özellikle idrar örneklerinden eksozom izolasyonunda SEC'nin avantajlarını vurgulayarak, bu yöntemin daha saf ve

biyolojik olarak aktif eksozomlar elde edilmesi için uygun bir seçenek olduğunu önermektedir. Bu bulgular, biyobelirteç keşfi ve terapötik uygulamalar açısından SEC'in potansiyelini ortaya koymaktadır. Mevcut tez çalışmasında bu makaleden farklı bir biyolojik sıvı kullanılmasına rağmen; benzer sonuçlar raporlanmıştır. Tıpkı bu makalenin vurguladığı gibi; bu tez çalışmasında da UC ile izole edilen eksozomların membran bütünlüğünün zarar gördüğü ve hücresel biyolojik kontaminantların bulunmasından dolayı TEM görüntülerinde kirlilik olduğu öngörülmektedir (Şekil 5.1).

Tez çalışmasında bütçe kısıtlamaları nedeniyle mikroveziküllerin TEM görüntülemesi ve Western blot analizi yapılamamıştır. Bu analizlerin gerçekleştirilmesi durumunda, mikroveziküller ile eksozomların karşılaştırmasını içeren daha kapsamlı bir değerlendirme yapılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, farklı prensiplere dayanan izolasyon yöntemlerin, örneğin çöktürme veya diferansiyel ultrasantrifüjleme, uygulanarak elde edilen sonuçların, örnek miktarının artırılarak bu analizlerin gerçekleştirilmesinin daha geniş bir veri setine ulaşılmasını sağlayabileceği ve çalışmanın genel geçerliliğini artırabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak mevcut tez çalışmasında; ultrasantrifüj yönteminin boyut dışlama kromatografisine göre daha heterojen bir eksozom topluluğu izole ettiği tespit edildi. Tüm yöntemlerle izole edilen eksozomların eksozom biyobelirteci olan CD9, CD63 ve CD81 proteinlerine sahip olduğu Western blot ile kanıtlandı. Ultrasantrifüj yöntemiyle izole edilen eksozomların boyut dışlama kromatografisiyle izole edilen eksozomlara göre daha yüksek protein konsantrasyonuna sahip olduğu bulundu. Fakat TEM analizinde ultrasantrifüj yöntemiyle izole edilen eksozom topluluğunda çok fazla hücresel kirliliğin de bulunduğu tespit edildi. Dolayısıyla ultrasanrifüjle izole edilen eksozomların daha fazla protein içeriğine sahip olması bu yöntemin daha yoğun miktarda eksozom izole edebildiğinden ziyade daha yoğun bir hücresel kirlilik içermesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Sonuçlar bireysel olarak değerlendirildiğinde tüm bireylerde minimum span değerine sahip olan yöntemin SEC olduğu, tüm bireylerde en homojen eksozom topluluğunu SEC yönteminin ürettiği belirlendi. Bu durumun NTA grafiklerinin paternine de yansıdığı tespit edildi; SEC yöntemiyle izole edilen eksozomların

NTA grafikleri tüm bireylerde benzer paterni üretirken; UC yöntemiyle izole edilen eksozomların NTA grafikleri bireyler arasında span değerine de yansıyacak derecede farklı paternlerde grafikler ürettiği tespit edildi. Ayrıca tüm bireyler için SEC yöntemiyle izole edilen eksozomların UC'nin tüm varyasyonlarıyla izole edilen eksozomalara göre daha yüksek konsantrasyonda parçacık içerdiği saptandı.

Bunun yanı sıra literatürde ultrasantrifüjle 3.000xg hızla santrifüjün sonunda insan periferik kan plazmasından mikrovezikül izole edildiği bilgisi mevcuttur. Fakat yapılan NTA analizine göre, 3000xg ile izole edilen mikrovezikül topluluğunun büyük miktarda eksozom içerdiği de tespit edildi. Sonuçlarımıza göre aynı materyalden önce mikrovezikül, sonrasında eksozom izolasyonu yapmanın yüksek miktarda eksozom kaybına yol açtığı belirlenmiştir.

SEC yöntemiyle yapılan eksozom izolasyonunda daha düşük protein konsantrasyonları görülürken bu yöntem tüm bireylerde NTA analizinde daha stabil grafikler oluşturdu. Yani SEC, ultrasantrifüj yöntemine göre daha saf bir eksozom topluluğu elde edilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca düşük protein konsantrasyonu seviyelerine rağmen SEC ile izole edilen tüm eksozomlarda eksozom biyobelirteci olan CD63, CD81 ve CD9 proteinlerinin varlığı Western ile doğrulandı. Literatürde UC'nin eksozom izolasyonunda altın standart olduğu vurgulanmaktadır [178]. Fakat bu tez çalışmasında SEC'in UC'ye göre özellikle konsantrasyon açısından daha üstün olduğu keşfedildi.

Sonuç olarak eksozom izolasyonunda UC yönteminin farklı hızlarının istatistiksel anlamda farklı sonuçlar üretmediği ve SEC yönteminin UC yöntemine göre özellikle konsantrasyon açısından daha üstün olduğu tespit edildi. Bilindiği kadarıyla bu çalışma insan kan plazmasından eksozom izolasyon yöntemlerinden UC'nin farklı hızlarıyla SEC'i kıyaslayan ilk çalışmadır. Ayrıca bu tez çalışması izole edilen eksozomların NTA verilerini derinlemesine karşılaştıran ilk çalışmadır. Tez çalışması bu yönüyle özgünlük taşımakta ve literatüre katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda eksozom izolasyonunda standardizasyona duyulan ihtiyacın bir kısmını aydınlatmaktadır.

KAYNAKÇA

[1] "The Cell: A Molecular Approach - Geoffrey M. Cooper, Kenneth Adams - Google Kitaplar." Accessed: Dec. 08, 2024. [Online]. Available: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=GNebEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=+Cooper,+G.+M.,+(2019),+%E2%80%9CCell+Signaling%E2%80%9D,+The+Cell+A+Molecular+Approach,+&ots=IJ2lExDjq3&sig=NLcMMZOCY7TPWgxw6loQzzAs9nE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

[2] G. Van Niel, G. D'Angelo, and G. Raposo, "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 19, no. 4, pp. 213–228, Apr. 2018, doi: 10.1038/NRM.2017.125.

[3] L. Edelstein, J. Smythies, P. Quesenberry, and D. Noble, "Exosomes: A Clinical Compendium," *Exosomes: A Clinical Compendium*, pp. 1–519, Jan. 2019, doi: 10.1016/C2017-0-01516-1.

[4] W. M. Henne, N. J. Buchkovich, and S. D. Emr, "The ESCRT Pathway," *Dev Cell*, vol. 21, no. 1, pp. 77–91, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.DEVCEL.2011.05.015/ASSET/3DEB1630-85CF-4A31-9992-880EF05E7C73/MAIN.ASSETS/GR3.JPG.

[5] N. Luhtala and G. Odorizzi, "Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes," *Volume 166, Issue 5, Pages 717 - 729*, vol. 166, no. 5, pp. 717–729, Aug. 2004, doi: 10.1083/jcb.200403139.

[6] M. Colombo *et al.*, "Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles," *J Cell Sci*, vol. 126, no. 24, pp. 5553–5565, Dec. 2013, doi: 10.1242/jcs.128868.

[7] C. E. Jackson, B. S. Scruggs, J. E. Schaffer, and P. I. Hanson, "Effects of Inhibiting VPS4 Support a General Role for ESCRTs in Extracellular

Vesicle Biogenesis," *Biophys J*, vol. 113, no. 6, pp. 1342–1352, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.BPJ.2017.05.032.

[8] R. Ghossoub *et al.*, "Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2," *Nat Commun*, vol. 5, p. 3477, Mar. 2014, doi: 10.1038/ncomms4477.

[9] N. S. Imjeti *et al.*, "Syntenin mediates SRC function in exosomal cell-to-cell communication," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 47, pp. 12495–12500, Nov. 2017, doi: 10.1073/PNAS.1713433114/SUPPL_FILE/PNAS.201713433SI.PDF.

[10] T. Kajimoto, T. Okada, S. Miya, L. Zhang, and S. I. Nakamura, "Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes," *Nat Commun*, vol. 4, p. 2712, Nov. 2013, doi: 10.1038/ncomms3712.

[11] K. Trajkovic *et al.*, "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes," *Science (1979)*, vol. 319, no. 5867, pp. 1244–1247, Feb. 2008, doi: 10.1126/SCIENCE.1153124/SUPPL_FILE/TRAJKOVIC.SOM.PDF.

[12] R. Alonso, M. C. Rodríguez, J. Pindadolh, E. Merino, I. Mérida, and M. Izquierdo, "Diacylglycerol Kinase α Regulates the Secretion of Lethal Exosomes Bearing Fas Ligand during Activation-induced Cell Death of T Lymphocytes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 31, pp. 28439–28450, Aug. 2005, doi: 10.1074/JBC.M501112200.

[13] S. Charrin, S. Jouannet, C. Boucheix, and E. Rubinstein, "Tetraspanins at a glance," *J Cell Sci*, vol. 127, no. 17, pp. 3641–3648, Jan. 2014, doi: 10.1242/jcs.154906.

[14] N. Latysheva *et al.*, "Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: Mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63," *Mol Cell Biol*, vol. 26, no. 20, pp. 7707–7718, Oct. 2006, doi: 10.1128/MCB.00849-06.

[15] C. M. Fader, D. G. Sánchez, M. B. Mestre, and M. I. Colombo, "TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved

in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1793, no. 12, pp. 1901–1916, Dec. 2009, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2009.09.011.

[16] M. Ruiz-Martinez *et al.*, "YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 32, pp. 51515–51524, Jun. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.9862.

[17] S. Sinha *et al.*, "Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics," *Journal of Cell Biology*, vol. 214, no. 2, pp. 197–213, Jul. 2016, doi: 10.1083/JCB.201601025/VIDEO-2.

[18] M. Ostrowski *et al.*, "Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway," *Nature Cell Biology 2010 12:1*, vol. 12, no. 1, pp. 19–30, Dec. 2009, doi: 10.1038/ncb2000.

[19] A. Bobrie *et al.*, "Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression," *Cancer Res*, vol. 72, no. 19, pp. 4920–4930, Oct. 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0925.

[20] C. Hsu *et al.*, "Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C," *Journal of Cell Biology*, vol. 189, no. 2, pp. 223–232, Apr. 2010, doi: 10.1083/JCB.200911018.

[21] M. F. Baietti *et al.*, "Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes," *Nature Cell Biology 2012 14:7*, vol. 14, no. 7, pp. 677–685, Jun. 2012, doi: 10.1038/ncb2502.

[22] C. S. Wegener *et al.*, "Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5," *Histochem Cell Biol*, vol. 133, no. 1, pp. 41–55, Oct. 2010, doi: 10.1007/S00418-009-0643-8/FIGURES/10.

[23] R. J. Loomis, D. A. Holmes, A. Elms, P. A. Solski, C. J. Der, and L. Su, "Citron Kinase, a RhoA Effector, Enhances HIV-1 Virion Production by Modulating Exocytosis," *Traffic*, vol. 7, no. 12, pp. 1643–1653, Dec. 2006, doi: 10.1111/J.1600-0854.2006.00503.X.

[24] S. Phuyal *et al.*, "The Ether Lipid Precursor Hexadecylglycerol Stimulates the Release and Changes the Composition of Exosomes Derived from PC-3

Cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, no. 7, pp. 4225–4237, Feb. 2015, doi: 10.1074/JBC.M114.593962.

[25] K. Strauss *et al.*, "Exosome Secretion Ameliorates Lysosomal Storage of Cholesterol in Niemann-Pick Type C Disease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 34, pp. 26279–26288, Aug. 2010, doi: 10.1074/JBC.M110.134775.

[26] A. Llorente, B. van Deurs, and K. Sandvig, "Cholesterol regulates prostasome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells," *Eur J Cell Biol*, vol. 86, no. 7, pp. 405–415, Jul. 2007, doi: 10.1016/J.EJCB.2007.05.001.

[27] A. Savina, M. Furlán, M. Vidal, and M. I. Colombo, "Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 22, pp. 20083–20090, May 2003, doi: 10.1074/JBC.M301642200.

[28] D. Hoshino *et al.*, "Exosome Secretion Is Enhanced by Invadopodia and Drives Invasive Behavior," *Cell Rep*, vol. 5, no. 5, pp. 1159–1168, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.CELREP.2013.10.050.

[29] C. Villarroya-Beltri *et al.*, "ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins," *Nat Commun*, vol. 7, p. 13588, Nov. 2016, doi: 10.1038/ncomms13588.

[30] R. K. Gangalum, A. M. Bhat, S. A. Kohan, and S. P. Bhat, "Inhibition of the Expression of the Small Heat Shock Protein αB-Crystallin Inhibits Exosome Secretion in Human Retinal Pigment Epithelial Cells in Culture," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, no. 25, pp. 12930–12942, Jun. 2016, doi: 10.1074/JBC.M115.698530.

[31] A. Conigliaro, S. Fontana, S. Raimondo, and R. Alessandro, "Exosomes: Nanocarriers of biological messages," *Adv Exp Med Biol*, vol. 998, pp. 23–43, 2017, doi: 10.1007/978-981-10-4397-0_2/TABLES/1.

[32] Z. Andreu and M. Yáñez-Mó, "Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function," *Front Immunol*, vol. 5, no. SEP, p. 442, Jan. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.

[33] J. H. Hurley and G. Odorizzi, “Get on the exosome bus with ALIX,” *Nature Cell Biology 2012 14:7*, vol. 14, no. 7, pp. 654–655, Jun. 2012, doi: 10.1038/ncb2530.

[34] A. Hoshino *et al.*, “Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis,” *Nature 2015 527:7578*, vol. 527, no. 7578, pp. 329–335, Oct. 2015, doi: 10.1038/nature15756.

[35] O. Schillaci *et al.*, “Exosomes from metastatic cancer cells transfer amoeboid phenotype to non-metastatic cells and increase endothelial permeability: Their emerging role in tumor heterogeneity,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 4711, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05002-y.

[36] S. Taverna *et al.*, “Curcumin modulates chronic myelogenous leukemia exosomes composition and affects angiogenic phenotype via exosomal miR-21,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 21, pp. 30420–30439, Mar. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.8483.

[37] S. P. Li, Z. X. Lin, X. Y. Jiang, and X. Y. Yu, “Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools,” *Acta Pharmacologica Sinica 2018 39:4*, vol. 39, no. 4, pp. 542–551, Jan. 2018, doi: 10.1038/aps.2017.178.

[38] O. Moreno-Gonzalo, I. Fernandez-Delgado, and F. Sanchez-Madrid, “Post-translational add-ons mark the path in exosomal protein sorting,” *Cellular and Molecular Life Sciences 2017 75:1*, vol. 75, no. 1, pp. 1–19, Oct. 2017, doi: 10.1007/S00018-017-2690-Y.

[39] R. Kalluri and V. S. Lebleu, “Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes,” *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 81, no. 1, pp. 275–280, Jan. 2016, doi: 10.1101/SQB.2016.81.030932.

[40] C. Kahlert *et al.*, “Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 7, pp. 3869–3875, Feb. 2014, doi: 10.1074/JBC.C113.532267.

[41] E. Lázaro-Ibáñez *et al.*, “Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes,” *Prostate*, vol. 74, no. 14, pp. 1379–1390, Oct. 2014, doi: 10.1002/PROS.22853.

[42] B. K. Thakur *et al.*, “Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection,” *Cell Research 2014 24:6*, vol. 24, no. 6, pp. 766–769, Apr. 2014, doi: 10.1038/cr.2014.44.

[43] J. Cai, G. Wu, P. A. Jose, and C. Zeng, “Functional transferred DNA within extracellular vesicles,” *Exp Cell Res*, vol. 349, no. 1, pp. 179–183, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.YEXCR.2016.10.012.

[44] J. Cai *et al.*, “Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells,” *J Mol Cell Biol*, vol. 5, no. 4, pp. 227–238, Aug. 2013, doi: 10.1093/JMCB/MJT011.

[45] A. Takahashi *et al.*, “Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells,” *Nat Commun*, vol. 8, p. 15287, May 2017, doi: 10.1038/ncomms15287.

[46] J. C. M. Wan *et al.*, “Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA,” *Nature Reviews Cancer 2017 17:4*, vol. 17, no. 4, pp. 223–238, Feb. 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.7.

[47] M. Guescini, S. Genedani, V. Stocchi, and L. F. Agnati, “Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA,” *J Neural Transm*, vol. 117, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2010, doi: 10.1007/S00702-009-0288-8/FIGURES/1.

[48] Z. Sun *et al.*, “Emerging role of exosome-derived long non-coding RNAs in tumor microenvironment,” *Mol Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 1–9, Apr. 2018, doi: 10.1186/S12943-018-0831-Z/FIGURES/4.

[49] M. F. Bolukbasi *et al.*, “miR-1289 and ‘Zipcode’-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 1, no. 2, p. e10, Jan. 2012, doi: 10.1038/MTNA.2011.2.

[50] T. Gao, J. Shu, and J. Cui, “A systematic approach to RNA-associated motif discovery,” *BMC Genomics*, vol. 19, no. 1, p. 146, Feb. 2018, doi: 10.1186/s12864-018-4528-x.

[51] S. R. Baglio *et al.*, “Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species,” *Stem Cell Res Ther*, vol. 6, no. 1, p. 127, Jul. 2015, doi: 10.1186/s13287-015-0116-z.

[52] N. P. Hessvik, S. Phuyal, A. Brech, K. Sandvig, and A. Llorente, “Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1819, no. 11–12, pp. 1154–1163, Nov. 2012, doi: 10.1016/J.BBAGRM.2012.08.016.

[53] Z. Sun *et al.*, “Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications,” *Mol Cancer*, vol. 17, no. 1, p. 147, Oct. 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0897-7.

[54] F. Momen-Heravi, S. J. Getting, and S. A. Moschos, “Extracellular vesicles and their nucleic acids for biomarker discovery,” *Pharmacol Ther*, vol. 192, pp. 170–187, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2018.08.002.

[55] N. Garcia-Romero, S. Esteban-Rubio, G. Rackov, J. Carrión-Navarro, C. Belda-Iniesta, and A. Ayuso-Sacido, “Extracellular vesicles compartment in liquid biopsies: Clinical application,” *Mol Aspects Med*, vol. 60, pp. 27–37, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.MAM.2017.11.009.

[56] D. Koppers-Lalic *et al.*, “Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes,” *Cell Rep*, vol. 8, no. 6, pp. 1649–1658, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.CELREP.2014.08.027.

[57] M. L. Squadrito *et al.*, “Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells,” *Cell Rep*, vol. 8, no. 5, pp. 1432–1446, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.CELREP.2014.07.035.

[58] T. Janas, M. M. Janas, K. Sapoń, and T. Janas, “Mechanisms of RNA loading into exosomes,” *FEBS Lett*, vol. 589, no. 13, pp. 1391–1398, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2015.04.036.

[59] S. A. Melo *et al.*, “Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis,” *Cancer Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 707–721, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.CCELL.2014.09.005.

[60] T. Skotland, K. Sandvig, and A. Llorente, “Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward,” *Prog Lipid Res*, vol. 66, pp. 30–41, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2017.03.001.

[61] R. A. Haraszti *et al.*, “High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources,” *J Extracell Vesicles*, vol. 5, no. 1, p. 32570, Jan. 2016, doi: 10.3402/jev.v5.32570.

[62] X. Yi, J. Ma, Y. Guan, R. Chen, L. Yang, and X. Xia, “The feasibility of using mutation detection in ctDNA to assess tumor dynamics,” *Int J Cancer*, vol. 140, no. 12, pp. 2642–2647, Jun. 2017, doi: 10.1002/IJC.30620.

[63] C. Guay and R. Regazzi, “Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk,” *Diabetes Obes Metab*, vol. 19, pp. 137–146, Sep. 2017, doi: 10.1111/DOM.13027.

[64] G. Chen *et al.*, “Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response,” *Nature 2018 560:7718*, vol. 560, no. 7718, pp. 382–386, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0392-8.

[65] L. Lugini *et al.*, “Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes,” *The Journal of Immunology*, vol. 189, no. 6, pp. 2833–2842, Sep. 2012, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1101988.

[66] S. H. Kim, N. R. Bianco, W. J. Shufesky, A. E. Morelli, and P. D. Robbins, “MHC Class II+ Exosomes in Plasma Suppress Inflammation in an Antigen-Specific and Fas Ligand/Fas-Dependent Manner,” *The Journal of Immunology*, vol. 179, no. 4, pp. 2235–2241, Aug. 2007, doi: 10.4049/JIMMUNOL.179.4.2235.

[67] L. Rivoltini *et al.*, “TNF-related apoptosis-inducing ligand (trail)-armed exosomes deliver proapoptotic signals to tumor site,” *Clinical Cancer Research*, vol. 22, no. 14, pp. 3499–3512, Jul. 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2170.

[68] I. J. McGough and J. P. Vincent, “Exosomes in developmental signalling,” *Development*, vol. 143, no. 14, pp. 2482–2493, Jul. 2016, doi: 10.1242/DEV.126516.

[69] H. Sheldon *et al.*, “New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes,” *Blood*, vol. 116, no. 13, pp. 2385–2394, Sep. 2010, doi: 10.1182/BLOOD-2009-08-239228.

[70] S. Raimondo *et al.*, “Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism,” *Cell Communication and Signaling*, vol. 13, no. 1, p. 8, Jan. 2015, doi: 10.1186/s12964-015-0086-x.

[71] L. Yu *et al.*, “Exosomes with membrane-associated TGF-β1 from gene-modified dendritic cells inhibit murine EAE independently of MHC restriction,” *Eur J Immunol*, vol. 43, no. 9, pp. 2461–2472, Sep. 2013, doi: 10.1002/EJI.201243295.

[72] C. Corrado, L. Saieva, S. Raimondo, A. Santoro, G. De Leo, and R. Alessandro, “Chronic myelogenous leukaemia exosomes modulate bone marrow microenvironment through activation of epidermal growth factor receptor,” *J Cell Mol Med*, vol. 20, no. 10, pp. 1829–1839, Oct. 2016, doi: 10.1111/JCMM.12873.

[73] S. Taverna *et al.*, “Amphiregulin contained in NSCLC-exosomes induces osteoclast differentiation through the activation of EGFR pathway,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 3170, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-03460-y.

[74] A. Montecalvo *et al.*, “Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes,” *Blood*, vol. 119, no. 3, pp. 756–766, Jan. 2012, doi: 10.1182/BLOOD-2011-02-338004.

[75] L. A. Mulcahy, R. C. Pink, and D. R. F. Carter, “Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake,” *J Extracell Vesicles*, vol. 3, no. 1, 2014, doi: 10.3402/JEV.V3.24641.

[76] K. J. McKelvey, K. L. Powell, A. W. Ashton, J. M. Morris, and S. A. McCracken, “Exosomes: Mechanisms of Uptake,” *J Circ Biomark*, vol. 4, no. 1, Jul. 2015, doi: 10.33393/JCB.2015.2057.

[77] M. Kaksonen and A. Roux, “Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2018 19:5*, vol. 19, no. 5, pp. 313–326, Feb. 2018, doi: 10.1038/nrm.2017.132.

[78] T. Tian *et al.*, “Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 32, pp. 22258–22267, Aug. 2014, doi: 10.1074/JBC.M114.588046.

[79] K. J. Svensson *et al.*, “Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 24, pp. 17713–17724, Jun. 2013, doi: 10.1074/JBC.M112.445403.

[80] M. F. Santos, G. Rappa, J. Karbanová, T. Kurth, D. Corbeil, and A. Lorico, “VAMP-associated protein-A and oxysterol-binding protein–related protein 3 promote the entry of late endosomes into the nucleoplasmic reticulum,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, no. 36, pp. 13834–13848, Sep. 2018, doi: 10.1074/JBC.RA118.003725.

[81] X. Song *et al.*, “Cancer Cell-derived Exosomes Induce Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Monocyte Survival by Transport of Functional Receptor Tyrosine Kinases,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, no. 16, pp. 8453–8464, Apr. 2016, doi: 10.1074/JBC.M116.716316.

[82] D. W. Greening, H. P. T. Nguyen, K. Elgass, R. J. Simpson, and L. A. Salamonsen, “Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: Insights into endometrial-embryo interactions,” *Biol Reprod*, vol. 94, no. 2, p. 38, Feb. 2016, doi: 10.1095/biolreprod.115.134890.

[83] C. Crewe *et al.*, “An Endothelial-to-Adipocyte Extracellular Vesicle Axis Governed by Metabolic State,” *Cell*, vol. 175, no. 3, pp. 695-708.e13, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.09.005.

[84] G. Lou, Z. Chen, M. Zheng, and Y. Liu, “Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases,” *Experimental & Molecular Medicine 2017 49:6*, vol. 49, no. 6, pp. e346–e346, Jun. 2017, doi: 10.1038/emm.2017.63.

[85] D. M. Pegtel *et al.*, "Functional delivery of viral miRNAs via exosomes," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 14, pp. 6328–6333, Apr. 2010, doi: 10.1073/PNAS.0914843107/SUPPL_FILE/PNAS.200914843SI.PDF.

[86] J. P. Tosar, F. Gámbaro, J. Sanguinetti, B. Bonilla, K. W. Witwer, and A. Cayota, "Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines," *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no. 11, pp. 5601–5616, Jun. 2015, doi: 10.1093/NAR/GKV432.

[87] C. Subra *et al.*, "Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins," *J Lipid Res*, vol. 51, no. 8, pp. 2105–2120, Aug. 2010, doi: 10.1194/JLR.M003657.

[88] C. Théry, L. Zitvogel, and S. Amigorena, "Exosomes: composition, biogenesis and function," *Nat Rev Immunol*, vol. 2, no. 8, pp. 569–579, 2002, doi: 10.1038/NRI855.

[89] H. Kalra *et al.*, "Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma," *Proteomics*, vol. 13, no. 22, pp. 3354–3364, Nov. 2013, doi: 10.1002/PMIC.201300282.

[90] P. A. Gonzales *et al.*, "Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 20, no. 2, pp. 363–379, Feb. 2009, doi: 10.1681/ASN.2008040406.

[91] Y. Zhao, W. Wang, C. Li, Y. Xu, and L. He, "Tuning the magnetic properties of the monolayer MoSe2 by nonmetal doping: First-principles study," *Solid State Commun*, vol. 281, pp. 6–11, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.SSC.2018.06.010.

[92] S. Runz *et al.*, "Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM," *Gynecol Oncol*, vol. 107, no. 3, pp. 563–571, Dec. 2007, doi: 10.1016/J.YGYNO.2007.08.064.

[93] P. Torregrosa Paredes *et al.*, "Differences in exosome populations in human breast milk in relation to allergic sensitization and lifestyle," *Allergy*, vol. 69, no. 4, pp. 463–471, Apr. 2014, doi: 10.1111/ALL.12357.

[94] A. Stuendl *et al.*, “Induction of α-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson’s disease and dementia with Lewy bodies,” *Brain*, vol. 139, no. 2, pp. 481–494, Feb. 2016, doi: 10.1093/BRAIN/AWV346.

[95] Y. Zhao *et al.*, “Liquid Biopsy of Vitreous Reveals an Abundant Vesicle Population Consistent With the Size and Morphology of Exosomes,” *Transl Vis Sci Technol*, vol. 7, no. 3, p. 6, May 2018, doi: 10.1167/TVST.7.3.6.

[96] M. Colombo *et al.*, “Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles,” *J Cell Sci*, vol. 126, no. 24, pp. 5553–5565, Dec. 2013, doi: 10.1242/jcs.128868.

[97] K. Trajkovic *et al.*, “Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes,” *Science (1979)*, vol. 319, no. 5867, pp. 1244–1247, Feb. 2008, doi: 10.1126/SCIENCE.1153124/SUPPL_FILE/TRAJKOVIC.SOM.PDF.

[98] M. Ostrowski *et al.*, “Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway,” *Nature Cell Biology 2010 12:1*, vol. 12, no. 1, pp. 19–30, Dec. 2009, doi: 10.1038/ncb2000.

[99] A. Bobrie, M. Colombo, S. Krumeich, G. Raposo, and C. Théry, “Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation,” *J Extracell Vesicles*, vol. 1, no. 1, 2012, doi: 10.3402/JEV.V1I0.18397.

[100] M. Mittelbrunn *et al.*, “Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells,” *Nat Commun*, vol. 2, no. 1, p. 282, Jan. 2011, doi: 10.1038/ncomms1285.

[101] A. S. Azmi, B. Bao, and F. H. Sarkar, “Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 32, no. 3–4, pp. 623–642, Dec. 2013, doi: 10.1007/S10555-013-9441-9/FIGURES/4.

[102] L. Alvarez-Erviti *et al.*, "Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission," *Neurobiol Dis*, vol. 42, no. 3, pp. 360–367, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.NBD.2011.01.029.

[103] L. Rajendran *et al.*, "Alzheimer's disease β-amyloid peptides are released in association with exosomes," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 30, pp. 11172–11177, Jul. 2006, doi: 10.1073/PNAS.0603838103/SUPPL_FILE/03838FIG10.PDF.

[104] J. Lin *et al.*, "Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis," *Scientific World Journal*, vol. 2015, p. 657086, Jan. 2015, doi: 10.1155/2015/657086.

[105] D. G. Phinney and M. F. Pittenger, "Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy," *Stem Cells*, vol. 35, no. 4, pp. 851–858, Apr. 2017, doi: 10.1002/STEM.2575.

[106] S. Kamerkar *et al.*, "Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer," *Nature 2017 546:7659*, vol. 546, no. 7659, pp. 498–503, Jun. 2017, doi: 10.1038/nature22341.

[107] R. M. Johnstone, M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide, "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes).," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 19, pp. 9412–9420, Jul. 1987, doi: 10.1016/S0021-9258(18)48095-7.

[108] J. Kowal *et al.*, "Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, no. 8, Feb. 2016, doi: 10.1073/pnas.1521230113.

[109] P. P. Van Veldhoven, E. Baumgart, and G. P. Mannaerts, "Iodixanol (Optiprep), an Improved Density Gradient Medium for the Iso-osmotic Isolation of Rat Liver Peroxisomes," *Anal Biochem*, vol. 237, no. 1, pp. 17–23, May 1996, doi: 10.1006/ABIO.1996.0194.

[110] D. W. Greening, R. Xu, H. Ji, B. J. Tauro, and R. J. Simpson, "A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of

Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1295, pp. 179–209, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2550-6_15.

[111] D.-S. Choi and Y. S. Gho, "Isolation of extracellular vesicles for proteomic profiling," *Proteomic Profiling: Methods and Protocols*, pp. 167–177, 2015.

[112] A. Clayton *et al.*, "Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry," *J Immunol Methods*, vol. 247, no. 1–2, pp. 163–174, Jan. 2001, doi: 10.1016/S0022-1759(00)00321-5.

[113] P. Sharma *et al.*, "Immunoaffinity-based isolation of melanoma cell-derived exosomes from plasma of patients with melanoma," *J Extracell Vesicles*, vol. 7, no. 1, p. 1435138, Jan. 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1435138.

[114] L. Lugini *et al.*, "Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes," *The Journal of Immunology*, vol. 189, no. 6, pp. 2833–2842, Sep. 2012, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1101988.

[115] M. Mustapic *et al.*, "Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: A potential window into brain pathologic processes," *Front Neurosci*, vol. 11, no. MAY, p. 250515, May 2017, doi: 10.3389/FNINS.2017.00278/BIBTEX.

[116] U. Gurriaran-Rodriguez, Y. De Repentigny, R. Kothary, and M. A. Rudnicki, "Isolation of small extracellular vesicles from regenerating muscle tissue using tangential flow filtration and size exclusion chromatography," *Skelet Muscle*, vol. 14, no. 1, p. 22, Oct. 2024, doi: 10.1186/S13395-024-00355-1.

[117] S. Sharif *et al.*, "Isolation of plasma small extracellular vesicles by an optimized size-exclusion chromatography-based method for clinical applications," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 87, Jul. 2023, doi: 10.1016/J.JDDST.2023.104796.

[118] M. Grenhas, R. Lopes, B. V. Ferreira, F. Barahona, C. João, and E. A. Carneiro, "Size-Exclusion Chromatography: A Path to Higher Yield and Reproducibility Compared to Sucrose Cushion Ultracentrifugation for

Extracellular Vesicle Isolation in Multiple Myeloma," *Int J Mol Sci*, vol. 25, no. 15, Aug. 2024, doi: 10.3390/IJMS25158496.

[119] S. Thomas *et al.*, "Investigate the efficacy of size exclusion chromatography for the isolation of extracellular vesicles from C. elegans.," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 1233, pp. 123982–123982, Dec. 2023, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2023.123982.

[120] J. Van Deun *et al.*, "The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling," *J Extracell Vesicles*, vol. 3, no. 1, p. 24858, 2014.

[121] "Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum." Accessed: Dec. 08, 2024. [Online]. Available: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2017.3080

[122] J. Kim, H. Shin, J. Kim, J. Kim, and J. Park, "Isolation of high-purity extracellular vesicles by extracting proteins using aqueous two-phase system," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, p. e0129760, 2015.

[123] Y. Yuana *et al.*, "Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles," *J Extracell Vesicles*, vol. 4, no. 1, p. 29260, Jan. 2015, doi: 10.3402/jev.v4.29260.

[124] R. J. Lobb *et al.*, "Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma," *J Extracell Vesicles*, vol. 4, no. 1, p. 27031, Jan. 2015, doi: 10.3402/jev.v4.27031.

[125] M. K. Jung and J. Y. Mun, "Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy.," *J Vis Exp*, no. 131, Jan. 2018, doi: 10.3791/56482.

[126] V. Sokolova *et al.*, "Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 87, no. 1, pp. 146–150, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2011.05.013.

[127] S. Sharma *et al.*, "Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM, and force

spectroscopy," *ACS Nano*, vol. 4, no. 4, pp. 1921–1926, Apr. 2010, doi: 10.1021/NN901824N/SUPPL_FILE/NN901824N_SI_002.PDF.

[128] I. Tatischeff, E. Larquet, J. M. Falcón-Pérez, P.-Y. Turpin, and S. G. Kruglik, "Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy," *J Extracell Vesicles*, vol. 1, no. 1, p. 19179, Jan. 2012, doi: 10.3402/jev.v1i0.19179.

[129] Y. Yuana *et al.*, "Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma," *J Extracell Vesicles*, vol. 2, no. 1, p. 21494, Jan. 2013, doi: 10.3402/jev.v2i0.21494.

[130] H. Zhang *et al.*, "Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation," *Nature Cell Biology 2018 20:3*, vol. 20, no. 3, pp. 332–343, Feb. 2018, doi: 10.1038/s41556-018-0040-4.

[131] K. E. Petersen *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*, vol. 406, no. 30, pp. 7855–7866, Nov. 2014, doi: 10.1007/S00216-014-8040-0/FIGURES/7.

[132] S. Sitar *et al.*, "Size Characterization and Quantification of Exosomes by Asymmetrical-Flow Field-Flow Fractionation," *Anal Chem*, vol. 87, no. 18, pp. 9225–9233, Sep. 2015, doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.5B01636/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AC-2015-01636F_0012.GIF.

[133] A. D. Grabarek, D. Weinbuch, W. Jiskoot, and A. Hawe, "Critical Evaluation of Microfluidic Resistive Pulse Sensing for Quantification and Sizing of Nanometer- and Micrometer-Sized Particles in Biopharmaceutical Products," *J Pharm Sci*, vol. 108, no. 1, pp. 563–573, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.XPHS.2018.08.020.

[134] S. A. Melo *et al.*, "Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer," *Nature 2015 523:7559*, vol. 523, no. 7559, pp. 177–182, Jun. 2015, doi: 10.1038/nature14581.

[135] H. Suárez *et al.*, "A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of Extracellular Vesicles," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, Sep. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11249-2.

[136] G. G. Daaboul *et al.*, "Digital Detection of Exosomes by Interferometric Imaging," *Sci Rep*, vol. 6, Nov. 2016, doi: 10.1038/SREP37246.

[137] A. Yoshimura *et al.*, "Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids," *Scientific Reports 2016 6:1*, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, Aug. 2016, doi: 10.1038/srep31172.

[138] L. M. Epple *et al.*, "Medulloblastoma Exosome Proteomics Yield Functional Roles for Extracellular Vesicles," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e42064, Jul. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0042064.

[139] K. L. Schey, J. M. Luther, and K. L. Rose, "Proteomics characterization of exosome cargo," *Methods*, vol. 87, pp. 75–82, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.YMETH.2015.03.018.

[140] M. Klingeborn, W. M. DIsmuke, N. P. Skiba, U. Kelly, W. D. Stamer, and C. Bowes Rickman, "Directional Exosome Proteomes Reflect Polarity-Specific Functions in Retinal Pigmented Epithelium Monolayers," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–16, Jul. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05102-9.

[141] G. Van Niel and M. Heyman, "The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. II. Intestinal epithelial cell exosomes: perspectives on their structure and function," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 283, no. 2, 2002, doi: 10.1152/AJPGI.00102.2002.

[142] J. Nilsson *et al.*, "Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer," *Br J Cancer*, vol. 100, no. 10, pp. 1603–1607, May 2009, doi: 10.1038/sj.bjc.6605058.

[143] "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers".

[144] G. Szabo and F. Momen-Heravi, "Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets," *Nat Rev Gastroenterol*

Hepatol, vol. 14, no. 8, pp. 455–466, Aug. 2017, doi: 10.1038/NRGASTRO.2017.71.

[145] W. Fitzgerald, M. L. Freeman, M. M. Lederman, E. Vasilieva, R. Romero, and L. Margolis, "A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles," *Scientific Reports 2018 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27190-x.

[146] M. Skliar *et al.*, "Membrane proteins significantly restrict exosome mobility," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 501, no. 4, pp. 1055–1059, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.BBRC.2018.05.107.

[147] S. Bala *et al.*, "Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases," *Hepatology*, vol. 56, no. 5, pp. 1946–1957, Nov. 2012, doi: 10.1002/HEP.25873.

[148] V. Van Giau and S. S. A. An, "Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease," *J Neurol Sci*, vol. 360, pp. 141–152, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.JNS.2015.12.005.

[149] A. E. Kocman, I. Dag, T. Sengel, E. Soztutar, and M. Canbek, "The effect of lithium and lithium-loaded hyaluronic acid hydrogel applications on nerve regeneration and recovery of motor functions in peripheral nerve injury," *Rendiconti Lincei*, vol. 31, no. 3, pp. 889–904, Sep. 2020, doi: 10.1007/S12210-020-00919-5/FIGURES/11.

[150] W. H. Kruskal and W. A. Wallis, "Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis," *J Am Stat Assoc*, vol. 47, no. 260, pp. 583–621, Dec. 1952, doi: 10.1080/01621459.1952.10483441.

[151] P. Virtanen *et al.*, "SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python," *Nature Methods 2020 17:3*, vol. 17, no. 3, pp. 261–272, Feb. 2020, doi: 10.1038/s41592-019-0686-2.

[152] A. Fernández-Castané *et al.*, "Nanoparticle tracking analysis as a process analytical tool for characterising magnetosome preparations," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 127, pp. 426–434, May 2021, doi: 10.1016/J.FBP.2021.03.013.

[153] Y. Tian, D. Tian, X. Peng, and H. Qiu, “Critical parameters to standardize the size and concentration determination of nanomaterials by nanoparticle tracking analysis,” *Int J Pharm*, vol. 656, p. 124097, May 2024, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2024.124097.

[154] F. J. Ansari *et al.*, “Comparison of the efficiency of ultrafiltration, precipitation, and ultracentrifugation methods for exosome isolation,” *Biochem Biophys Rep*, vol. 38, Jul. 2024, doi: 10.1016/J.BBREP.2024.101668.

[155] Ö. Altıntaş and Y. Saylan, “Exploring the Versatility of Exosomes: A Review on Isolation, Characterization, Detection Methods, and Diverse Applications,” *Anal Chem*, vol. 95, no. 44, pp. 16029–16048, Nov. 2023, doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.3C02224/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AC3C02224_0009.GIF.

[156] C. Xu *et al.*, “Exosome nanovesicles: biomarkers and new strategies for treatment of human diseases,” *MedComm (Beijing)*, vol. 5, no. 8, p. e660, Aug. 2024, doi: 10.1002/MCO2.660.

[157] K. W. A. Lee, L. K. W. Chan, L. C. Hung, L. K. W. Phoebe, Y. Park, and K. H. Yi, “Clinical Applications of Exosomes: A Critical Review,” *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 7794*, vol. 25, no. 14, p. 7794, Jul. 2024, doi: 10.3390/IJMS25147794.

[158] “Method for isolating exosome and exosome isolation kit,” Jul. 2018.

[159] S. Sharif *et al.*, “Isolation of plasma small extracellular vesicles by an optimized size-exclusion chromatography-based method for clinical applications,” *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 87, p. 104796, Sep. 2023, doi: 10.1016/J.JDDST.2023.104796.

[160] J. Shen *et al.*, “Exosome Isolation and Detection: From Microfluidic Chips to Nanoplasmonic Biosensor,” *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, doi: 10.1021/ACSAMI.3C19396/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AM3C19396_0007.GIF.

[161] J. Cai and Y. Liu, “Isolation and Characterization of Exosomes from Ocular Samples,” *Methods Mol Biol*, vol. 2858, pp. 63–75, 2025, doi: 10.1007/978-1-0716-4140-8_6.

[162] H. Wei, X. Qian, F. Xie, and D. Cui, “Isolation of exosomes from serum of patients with lung cancer: a comparison of the ultra-high speed centrifugation and precipitation methods,” *Ann Transl Med*, vol. 9, no. 10, pp. 882–882, May 2021, doi: 10.21037/ATM-21-2075.

[163] X. Wu *et al.*, “Exosomes Extraction and Identification,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 2054, pp. 81–91, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9769-5_4.

[164] S. Thomas *et al.*, “Investigate the efficacy of size exclusion chromatography for the isolation of extracellular vesicles from C. elegans,” *Journal of Chromatography B*, vol. 1233, p. 123982, Feb. 2024, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2023.123982.

[165] S. K. Patel *et al.*, “Comprehensive Profiling of Plasma Exosomes Using Data-Independent Acquisitions – New Tools for Aging Cohort Studies,” *bioRxiv*, p. 2021.02.27.433188, Feb. 2021, doi: 10.1101/2021.02.27.433188.

[166] D. Maisano *et al.*, “Uncovering the Exosomes Diversity: A Window of Opportunity for Tumor Progression Monitoring,” *Pharmaceuticals*, vol. 13, no. 8, p. 180, Aug. 2020, doi: 10.3390/PH13080180.

[167] V. Saraswathi *et al.*, “A Pilot Study on the Proteomics Profile of Serum Exosome-Enriched Extracellular Vesicles from Normal versus Individuals with Obesity-Related Insulin Resistance,” *Biomedicines*, vol. 12, no. 4, Apr. 2024, doi: 10.3390/BIOMEDICINES12040799.

[168] K. Felekkis, M. Pieri, and C. Papaneophytou, “Variability in the levels of exosomal miRNAs among human subjects could be explained by differential interactions of exosomes with the endothelium,” *IUBMB Life*, vol. 73, no. 12, pp. 1400–1405, Dec. 2021, doi: 10.1002/IUB.2575.

[169] “Isolation of three different sizes of exosomes in an Asian population with different retinal diseases before and after treatment: preliminary results,” Jan. 2023, doi: 10.6084/M9.FIGSHARE.24916084.

[170] W. Y. Zhang *et al.*, “Large-scale separation and purification of exosomes using ionexchange chromatography,” *Biomedical Research and Therapy*, vol. 11, no. 4, pp. 6348–6356, Apr. 2024, doi: 10.15419/bmrat.v11i4.881.

[171] S. Sharif *et al.*, “Isolation of plasma small extracellular vesicles by an optimized size-exclusion chromatography-based method for clinical applications,” *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 87, p. 104796, Sep. 2023, doi: 10.1016/J.JDDST.2023.104796.

[172] M. Grenhas, R. Lopes, B. V. Ferreira, F. Barahona, C. João, and E. A. Carneiro, “Size-Exclusion Chromatography: A Path to Higher Yield and Reproducibility Compared to Sucrose Cushion Ultracentrifugation for Extracellular Vesicle Isolation in Multiple Myeloma,” *Int J Mol Sci*, vol. 25, no. 15, p. 8496, Aug. 2024, doi: 10.3390/IJMS25158496/S1.

[173] E.-Y. Bok *et al.*, “Exosomes isolation from bovine serum: qualitative and quantitative comparison between ultracentrifugation, combination ultracentrifugation and size exclusion chromatography, and exoEasy methods,” *Journal of Animal Science and Technology J Anim Sci Technol*, vol. 66, no. 5, pp. 1021–1033, 2024, doi: 10.5187/jast.2024.e45.

[174] H. Contreras *et al.*, “Comparative study of size exclusion chromatography for isolation of small extracellular vesicle from cell-conditioned media, plasma, urine, and saliva OPEN ACCESS EDITED BY,” *Front. Nanotechnol*, vol. 5, p. 1146772, 2023, doi: 10.3389/fnano.2023.1146772.

[175] V. Moccia, A. Sammarco, S. Ferro, L. Cavicchioli, and V. Zappulli, “Characterization and function of extracellular vesicles in a canine mammary tumour cell line: Ultracentrifugation versus size exclusion chromatography,” *Vet Comp Oncol*, vol. 21, no. 1, pp. 36–44, Mar. 2023, doi: 10.1111/VCO.12858.

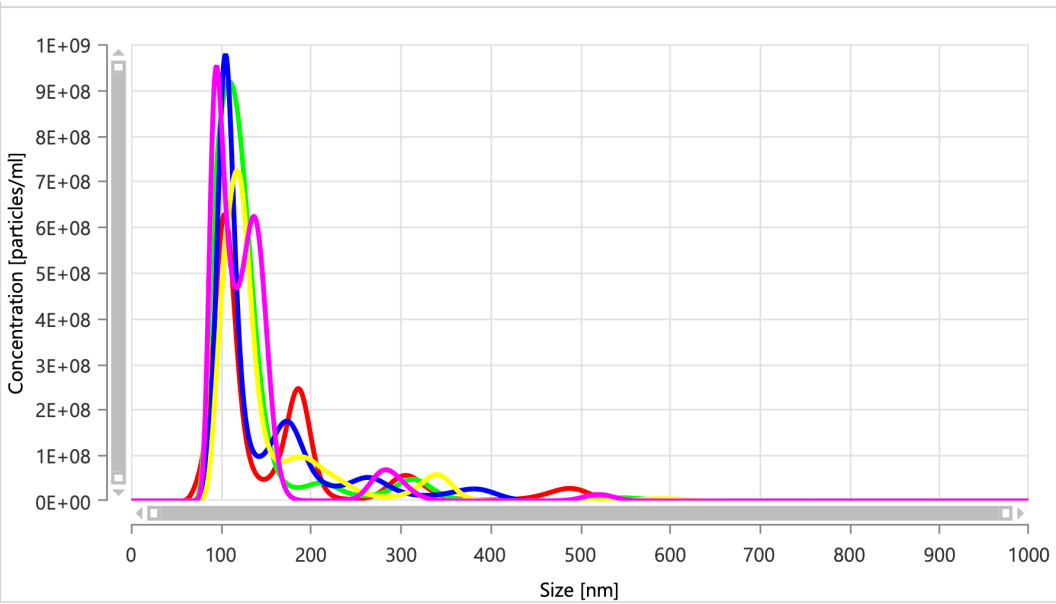
[176] K. Sidhom, P. O. Obi, and A. Saleem, “A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option?,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 18, p. 6466, Sep. 2020, doi: 10.3390/IJMS21186466.

[177] S. Guan *et al.*, “Characterization of Urinary Exosomes Purified with Size Exclusion Chromatography and Ultracentrifugation,” *J Proteome Res*, vol.

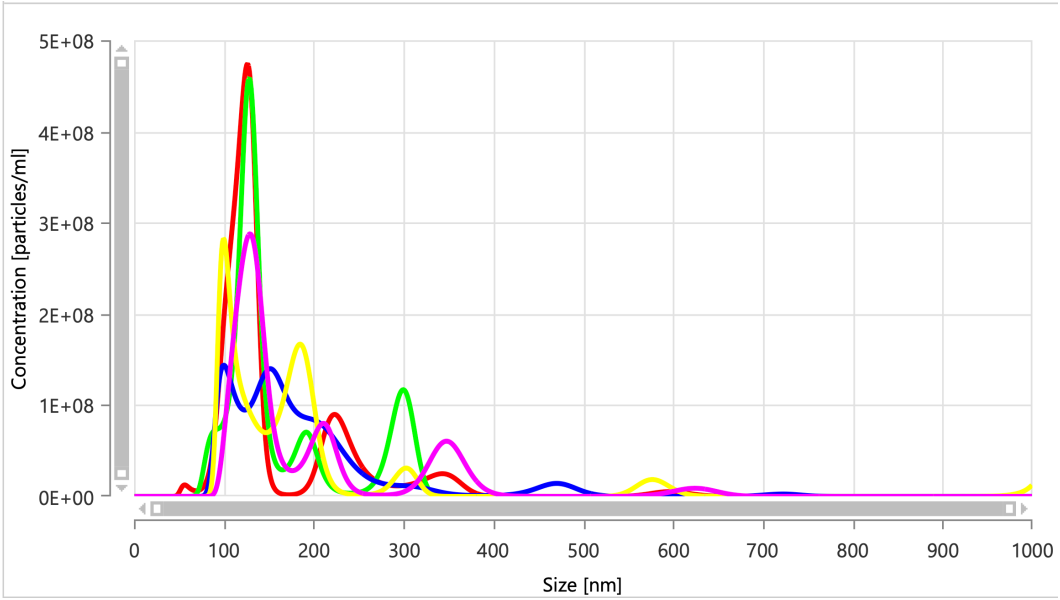
19, no. 6, pp. 2217–2225, Jun. 2020, doi: 10.1021/ACS.JPROTEOME.9B00693.

[178] F. Rahmatinejad, Z. Kharat, H. Jalili, M. K. Renani, and H. Mobasheri, “Comparison of morphology, protein concentration, and size distribution of bone marrow and Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells exosomes isolated by ultracentrifugation and polymer-based precipitation techniques,” *Tissue Cell*, vol. 88, p. 102427, Jun. 2024, doi: 10.1016/J.TICE.2024.102427.

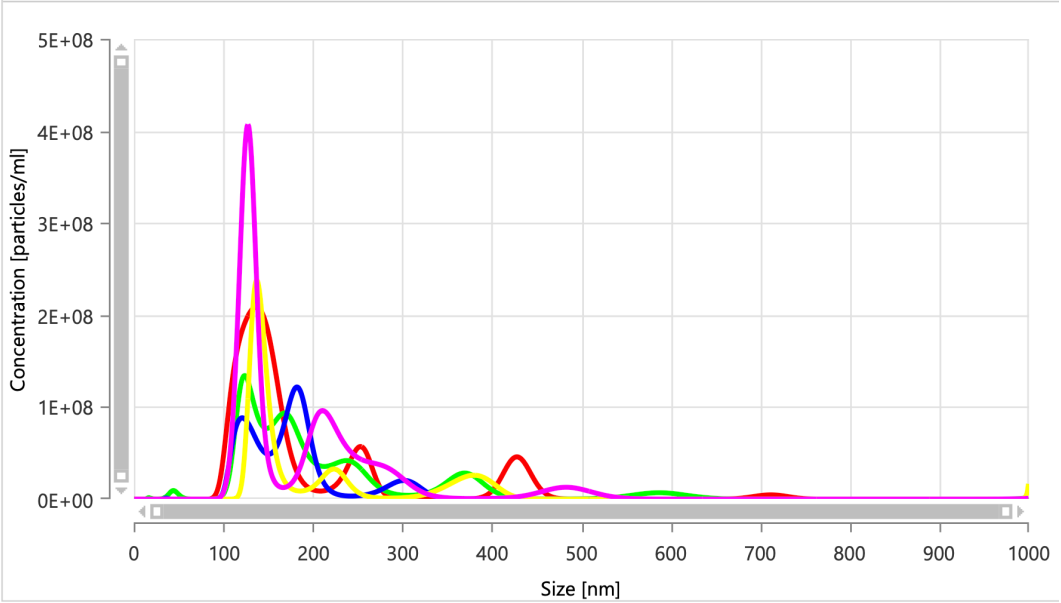
A
TAMAMLAYICI VERİLER



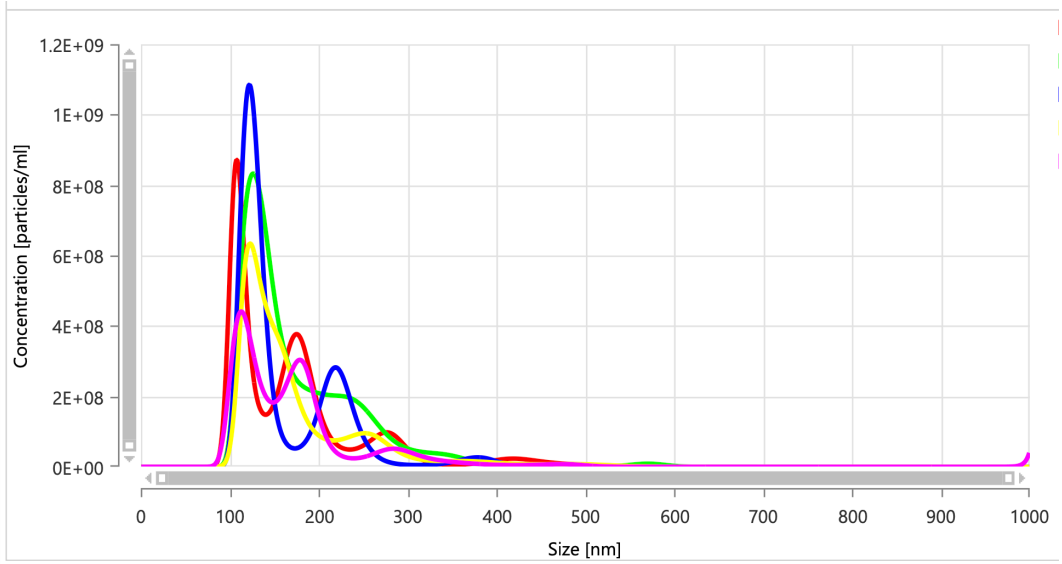
Şekil A.1: Birinci klinik örneğe ait 100.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



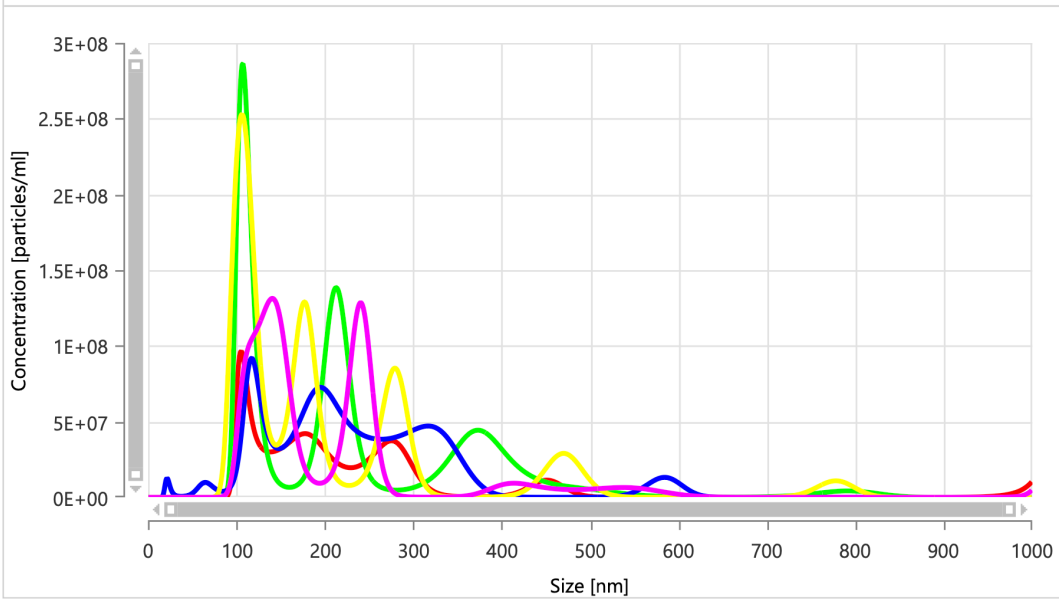
Şekil A.2: Birinci klinik örneğe ait 125.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



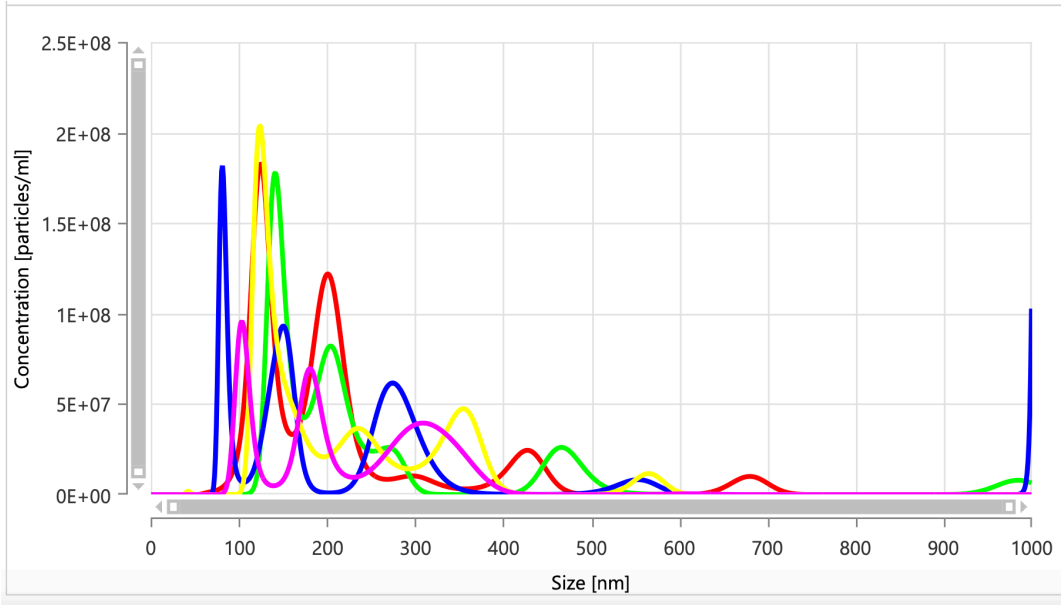
Şekil A.3: Birinci klinik örneğe ait 150.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



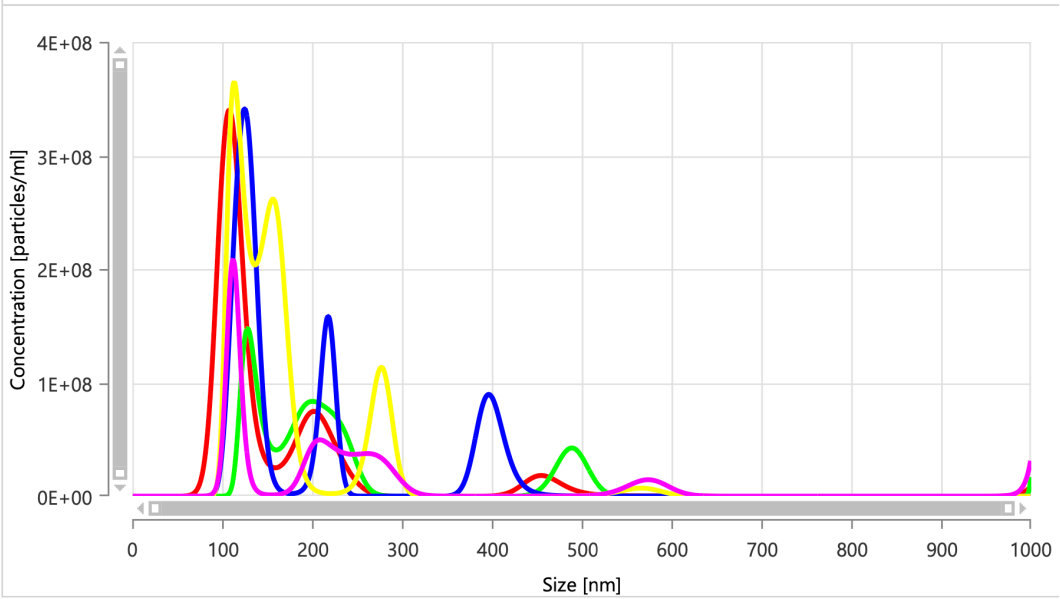
Şekil A.4: Birinci klinik örneğe ait SEC ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



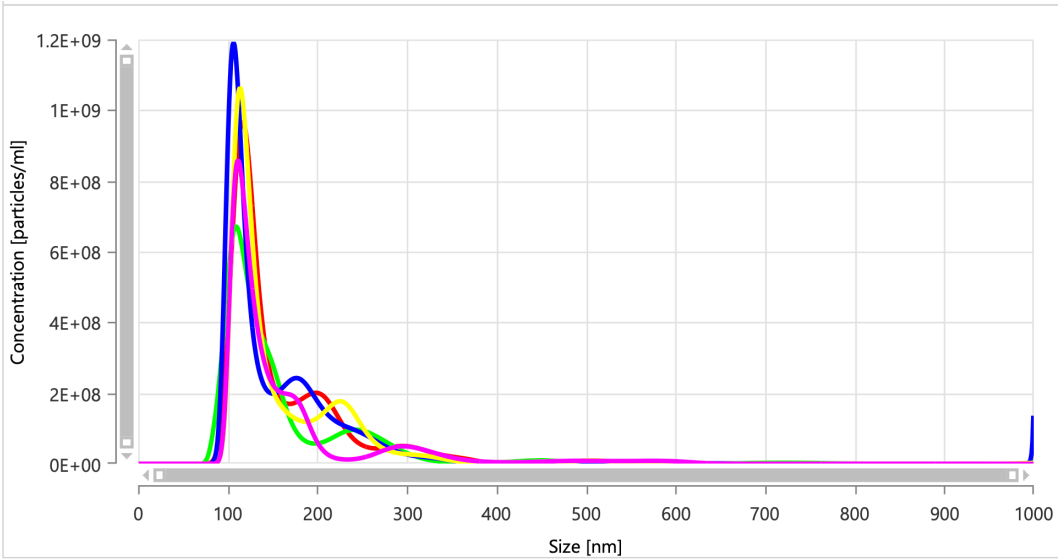
Şekil A.5: İkinci klinik örneğe ait 100.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



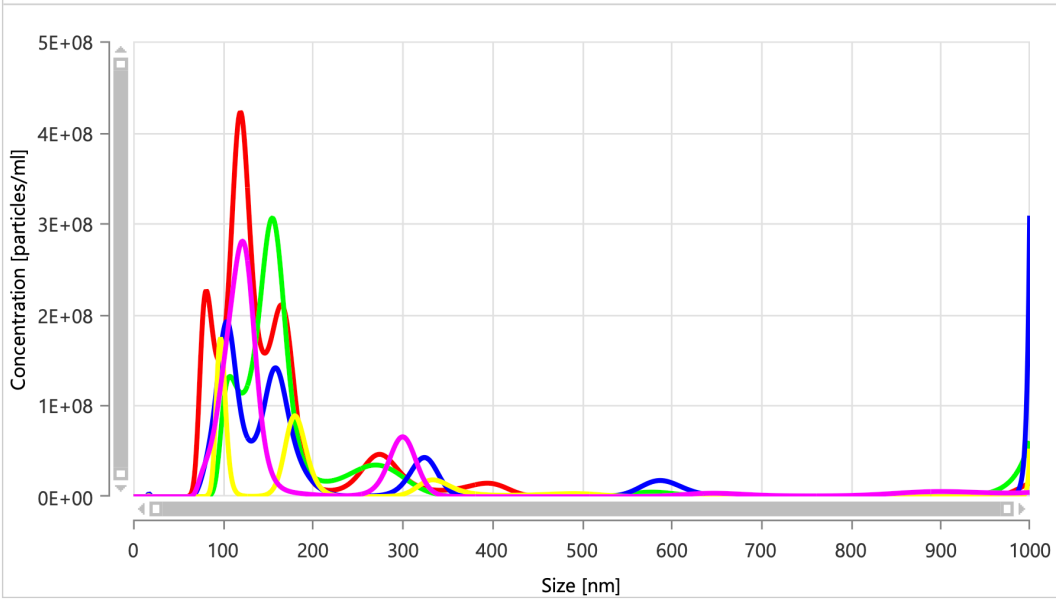
Şekil A.6: İkinci klinik örneğe ait 125.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



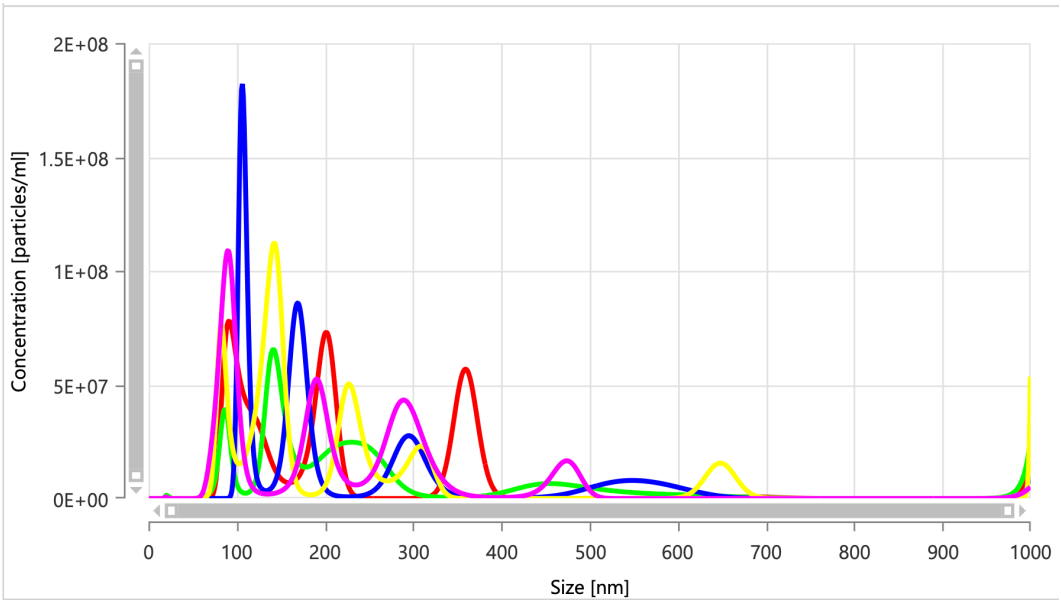
Şekil A.7: İkinci klinik örneğe ait 150.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



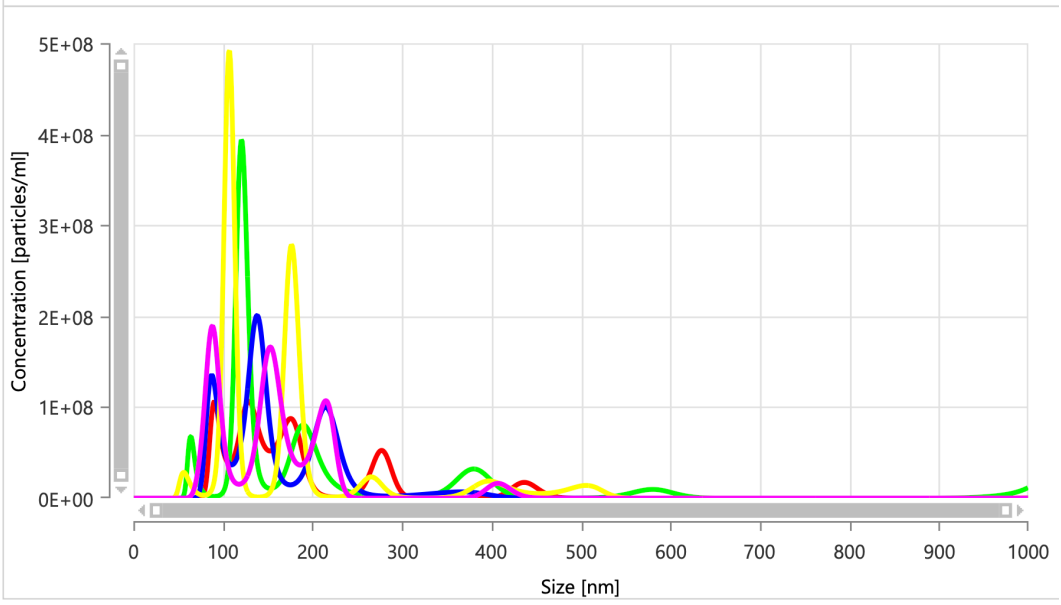
Şekil A.8: İkinci klinik örneğe ait SEC ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



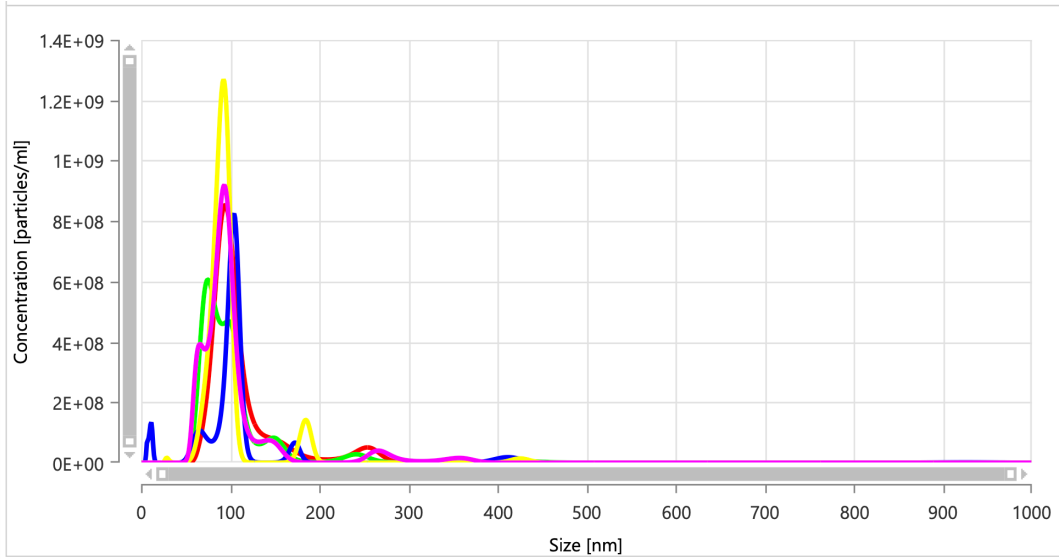
Şekil A.9: Üçüncü klinik örneğe ait 100.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



Şekil A.10: Üçüncü klinik örneğe ait 125.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali

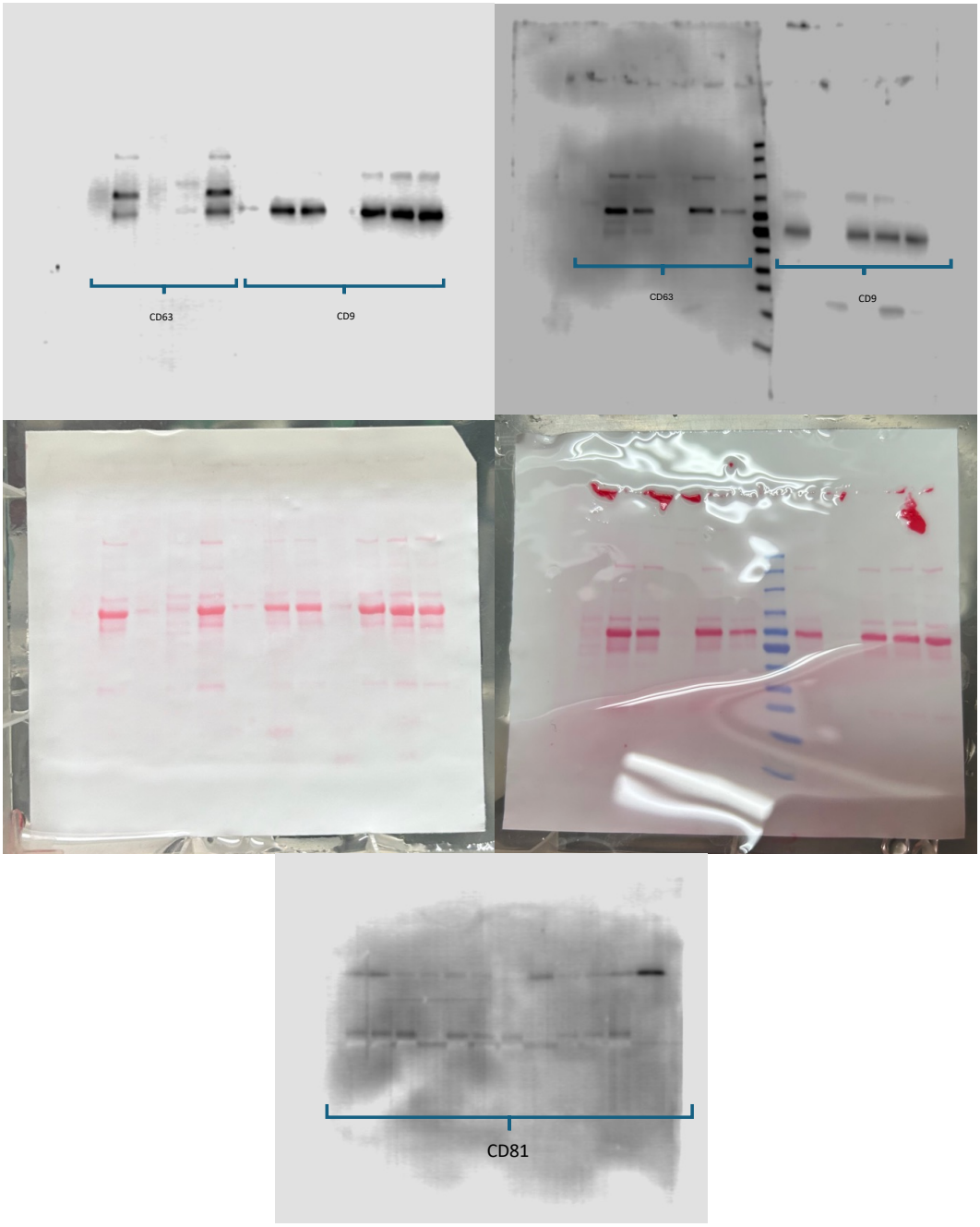


Şekil A.11: Üçüncü klinik örneğe ait 150.000xg ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali



Şekil A.12: Üçüncü klinik örneğe ait SEC ile izole edilmiş eksozomların tekrarlı NTA ölçümlerinde verdiği 5 grafiğin çakıştırılmış hali

Western Blot Membran Görüntüleri



Şekil A.13: Western blot deneyi membran ponceu boyama ve immünofloresan görüntüleme sonuçları

Kullanılan protein ladder 11-250 kDa aralığını göstermektedir. CD63 25-60 kDa, CD9 22, 24, 35 kDa ve CD81 22 kDa olan proteinlerdir.

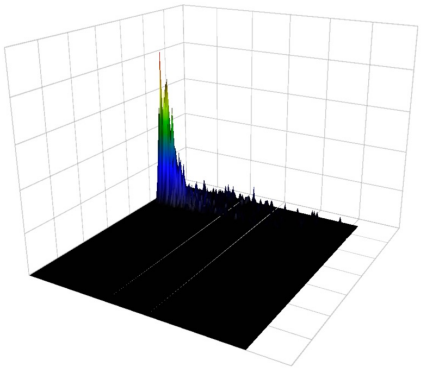
Tablo A.1: Tanımlayıcı istatistikler

Descriptives

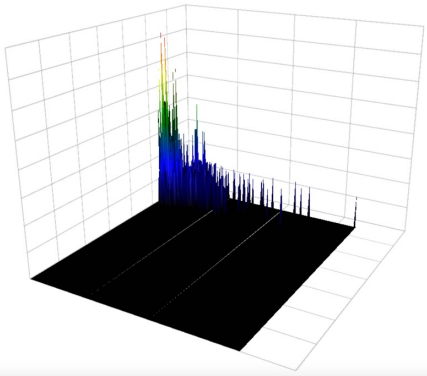
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Mode (nm)	1	3	104,1667	4,50925					
	2	3	114,1667	23,09401					
	3	3	122,1667	8,62168					
	4	3	108,5000	12,76715					
	p		0,4750						
Mean (nm)	1	3	189,67	39,954	23,068	90,42	288,92	145	222
	2	3	211,00	29,597	17,088	137,48	284,52	177	231
	3	3	186,67	10,066	5,812	161,66	211,67	176	196
	4	3	145,67	34,962	20,185	58,82	232,52	106	172
	Total	12	183,25	36,053	10,408	160,34	206,16	106	231
Std. Dev. (nm)	1	3	130,33	54,049	31,205	-3,93	264,60	75	183
	2	3	134,33	33,531	19,359	51,04	217,63	100	167
	3	3	108,00	6,245	3,606	92,49	123,51	103	115
	4	3	70,00	13,077	7,550	37,52	102,48	55	79
	Total	12	110,67	38,535	11,124	86,18	135,15	55	183
Concentration (particles/mL)	1	3	2,48E+10	1,544E+10	8,915E+09	-1,36E+10	######	1,E+10	4,E+10
	2	3	1,30E+10	6,373E+09	3,679E+09	-2,85E+09	######	7,E+09	2,E+10
	3	3	1,42E+10	1,710E+09	9,871E+08	9,99E+09	######	1,E+10	2,E+10
	4	3	4,29E+10	1,064E+10	6,140E+09	1,64E+10	######	3,E+10	5,E+10
	Total		0.021	1,510E+10	4,360E+09	1,41E+10	######	7,E+09	5,E+10
D10 (nm)	1	3	98,33	5,859	3,383	83,78	112,89	94	105
	2	3	102,33	11,015	6,360	74,97	129,70	91	113
	3	3	105,33	14,012	8,090	70,53	140,14	91	119
	4	3	94,67	20,793	12,005	43,01	146,32	71	110
	Total	12	100,17	12,662	3,655	92,12	108,21	71	119
D50 (nm)	1	3	150,00	35,029	20,224	62,98	237,02	119	188
	2	3	169,33	26,502	15,301	103,50	235,17	139	188
	3	3	147,67	6,028	3,480	132,69	162,64	142	154
	4	3	123,00	26,514	15,308	57,14	188,86	94	146
	Total	12	147,50	27,940	8,066	129,75	165,25	94	188
D90 (nm)	1	3	318,33	79,148	45,696	121,72	514,95	234	391
	2	3	370,33	69,601	40,184	197,43	543,23	303	442
	3	3	312,67	37,448	21,620	219,64	405,69	281	354
	4	3	217,67	64,237	37,087	58,09	377,24	144	262

Descriptives

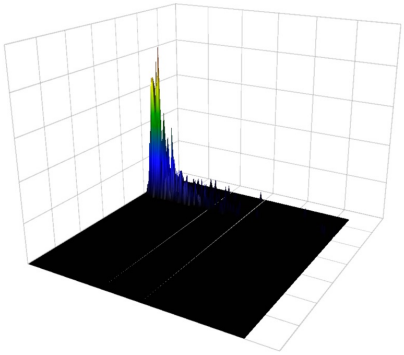
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
	Total	12	304,75	79,584	22,974	254,18	355,32	144	442
Size range 1 (0-100 nm aralığı) [particles/ml]	1	3	3,64E+09	3,793E+09	2,190E+09	-5,78E+09	######	7,E+08	8,E+09
	2	3	1,97E+09	1,623E+09	9,373E+08	-2,07E+09	######	6,E+08	4,E+09
	3	3	9,44E+08	9,639E+08	5,565E+08	-1,45E+09	######	7,E+07	2,E+09
	4	3	7,68E+09	1,002E+10	5,783E+09	-1,72E+10	######	1,E+09	2,E+10
	Total	12	3,56E+09	5,357E+09	1,547E+09	1,55E+08	######	7,E+07	2,E+10
Size range 1 (0-100 nm aralığı) [%]	1	3	1,22E+01	7,096E+00	4,097E+00	-5,38E+00	######	5,E+00	2,E+01
	2	3	7,12E+00	1,463E+00	8,446E-01	3,48E+00	######	6,E+00	8,E+00
	3	3	6,72E+00	7,318E+00	4,225E+00	-1,15E+01	######	6,E-01	1,E+01
	4	3	2,36E+01	3,411E+01	1,969E+01	-6,12E+01	######	2,E+00	6,E+01
	Total	12	1,24E+01	1,677E+01	4,841E+00	1,76E+00	######	6,E-01	6,E+01
Size range 2 (100-200 nm aralığı) [particles/ml]	1	3	15770000000,00	11656573252,890	6729925705,385	-13186533207,29	######	7,E+09	3,E+10
	2	3	17196666666,67	13774760735,974	7952861818,937	-17021735947,90	######	6,E+09	3,E+10
	3	3	9186666666,67	1176279445,257	679125254,361	6264626537,15	######	8,E+09	1,E+10
	4	3	27490000000,00	15186681665,196	8768034747,498	-10235808640,86	######	1,E+10	4,E+10
	Total	12	17410833333,33	12177369068,245	3515303654,786	9673702155,93	######	6,E+09	4,E+10
Size range 2 (100-200 nm aralığı)[%]	1	3	60,7667	10,22338	5,90247	35,3704	######	49,14	68,35
	2	3	62,9333	12,02894	6,94491	33,0518	######	49,41	72,44
	3	3	64,4633	2,85934	1,65084	57,3603	######	61,48	67,18
	4	3	60,2367	23,92365	13,81232	0,8070	######	32,62	74,62
	Total	12	62,1000	12,40985	3,58241	54,2152	######	32,62	74,62
Size range 3 (200-300 nm aralığı) [particles/ml]	1	3	2780000000,00	1369561973,771	790716974,229	-622180547,62	######	1,E+09	4,E+09
	2	3	4133333333,33	2041674149,646	1178761119,896	-938466416,91	######	3,E+09	6,E+09
	3	3	2613333333,33	661614187,675	381983129,354	969792579,10	######	2,E+09	3,E+09
	4	3	5824666666,67	4368915807,535	2522394717,547	-5028321850,29	######	9,E+08	9,E+09
	Total	12	3837833333,33	2542337858,720	733909723,551	2222508922,95	######	9,E+08	9,E+09
Size range 3 (200-300 nm aralığı) [%]	1	3	14,2567	12,06828	6,96762	-15,7226	######	7,09	28,19
	2	3	18,1167	5,77140	3,33212	3,7797	######	14,46	24,77
	3	3	18,2000	3,01443	1,74038	10,7117	######	14,76	20,38
	4	3	12,2567	8,35097	4,82143	-8,4883	######	2,86	18,83
	Total	12	15,7075	7,34627	2,12069	11,0399	######	2,86	28,19



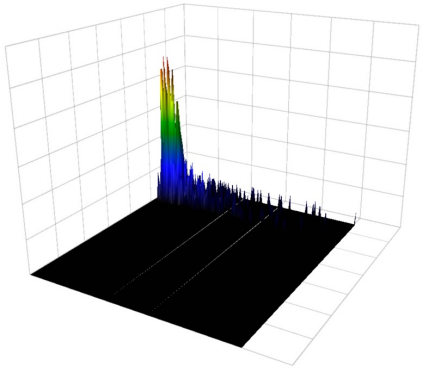
1. Klinik Örnek İçin 100.000xg 3B Eksozom Grafiği



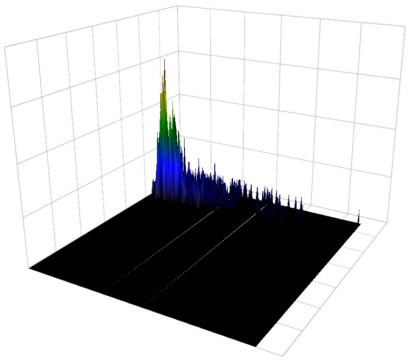
2. Klinik Örnek İçin 100.000xg 3B Eksozom Grafiği



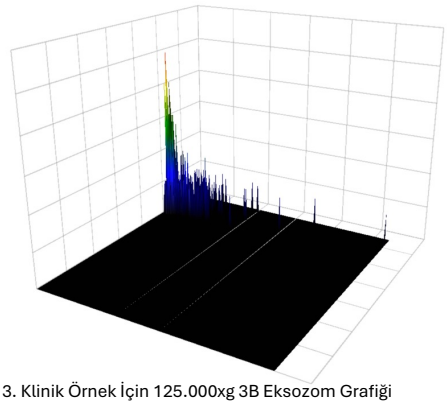
3. Klinik Örnek İçin 100.000xg 3B Eksozom Grafiği



1. Klinik Örnek İçin 125.000xg 3B Eksozom Grafiği

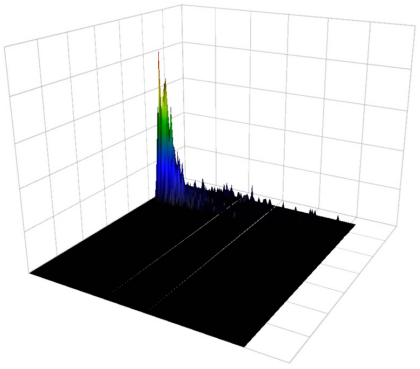


2. Klinik Örnek İçin 125.000xg 3B Eksozom Grafiği

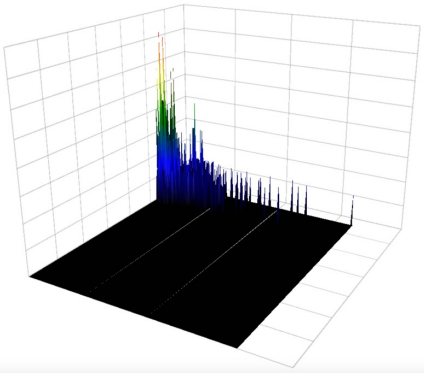


3. Klinik Örnek İçin 125.000xg 3B Eksozom Grafiği

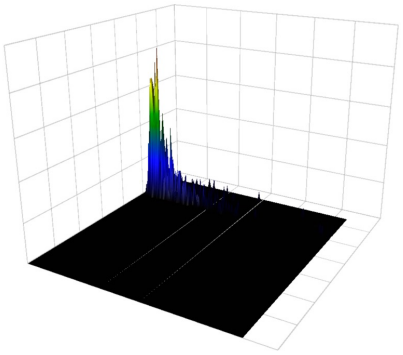
Şekil A.14: NTA sonuçlarının üç boyutlu grafikleri - 1



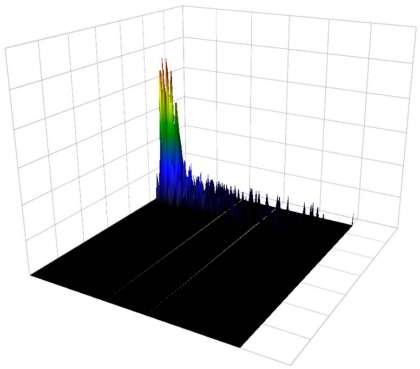
1. Klinik Örnek İçin 100.000xg 3B Eksozom Grafiği



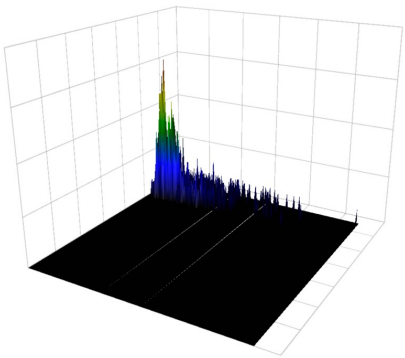
2. Klinik Örnek İçin 100.000xg 3B Eksozom Grafiği



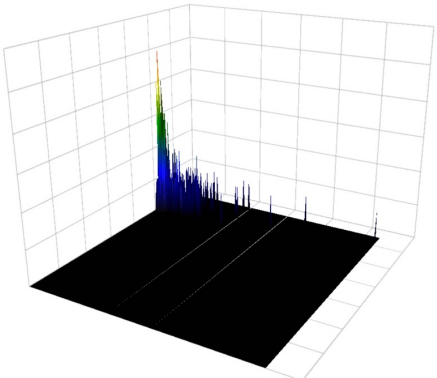
3. Klinik Örnek İçin 100.000xg 3B Eksozom Grafiği



1. Klinik Örnek İçin 125.000xg 3B Eksozom Grafiği

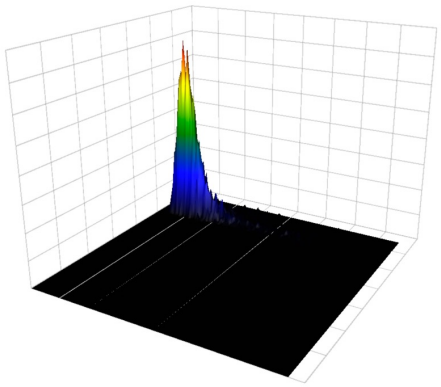


2. Klinik Örnek İçin 125.000xg 3B Eksozom Grafiği

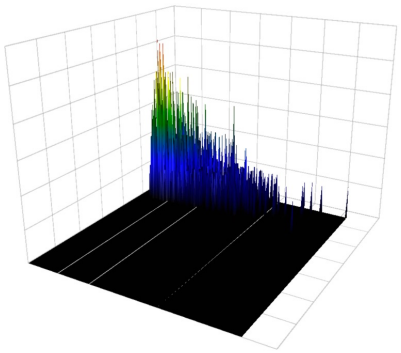


3. Klinik Örnek İçin 125.000xg 3B Eksozom Grafiği

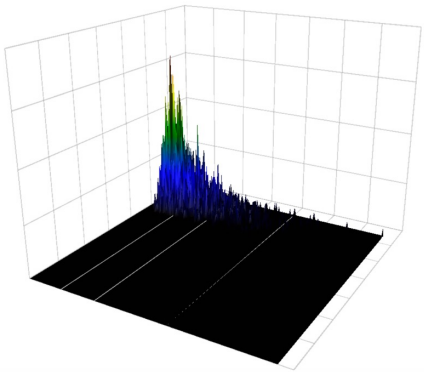
Şekil A.15: NTA sonuçlarının üç boyutlu grafikleri - 2



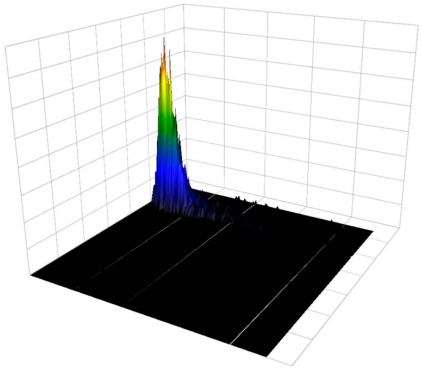
1. Klinik Örnek İçin 100.000xg 3B Mikrovezikül Grafiği



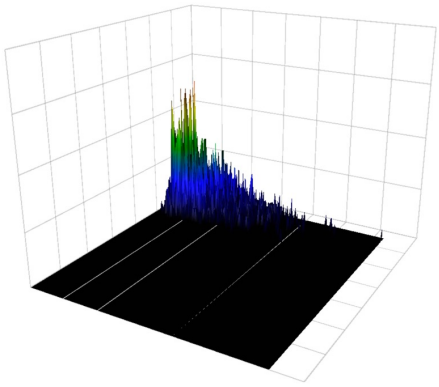
1. Klinik Örnek İçin 125.000xg 3B Mikrovezikül Grafiği



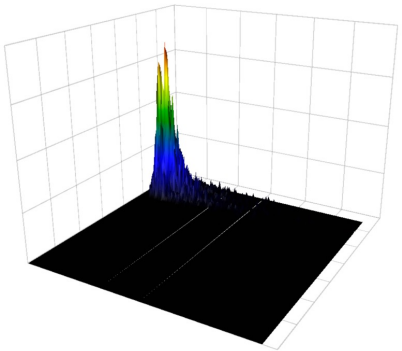
1. Klinik Örnek İçin 150.000xg 3B Mikrovezikül Grafiği



2. Klinik Örnek İçin 100.000xg 3B Mikrovezikül Grafiği



2. Klinik Örnek İçin 125.000xg 3B Mikrovezikül Grafiği



2. Klinik Örnek İçin 150.000xg 3B Mikrovezikül Grafiği

Şekil A.16: NTA sonuçlarının üç boyutlu grafikleri – 3

Tablo A.2: BCA standart dilüsyonların iki tekrarlı absorbans değerleri

Standart	0,559	0,405	0,217	0,146	0,152	0,103	0,093	0,092	0,091	0,089	0,084	0,09
Standart	0,511	0,323	0,215	0,151	0,12	0,103	0,096	0,095	0,092	0,091	0,091	0,092

Tablo A.3: BCA standart dilüsyonlarının absorbans değerlerinin ortalaması ve karşılık geldikleri konsantrasyon değerleri

ORT. OD	Kons. (ug/ml)
0,535	2000
0,364	1000
0,216	500
0,149	250
0,136	125
0,103	62,5
0,095	31,25
0,094	15,625
0,092	7,8125
0,090	3,90625
0,088	1,953125
0,091	BLANK

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Altınok, Y., Çeçener G., Korkut Ş.V. (2024, Kasım). Comparison of Three Exosome Isolation Techniques Based on Distinct Principles. European Biotechnology Congress, İstanbul, Turkey.